

Biotehnološka proizvodnja 2,3-butandiola s pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Rajković, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:240442>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Ana Rajković

1265/BPI

BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA
2,3-BUTANDIOLA S POMOĆU
BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa*
DSM 742

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

Diplomski rad je izrađen u okviru projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (šifra projekta: IP-2018-01-9717). Voditelj projekta je prof. dr. sc. Božidar Šantek, a projekt je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

Najljepše hvala mom mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na uloženom vremenu, iznimnom strpljenju i pruženoj pomoći tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Hvala i dr. sc. Blanki Ljubas za svu pruženu pomoć pri izradi eksperimentalnog rada, ljubaznosti i divnom druženju tijekom izrade ovog rada, a najiskrenije se zahvaljujem za sve Vaše privatno vrijeme koje ste bili spremni utrošiti na brojne dolaske u laboratorij u večernjim satima i vikendima. U situaciji koja se činila bezizlazna, pokazali ste iznimno razumijevanje i trud zbog kojeg ja danas mogu obraniti svoj diplomski rad. Još jednom veliko hvala mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku i dr. sc. Blanki Ljubas na svemu što su uradili za mene!

Također zahvaljujem doc. dr. sc. Antoniji Trontel, Marini Grubišić, mag. ing. i Nenadu Marđetku, mag. ing., kao i ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na susretljivosti, pruženoj pomoći i jako ugodnoj radnoj atmosferi.

Prilikom osvrta na cjelokupno iskustvo studiranja na diplomskom studiju, nemoguće je ne sjetiti se voditelja studija prof. dr. sc. Božidara Šanteka kojemu iskreno zahvaljujem za svo preneseno znanje, srdačnost, susretljivost i iznimno brižan odnos prema studentima.

Na kraju bih željela istaknuti cijelu skupinu voljenih osoba koje su bile uz mene i najzaslužnije su za ovaj uspjeh. To su moji roditelji puni razumijevanja, ljubavi, nesebičnosti, utjehe i podrške, moja sestra Marija koja danas postaje baccalaurea, Iva koja je odrasla u djevojku dok sam ja studirala, ali je i dalje malena, brižne bake i ponosni djedovi. Hvala vam što ste mi pružili priliku da studiram i omogućili bezbrižne studentske dane. Uz vas sam oduvijek imala sve što sam željela u životu. Hvala Oliveru koji je sa mnom dijelio sreću, ali i teška razdoblja, koji je sa mnom učio i, iako je diploma moja, njemu pripada barem jedan položen ispit.

Hvala mojim prijateljima koji su bili uvijek tu za mene, dijelili sa mnom dobro i loše, hvala mojim kolegicama za sve trenutke koje smo provele zajedno i ispijene kave. Hvala i Marini, koja zna što smo sve prošle zajedno, i Kristianu, koji zna da je beg široke ruke, za sve suze i smijeh.

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

BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA 2,3-BUTANDIOLA S POMOĆU BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Ana Rajković, 1265/BPI

Sažetak: Povećanje potražnje 2,3-butandiola potaknulo je istraživanja biotehnološke proizvodnje 2,3-butandiola sa ciljem zamjene dosadašnje kemijske proizvodnje. U ovom radu istraživana je proizvodnja 2,3-butandiola s bakterijom *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, tijekom kojeg se ispitivao rast pri različitom pH (3, 4, 5 i 6,5), utjecaj broja okretaja ($50, 150$ i 200 min^{-1}) i početnih koncentracija ($10, 20$ i 30 g L^{-1}) glukoze ili ksiloze u podlozi na prinos 2,3-butandiola te utjecaj acetata na proizvodnju 2,3-butandiola. Soj DSM 742 ne raste u rasponu pH vrijednosti od 3 do 5 jedinica. Najveći prinos 2,3-butandiola od $6,44 \text{ g L}^{-1}$ i produktivnost $0,215 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ postignuti su tijekom uzgoja provedenog pri 50 min^{-1} , početnoj koncentraciji glukoze od 20 g L^{-1} i pH vrijednosti od 6,5 jedinica. Uzgojem bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na 20 g L^{-1} pri 200 min^{-1} do ekspanzionalne faze te smanjenjem na 50 min^{-1} nakon dodatka 5 g L^{-1} acetata postignut je prinos 2,3-butandiola od $8,72 \text{ g L}^{-1}$ uz produktivnost $0,242 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Ključne riječi: 2,3-butandiol, *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, optimizacija procesa

Rad sadrži: 56 stranica, 12 slika, 10 tablica, 68 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: dr. sc. Blanka Ljubas

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Antonija Trontel

2. doc. dr. sc. Mario Novak

3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Datum obrane: 28. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Biotechnological production of 2,3-butanediol by bacterium *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Ana Rajković, 1265/BPI

Abstract: The increase in demand for 2,3-butanediol has prompted research of biotechnological production of 2,3-butanediol with the aim of replacing existing chemical production. In this work, the production of 2,3-butanediol with the bacterium *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 was investigated, observing growth at different pH values (3, 4, 5 and 6,5), the influence of mixing (50, 150, 200 min⁻¹), initial concentrations (10, 20, 30 g L⁻¹) of glucose or xylose in the broth and effect of acetate on the yield of 2,3-butanediol. It was observed that strain DSM 742 does not grow between 3 and 5 pH units. Highest yield of 2,3-butanediol (6,44 g L⁻¹) and productivity (0,215 g L⁻¹ h⁻¹) were achieved at 50 min⁻¹, initial concentration of glucose 20 g L⁻¹ and 6,5 pH units. By culturing *P. polymyxa* DSM 742 at 20 g L⁻¹ and 200 min⁻¹ until the exponential phase and reducing to 50 min⁻¹ after the addition of 5 g L⁻¹ acetate, a yield of 8,72 g L⁻¹ was achieved with productivity 0,242 g L⁻¹ h⁻¹.

Keywords: 2,3-butanediol, *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, process optimization

Thesis contains: 56 pages, 12 figures, 10 tables, 68 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Mario Novak, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Blanka Ljubas*

Reviewers:

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

Thesis defended: 28th September 2021.

TABLICA SADRŽAJA

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. 2,3-BUTANDIOL.....	3
2.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva 2,3-butandiola.....	3
2.1.2. Primjena 2,3-butandiola.....	4
2.1.3. Proizvodnja 2,3-butandiola.....	5
2.2. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA 2,3-BUTANDIOLA.....	7
2.2.1. Biotehnološka proizvodnja 2,3-butandiola s bakterijom <i>Paenibacillus polymyxa</i>	11
2.2.1.1. Karakteristike bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i>	11
2.2.1.2. Metabolitički put sinteze 2,3-butandiola.....	13
2.2.1.3. Utjecaj procesnih parametara na biotehnološku proizvodnju 2,3-butandiola.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Hranjive podloge.....	19
3.1.4. Aparatura i pribor.....	22
3.2. METODE RADA.....	24
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....	24
3.2.2. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742.....	25
3.3. ANALITIČKE METODE.....	27
3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka	27
3.3.2. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti	27
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI PROCESA	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. REZULTATI UZGOJA BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 PRI RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA.....	31

4.2. UZGOJ BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 NA PODLOGAMA SA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE I KSILOZE KAO IZVORA UGLJIKA PRI RAZLIČITIM UVJETIMA MIJEŠANJA.....	33
4.3. UTJECAJ ACETATA NA RAST I KINETIKU SINTEZE PRODUKTA TIJEKOM UZGOJA BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742.....	45
5. ZAKLJUČAK	51
6. POPIS LITERATURE	52
7. PRILOZI.....

1.UVOD

Znanstvenim istraživanjima je procijenjeno da će se u prvoj četvrtini 21. stoljeća dostići maksimum potrošnje fosilnih goriva, nakon čega će uslijediti nestašica fosilnih goriva u svijetu što će uzrokovati velike ekonomske, političke i socijalne probleme (Zittel i Schindler, 2009). Stoga se posljednjih godina nastoji smanjiti negativni učinak na okoliš i ulažu se znatni naponi u pronalazak novih postupaka i metoda koji bi omogućili pronalazak novih ekoloških proizvoda, kao i alternativnih izvora energije koji bi smanjili emisiju ugljikovog dioksida u atmosferu (Gwehenberger i Narodslawsky, 2007).

Sukladno tome, brojne grane znanosti su usmjerene na istraživanja koja bi omogućila pronalazak alternative fosilnim sirovinama i njihovim proizvodima, a za sada se smatra da najveći potencijal ima biomasa, tj. obnovljiva sirovina. Osim toga, brojna istraživanja su usmjerena na osmišljavanje i optimiranje biotehnoloških procesa, koji bi zamijenili kemijske procese u biotehnologiji (Celińska i Grajek, 2009). Jedan od takvih primjera jest i zamjena postojeće kemijske proizvodnje 2,3-butandiola biotehnološkom proizvodnjom pomoću različitih mikroorganizama, koja je trenutno u fazi intenzivnog istraživanja. Jedan od takvih primjera je i ovaj diplomski rad, čiji je cilj određivanje uvjeta uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri kojima se postiže maksimalni mogući prinos 2,3-butandiola i procjena potencijalne primjene navedenog soja u industrijskoj proizvodnji 2,3-butandiola.

Tijekom izrade ovog rada, proveden je niz eksperimenata kojima su se promjenom procesnih parametara, načina vođenja procesa, sastava izvora ugljika u podlozi i dodatkom acetata kao potencijalnog induktora proizvodnje 2,3-butandiola istraživali optimalni uvjeti za rast i aktivnost soja *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Ispitivan je rast pri različitim pH vrijednostima, zbog potencijalne primjene ovog soja za uzgoje na hidrolizatima lignocelulozne biomase dobivene kiselinskom hidrolizom. S istim ciljem zbog specifičnog sastava hidrolizata lignocelulozne sirovine ispitivan je uzgoj i aktivnost *P. polymyxa* DSM 742 na hranjivim podlogama koje sadrže glukozu ili ksilozu. Uzgojima pri različitim brojevima okretaja na tresilici i njihovom promjenom tijekom faza uzgoja istraživao se utjecaj stupnja aeracije na prinos 2,3-butandiola i način aeracije koji predstavlja najbolji omjer između rasta biomase i fermentativnog metabolizma.

Dostupan je značajan broj istraživanja s različitim sojevima *Paenibacillus polymyxa*, osobito sa sojem DSM 365, ali je soj DSM 742 vrlo slabo istražen i nisu pronađena istraživanja proizvodnje 2,3-butandiola sa sojem koji je korišten u ovom radu.

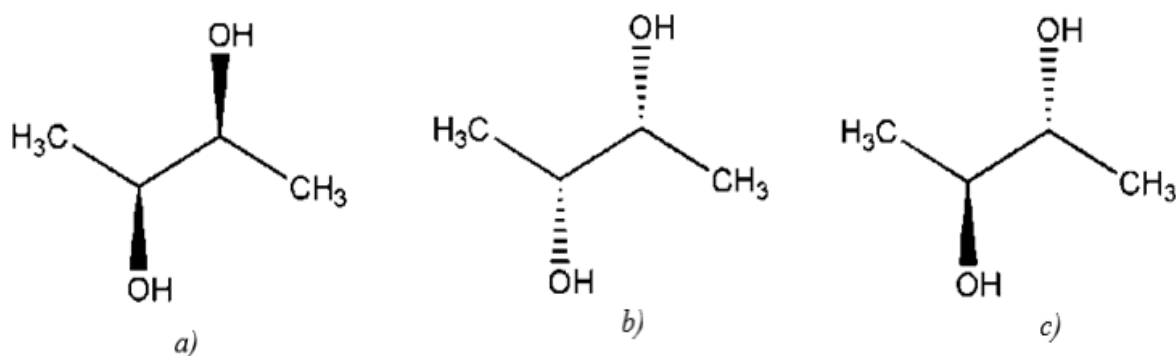
2. TEORIJSKI DIO

2.1. 2,3-BUTANDIOL

2.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva 2,3-butandiola

Kemijski spoj 2,3-butandiol (2,3-BDL) je organska molekula, koja s dvije vezane hidroksilne (-OH) skupine na ugljikovim atomima po svojoj strukturi spada u skupinu alkohola, točnije diola ili glikola. To je alifatski ugljikovodik s četiri ugljikova atoma pri čemu su hidroksilne skupine vezane na 2. i 3. ugljikov atom, što ga čini i sekundarnim alkoholom. Osim 2,3-butandiol, koriste se i sinonimi: 2,3-butilen glikol, butan-2,3-diol, 2,3-hidroksibutan, dimetilen glikol ili dimetiletilen glikol (NCBI, 2021).

Ugljikovi atomi na koje su vezane hidroksilne skupine čine dva kiralna centra te su prisutna tri stereoizomera 2,3-butandiola (Javidnia i sur., 2016), prikazana na slici 1: optički aktivni enantiomeri *R,R*-2,3-butandiol (*levo*-2,3-butandiol) i *S,S*-2,3-butandiol (*dextro*-2,3-butandiol) te optički neaktivan *meso*-*R,S*-izomer (*2R,3S*-butandiol ili *2S,3R*-butandiol).



Slika 1. Strukturni prikaz izomera 2,3-butandiola: a) *S,S*-2,3-BDL, *dextro*-izomer; b) *R,R*-2,3-BDL, *levo*-izomer; c) *R,S*-2,3-BDL, *meso*-izomer (Javidnia i sur., 2016)

Prisutnost i udio pojedinog stereoizomera 2,3-butandiola utječe na njegove fizikalne karakteristike, osobito na temperature tališta i vrelišta što je vidljivo iz tablice 1. Temperatura vrenja je relativno visoka, kreće se od 177 do 182 °C, ovisno o kojem se stereoizomeru radi i

udjelu pojedinog izomera u sastavu smjese. Bitno je naglasiti da su temperature tališta optički aktivnih *R,R*- i *S,S*- izomera iznimno niske i iznose -60 °C (Tinôco i sur., 2021).

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva 2,3-butandiola (Tinôco i sur., 2021)

SVOJSTVO	OPIS
Molekulska formula	C ₄ H ₁₀ O ₂
Molarna masa [g mol ⁻¹]	90,121
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 ⁻¹]	27,2
Oktanski broj	Visok
Biorazgradivost	Da

Na sobnoj temperaturi 2,3-butandiol je prozirna uljasta tekućina bez boje i mirisa, slatkastog okusa. Iznimno je higroskopan, topljiv je u vodi, alkoholima i ketonima male molekulske mase i eterima (NCBI, 2021).

2.1.2. Primjena 2,3-butandiola

Zbog svoje strukture i specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava prikazanih u tablici 1, 2,3-butandiol ima širok spektar primjene u različitim granama industrije, gdje se koristi kao sirovina i prekursor za sintezu. Reakcijama dehidratacije, dehidrogenacije, ketalizacije i esterifikacije se dobivaju derivati 2,3-butandiola koji imaju širok spektar primjene. Dehidratacijom 2,3-butandiola nastaje važno industrijsko otapalo metil-etil keton (MEK) koji se koristi u industriji smola i lakova, a upotrebljava se i kao oktanski pojačivač i aditiv za goriva zbog visoke topline izgaranja. Pirolizom 2,3-butandiol diacetata ili dibromida može se dobiti 1,3-butadien, važna organska kemikalija koja služi kao prekursor za proizvodnju polimera sintetičke gume (van

Haveren i sur., 2008). Procesom dehidrogenacije iz 2,3-butandiola nastaju acetoin, korišten kao prehrambeni aditiv i pojačivač okusa te diacetil, karakteristične arome po maslacu, izrazito važan za organoleptičku kvalitetu mliječnih proizvoda poput sira, putera i vrhnja (Faveri i sur., 2003). Ketalizacijom nastaju tetrametilne komponente, koje mogu služiti kao zamjena za metil *tert* butil eter u benzinskim gorivima, a esteri 2,3-butandiola služe kao plastifikatori kod sinteze termoplastičnih polimera i prekursori za lijekove i kozmetičke preparate (Ji i sur., 2011). Zbog svojih optičkih svojstava, stereoizomeri *R*- i *S*- konfiguracije 2,3-butandiola služe za sintezu specifičnih kiralnih molekula u brojnim granama industrije (Schilling i sur., 2020).

Potencijalno je vrijedan aditiv za goriva zbog visoke topline izgaranja ($27,2 \text{ kJ g}^{-1}$) koja je vrlo dobra u usporedbi sa drugim tekućim gorivima, poput etanola, čija vrijednost topline izgaranja iznosi $29,055 \text{ kJ g}^{-1}$ i tek je nešto viša od topline izgaranja 2,3-butandiola. 2,3-butandiol ima visok oktanski broj i može se koristiti i kao oktanski pojačivač za benzinsko ili avionsko gorivo. Butan-2,3-diol nalazi primjenu i u proizvodnji tinte, parfema i rastezljivih elastičnih tkanina (Garg i Jain, 1995). Zbog niske temperature smrzavanja *R*-enantiomera, 2,3-butandiol se primjenjuje kao sredstvo protiv smrzavanja (antifreeze agent; Flickinger, 1980.).

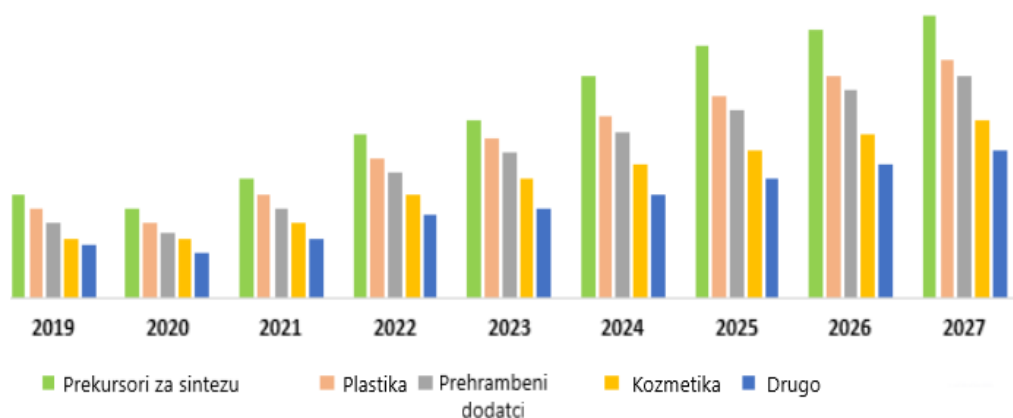
Bitno je istaknuti i moguću primjenu 2,3-butandiola kao biorazgradivog promotora biljnog rasta i pesticida obzirom da je nizom istraživanja dokazan njegov utjecaj na rast biljnih vrsta i njihove otpornosti na različite biljne patogene i insekte. Istraživanje (Han i sur., 2006) je pokazalo da optički aktivni *R,R*-2,3-BDL inhibira rast bakterijskog patogena *Erwinia carotovora* na biljci duhana, pozitivno utječe na rast i otpornost biljne vrste *Arabidopsis thaliana* (Cho i sur., 2008) u sušnim uvjetima, djeluje kao insekticid protiv kukca *Spodoptera littoralis* na usjevima kukuruza (D'Alessandro i sur., 2014), a istraživanje Kong i sur. (2018) upućuje i na utjecaj *R,R*- i *meso*-izomera 2,3-butandiola na otpornost biljaka protiv biljnih virusa, osobito virusa mozaika duhana i krastavca.

2.1.3. Proizvodnja 2,3-butandiola

Počeci znanstvenih istraživanja biotehnoške proizvodnje 2,3-butandiola datiraju još iz 1906. godine (Harden i Walpole, 1906) pri čemu se istražuje proizvodnja pomoću bakterije *Aerobacter aerogenes*, a 1930-ih godina započinje i proizvodnja u industrijskim mjerilima fermentacijom sa bakterijom *Klebsiella pneumoniae* (Fulmer i sur., 1933). Povećana industrijska proizvodnja 2,3-butandiola uzrokovana je nestašicom 1,3-butandiena tijekom Drugog svjetskog rata, kemikalije

koja je organski prekursor za proizvodnju sintetičke gume. Razvijaju se pilot postrojenja za proizvodnju 2,3-butandiola bakterijskom konverzijom iz pentoza i heksoza pomoću bakterijskih sojeva *Klebsiella* sp. i *B. polymyxa*, kao i njegove konverzije u 1,3-butandien. Međutim, daljnji razvoj biotehnoške proizvodnje 2,3-butandiola je prekinut zbog dostupnosti jeftinijih procesa proizvodnje iz fosilnih sirovina, odnosno nafte i petrokemikalija nastalih njenom rafinacijom (Ji i sur., 2011).

Industrijski se 2,3-butandiol proizvodi iz butena dobivenih pirolizom diacetata ili, većinom, iz plinova porijeklom iz procesa naftne rafinacije. Izdvajanjem butadiena i izobutena dobije se rafinat sa otprilike 77 % butena i 23 % smjese butana i izobutana. Tretiranjem frakcije s vodenom otopinom klora i natrijevim dioksidom u dva uzastopna procesa dobije se smjesa butenskih oksida: 55 % *trans*-izomera 2,3-epoksibutana, 30 % *cis*-izomera 2,3-epoksibutana i 15 % 1,2-epoksibutana. Hidrolizom navedene smjese, pri tlaku od 50 bara i temperaturi od 160 do 220 °C i frakcijskim razdvajanjem dobije se racemična smjesa *R,R*-, *S,S*- i *meso*-izomera 2,3-butandiola. Hidrolizom *cis*-izomera 2,3-epoksibutana nastaju *R,R*- i *S,S*- izomeri, a hidrolizom *trans*-izomera 2,3-epoksibutana nastaje *meso*-2,3-butandiol (Gräfje i sur., 2000).



Slika 2. Prikaz procjene rasta ukupne vrijednosti tržišta 2,3-butandiola do 2027. godine i raspodjela industrijske primjene 2,3-butandiola (Maximize Market Research, 2020)

Vrijednost svjetskog tržišta 2,3-butandiola u 2019. godini iznosila je 175 milijuna američkih dolara, s procjenom godišnje stope rasta tržišta od 3,19 % do 2027. godine, kada se procjenjuje rast na ukupnu vrijednost tržišta od 225 milijuna američkih dolara. Smatra se da će povećana potražnja za derivatima 2,3-butandiola potaknuti rast njegove godišnje proizvodnje i vrijednost

ukupnog tržišta. Najveći udio u ukupnoj godišnjoj potrošnji 2,3-butandiola jest utrošak 2,3-butandiola za sintezu kemijskih prekursora (slika 2), što je i najbrže rastući segment primjene 2,3-butandiola, a slijedi ga proizvodnja plastike, prehrambenih dodataka, kozmetičkih preparata i druge primjene (Maximize Market Research, 2020).

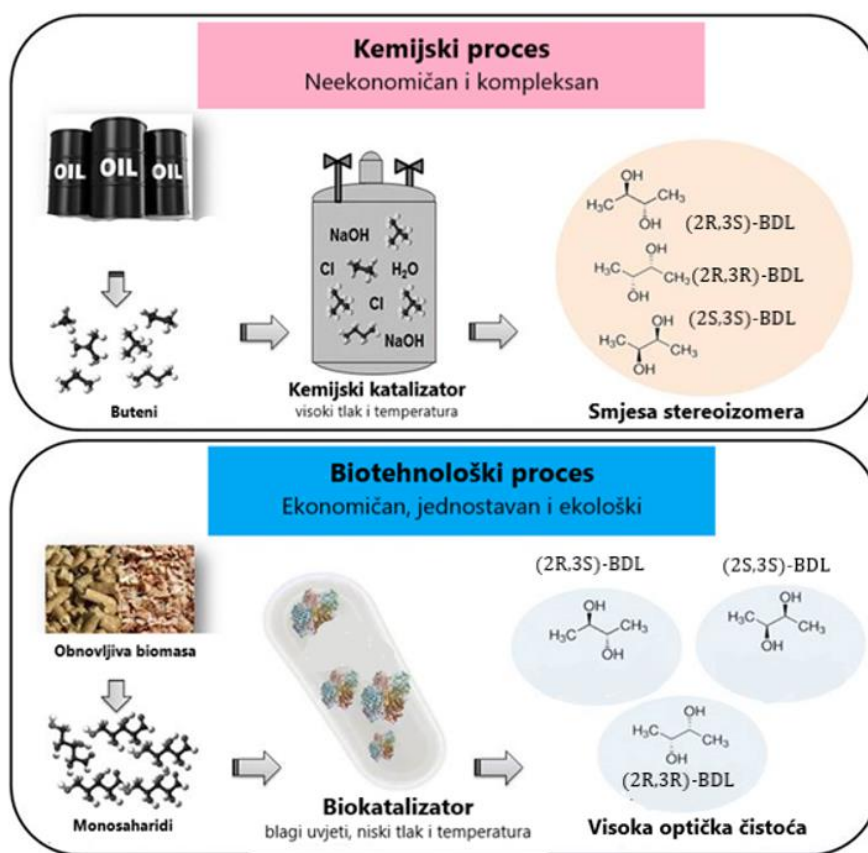
Analiza tržišta 2,3-butandiola iz 2020. godine predviđa godišnju stopu rasta tržišta od 3,5 % tijekom sljedećeg desetljeća, a najveći utjecaj na rast tržišta predstavlja cijena dosadašnjih kemijskih postupaka proizvodnje zbog utroška velike količine energije obzirom da se odvija u uvjetima visokih temperatura i tlaka, rast cijene nafte i nepovoljan ekološki utjecaj iskorištavanja fosilnih goriva (Transparency Market Research, 2020). Zbog toga se industrija 2,3-butandiola počela okretati istraživanju alternativnih postupaka, odnosno povratku biotehnološkoj proizvodnji.

2.2. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA 2,3-BUTANDIOLA

Iako je 2,3-butandiol prepoznat kao važna industrijska kemikalija i mogućnost njegove proizvodnje pomoću mikroorganizama je odavno poznata, kako je prethodno spomenuto, vrlo mali udio ukupno proizvedenog komercijalnog 2,3-butandiola je porijeklom iz biotehnološke proizvodnje. Razlog jeste veliki trošak proizvodnje biotehnološkim putem i ekonomska neisplativost obzirom da je produktivnost procesa nedovoljna da bi mogla zamijeniti dobro uhodane i jeftinije opcije proizvodnje iz petrokemikalija (Wu i sur., 2008). Međutim, zbog rastuće zabrinutosti negativnog utjecaja iskorištavanja fosilnih goriva na ekološki sustav, kao i njihove nestašice, sve je intenzivniji razvoj biotehnoloških procesa koji koriste obnovljive izvore energije i obnovljive sirovine za proizvodnju različitih kemikalija. Takav trend odražava se i na proizvodnju 2,3-butandiola (Hazeena i sur., 2020).

Biotehnološka proizvodnja 2,3-butandiola ima nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalnu kemijsku sintezu iako je trenutno neisplativa. Osim ekološkog utjecaja, kemijskom sintezom iz butena postupkom opisanim u prethodnom poglavlju dobije se racemična smjesa stereoisomera (slika 3), a sam proces se vodi u uvjetima visoke temperature i tlaka uz upotrebu agresivnih kemikalija. Dodatni trošak predstavljaju relativno skupi postupci pročišćavanja smjese stereoisomera 2,3-butandiola. Nasuprot tome, biotehnološki proces se odvija u blagim uvjetima temperature i tlaka, a rezultat je 2,3-butandiol visoke optičke čistoće obzirom da se

metaboličkim reakcijama mikroorganizama proizvode kiralno specifični izomeri (Song i sur., 2019).



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

Najznačajniji rodovi mikroorganizama koji fermentiraju šećere do 2,3-butandiola su bakterijske vrste iz rodova: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* i *Serratia* (López-Contreras i sur., 2010). Osim navedenih rodova, kod velikog broja mikroorganizama iz rodova *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus* uočena je prisutnost enzima metaboličkog puta proizvodnje 2,3-butandiola. Međutim, iako posjeduju metabolički put, navedeni mikroorganizmi ili ne proizvode 2,3-butandiol u dovoljnim količinama da bi se mogli upotrijebiti za industrijsku proizvodnju ili nakupljaju međuprodukte metaboličkog puta, ali ne proizvode konačni produkt, odnosno 2,3-butandiol (Celińska i Grajek, 2009). Od navedenih pet najznačajnijih rodova, najefikasniji proizvođači 2,3-butandiola su bakterije: *Klebsiella*

pneumoniae, *Klebsiella oxytoca* i *Paenibacillus polymyxa* (Song i sur., 2019). Primjer nekih istraživanja i postignutih rezultata s različitim bakterijama naveden je u tablici 2.

Način vođenja procesa je uglavnom šaržni ili šaržni s pritokom supstrata, u tikvicama ili laboratorijskim bioreaktorima volumena do 5 L. Najveća koncentracija 2,3-butandiola u dosadašnjim istraživanjima postignuta je konverzijom s bakterijskom vrstom *Klebsiella pneumoniae*, gdje su Ma i sur. (2009) izvijestili o postignutoj koncentraciji 2,3-butandiola od 150 g L⁻¹, a nešto niža koncentracija od 139 g L⁻¹ postignuta je konverzijom s bakterijom *Serratia marcescens* (Zhang i sur., 2010) i *Klebsiella oxytoca*, gdje je iznosila 130 g L⁻¹ (Ji i sur., 2010). Međutim, navedeni mikroorganizmi su patogene bakterije koje spadaju u skupinu 2 rizičnih organizama, zbog čega su nepovoljne za industrijsku proizvodnju u velikom mjerilu obzirom da moraju biti zadovoljeni i svi sigurnosni standardi. Kao rješenje se izdvaja upotreba mikroorganizama koji se smatraju bezopasnim, odnosno posjeduju GRAS (Generally Regarded As Safe) status. Takve su primjerice bakterijske vrste iz roda *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis* i *B. amyloliquefaciens*, ali produktivnost biotehnološkog procesa s tim bakterijskim sojevima je vrlo mala. Značajno povećanje produktivnosti moglo bi se postići genetičkim inženjerstvom navedenih sojeva ili drugih dobro poznatih industrijskih mikroorganizama koji prirodno ne proizvode 2,3-butandiol, poput kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i bakterije *Escherichia coli* (Yang i Zhang, 2019). Kao jedno od rješenja su i sojevi bakterije *Paenibacillus polymyxa*, koja je nepatogena i također posjeduje GRAS status (Häßler i sur, 2012).

Tablica 2. Sažeti prikaz postignute koncentracije, prinosa i produktivnosti procesa proizvodnje 2,3-butandiola (2,3-BDL) tijekom istraživanja različitih bakterijskih vrsta (Ji i sur., 2011)

Mikroorganizam	Izomer 2,3-BDL	Supstrat	Tip procesa	2,3-BDL [g L ⁻¹]	Acetoin [g L ⁻¹]	Produktivnost [g L ⁻¹ h ⁻¹]	Prinos [g g ⁻¹]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S-, meso-	Glukoza	Šaržni s pritokom	150,0	10,0	4,21	0,43
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S-, meso-	Glicerol	Šaržni s pritokom	49,2	-	0,18	0,36
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S-, meso-	Glicerol	Šaržni s pritokom	70,0	-	0,47	0,39
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S-, meso-	Stabljika i gomolj jeruzalemske artičoke	Šaržni s pritokom, SSF	67,4	13,1	1,18	1,18
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S-, meso-	Melasa	Recirkulacija biomase	118,0	2,3	2,40	0,42
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S-, meso-	Glukoza	Šaržni s pritokom	130,0	1,4	1,64	0,48
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S-, meso-	Glukoza	Šaržni s pritokom	110,0		5,40	0,49
<i>Serratia marcescens</i>	meso-	Sukroza	Šaržni s pritokom	139,9	6,7	3,49	0,47
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	R-	Stabljika jeruzalemske artičoke	Šaržni	36,9	-	0,88	0,50
<i>Bacillus subtilis</i>	S-, meso-	Glukoza	Šaržni	2,5	0,6	0,33	0,38

2.2.1. Biotehnoška proizvodnja 2,3-butandiola s bakterijom *Paenibacillus polymyxa*

2.2.1.1. Karakteristike bakterije *Paenibacillus polymyxa*

Paenibacillus polymyxa, prijašnjeg naziva *Bacillus polymyxa*, jedna je od najstarijih bakterija koja se taksonomski svrstava u bakterijski rod *Paenibacillus*. Rod *Paenibacillus* broji preko 150 različitih vrsta i složenica je latinske riječi *paene* što znači *gotovo (skoro pa)* i naziva bakterijskog roda *Bacillus sp.*, što u doslovnom prijevodu znači da su bakterije iz roda *Paenibacillus* skoro *Bacillusi*, unutar kojih se svrstavala i *P. polymyxa* do 1993. godine.

To je Gram pozitivna, štapičasta bakterija s flagelama raspoređenim duž čitavog volumena stanice. Sposobna je stvarati endospore, podnosi kisik, ali raste i u anaerobnim uvjetima prema čemu spada u skupinu fakultativnih anaeroba. Neutrofilna je bakterija, što znači da je područje pH između 6 i 8 optimalno za rast i aktivnost (Daud i sur., 2019). Istraživanja su pokazala da je *P. polymyxa* bakterija koja se iznimno brzo prilagođava na uvjete u okolišu, sa značajnim spektrom sekundarnih metabolita poput fitohormona, polisaharida i antimikrobnih tvari koji na različite načine utječu na prilagodbu i preživljavanje bakterije u nepovoljnim uvjetima rasta (Grady i sur., 2016).

Određeni sojevi *P. polymyxa* sintetiziraju polymyxin E1, sekundarni metabolit sa antibiotskim djelovanjem, vrlo efikasan protiv patogenih Gram negativnih bakterija te lantibiotik i paenibacilin, koji su pokazali antimikrobno djelovanje protiv Gram pozitivnih bakterija (Lal i Tabacchioni, 2009; He i sur., 2007). Osim navedenih antibiotika, veliki broj peptida sa antimikrobnim djelovanjem zajedničkog naziva fusaricidini su izolirani i okarakterizirani kao metaboliti bakterije *P. polymyxa*, a pokazuju iznimno jako antifungalno djelovanje protiv plijesni *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum* i kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans* (Kajimura i Kaneda, 1997).

Uočeno je da tijekom rasta bakterijski sojevi *P. polymyxa* sintetiziraju i izlučuju egzopolisaharide, molekule velike molarne mase koje su po svom sastavu polisaharidi, ali sadrže i peptide i glikoproteine. Bakterijski soj *P. polymyxa* SQR-21 sintetizira i izlučuje egzopolisaharid koji u svom sastavu ima manozu, glukozu, fruktoru i glukuronsku kiselinu, a pokazuje dobru sposobnost uklanjanja superoksidnih radikala, flokulacijsku i metal kelatnu aktivnost zbog čega ima veliki potencijal primjene u industriji umjesto sintetičkih komponenata

(Raza i sur., 2011). Soj EJS-3 sintetizira polisaharid levan, koji pokazuje vrlo dobru antioksidacijsku aktivnost protiv hidroksilnih i superoksidnih radikala (Donot i sur., 2012). Bitno je istaknuti i soj TKU023 koji sintetizira i izlučuje egzopolisaharid koji pokazuje antioksidacijsko i antitumorsko djelovanje (Wang i sur., 2011), kao i soj JB115 koji sintetizira β -1,3/1,6-glukane sa jakim antitumorskim djelovanjem (Chang i sur., 2010). Osim egzopolisaharida, sojevi *P. polymyxa* proizvode veliki broj ekstracelularnih enzima, poput egzocelulaza, endocelulaza, β -glukozidaza, oksidaza, peroksidaza, ksilanaza, ksilozidaza, galaktozidaza, arabinofuranozidaza, itd., odnosno enzima koji sudjeluju u razgradnji celuloze, hemiceluloze i lignina (Grady i sur. 2016; Howard i sur., 2003). Navedeni enzimi su vrlo važni u poljoprivrednoj, prehrambenoj i biotehnološkoj industriji, osobito u posljednje vrijeme kada se sve više razvijaju biotehnološki procesi fermentacije obnovljive lignocelulozne sirovine. Značajni su i fibrinolitički enzimi, čija se primjena kao terapija za liječenje tromboze istražuje (Daud i sur., 2019).

P. polymyxa dobro je poznata rizobakterija koja se prirodno nalazi u više ekoloških sustava i pronađena je u obradivom tlu, morskom sedimentu, šumskim predjelima, ličinkama insekata kao i u nekim sortama vina. Njena prisutnost je dokazana na korijenu kukuruza, pšenice, ječma i šećerne trske (Guemori-Athmani i sur., 2000; von der Weid i sur., 2000), gdje stvara biofilm (Timmusk i sur., 2005). Svojom metabolitičkom aktivnošću na rizodermi korijena sudjeluje u procesu fiksacije dušika u tlu, povećava dostupnost fosfata (Singh i Singh, 1993) i povećava poroznost tla (Gouzou i sur., 1993) zbog čega ima veliki značaj u agrikulturi.

Za potrebe ovog rada, vrlo značajna karakteristika bakterije *Paenibacillus polymyxa* jest proizvodnja 2,3-butandiola. Iako tek jedna od mnogih bakterija koje posjeduju sposobnost fermentacije monosaharida do 2,3-butandiola i u usporedbi sa drugim bakterijama, osobito iz roda *Klebsiella*, daje značajno manje prinose, njena važnost se ogledava u proizvodnji optički gotovo čistog (98 %) *R,R*-2,3-butandiola (Syu, 2001). Ostale prethodno spomenute bakterije proizvođači 2,3-butandiola proizvode *S,S*-izomer ili *meso*-izomer u određenim omjerima (tablica 2). Dosad najveća postignuta koncentracija 2,3-butandiola sa *P. polymyxa* sojevima je 111 g L^{-1} (Häßler i sur., 2012), ali je primijećeno da pri koncentracijama 2,3-butandiola iznad 60 g L^{-1} dolazi do značajnog povećanja povratne reakcije oksidacije 2,3-butandiola u acetoin (Okonkwo i sur., 2017).

2.2.1.2. Metabolitički put sinteze 2,3-butandiola

Bakterija *P. polymyxa* je sposobna metabolizirati glukozu, manozu, ksilozu, arabinozu, manitol, celobiozu, trehalozu, laktozu, maltozu, sukrozu i glicerol, a kao produkti fermentacije nastaju etanol, acetoin, organske kiseline i 2,3-butandiol (De Mas i sur., 1988). Glukoza se nizom reakcija razgrađuje do piruvata u procesu glikolize u koji se uključuju i ostali monosaharidi i disaharidi, ovisno o kojem je soju riječ. Heksoze se vrlo lako uključuju u glikolitičke reakcije, ali pentoze se do piruvata metaboliziraju kombinacijom pentoza fosfatnog puta i glikolize (Stryer, 1991; Jansen i Tsao, 1983).

Glikolizom iz jednog mola glukoze nastanu 2 mola ATP-a, 2 mola reduciranog koenzima NADH i 2 mola piruvata. U uvjetima limitacije kisikom, odnosno anaerobnim i mikroaerofilnim uvjetima, reducirani koenzimi NADH nastali glikolizom ne mogu se regenerirati procesom oksidacijske fosforilacije u kojem kisik djeluje kao krajnji akceptor elektrona. U takvim uvjetima reducirani koenzim se regenerira reakcijama fermentacije gdje je krajnji akceptor elektrona organska molekula (Stryer, 1991; Clark, 1989).

Nastali piruvat se može uključiti u više metabolitičkih puteva, ovisno o okolišnim uvjetima i uvjetima u stanici. Reakcijom laktat dehidrogenaze se može reducirati do laktata; reakcijom piruvat dehidrogenaze nastaje acetyl-CoA koji se reakcijom aldehyd dehidrogenaze i alkohol dehidrogenaze preko međuprodukta acetaldehida prevodi u etanol kao krajnji produkt ili reakcijom fosfat acetyltransferaze i acetat kinaze iz acetyl-CoA nastaje acetat kao krajnji produkt. Ključni enzimi za proizvodnju 2,3-butandiola redukcijom piruvata su α -acetolaktat sintaza, α -acetolaktat dekarboksilaza i butandiol dehidrogenaza (Maina i sur., 2019). Dvije molekule piruvata (3C jedinica) reakcijom acetolaktat sintaze uz dekarboksilaciju daju 5C jedinicu α -acetolaktat. Nastali α -acetolaktat se do 2,3-butandiola prevodi na dva načina, ovisno o uvjetima uzgoja. Ukoliko se radi o anaerobnim uvjetima, α -acetolaktat se enzimski kataliziranom dekarboksilacijom enzimom acetolaktat dekarboksilaze direktno prevodi u acetoin (4C jedinica). Ako je dostupan kisik, α -acetolaktat se može konvertirati u diacetyl (4C jedinica) spontanom dekarboksilacijom, a dalje se reducira u acetoin i 2,3-butandiol reakcijama diacetyl reduktaze i butandiol dehidrogenaze (Hazeena i sur., 2020; Alexeeva i sur., 2003).

Ovisno o soju, konverzijom 2 mola piruvata u 1 mol 2,3-butandiola regenerira se 1 mol NADH (direktnom konverzijom α -acetolaktata u acetoin). Ovisno o uvjetima, regeneracija preostalog NADH se odvija uz nastajanje nekog od nusprodukata: etanola, formata, acetata ili laktata. Teoretski, maksimalni prinos 2,3-butandiola iz glukoze jest 0,67 mol/mol (Nakashimada i sur., 1998).

Metabolička uloga biosinteze 2,3-butandiola nije potpuno razjašnjena, međutim, očito je da ima vrlo važnu ulogu u regulaciji unutarstaničnog omjera NADH/NAD⁺, a pretpostavlja se da regeneracija koenzima NAD⁺ metaboličkim putem sinteze neutralne molekule poput 2,3-butandiola kao krajnjeg akceptora protona umjesto organskih kiselina sprječava zakiseljavanje unutarstaničnog sadržaja (van Houdt i sur., 2007; Nakashimada i sur., 2000). Također se smatra da je sinteza 2,3-butandiola mehanizam pohrane izvora ugljika i energije, obzirom da se 2,3-butandiol može koristiti i kao izvor energije ukoliko je potrošen sav dostupni supstrat (Xiao i Xu, 2007).

2.2.1.3. Utjecaj procesnih parametara na biotehnološku proizvodnju 2,3-butandiola

➤ Kisik

Brojnim istraživanjima je utvrđeno da količina dostupnog kisika uvelike utječe na prinos proizvoda, produktivnost i nastajanje nusprodukata (Silveira i sur., 1993). Visok stupanj aeracije povoljno je utjecao na rast biomase, međutim, u uvjetima visoke koncentracije kisika enzim acetolaktat sintaza je inhibiran i nastaje vrlo malo ili nimalo 2,3-butandiola (Kosaric i sur., 1992). Iako se općenito smatra da se fermentacijski procesi odvijaju u isključivo anaerobnim uvjetima, istraživanjima je uočeno da prisutnost određene količine kisika potiče proizvodnju acetoina i 2,3-butandiola kod nekih sojeva bakterije *Paenibacillus polymyxa*, poput soja ATCC 12321, koji u potpuno anaerobnim uvjetima uopće ne proizvodi 2,3-butandiol (Dziewulski i sur., 1986). Fenomen povećane proizvodnje produkta fermentacije, 2,3-butandiola, u mikroaerofilnim uvjetima u odnosu na anaerobne uvjete objašnjava se samom fiziologijom mikroorganizma producenta. Obzirom da je *Paenibacillus polymyxa* fakultativni anaerob, u uvjetima limitacije kisikom istovremeno se odvijaju dva metabolička puta dobivanja energije: respiracija i fermentacija. Omjer njihove aktivnosti uvjetovan je količinom dostupnog kisika (Voloch i sur., 1985). Smanjenjem stupnja aeracije povećava se koeficijent konverzije supstrata u 2,3-butandiol, ali je koncentracija porasle biomase koja provodi konverziju vrlo mala pa je i ukupna količina

nastalog 2,3-butandiola mala (Converti i sur., 2003). Količina dostupnog kisika utječe i na udio i međusobni omjer nastalih nusprodukata fermentacije: u anaerobnim uvjetima uglavnom se nakuplja etanol, a kod aerobnog uzgoja nakuplja se acetat (Häbler i sur., 2012; De Mas i sur., 1988).

Laube i sur. (1984) su tijekom uzgoja u tikvicama primijetili da je nastalo više 2,3-butandiola u otvorenim tikvicama na tresilici nego u zatvorenim tikvicama koje se nisu miješale. Međutim, primijetili su da je količina nastalog 2,3-butandiola znatno viša na 120 min^{-1} nego na 300 min^{-1} , što potvrđuje prethodno iznesene činjenice da proizvodnji 2,3-butandiola odgovaraju mikroaerofilni uvjeti.

Za postizanje maksimalne produktivnosti, ključno je odrediti optimalan stupanj aeracije koji će potaknuti rast biomase mikroorganizma producenta, ali neće inhibirati nastanak 2,3-butandiola. Fages i sur. (1986) su stupanj aeracije prilagodili fazi rasta mikroorganizma producenta tijekom procesa fermentacije sa *P. polymyxa*. Prvih 19 sati uzgoja K_L a je iznosio 40/h, od 19. do 41. sata uzgoja K_L a je smanjen na 21/h, a u završnoj stacionarnoj fazi uzgoja od 41. do 55. sata na 8/h, uz konačnu postignutu koncentraciju od 44 g L^{-1} i produktivnost $0,79 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Iako su male količine kisika potrebne za proizvodnju 2,3-butandiola pomoću nekih sojeva bakterije *Paenibacillus polymyxa*, uočeno je da se većim stupnjem aeracije smanjila selektivnost proizvodnje optički čistog *R,R*-2,3-butandiola i da dolazi do povećanja udjela *meso*-izomera (Nakashimada i sur., 1998).

➤ *pH i acetat*

U svakom biotehnološkom procesu nužno je postaviti optimalni pH, obzirom da mikroorganizmi producenti mogu rasti samo u određenom rasponu pH. Sojevi bakterije *Paenibacillus polymyxa* su neutrofili, kako je prethodno navedeno i odgovara im raspon pH 6-8 jedinica. Bazičniji uvjeti rasta pogoduju nastajanju organskih kiselina, a smanjenje pH prema kiselijim uvjetima pogoduje nastanku 2,3-butandiola uz smanjenje nastanka organskih kiselina. Optimalni pH osim o soju producentu, ovisi i o supstratu koji se koristi (Celinska i Grajek, 2009; Garg i Jain, 1995). Nakshimada i sur. (2000) odredili su optimalni raspon pH za proizvodnju 2,3-butandiola pomoću *P. polymyxa*, koji se kreće između 6,3 i 6,8. Pri višoj od dvije navedene vrijednosti postignuta je nešto viša krajnja koncentracija 2,3-butandiola, ali je stupanj konverzije glukoze u 2,3-butandiol

bio veći pri nižoj vrijednosti pH. Optimalni pH za proizvodnju 2,3-butandiola pomoću vrsta *Klebsiella sp.* je niži nego za sojeve *P. polymyxa* i kreće se između 5 i 6 (Biebl i sur., 1998).

Tijekom uzgoja zbog sinteze organskih kiselina dolazi do prirodnog snižavanja pH u hranjivoj podlozi. Rast i aktivnost mikroorganizma producenta inhibirani su promjenom pH izvan optimalnog područja pa su neki mikroorganizmi razvili prilagodbe na zakiseljavanje podloge zbog nastanka organskih kiselina. Regeneracija reduciranih koenzima odvija se drugim metabolitičkim putevima u kojima nastaju pH neutralne molekule, poput alkohola ili glikola. Smatra se da prebacivanje metabolizma mikroorganizma producenta na redukciju piruvata do 2,3-butandiola nije izazvano sniženim pH, nego nakupljanjem kiselih produkata, osobito acetata, koji aktivira enzime uključene u metabolizam 2,3-butandiola (Maddox, 1996). Na osnovu toga, Nakashimada i sur. (2000) uspostavili su šaržni proces sa pritokom supstrata gdje su dodavali 0,35 mola acetata po molu glukoze pri pH 6,8, što je rezultiralo povećanjem proizvodnje 2,3-butandiola do koncentracije od 57,4 g L⁻¹ i konverzijom 0,27 g g⁻¹ uz očuvanje optičke čistoće *R,R*-izomera.

➤ *Temperatura*

Povišenje temperature utječe na povećanje enzimске aktivnosti, a samim time i brzinu rasta biomase i metabolitičku aktivnost. Međutim, prevelikim povećanjem dolazi do inaktivacije enzima i inhibicije rasta mikroorganizma. Prema dosadašnjim istraživanjima, optimalna temperatura za proizvodnju 2,3-butandiola pomoću *P. polymyxa* se kreće između 30 i 35 °C, a uz osiguravanje mikroaerofilnih uvjeta inducira se proizvodnja 2,3-butandiola (Garg i Jain, 1995). Optimalna temperatura za fermentaciju vrstama iz roda *Klebsiella* je viša i kreće se između 33 i 37 °C (Celinska i Grajek, 2009).

➤ *Koncentracija supstrata*

Istraživanjima na sintetičkim podlogama s čistim kemikalijama uočeno je da početna koncentracija glukoze, odnosno izvora ugljika može ići i do 200 g L⁻¹ i da se povećanjem početne koncentracije supstrata povećava i prinos 2,3-butandiola. Međutim, početne koncentracije šećera iznad 20 g L⁻¹ pokazuju inhibicijsko djelovanje na rast biomase dok isti trend nije primijećen na produktivnost proizvodnje 2,3-butandiola koji podnosi i koncentracije do 100 g L⁻¹ (Converti i Perego, 2002). U istraživanjima sa bakterijom *P. polymyxa* uočeno je da

početna koncentracija od 150 g L^{-1} inhibira rast i aktivnost biomase (De Mas i sur., 1988). Utjecaj početne koncentracije ksiloze na prinos 2,3-butandiola i produktivnost uvelike ovisi o soju mikroorganizma producenta. Bakterija *P. polymyxa* istovremeno može metabolizirati glukozu i ksilozu (Okonkwo i sur., 2021). U slučaju korištenja podloga porijeklom iz industrijskih i poljoprivrednih sirovina kao što su hidrolizati lignocelulozne biomase, maksimalne početne koncentracije šećera su vrlo niske i kreću se između 5 i 10 %. Razlog je prisutnost toksičnih komponenata koji se prirodno nalaze u sirovini ili nastanu predobradom sirovine, a djeluju inhibirajuće na rast ili aktivnost biomase, odnosno proizvodnju 2,3-butandiola (Celińska i Grajek, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam korišten u ovom radu jest bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

3.1.2. Kemikalije

Popis kemikalija korišten u ovom radu nalazi se u Tablici 3.

Tablica 3. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade ovog rada

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
Agar	tehnički	Biolife, Italija
Amonijev acetat	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
Amonijev sulfat	≥ 99 %	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

Tablica 3. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade ovog rada - *nastavak*

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
Dikalijev hidrogenfosfat	≥ 98 %	Kemika, Hrvatska
Kobaltov klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Ksilozna	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
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	≥ 98 %	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. Hranjive podloge

Sastav hranjivih podloga za održavanje radne kulture, uzgoj inokuluma te uzgoje u Erlenmeyerovim tikvicama korištenih prilikom izrade ovog rada naveden je u tablicama 4 - 6.

Čista kultura bakterije *Peanibacillus polymyxa* DSM 742 održavana je na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama, a uzgoj inokuluma i uzgoj u tikvicama provodio se na tekućim hranjivim podlogama. Čvrsta hranjiva podloga za održavanje radne kulture istog je sastava kao i podloga za uzgoj inokuluma, uz dodatak agara u koncentraciji 15 g L⁻¹. Sastav hranjive podloge za uzgoj inokuluma prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge za uzgoj inokuluma

Kemikalija	Koncentracija [g L ⁻¹]	
	Tekuća hranjiva podloga	Čvrsta hranjiva podloga
Glukoza	1	1
Mesni ekstrakt	3	3
Pepton	5	5
Agar	-	15

Osnovni sastav hranjive podloge za uzgoje u Erlenmeyerovim tikvicama, odnosno sastav soli, faktora rasta i izvora dušika, prikazan je u tablici 5. Kao izvor ugljika korištene su glukoza ili ksiloza, ovisno o uzgoju, u različitim koncentracijama. Nakon eksperimentalnog određivanja optimalne koncentracije izvora ugljika, uzgoj je proveden a) na podlogama sa različitim početnim koncentracijama amonijevog acetata; b) sa dodatkom različitih koncentracija amonijevog acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi. Rasponi koncentracija glukoze i ksiloze kao izvora ugljika te amonijevog acetata kao ispitivanog stimulatora prizvodnje 2,3-butandiola prikazani su u tablici 6.

Tablica 5. Sastav soli, faktora rasta i izvora dušika hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

Kemikalija	Koncentracija γ [g L⁻¹]
Kvašćev ekstrakt	5,0
Tripton	5,0
Magnezijev sulfat heptahidrat	0,2
Kalijev dihidrogenkarbonat	3,5
Kalijev hidrogenkarbonat	2,5
Amonijev acetat	5,0
Amonijev sulfat	0,6

Tablica 6. Koncentracije izvora ugljika i ispitivanog stimulatora proizvodnje 2,3-butandiola

Izvor ugljika	Koncentracija [g L⁻¹]			
Glukoza	10	20	30	
Ksiloza	10	20	30	
20 g L⁻¹ glukoze	Koncentracija [g L⁻¹]			
	Amonijev acetat	5	10	15

Sastav otopine elemenata u tragovima koja je dodavana u svaku hranjivu podlogu u volumnom udjelu od 3 mL L⁻¹ prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Sastav otopine elemenata u tragovima

Kemikalija	Koncentracija [g L⁻¹]
Bakrov sulfat pentahidrat	0,031
Borna kiselina	0,258
Cinkov klorid	0,021
Kobaltov klorid heksahidrat	0,075
Manganov klorid dihidrat	1,800
Natrijev molibdat dihidrat	0,023
Natrijev tartarat dihidrat	2,100
Željezov sulfat heptahidrat	2,500

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Termostatirana tresilica za mikrobiološke uzgoje

Za istraživanje utjecaja pH, vrste i koncentracije izvora ugljika te koncentracije acetata na rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i proizvodnju 2,3-butandiola u Erlenmeyerovim tikvicama korištena su dva tipa laboratorijskih tresilica:

- za uzgoj inokuluma korištena je termostatirana tresilica za mikrobiološke uzgoje „BIOSAN“ (Environmental shaker incubator ES 20/60) zatvorenog tipa s automatskom kontrolom temperature

-za uzgoj u tikvicama korištena je laboratorijska tresilica otvorenog tipa „Certomat RM 71“ B. Braun Biotech International (Njemačka) u termostatu „Instrumentaria ST-50“ (Zagreb, Hrvatska)

3.1.4.2. Spektrofotometar

Za određivanje promjene optičke gustoće izuzetih uzoraka korišten je spektrofotometar „Cary 100, UV-VIS” (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) pomoću računalnog programa „SimpleReads”.

3.1.4.3. Centrifuga

Za odvajanje bakterijske biomase i supernatanta iz izuzetih uzoraka korištena je centrifuga tipa „SL 8R Thermoscientific“ (Waltham, Massachusetts, SAD), a za odvajanje taloga prilikom pripreme uzoraka za UPLC analizu korištena je centrifuga tipa „Witeg CF-10“ (Njemačka).

3.1.4.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Za određivanje koncentracije supstrata i nastalih produkata izuzetih uzoraka korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler), pećnice, predkolone, analitičke kolone (Rezex ROA- Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline, protoka 0,6 mL min⁻¹. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL.

3.1.4.5. Ostali pribor, aparatura i software

- analitička vaga „Shimadzu“, AX-200 W/O AC ECTA i tehnička vaga „Tehtnica“ ET-1211
- stakleno i plastično laboratorijsko posuđe (Erlenmeyerove tikvice od 100 i 250 mL, nastavci za pipetiranje, automatska pipeta, staklena pipeta, Petrijeve zdjelice, vateni čepovi, vrelnjače, Falcon kivete od 50 i 15 mL, stakleni štapić, menzure)
- autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija)
- magnetna miješalica
- vorteks miješalica
- zamrzivač Gorenje za čuvanje uzoraka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Čvrste hranjive podloge pripremljene su na način da se u određenom volumenu demineralizirane vode otopila odvagana količina sastojaka hranjive podloge prema koncentracijama navedenim u tablici 4. Sastav čvrste hranjive podloge je isti kao i sastav podloge za uzgoj inokuluma uz iznimku dodatka agara u koncentraciji 15 g L^{-1} , kako je i navedeno u tablici 4. Pripremljena podloga je sterilizirana u autoklavu na $121 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 20 min i izljevena u Petrijeve zdjelice uz održavanje sterilnih uvjeta.

Sve tekuće hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama pripremljene su na isti način: otapanjem odvaganih količina kemikalija, izračunatih prema koncentracijama navedenim u tablici 5, u određenom volumenu demineralizirane vode u tikvici. Konačni volumen u tikvici je iznosio 150 mL, na osnovu kojeg su izračunate potrebne odvage praškastih sastojaka hranjive podloge i volumen demineralizirane vode u kojoj su otopljene. U hranjivu podlogu su prije sterilizacije dodane sve kemikalije osim izvora ugljika, a otopina izvora ugljika je pripremljena u zasebnoj tikvici u koncentraciji od 500 g L^{-1} . Tikvice sa otopljenim sastojcima hranjive podloge prema tablici 5 i otopinama izvora ugljika su sterilizirane u autoklavu na $121 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 20 min, a nakon hlađenja podloge su dovršene dodatkom izračunatog volumena otopine izvora ugljika i otopine elemenata u tragovima pomoću automatske pipete uz održavanje sterilnih uvjeta. Izvor ugljika (glukoza i ksiloza) i elementi u tragovima zasebno su sterilizirani i dodavani naknadno u hranjivu podlogu radi sprječavanja nastanka toksičnih razgradnih produkata tijekom sterilizacije.

Volumen otopine elemenata u tragovima koji se dodavao u hranjivu podlogu je iznosio $450 \text{ }\mu\text{L}$, određen prema konačnom volumenu u tikvici (150 mL) i volumnom udjelu otopine elemenata u tragovima ($3 \text{ }\mu\text{L L}^{-1}$).

Volumen otopine izvora ugljika (glukoze ili ksiloze) određivan je prema konačnoj željenoj koncentraciji u hranjivoj podlozi. Za ispitivanje utjecaja koncentracije supstrata dodavani su volumeni od 3, 6 i 9 mL redom za koncentracije šećera od 10, 20 i 30 g L^{-1} .

Za ispitivanje rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i proizvodnje 2,3-butandiola pri sniženom pH, pripremljenoj hranjivoj podlozi prije sterilizacije je podešavan pH 3 M otopinom NaOH i 2 M otopinom H_2SO_4 , pri čemu su ispitivane pH vrijednosti bile 3, 4, 5 i 6,5. Vrijednosti

sniženog pH podloge od 3, 4 i 5 jedinica odabrane su radi ispitivanja moguće primjene bakterije *P. polymyxa* DSM 742 za fermentiranje hidrolizata lignocelulozne biomase dobivene kiselinskom hidrolizom, bez prethodnog podešavanja pH na područje neutralnih pH vrijednosti. Vrijednost pH od 6,5 jedinica odabrana je prema dostupnoj literaturi kao optimalna vrijednost pH za rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* i služila je kao referentna vrijednost pH za usporedbu kinetike rasta.

Za ispitivanje utjecaja amonijeva acetata na proizvodnju 2,3-butandiola, dodavano je 6 mL otopine glukoze u podlogu za uzgoj (početna koncentracija 20 g L⁻¹ glukoze u podlozi) na način opisan prethodno, a ispitivane koncentracije acetata prikazane su u tablici 6.

Podloge za provođenje eksperimenta kojim se ispitivao rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i proizvodnja 2,3-butandiola uz prisustvo amonijevog acetata u različitim koncentracijama u podlozi pripremljene su na način da se odvagana količina amonijevog acetata otopila u demineraliziranoj vodi zajedno sa ostalim sastojcima hranjive podloge navedenim u tablici 5, nakon čega je uslijedila sterilizacija i dovršavanje podloge dodatkom izvora ugljika i inokuluma.

Podloge za provođenje eksperimenta kojim se ispitivao utjecaj amonijevog acetata dodanog u kasnoj eksponencijalnoj fazi u različitim koncentracijama su pripremljene na način opisan prethodno prema sastavu prikazanom u tablici 5, ali bez dodatka amonijevog acetata. Amonijev acetat je pripremljen kao koncentrirana otopina otapanjem odvagane količine u određenom volumenu demineralizirane vode uz zagrijavanje na magnetnoj miješalici, zasebno steriliziran i dodan u hranjivu podlogu naknadno, nakon inokulacije, tijekom završnog dijela eksponencijalne faze rasta uz održavanje aseptičnih uvjeta. Volumen dodane otopine amonijevog acetata izračunat je prema konačnom volumenu u tikvici, koncentraciji pripremljene otopine (500 g L⁻¹) i željenoj koncentraciji u podlozi (tablica 6).

3.2.2. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

3.2.2.1. Uzgoj inokuluma

Radna kultura bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 čuvana je na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama i redovno precijepljena na svježju čvrstu podlogu u aseptičnim uvjetima

pomoću jednokratne plastične mikrobiološke ušice. Svježe naciyepljene ploče u Petrijevim zdjelicama su termostatirane na 30 °C i čuvane u hladnjaku.

Inokulum za određivanje optimalnih parametara uzgoja (pH, broj okretaja i koncentracija supstrata) te utjecaja acetata na kinetiku rasta i proizvodnje 2,3-butandiola pripremljen je aseptičnim prenošenjem porasle kulture bakterije *P. polymyxa* DSM 742 sa čvrste hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama pomoću mikrobiološke ušice u 20 mL pripremljene tekuće podloge za uzgoj inokuluma (tablica 4). Naciyepljena podloga je termostatirana na 30 °C i 200 min⁻¹ (broj okretaja na tresilici) tijekom 24 h. Nakon 24 h, 10 mL porasle kulture u tekućoj hranjivoj podlozi preneseno je u 100 mL nove svježe hranjive podloge za uzgoj inokuluma, koja je nakon inokulacije također termostatirana tijekom 24 h na 30 °C i 200 min⁻¹, a porasla bakterijska biomasa služila je kao inokulum za postavljanje biotehnološkog procesa u Erlenmeyerovim tikvicama.

3.2.2.2. Proizvodnja 2,3-butandiola uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Erlenmeyerove tikvice sa hranjivom podlogom za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 (tablica 5, poglavlje 3.2.1.), naciyepljene su inokulumom u volumnom udjelu 5 %, tj. dodatkom 7,5 mL poraslog inokuluma u aseptičnim uvjetima. Tikvice su zatvorene vrelnjačama radi osiguravanja mikroaerofilnih uvjeta i stavljene na tresilicu u komori termostatiranoj na 30 °C.

Određivanje utjecaja koncentracije supstrata, odnosno izvora ugljika, provedeno je pri različitom broju okretaja: 50, 150 i 200 min⁻¹, određivanje utjecaja pH pri 150 min⁻¹, određivanje utjecaja acetata u podlozi na produktivnost proizvodnje 2,3-butandiola provodilo se pri 50 min⁻¹, a određivanje utjecaja acetata dodanog u kasnoj eksponencijalnoj fazi uzgojem biomase na 200 min⁻¹ do usporavanja eksponencijalne faze i 50 min⁻¹ nakon dodatka acetata.

Uzgoj u tikvicama je praćen sterilnim izuzimanjem uzoraka u određenim vremenskim intervalima. Izdvajano je 5 mL uzorka, pomoću kojeg je indirektno određivanjem optičke gustoće praćen rast bakterijske biomase na način opisan u poglavlju 3.3.1. Uzorci su nakon određivanja optičke gustoće centrifugirani pri 8000 min⁻¹ na 4 °C tijekom 5 min, pri čemu je izdvojen talog bakterijske biomase od supernatanta. Supernatant je pohranjen u Falcon kivete i

spremljen u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stupnjeva do analize primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti, čiji je postupak opisan u poglavlju 3.3.2.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka

Izuzetim uzorcima, homogeniziranim na vorteksu, spektrofotometrom „Cary 100, UV/VIS“ određena je optička gustoća na valnoj duljini od 600 nm za 0. i po potrebi 1. decimalno razrjeđenje.

3.3.2. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti

Prilikom pripreme uzoraka za UPLC analizu, odmrznuti uzorci supernatanta (pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.3.1.) su vorteksirani, izdvojeno je 750 μL uzorka supernatanta u plastične Eppendorf kivete u koje je zatim dodano 750 μL prethodno pripremljene otopine cinkovog sulfata koncentracije 100 g L^{-1} . Sadržaj kiveta je dobro homogeniziran na vorteksu i ostavljen na čekanje 5 minuta, tijekom čega cinkov sulfat veže proteine i prisutne nečistoće stvarajući talog. Po isteku 5 minuta vremena, kivete s uzorcima su centrifugirane 5 min na 13000 min^{-1} . Izdvojeni supernatant se po potrebi razrjeđivao demineraliziranom vodom tako da koncentracija šećera u volumenu pripremljenog uzorka za analizu ne prelazi 10 g L^{-1} . Supernatant je profiltriran kroz filter za špricu veličine pora 0,2 μm (Sartorius) u staklenu vialu za UPLC uzorke.

Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti provedena je uz protok mobilne faze 0,6 L min^{-1} , temperaturu od $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i volumen injektiranog uzorka 10 μL . Rezultati dobiveni kromatografskom analizom obrađeni su u računalnom programu za kromatografiju „OpenLAB CDS“.

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI PROCESA

Za izračunavanje parametara uspješnosti biotehnološkog procesa proizvodnje 2,3-butandiola korištene su sljedeće jednačbe:

- Potrošnja supstrata ΔS

$$\Delta S = S_0 - S \quad [g L^{-1}]$$

S_0 = koncentracija supstrata na početku uzgoja $[g L^{-1}]$

S = koncentracija supstrata na kraju uzgoja $[g L^{-1}]$

- Prinos produkta 2,3-butandiola $Y_{2,3-BDL}$

$$Y_{2,3-BDL} = P_0 - P \quad [g L^{-1}]$$

P_0 = koncentracija 2,3 – butandiola na početku uzgoja $[g L^{-1}]$

P = koncentracija 2,3 – butandiola na kraju uzgoja $[g L^{-1}]$

- Prinos mliječne kiseline Y_{MK}

$$Y_{MK} = P_{0,MK} - P_{MK} \quad [g L^{-1}]$$

$P_{0,laktat}$ = koncentracija mliječne kiseline na početku uzgoja $[g L^{-1}]$

P_{laktat} = koncentracija mliječne kiseline na kraju uzgoja $[g L^{-1}]$

- Prinos etanola Y_{EtOH}

$$Y_{EtOH} = P_{0,EtOH} - P_{EtOH} \quad [g L^{-1}]$$

$P_{0,EtOH}$ = koncentracija etanola na početku uzgoja $[g L^{-1}]$

P_{EtOH} = koncentracija etanola na kraju uzgoja $[g L^{-1}]$

- Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt $Y_{2,3-BDL/S}$

$$Y_{2,3-BDL/S} = \frac{Y_{2,3-BDL}}{\Delta S} \quad [g g^{-1}]$$

- Produktivnost procesa proizvodnje 2,3-butandiola $Pr_{2,3-BDL}$

$$Pr_{2,3-BDL} = \frac{Y_{2,3-BDL}}{t_u} \quad [g L^{-1} h^{-1}]$$

t_u = ukupno vrijeme trajanja uzgoja [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedeni su šaržni uzgoji bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s ciljem određivanja optimalnih procesnih parametara i tehnoloških uvjeta za proizvodnju 2,3-butandiola. Prvi dio istraživanja bio je usmjeren na ispitivanje mogućnosti rasta bakterije *P. polymyxa* DSM 742 pri kiselim pH vrijednostima. U drugom dijelu istraživanja ispitivao se rast i metabolitička aktivnost u podlogama s različitim početnim koncentracijama glukoze i ksiloze te se istraživao utjecaj miješanja na proizvodnju 2,3-butandiola i produktivnost procesa. Istraživan je i utjecaj različite koncentracije amonijevog acetata na sintezu 2,3-butandiola.

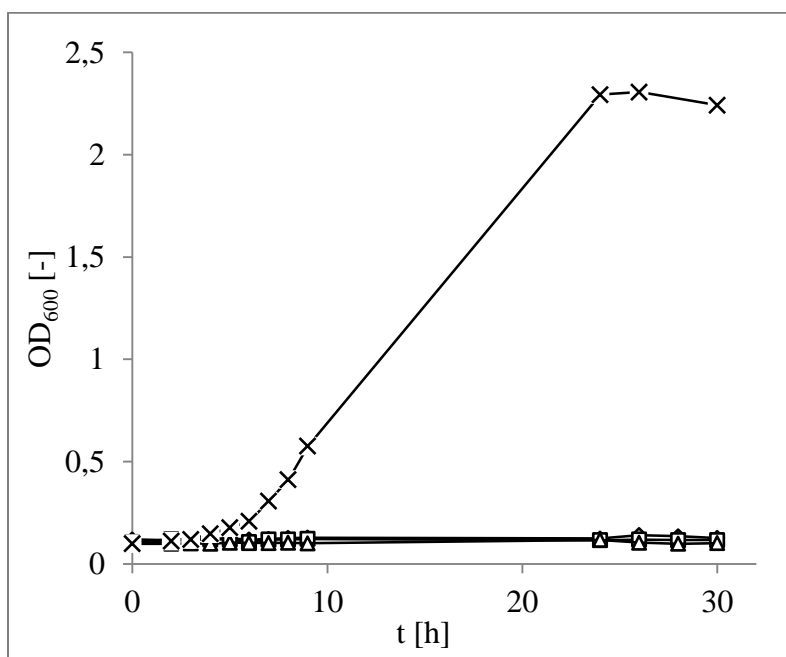
U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri različitim pH vrijednostima.

U poglavlju 4.2. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim koncentracijama glukoze i ksiloze kao izvora ugljika pri različitim uvjetima miješanja.

U poglavlju 4.3. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s različitim koncentracijama amonijevog acetata u podlozi i različitim koncentracijama amonijevog acetata dodanog u kasnu eksponencijalnu fazu rasta.

4.1. REZULTATI UZGOJA BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 PRI RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 proveden je anaerobno u Erlenmeyerovim tikvicama na kemijski definiranoj podlozi s 30 g L^{-1} glukoze i sastava soli, izvora dušika i faktora rasta navedenih u tablici 5. Uzgoj se vodio na 30 °C i 150 min^{-1} pri početnim pH vrijednostima 3, 4, 5 i 6,5. Tijekom navedenih uzgoja praćena je promjena optičke gustoće podloge (OD) pri 600 nm (slika 4) kao direktnog pokazatelja rasta biomase te promjena koncentracije supstrata glukoze i produkata fermentacije na osnovu čega su izračunati parametri uspješnosti procesa.

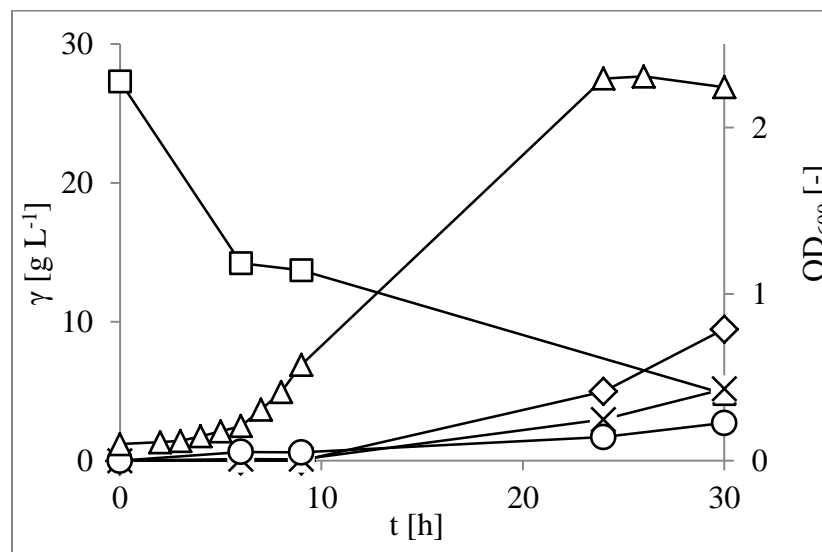


Slika 4. Prikaz promjene izmjerene OD [-] vrijednosti tijekom rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 tijekom uzgoja na podlozi sa 30 g L^{-1} glukoze i početnim pH vrijednostima 3, 4, 5 i 6,5 (-◇- pH 3, -□- pH 4, -△- pH 5, -x- pH 6,5)

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama različitih početnih pH vrijednosti praćen je tijekom 30 sati. Uzgojem na podlogama s početnim vrijednostima pH 3, 4 i 5 nije došlo do promjene optičke gustoće izuzetih uzoraka podloge (slika 4), a UPLC analizom uzoraka nije uočen utrošak glukoze niti je detektirano prisustvo produkata fermentacije na

osnovu čega se može zaključiti da pri navedenim početnim pH vrijednostima podloge bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 ne može preživjeti. Obzirom da nema rasta bakterijske biomase niti metaboličke aktivnosti, postignuti prinosi produkata fermentacije i pokazatelji uspješnosti uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na početnoj vrijednosti pH podloge 3, 4 i 5 nisu prikazani u radu. Nasuprot tome, na slikama 4 i 5 jasno se može uočiti izražen rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 tijekom uzgoja na podlozi početne pH vrijednosti od 6,5 jedinica. Faza prilagodbe bakterije na uvjete uzgoja (*lag*-faza) trajala je 6 sati, nakon čega nastupa eksponencijalna faza u trajanju od 18 sati. Na osnovu navedenoga, može se zaključiti da bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 nije pogodna za fermentiranje kiselih hidrolizata lignocelulozne biomase bez prethodno provedenog postupka podešavanja pH vrijednosti sirovine do neutralnog pH područja.

Rast biomase i promjena koncentracije glukoze i 2,3-butandiola tijekom uzgoja pri pH 6,5 prikazani su na slici 5, a parametri uspješnosti procesa prikazani su u tablici 8.



Slika 5. Prikaz promjene izmjerene OD [-] vrijednosti tijekom rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, potrošnja glukoze i promjena koncentracije produkata tijekom uzgoja pri pH 6,5 (-□- glukoza, -◇- 2,3-butandiol, -x- mliječna kiselina, -o- etanol, -Δ- biomasa)

Tijekom 30 h uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlozi sa početnim pH od 6,5 jedinica utrošeno je 22,51 g L⁻¹ glukoze, a proizvedeno je 9,47 g L⁻¹ 2,3-butandiola uz

koeficijent konverzije glukoze u 2,3-butandiol 0,42 g g⁻¹, što čini 62,7 % maksimalnog teoretskog koeficijenta konverzije. Produktivnost procesa jest 0,32 g L⁻¹ h⁻¹. Iako je u 30. satu u podlozi zaostalo 4,81 g L⁻¹ glukoze, prema slici 5 vidljivo je da već nakon 26 sati uzgoja dolazi do odumiranja biomase. Uočeno je da dolazi i do utroška 2,77 g L⁻¹ acetata koji je u početnu podlogu dodan u koncentraciji od 5 g L⁻¹ prema tablici 5, na osnovu čega se može zaključiti da bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz glukozu može trošiti i acetat kao izvor ugljika. Tijekom uzgoja, osim 2,3-butandiola kao glavnog produkta fermentacije, dolazi do proizvodnje 5,17 g L⁻¹ mliječne kiseline i 2,72 g L⁻¹ etanola, uz koeficijente konverzije od 0,23 g g⁻¹ i 0,12 g g⁻¹.

Tablica 8. Parametri uspješnosti procesa proizvodnje 2,3-butandiola tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri pH 6,5 u anaerobnim uvjetima

ΔS_{GLC} [g L ⁻¹]	22,51
$Y_{2,3\text{-BDL}}$ [g L ⁻¹]	9,47
Y_{MK} [g L ⁻¹]	5,17
Y_{EtOH} [g L ⁻¹]	2,72
$Y_{2,3\text{-BDL/GLC}}$ [g g ⁻¹]	0,42
$Pr_{2,3\text{-BDL}}$ [g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,32

4.2. REZULTATI UZGOJA BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 NA PODLOGAMA SA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE I KSILOZE KAO IZVORA UGLJIKA PRI RAZLIČITIM UVJETIMA MIJEŠANJA

U ovom dijelu istraživanja ispitivao se rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri različitim uvjetima miješanja, na kemijski definiranim podlogama sa različitim koncentracijama glukoze i ksiloze. Ispitivan je utjecaj broja okretaja od 50 min⁻¹, 150 min⁻¹ i 200 min⁻¹ pri početnoj koncentraciji 10, 20 i 30 g L⁻¹ glukoze ili ksiloze u podlozi. Uzgoj se vodio u anaerobnim uvjetima pri 30 °C i pH 6,5. Rast biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM

742 praćen je određivanjem optičke aktivnosti, a koncentracije supstrata i produkata fermentacije tijekom uzgoja određene su UPLC metodom. Na osnovu dobivenih rezultata su izračunati pokazatelji uspješnosti procesa. Rezultati su grafički predstavljeni na slikama 6 - 8, a parametri uspješnosti procesa na slici 9 i tablici 9.

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na glukozi i ksilozi kao izvoru ugljika pri 50 i 150 min⁻¹ praćen je tijekom 30 sati, a uzgoj na 200 min⁻¹ praćen je tijekom 25 sati.

Usporedbom dinamike rasta biomase bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na različitim početnim koncentracijama glukoze i ksiloze kao izvorima ugljika (slike 6, 7 i 8), može se uočiti da je trajanje faze prilagodbe na uvjete uzgoja (*lag* faze) približno isto za oba supstrata, odnosno ne ovisi o vrsti supstrata u podlozi kao ni o početnoj koncentraciji supstrata u podlozi. Međutim, povećanjem broja okretaja trajanje *lag* faze se smanjuje. Pri broju okretaja 50 min⁻¹ *lag* faza traje 8 sati, povećanjem na 150 min⁻¹ prilagodba na uvjete uzgoja je 2 puta brža i trajanje *lag* faze se smanjuje na 4 sata, a povećanjem na 200 min⁻¹ dolazi do 4 puta brže prilagodbe u odnosu na uzgoj pri 50 min⁻¹ pri čemu *lag* faza traje 2 h.

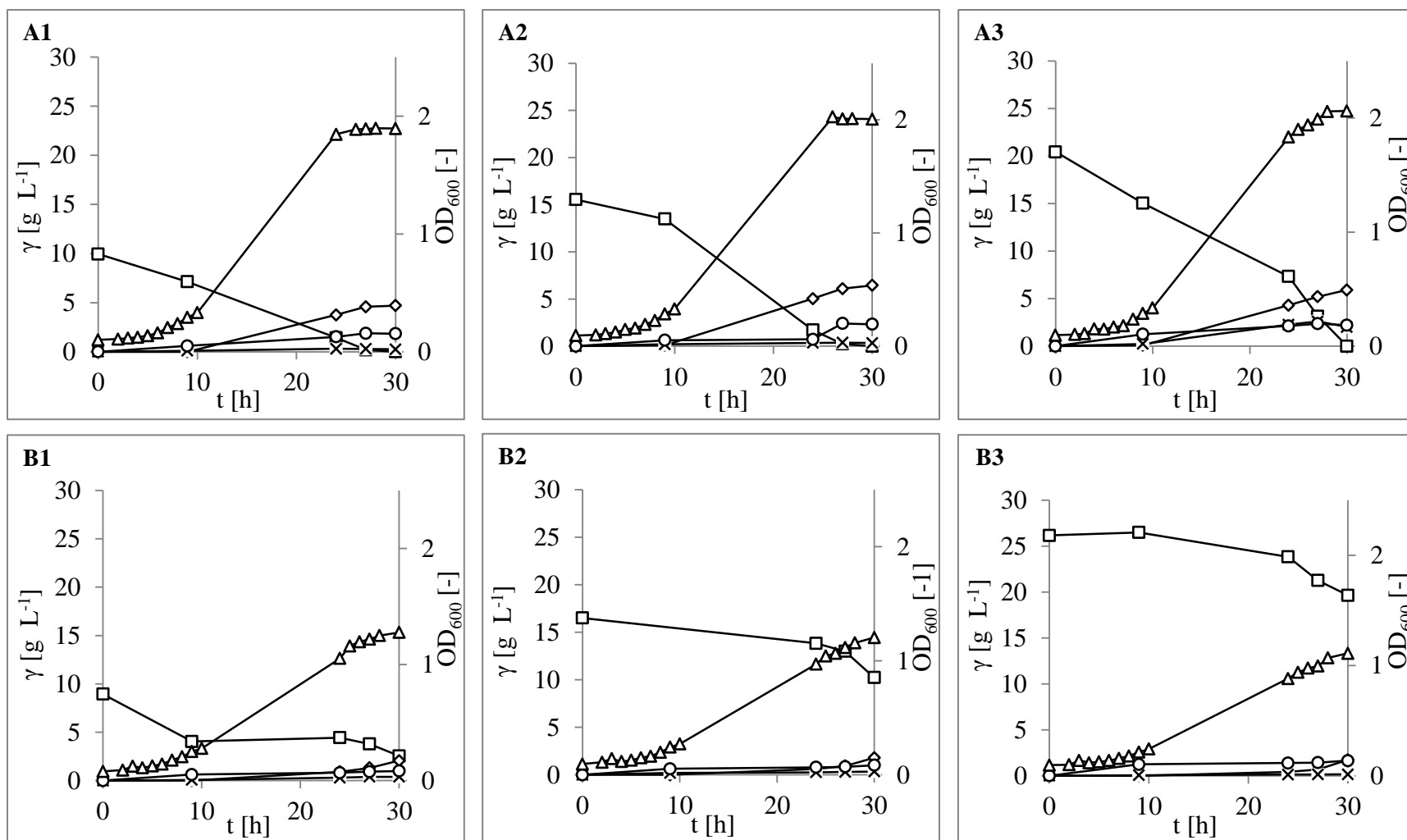
Nakon *lag* faze nastupa eksponencijalna faza rasta koja za oba izvora ugljika pri svim početnim koncentracijama supstrata u podlozi traje jednako, ali je izražen utjecaj broja okretaja na trajanje eksponencijalne faze. Najduža je pri broju okretaja 50 min⁻¹ i traje 18 sati, dok je povećanjem broja okretaja na 200 min⁻¹ eksponencijalna faza 4,5 puta kraća i stacionarna faza nastupa već u 6. satu uzgoja nakon samo 4 sata trajanja eksponencijalne faze.

Najbolji rast biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na glukozi kao supstratu jest pri broju okretaja 50 i 200 min⁻¹, ali pri 200 min⁻¹ brzina rasta biomase je znatno veća u odnosu na rast pri 50 min⁻¹. Najbolji rast biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na ksilozi kao osnovnom supstratu postignut je pri broju okretaja 150 min⁻¹.

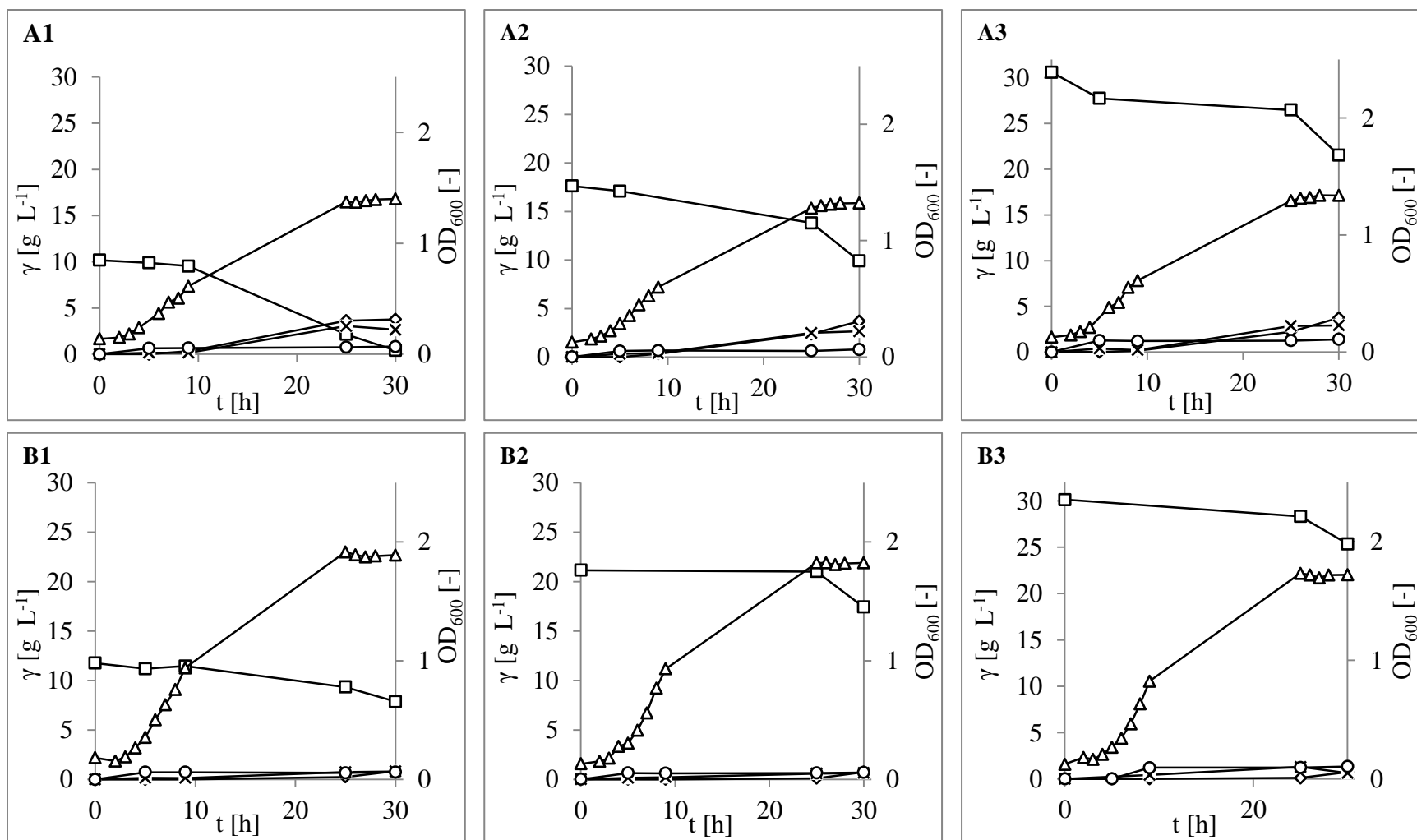
Usporedbom vrijednosti optičke gustoće na kraju uzgoja kao pokazatelja rasta biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlogama sa glukozom u odnosu na ksilozu kao osnovni izvor ugljika pri brojevima okretaja 50 min⁻¹ poraslo je 32,6 %, 40 % i 53,9 % više biomase pri početnim koncentracijama od 10, 20 i 30 g L⁻¹ glukoze kao osnovnog supstrata u odnosu na uzgoj na istim početnim koncentracijama ksiloze. Povećanjem broja okretaja na 200 min⁻¹ razlika između izmjerenih vrijednosti optičke gustoće na kraju uzgoja se smanjuje na 17 %.

Prema slikama 6-8 može se uočiti da početna koncentracija supstrata u podlozi utječe na rast biomase te da je povećanjem broja okretaja inhibicija rasta povećanjem koncentracije supstrata izraženija. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na glukozi kao supstratu pri 50 min⁻¹ vrijednosti optičke gustoće na kraju procesa rasta s povećanjem početne koncentracije glukoze u podlozi pri čemu su izmjerene vrijednosti 5 i 8 % veće na početnih 20 i 30 g L⁻¹ glukoze u podlozi u odnosu na podlogu sa početnih 10 g L⁻¹ glukoze. Međutim, povećanjem broja okretaja na 150 i 200 min⁻¹ može se uočiti obrnuta situacija, gdje su najveće vrijednosti optičke gustoće na kraju uzgoja izmjerene u podlozi sa početnom koncentracijom glukoze 10 g L⁻¹, dok su vrijednosti optičke gustoće na kraju uzgoja u podlogama sa početnih 20 i 30 g L⁻¹ gotovo identične i 4 - 6 % niže.

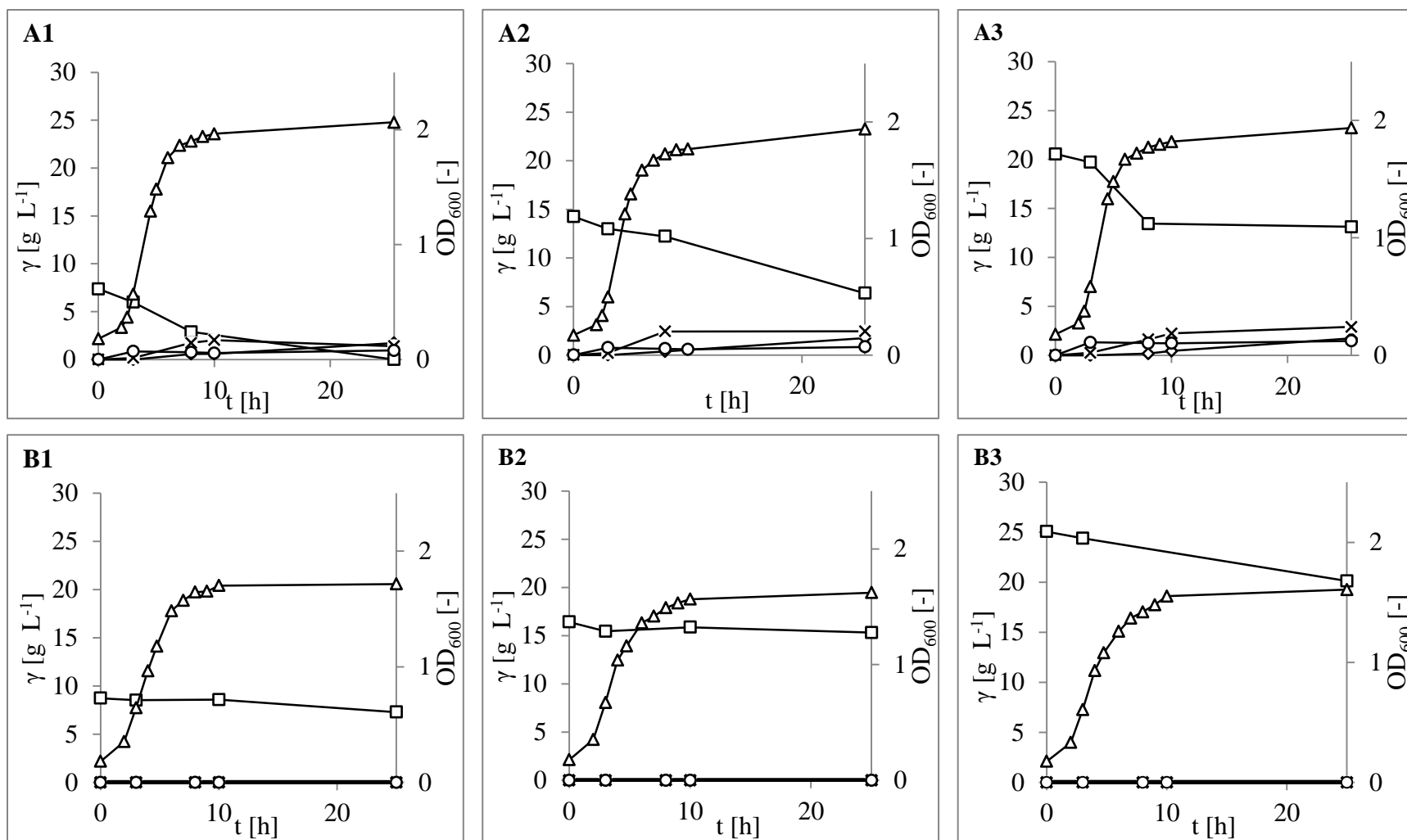
Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na ksilozi kao supstratu može se primijetiti da povećanjem početne koncentracije ksiloze u podlozi dolazi do smanjenja koncentracije biomase. Odnosno, u podlozi sa početnih 10 g L⁻¹ ksiloze je naraslo najviše biomase bakterije *P. polymyxa* DSM 742, u podlozi sa početnih 20 g L⁻¹ ksiloze 4,5 do 6,5 % manje te 6,5 do 13 % manje u podlozi sa početnih 30 g L⁻¹ ksiloze. Taj trend je vidljiv pri svim ispitivanim brojevima okretaja.



Slika 6. Prikaz promjene izmjerene OD [-] vrijednosti tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, potrošnje supstrata i promjena koncentracije produkata u podlogama sa početnom koncentracijom glukoze 10 g L⁻¹ (A1), 20 g L⁻¹ (A2) i 30 g L⁻¹ (A3) te početnom koncentracijom ksiloze 10 g L⁻¹ (B1), 20 g L⁻¹ (B2) i 30 g L⁻¹ (B3) pri 50 min⁻¹ (-□- glukoza, -◇- 2,3-butandiol, -x- mliječna kiselina, -o- etanol, -Δ- biomasa)



Slika 7. Prikaz promjene izmjerene OD [-] vrijednosti tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, potrošnje supstrata i promjena koncentracije produkata u podlogama sa početnom koncentracijom glukoze 10 g L⁻¹ (A1), 20 g L⁻¹ (A2) i 30 g L⁻¹ (A3) te početnom koncentracijom ksiloze 10 g L⁻¹ (B1), 20 g L⁻¹ (B2) i 30 g L⁻¹ (B3) pri 150 min⁻¹ (-□- glukoza, -◇- 2,3-butandiol, -x- mliječna kiselina, -o- etanol, -Δ- biomasa)



Slika 8. Prikaz promjene izmjerene OD [-] vrijednosti tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, potrošnje supstrata i promjena koncentracije produkata u podlogama sa početnom koncentracijom glukoze 10 g L⁻¹ (A1), 20 g L⁻¹ (A2) i 30 g L⁻¹ (A3) te početnom koncentracijom ksiloze 10 g L⁻¹ (B1), 20 g L⁻¹ (B2) i 30 g L⁻¹ (B3) pri 200 min⁻¹ (-□- glukoza, -◇- 2,3-butandiol, -x- mliječna kiselina, -o- etanol, -Δ- biomasa)

Na slikama 6 - 8 je prikazan utrošak supstrata tijekom provedenih uzgoja. Može se uočiti da se povećanjem broja okretaja smanjuje koncentracija utrošene glukoze ili ksiloze. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri 50 min⁻¹ u podlogama sa 10, 20 i 30 g L⁻¹ glukoze utrošen je sav supstrat. Povećanjem broja okretaja na 150 min⁻¹ u podlozi sa početnih 10 g L⁻¹ glukoze također je utrošen gotovo sav supstrat, ali u podlogama sa početnih 20 i 30 g L⁻¹ glukoze utrošeno je 9,9 i 9,07 g L⁻¹ što je svega 43,9 i 29,6 % glukoze. Povećanjem broja okretaja na 200 min⁻¹ utrošeno 7,37; 7,88 i 7,44 g L⁻¹ glukoze, što je 25 %, 20 % i 18 % manje nego pri 50 min⁻¹. Može se uočiti da je pri broju okretaja od 150 i 200 min⁻¹ potrošena gotovo jednaka količina glukoze u svim podlogama. Iz toga se može zaključiti da osim što se povećanjem broja okretaja smanjuje količina utrošene glukoze pri višem broju okretaja od 150 i 200 min⁻¹ količina glukoze koja se utroši je ograničena na prosječno 9,5 i 7,5 g L⁻¹, neovisno o početnoj koncentraciji supstrata

Sličan trend se može uočiti i tijekom uzgoja biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na ksilozi kao izvoru ugljika. Utrošak ksiloze tijekom uzgoja pri svim brojevima okretaja i početnim koncentracijama ksiloze u podlozi je manji nego pri odgovarajućima uzgojima na glukozi kao izvoru supstrata. Utjecaj broja okretaja na maksimalni mogući utrošak ksiloze je jače izražen nego kod uzgoja provedenih na glukozi kao supstratu. Pri broju okretaja od 50 min prosječno je potrošeno 6,4 g L⁻¹ ksiloze u svim podlogama (10, 20 i 30 g L⁻¹ početne koncentracije). Povećanjem broja okretaja na 150 min⁻¹ prosječna potrošnja ksiloze jest 4,13 g L⁻¹, što je 35,5 % manje nego pri uzgoju na 50 min⁻¹, a pri 200 min⁻¹ prosječna potrošnja ksiloze je čak 80 % niža i iznosi svega 1,3 g L⁻¹.

Tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlogama sa glukozom kao izvorom ugljika pri 50 i 150 min⁻¹ došlo je do utroška acetata (tablica 9) prisutnog u podlozi, pri čemu je uzgojem na 50 min⁻¹ utrošeno 80 - 88,7 % više acetata pri svim početnim koncentracijama glukoze. Međutim, pri broju okretaja 200 min⁻¹ dolazi do povećanja koncentracije acetata u podlozi na kraju procesa prosječno za 1,1 g L⁻¹ u odnosu na početnu koncentraciju. Potpuno suprotan trend je uočen uzgojem bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na ksilozi kao izvoru ugljika, gdje bakterija *P. polymyxa* DSM 742 ne troši acetat u podlozi pri 50 i 150 min⁻¹ nego ga proizvodi, a povećanjem broja okretaja na 200 min⁻¹ bakterija koristi acetat kao supstrat.

Na slikama 6, 7 i 8 može se uočiti da koncentracija 2,3-butandiola raste zajedno sa izmjerenim vrijednostima OD, odnosno da nakupljanje 2,3-butandiola, kao i drugih produkata fermentacije mliječne kiseline i etanola započinje nastupanjem eksponencijalne faze. Usporavanjem eksponencijalne faze i nastupanjem stacionarne faze rasta dolazi do stagniranja koncentracije 2,3-butandiola, iako u podlozi sa početnim koncentracijama supstrata od 20 i 30 g L⁻¹ nije potrošen sav supstrat pri višem broju okretaja 150 i 200 min⁻¹.

Tijekom 30 sati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 (slika 6) pri 50 min⁻¹ na glukozi kao osnovnom supstratu najviše 2,3-butandiola proizvedeno je uzgojem na podlozi sa početnom koncentracijom 20 g L⁻¹ uz postignutu koncentraciju 2,3-butandiola 6,44 g L⁻¹, što je ujedno i najveća postignuta koncentracija 2,3-butandiola postignuta istraživanjem opisanim u ovom poglavlju. Uzgojem na podlozi sa početnom koncentracijom glukoze od 30 g L⁻¹ nastalo je 8,2 % manje 2,3-butandiola, a najmanje 2,3-butandiola pri 50 min⁻¹ nastalo je na podlozi sa početnom koncentracijom 10 g L⁻¹ glukoze gdje je utrošena sva dostupna glukoza i proizvedeno je 27 % manje 2,3-butandiola.

Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri 150 min⁻¹ tijekom 30 h pri početnim koncentracijama glukoze od 10, 20 i 30 g L⁻¹ postignut je gotovo jednak prinos 2,3-butandiola i nastale koncentracije 2,3-butandiola međusobno se razlikuju za 0,04 do 0,1 g L⁻¹, što je gotovo zanemarivo (slika 7). Proizvedeno je prosječno 3,74 g L⁻¹ 2,3-butandiola, što je 41,9 % manje u odnosu na najveći prinos 2,3-butandiola postignut pri 50 min⁻¹. Isto je primijećeno uzgojem pri 200 min⁻¹, gdje je tijekom 25,5 h procesa nastalo čak 73 % manje 2,3-butandiola, uz prosječnu postignutu koncentraciju od 1,73 g L⁻¹.

Tijekom 30 h uzgoja na ksilozi kao izvoru ugljika pri 50 min⁻¹ najveći prinos 2,3-butandiola od 2,06 g L⁻¹ postignut je pri početnoj koncentraciji 10 g L⁻¹ ksiloze u podlozi, što je i najveća koncentracija 2,3-butandiola postignuta uzgojem na ksilozi kao izvoru ugljika. Za 12,6 % i 16 % manji prinosi 2,3-butandiola postignuti su uzgojem u podlogama sa početnih 20 i 30 g L⁻¹ ksiloze, iz čega se može zaključiti da se povećanjem koncentracije ksiloze u podlozi pri 50 min⁻¹ smanjuju i postignuti prinosi 2,3-butandiola.

Pri broju okretaja od 150 min⁻¹ postignuti su 60 % manji prinosi 2,3-butandiola uzgojem pri svim ispitivanim početnim koncentracijama ksiloze u podlozi u odnosu na prinose postignute pri 50 min⁻¹ i iznose 0,84 g L⁻¹, 0,72 g L⁻¹ i 0,74 g L⁻¹. Daljnjim povećanjem broja okretaja na 200 min⁻¹

nije detektirana prisutnost 2,3-butandiola niti pri jednoj ispitivanoj početnoj koncentraciji ksiloze, kao ni bilo kojeg drugog produkta fermentacije (tablica 9).

Na osnovu prethodno navedenog, može se zaključiti da povećanje broja okretaja značajno smanjuje postignute prinose 2,3-butandiola uzgojem na oba izvora ugljika pri svim ispitivanim početnim koncentracijama supstrata u podlozi (slike 6, 7 i 8).

Uzgojem na 50 min^{-1} , izražen je utjecaj početne koncentracije supstrata u podlozi, dok se nasuprot tome može zaključiti da početna koncentracija glukoze u podlozi pri većem broju okretaja od 150 i 200 min^{-1} nema utjecaja na prinos 2,3-butandiola. Pri uzgoju na 150 min^{-1} i 200 min^{-1} , broj okretaja uvjetuje maksimalnu moguću koncentraciju 2,3-butandiola koja se može postići, neovisno o koncentraciji dostupne glukoze u podlozi, što je istovjetno uočenome tijekom diskusije o potrošnji supstrata.

Usporedbom postignutih prinosa 2,3-butandiola uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na različitim početnim koncentracijama ksiloze u podlozi sa rezultatima postignutih prinosa uzgoja bakterije na glukozi pri 50 , 150 i 200 min^{-1} jasno je vidljivo da se uzgojem na glukozi postižu značajno viši prinosi 2,3-butandiola (slike 6, 7 i 8). Najveći prinos 2,3-butandiola $6,44 \text{ g L}^{-1}$ postignut uzgojem na podlozi sa 20 g L^{-1} glukoze je 3 puta veći u odnosu na najveći prinos 2,3-butandiola od $2,06 \text{ g L}^{-1}$ postignut uzgojem na podlozi sa 10 g L^{-1} ksiloze.

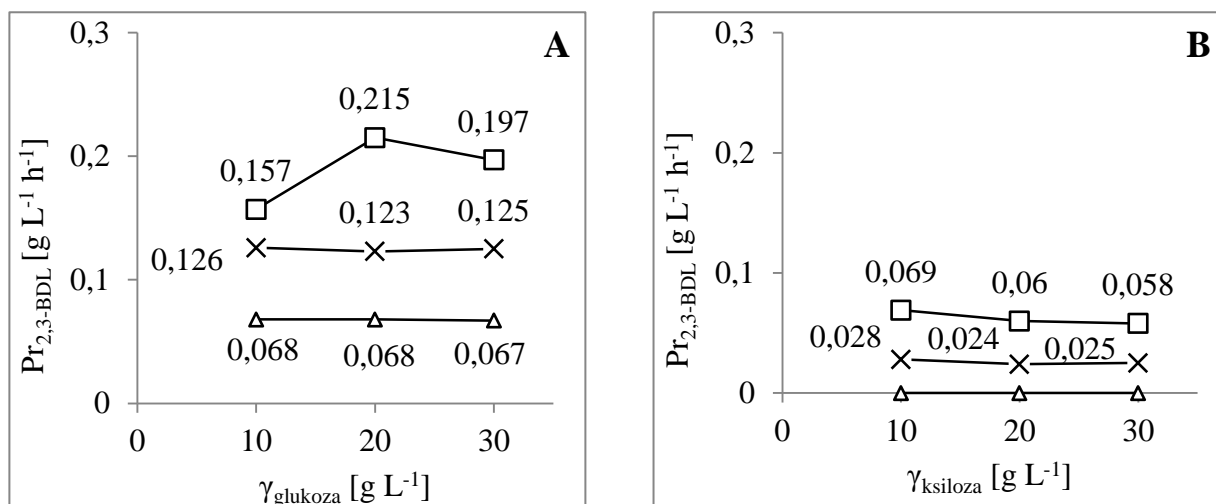
Fermentacijom ksiloze i glukoze bakterija *P. polymyxa* DSM 742 uz 2,3-butandiol proizvodi i mliječnu kiselinu i etanol (slike 6, 7 i 8). Može se uočiti da se povećanjem početne koncentracije glukoze u podlozi povećava prinos nastale mliječne kiseline, što je osobito izraženo pri 50 i 200 min^{-1} . Najveće koncentracije mliječne kiseline uzgojima na broju okretaja 50 , 150 i 200 min^{-1} postignute su sa početnom koncentracijom glukoze u podlozi od 20 i 30 g L^{-1} , te iznose $2,92 \text{ g L}^{-1}$ i $2,91 \text{ g L}^{-1}$, dok je pri 10 g L^{-1} glukoze u podlozi proizvedeno 30% manje mliječne kiseline.

Bitno je uočiti da na proizvodnju mliječne kiseline tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 izraženiji utjecaj ima broj okretaja nego početna koncentracija glukoze. Naime, uspoređujući rezultate uzgoja u podlogama sa početnih 10 , 20 i 30 g L^{-1} glukoze, najviši prinosi mliječne kiseline pri svim navedenim koncentracijama postignuti su uzgojem pri broju okretaja od 150 min^{-1} gdje su na kraju uzgoja postignute su gotovo identične koncentracije

mliječne kiseline i iznose 2,74-2,76 g L⁻¹. Prinos mliječne kiseline pri tom broju okretaja ne ovisi o početnoj koncentraciji glukoze u podlozi, kao što je to slučaj pri 50 i 200 min⁻¹.

Slično se može vidjeti i iz prinosa mliječne kiseline fermentacijom ksiloze uzgojem bakterije *P. polymyxa* DSM 742 gdje su najveći prinosi mliječne kiseline postignuti pri broju okretaja od 150 min⁻¹. Uzgojem na broju okretaja od 50 min⁻¹ postignuti su 4 puta manji prinosi mliječne kiseline na ksilozi kao supstratu (0,17 do 0,4 g L⁻¹) u odnosu na prinose pri 150 min⁻¹, dok pri 200 min⁻¹ uopće nije proizvedena mliječna kiselina. Međutim, suprotno trendu uočenom uzgojem bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na glukozi kao supstratu, uzgojem na ksilozi vidljivo je da povećanje početne koncentracije ksiloze u podlozi značajno smanjuje prinos mliječne kiseline pa je najviše mliječne kiseline (0,81 g L⁻¹) proizvedeno je u podlozi sa početnom koncentracijom ksiloze od 10 g L⁻¹ pri 150 min⁻¹.

Na prinos etanola (slike 6, 7 i 8) tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na glukozi utječe broj okretaja, dok utjecaj početne koncentracije glukoze u podlozi nije izražen. Najveći prinos od 2,33 g L⁻¹ postignut je pri 50 min⁻¹, i to uz početnu koncentraciju glukoze od 20 g L⁻¹, a niži prinosi su uočeni uzgojima pri 150 i 200 g L⁻¹. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na ksilozi kao izvoru ugljika može se uočiti trend povećanja prinosa etanola sa povećanjem početne koncentracije ksiloze u podlozi, a smanjenja sa povećanjem broja okretaja pa su najveći prinosi uzgojem na ksilozi postignuti pri 50 min⁻¹ i početnom koncentracijom ksiloze 30 g L⁻¹ u podlozi.



Slika 9. Produktivnost procesa proizvodnje 2,3-butandiola uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na glukozi (A) i ksilozi (B) kao izvoru ugljika pri različitom broju okretaja (-□- 50 min⁻¹, -x- 150 min⁻¹, -Δ- 200 min⁻¹)

Na slici 9 vidljivo je da broj okretaja značajno utječe na produktivnost procesa proizvodnje 2,3-butandiola tijekom uzgoja na oba supstrata. Povećanjem broja okretaja dolazi do smanjenja produktivnosti pri svakoj od ispitivanih početnih koncentracija glukoze i ksiloze u podlozi.

Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlozi sa početnom koncentracijom glukoze 10, 20 i 30 g L⁻¹ pri 50 min⁻¹ postignute su najveće vrijednosti produktivnosti, a iznose: 0,157 g L⁻¹ h⁻¹, 0,215 g L⁻¹ h⁻¹ i 0,197 g L⁻¹ h⁻¹. Povećanjem broja okretaja na 150 i 200 min⁻¹ produktivnost se smanjuje za 20 - 43 % na 0,123 - 0,126 g L⁻¹ h⁻¹ kod uzgoja pri 150 min⁻¹ te čak za 60 - 68 % na 0,067 - 0,068 g L⁻¹ h⁻¹ za uzgoj pri 200 min⁻¹.

Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na ksilozi kao izvoru ugljika također se uočava da povećanjem broja okretaja dolazi do značajnog smanjenja produktivnosti procesa proizvodnje 2,3-butandiola, pri čemu su najveće vrijednosti postignute uzgojem pri 50 min⁻¹, tri puta manje uzgojem pri 150 min⁻¹, a uzgojem pri 200 min⁻¹ produktivnost procesa proizvodnje je 0 g L⁻¹ h⁻¹, obzirom da uopće ne nastaje 2,3-butandiol. Najveća postignuta produktivnost od 0,064 g L⁻¹ h⁻¹ je pri 50 min⁻¹ i 10 g L⁻¹ početne koncentracije ksiloze u podlozi. Produktivnost uzgoja na ksilozi kao supstratu je 3 puta manja pri svim brojevima okretaja i početnim

koncentracijama ksiloze u odnosu na produktivnost procesa proizvodnje 2,3-butandiola fermentacijom glukoze.

Utjecaj početne koncentracije supstrata u podlozi pri 50 min⁻¹ na produktivnost odgovara utjecaju na prinos 2,3-butandiola, dok pri 150 i 200 min⁻¹ nije izražen utjecaj početne koncentracije supstrata na produktivnost procesa proizvodnje 2,3-butandiola, što također odgovara uočenom tijekom diskusije o utjecaju početne koncentracije supstrata na potrošnju glukoze ili ksiloze tijekom rasta i prinos 2,3-butandiola.

Tablica 9. Koeficijent konverzije supstrata u produkt 2,3-butandiol tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

$Y_{2,3\text{-BDL/GLC}}$ [g g ⁻¹]	Glukoza			
	Broj okretaja [min ⁻¹]	Koncentracija u podlozi		
		10 g L ⁻¹	20 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
50	0,47	0,41	0,29	
150	0,39	0,37	0,41	
200	0,23	0,22	0,12	
$Y_{2,3\text{-BDL/XYL}}$ [g g ⁻¹]	Ksiloza			
	Broj okretaja [min ⁻¹]	Koncentracija u podlozi		
		10 g L ⁻¹	20 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
	50	0,15	0,29	0,27
	150	0,22	0,19	0,16
200	-	-	-	

Najveći koeficijent konverzije (tablica 9) glukoze u 2,3-butandiol postignut je sa početnom koncentracijom glukoze 10 g L⁻¹ u podlozi pri 50 min⁻¹ i iznosi 0,47 g g⁻¹, što čini 70 % teorijske konverzije glukoze u 2,3-butandiol. Međutim, postignuta koncentracija 2,3-butandiola je 27 % niža pa su na osnovu najvećeg postignutog prinosa 2,3-butandiola i produktivnosti odabrani najbolji uvjeti za proizvodnju 2,3-butandiola pri 30 °C: pH 6,5, broj okretaja 50 min⁻¹ i početna koncentracija glukoze u podlozi 20 g L⁻¹. Uzgojem u takvim uvjetima postignuto je 61 % teoretske konverzije, uz zanemarivo nastajanje mliječne kiseline (0,33 g L⁻¹), ali uz značajan

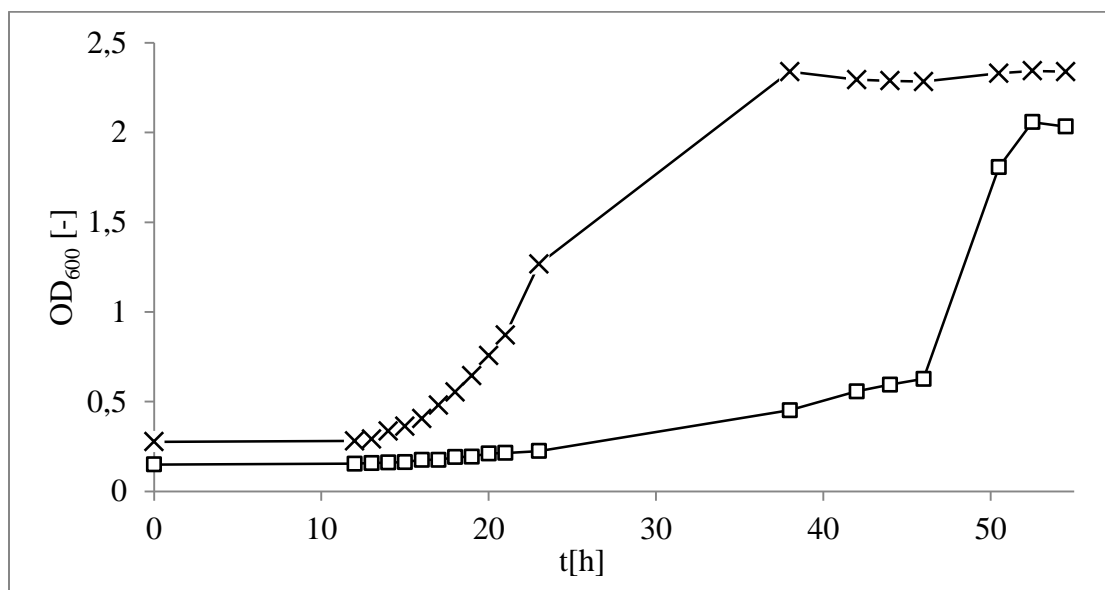
prinos etanola ($2,33 \text{ g L}^{-1}$). Koeficijenti konverzije ksiloze u 2,3-butandiol su niži u odnosu na koeficijent konverzije glukoze u 2,3-butandiol pri svim ispitivanim početnim koncentracijama supstrata u podlozi pri 50 i 150 min^{-1} .

4.3. UTJECAJ ACETATA NA RAST I KINETIKU SINTEZE PRODUKTA TIJEKOM UZGOJA BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Prema Maddox (1996) nakupljanje acetata potiče fermentaciju glukoze do 2,3-butandiola pa se proveo uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz dodatak acetata kao potencijalnog stimulatora proizvodnje 2,3-butandiola. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 provodio se u Erlenmeyerovim tikvicama na kemijski definiranim podlogama sastava soli, faktora rasta i izvora dušika prema tablici 5 te odabranoj optimalnoj koncentraciji glukoze od 20 g L^{-1} pri pH 6,5 i $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Utjecaj acetata na rast i sintezu produkta ispitivao se na dva načina: dodatkom različitih koncentracija acetata u podlogu tijekom pripreme same podloge zajedno sa ostalim sastojcima podloge navedenih u tablici 5 i dodatkom različitih koncentracija acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Cilj dodavanja acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta jest istraživanje mogućnosti postizanja većih prinosa 2,3-butandiola podešavanjem uvjeta tako da se uzgoji što više biomase koja će onda uz acetat kao induktor i broj okretaja od 50 min^{-1} proizvesti veće količine 2,3-butandiola u odnosu na prethodno provedene uzgoje.

Utjecaj 5 , 10 , 15 i 20 g L^{-1} acetata u podlozi na uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 ispitivao se pri 50 o min^{-1} koji je prethodno odabran kao najbolji za proizvodnju 2,3-butandiola. Utjecaj acetata dodanog u kasnoj eksponencijalnog fazi rasta na uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 ispitivao se uzgojem biomase pri 200 min^{-1} do dostizanja eksponencijalne faze rasta, nakon čega je u tikvice dodan izračunati volumen koncentrirane otopine amonijeva acetata, takav da se u tikvicama postigne koncentracija 5 , 10 , 15 i 20 g L^{-1} acetata, a broj okretaja je smanjen na 50 min^{-1} . 200 o min^{-1} odabrano je na osnovu istraživanja u poglavlju 4.2. radi postizanja najbržeg rasta biomase prije dodatka acetata, a smanjenjem okretaja na 50 min^{-1} nakon dodatka acetata u podlogu podešeni su prethodno određeni najbolji uvjeti za proizvodnju 2,3-butandiola.

Tijekom ispitivanja utjecaja 5, 10, 15 i 20 g L⁻¹ acetata u podlozi, rast biomase praćen je mjerenjem optičke gustoće što je prikazano na slici 10. U tikvicama sa koncentracijom acetata 15 i 20 g L⁻¹ u podlozi nije došlo do rasta biomase niti metabolitičke aktivnosti, stoga rezultati za te uzgoje nisu prikazani u ovom radu.

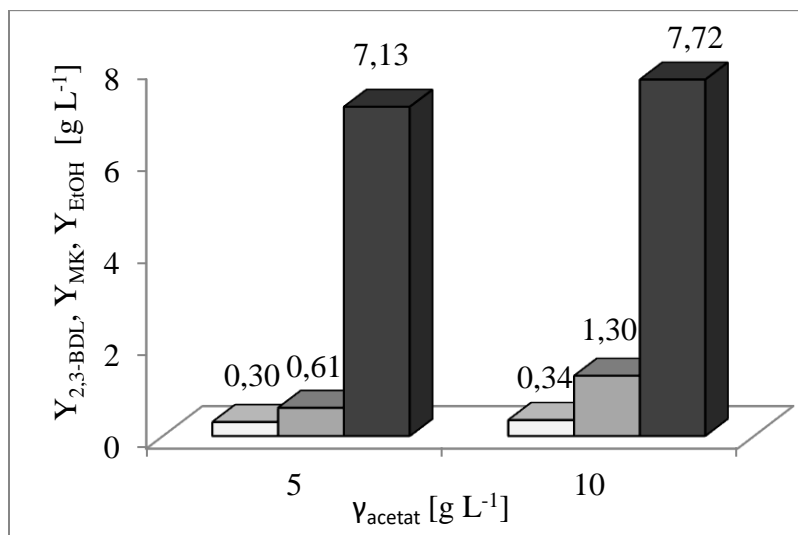


Slika 10. Promjena izmjerene OD [-] vrijednosti tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlozi sa 5 i 10 g L⁻¹ acetata (-x- 5 g L⁻¹, -□- 10 g L⁻¹)

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlozi sa 5 i 10 g L⁻¹ acetata praćen je tijekom 52,5 h. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlozi sa 5 g L⁻¹ acetata lag faza je trajala 16 sati, što je iznimno dugo obzirom da je u svim prethodno opisanim eksperimentima lag faza trajala znatno kraće, a podloga je također sadržavala 5 g L⁻¹ acetata. Konkretno, trajanje lag faze je 2 puta duže u odnosu na istovjetan uzgoj opisan u poglavlju 4.2. (20 g L⁻¹ glukoze pri 50 min⁻¹). Značajno odstupanje je moguće objasniti upotrebom starijeg inokuluma u odnosu na prethodne eksperimente. Uzgojem na podlozi koja je sadržavala 10 g L⁻¹ acetata lag faza je trajala čak 46 sati, nakon čega nastupa eksponencijalna faza u trajanju od 6,5 sati.

Iz navedenog se može zaključiti bakterija da *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 podnosi do 10 g L⁻¹ početne koncentracije acetata u podlozi, uz produženje faze prilagodbe, a pri koncentracijama od 15 i 20 g L⁻¹ dolazi do potpune inhibicije rasta i aktivnosti.

Postignuti prinosi produkata fermentacije: mliječne kiseline, etanola i 2,3-butandiola na kraju uzgoja prikazani su na slici 11.

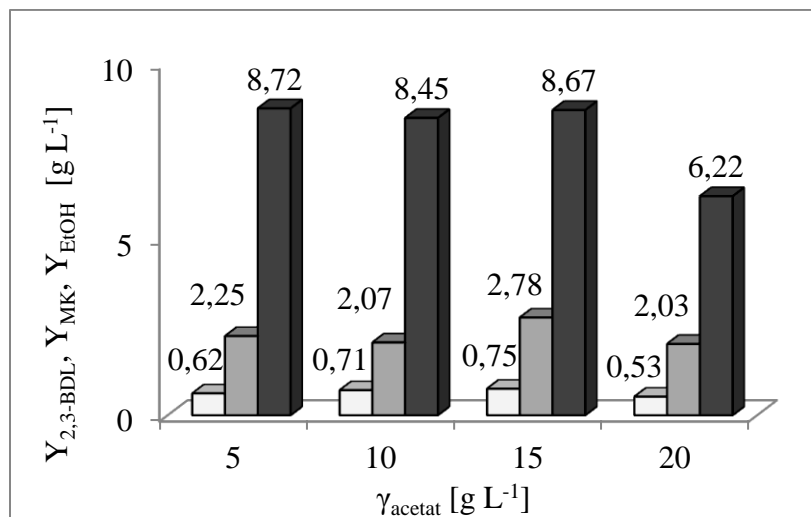


Slika 11. Prinos produkata fermentacije tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlozi sa 5 i 10 g L⁻¹ acetata (□ mliječna kiselina, ■ etanol, ■ 2,3-butandiol)

Uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na podlozi sa 5 g L⁻¹ acetata istovjetan je uzgoju sa 20 g L⁻¹ glukoze pri 50 min⁻¹ što su parametri odabrani kao najbolji za proizvodnju 2,3-butandiola pa stoga ovaj uzgoj služi kao kontrola utjecaja povećane koncentracije acetata dodanog u podlogu na rast biomase i proizvodnju 2,3-butandiola. Tijekom 52.5 h uzgoja, utrošeno je 16,41 g L⁻¹ glukoze uz sintezu 7,13 g L⁻¹ 2,3-butandiola. Koeficijent konverzije glukoze u 2,3-butandiol iznosi 0,43 g g⁻¹, a produktivnost procesa proizvodnje 2,3-butandiola je 0,131 g L⁻¹ h⁻¹. U odnosu na istovjetni uzgoj u poglavlju 4.2. (20 g L⁻¹ glukoze i 50 min⁻¹) postignuta je 10 % viša koncentracija 2,3-butandiola, ali uz 22 sata duže trajanje procesa, zbog čega je produktivnost 40 % manja (slika 9; tablica 10).

Uzgojem na podlozi sa 10 g L^{-1} acetata nakon 52,5 h utrošeno je $18,54 \text{ g L}^{-1}$ glukoze pri čemu je proizvedeno $7,72 \text{ g L}^{-1}$ 2,3-butandiola, uz koeficijent konverzije $0,42 \text{ g g}^{-1}$ i produktivnost $0,142 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Postignuta koncentracija 2,3-butandiola je za $0,59 \text{ g L}^{-1}$ viša u odnosu na koncentraciju 2,3-butandiola postignutu uzgojem na podlozi sa 5 g L^{-1} acetata što je povećanje od svega 7,6 %. Može se zaključiti da 10 g L^{-1} acetata u podlozi u utječe na blago povećanje prinosa 2,3-butandiola, ali istovremeno produžuje trajanje procesa i time smanjuje produktivnost proizvodnje 2,3-butandiola. Koncentracija octene kiseline na kraju uzgoja je manja u odnosu na početnih 5 i 10 g L^{-1} što znači da je dio acetata utrošen tijekom rasta.

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz dodatak acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi praćen je tijekom 36 sati, a na slici 12 prikazani su prinosi produkata fermentacije. Cilj dodavanja acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta jest istraživanje mogućnosti postizanja većih prinosa 2,3-butandiola podešavanjem uvjeta tako da se uzgoji što više biomase koja će onda uz acetat kao induktor i broj okretaja od 50 min^{-1} proizvesti veće količine 2,3-butandiola u odnosu na prethodno provedene uzgoje.



Slika 12. Prinosi produkata fermentacije tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 sa dodatkom 5, 10, 15 i 20 g L^{-1} amonijevog acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta (□ Mliječna kiselina, ■ Etanol, ■ 2,3-butandiol)

Koncentracije 2,3-butandiola u trenutku dodatka 5, 10, 15 i 20 g L⁻¹ amonijeva acetata u kasnoj ekspanzionalnoj fazi (slika 12) nakon 12 h uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 iznosile su redom 4,60 g L⁻¹, 6,13 g L⁻¹, 5,16 g L⁻¹ i 5,32 g L⁻¹, a nakon 36 sati uzgoja, na kraju procesa, ukupno je proizvedeno 8,72 g L⁻¹, 8,45 g L⁻¹, 8,67 g L⁻¹ i 6,22 g L⁻¹ 2,3-butandiola. Koncentracija postignutog 2,3-butandiola dodatkom 20 g L⁻¹ amonijevog acetata manja je za 27 % u odnosu na ostale prinose što uz zabilježeni pad izmjerene vrijednosti optičke gustoće u izuzetim uzorcima za navedeni uzgoj upućuje na pojavu inhibicijskog učinka dodatka 20 g L⁻¹ acetata na rast i aktivnost bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Koncentracija 2,3-butandiola u odnosu na već proizvedeni 2,3-butandiol nakon dodatka amonijevog acetata povećala se redom za: 45,2 %, 29,5 %, 43,9 % i 20,9 %. Obzirom da se postignute koncentracije 2,3-butandiola na kraju procesa u tikvicama gdje je dodano 5, 10 i 15 g L⁻¹ acetata razlikuju u svega 0,04 do 0,24 g L⁻¹, prema najvećem postotku povećanja 2,3-butandiola odabrana je najbolja koncentracija acetata od 5 g L⁻¹ dodanog u ekspanzionalnoj fazi za povećanje prinosa proizvodnje 2,3-butandiola.

Koncentracija nastale mliječne kiseline je gotovo zanemariva, obzirom da je detektirano najviše 0,56 g L⁻¹, a koncentracija detektiranog etanola je viša i iznosi 2,07 g L⁻¹, 2,25 g L⁻¹, 2,78 g L⁻¹ i 2,03 g L⁻¹ za uzgoje sa dodatkom 5, 10, 15 i 20 g L⁻¹ amonijevog acetata.

U usporedbi s referentnim prinosom 2,3-butandiola od 6,44 g L⁻¹ postignutim tijekom uzgoja pri 50 min⁻¹ i 20 g L⁻¹ glukoze u podlozi opisanog u poglavlju 4.2, dodatkom 5 g L⁻¹ acetata u kasnoj ekspanzionalnoj fazi postignuto je povećanje prinosa 2,3-butandiola od 26 %, što je 3,5 puta veće povećanje prinosa u odnosu na uzgoj sa 10 g L⁻¹ acetata u podlozi na početku uzgoja.

Parametri upješnosti uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na različitim koncentracijama amonijevog acetata u podlozi i uz dodatak u kasnoj ekspanzionalnoj fazi prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Parametri uspješnosti procesa proizvodnje 2,3-butandiola tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri 50 min^{-1} , početnoj koncentraciji glukoze od 20 g L^{-1} i s a) 5 i 10 g L^{-1} acetata u podlozi; b) dodatkom 5, 10, 15 i 20 g L^{-1} acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi

	Koncentracija acetata [g L^{-1}]					
	Podloga		Eksponencijalna faza			
	5	10	5	10	15	20
ΔS_{GLC} [g L^{-1}]	16,41	18,54	19,01	15,00	19,06	18,90
$Y_{2,3\text{-BDL}}$ [g L^{-1}]	7,13	7,72	8,67	6,22	8,72	8,45
$Y_{2,3\text{-BDL/GLC}}$ [g g^{-1}]	0,43	0,42	0,46	0,42	0,46	0,45
$Pr_{2,3\text{-BDL}}$ [$\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$]	0,131	0,142	0,241	0,173	0,242	0,235

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 prikazanih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 ne raste niti pokazuje metaboličku aktivnost pri pH vrijednosti podloge 3, 4 i 5, a raste pri pH podloge 6,5 i fermentira glukozu do mliječne kiseline, etanola i 2,3-butandiola. Obzirom da ne raste u području kiselih pH vrijednosti, nije pogodna za fermentaciju kiselinskih hidrolizata lignocelulozne biomase bez prethodnog podešavanja pH na 6,5.
2. Bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 fermentira glukozu i ksilozu do mliječne kiseline, etanola i 2,3-butandiola pri svim testnim brojevima okretaja ($50, 150$ i 200 min^{-1}), a povećanjem broja okretaja skraćuje se trajanje *lag* faze i eksponencijalne faze i ubrzava rast biomase.
3. Smanjenjem broja okretaja tijekom fermentacije ispitivanih izvora ugljika, glukoze i ksiloze, sa bakterijom *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 povećava se prinos 2,3-butandiola, a veći prinosi 2,3-butandiola postižu se fermentacijom glukoze u odnosu na fermentaciju ksiloze kao izvora ugljika. Najveći prinos 2,3-butandiola ($6,44 \text{ g L}^{-1}$) je postignut pri 50 min^{-1} na podlozi sa početnom koncentracijom glukoze 20 g L^{-1} uz koeficijent koverzije $0,41 \text{ g g}^{-1}$, a najveći postignuti prinos 2,3-butandiola ($2,06 \text{ g L}^{-1}$) na podlogama sa ksilozom kao izvorom ugljika pri 50 min^{-1} i početnom koncentracijom ksiloze u podlozi 10 g L^{-1} je 3 puta manji.
4. Produktivnost 2,3-butandiola povećava se smanjenjem broja okretaja, a utjecaj početne koncentracije supstrata u podlozi ($10, 20$ i 30 g L^{-1}) nije značajan. Fermentacijom glukoze pri 50 min^{-1} postižu se najveće produktivnosti ($0,157 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $0,215 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ i $0,197 \text{ g L}^{-1}$), a produktivnost fermentacije ksiloze do 2,3-butandiola značajno je manja u odnosu na glukozu. Najveće produktivnosti 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze postignute su pri 50 min^{-1} ($0,069 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $0,060 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ i $0,058 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).
5. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na 20 g L^{-1} glukoze u podlozi pri 200 min^{-1} i pH 6,5 te dodatkom 5 g L^{-1} acetata u kasnoj eksponencijalnoj fazi uz smanjenje broja okretaja na 50 min^{-1} prinos 2,3-butandiola se povećava za 26 % na $8,72 \text{ g L}^{-1}$, uz koeficijent konverzije $0,46 \text{ g g}^{-1}$ i produktivnost $0,242 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

6. POPIS LITERATURE

Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J., Teixeira de Mattos, M. J. (2003) Requirement of ArcA for Redox Regulation in *Escherichia coli* under Microaerobic but Not Anaerobic or Aerobic Conditions. *J. Bacteriol.* **185**, 204-209.

Biebl, H., Zeng, A. P., Menzel, K., Deckwer, W. D. (1998) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 24–29.

Celińska, E., Grajek, W. (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol - Current state and prospects. *Biotechnol. Adv.* **27**, 715-725.

Chang, Z.-Q., Lee, J.-S., Gebru, E., Hong, J.-H., Jung, H.-K., Jo, W.-S., Park, S.-C. (2010) Mechanism of macrophage activation induced by β -glucan produced from *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**(3), 1358-1362.

Cho, S. M., Kang, B. R., Han, S. H., Anderson, A. J., Park, J. Y., Lee, Y. H., Cho, B. H., Yang, K. Y., Ryu, C. M., Kim, Y. C. (2008) 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**,1067-1075.

Clark, D. P. (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *Microbiol. Lett.* **63**, 223-234.

Converti, A., Perego, P. (2002) Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 303–309.

Converti, A., Perego, P., Del Borghi, M. (2003) Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 370–377.

D'Alessandro, M. D., Erb, M., Ton, J., Brandenburg, A., Karlen, D., Zopfi, J. (2014) Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant Cell Environ.* **37**, 813–826.

- Daud, N. S., Din, A. R. J. M., Rosli, M. A., Azam, Z. M., Othman, N. Z., Sarmidi, M. R. (2019) *Paenibacillus polymyxa* bioactive compounds for agricultural and biotechnological applications. *Biocatal. Agric. Biotechn.* **18**, 092-101.
- De Mas, C., Jansen, N. B., Tsao, T. (1988) Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 366–377.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S. (2012) Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* **87**(2), 951-962.
- Dziewulski, D. M., Haughney, H. A., Das, K., Nauman, E. B. (1986) Fed-batch with biomass recycle and batch production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus polymyxa*. *J. Biotechnol.* **4**, 171–180.
- Fages, J., Mulard, D., Rouquet, J. J., Wilhelm, J. L. (1986) 2,3-Butanediol production from Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus*, by *Bacillus polymyxa* ATCC 12321. Optimization of kLa profile. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 197–202.
- Faveri, D. D., Torre, P., Molinari, F., Perego, P., Converti, A. (2003) Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 708-719.
- Flickinger, M. C. (1980) Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 27-48.
- Fulmer, E. I., Christensen, L. M., Kendall, A. R. (1933) Production of 2,3-butylene glycol by fermentation. *Ind. Eng. Chem.* **25**, 798-800.
- Garg, S. K., Jain, A. (1995) Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresour. Technol.* **51**, 103-109.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z. C. (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell Fact.* **1**(1), 203-215.

- Gräffe, H., Körnig, W., Weitz, H.-M., Reiß, W., Steffan, G., Diehl, H., Bosche, H., Schneider, K., Kieczk, H., Pinkos, R. (2000) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Butanediols, Butenediol, and Butynediol. str. 1–12.
- Gouzou, L., Burtin, G., Philippy, R., Bartoli, F., Heulin, T. (1993) Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. *Geoderma*. **56**, 479–491.
- Guemori-Athmani, S., Berge, O., Bourrain, M., Mavingui, P., Thiéry, J. M., Bhatnagar, T., Heulin, T. (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* **36**, 149–159.
- Gwehenberger G., Narodoslowsky M. (2008) Sustainable Processes – The Challenge of the 21st Century for Chemical Engineering. *Process Saf. Environ.* **86** (5), 321-327.
- Han, S. H., Lee, S. J., Moon, J. H., Park, K. H., Yang, K. Y., Cho, B. H. (2006) GacS-dependent production of 2R,3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 924–930.
- Harden, A., Walpole, G. (1906) 2,3-Butylene glycol fermentation by *Aerobacter aerogenes*. *Proc. R. Soc. Lond.* **77**, 399-405.
- Hazeena, S. H., Sindhu, R., Pandey, A., Binod, P. (2020) Lignocellulosic bio-refinery approach for microbial 2,3-Butanediol production. *Bioresour. Technol.* **302**. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122873
- 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.
- He, Z., Kisla, D., Zhang, L., Yuan, C., Green-Church, K. B., Yousef, A. E. (2007) Isolation and identification of *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl. envirom. microb.* **73**(1), 168-78.

- Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E. L., Howard, S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* **2**(12), 602–619.
- Jansen, N. B., Tsao, G. T. (1983) Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **27**, 85–99.
- Javidnia, K., Mirzaei, E., Attaroshan, M., Zomorodian, K. (2016) Biotransformation of acetoin to 2,3-butanediol: Assessment of plant and microbial biocatalysts. *Res. Pharm. Sci.* **11**, 349-354.
- Ji, X. J., Huang, H., Zhu, J. G., Ren, L. J., Nie, Z. K., Du, J. (2010) Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1751–1758.
- Ji, X.-J., Huang, H., Ouyang, P.-K. (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol. Adv.* **29**, 351-364.
- Kajimura, Y., Kaneda, M. (1997) Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot.* **50**, 220–228.
- Kong, H. G., Shin, T. S., Kim, T. H., Ryu, C. M. (2018) Stereoisomers of the Bacterial Volatile Compound 2,3-Butanediol Differently Elicit Systemic Defense Responses of Pepper against Multiple Viruses in the Field. *Front Plant Sci.* **9**, 90. Objavljeno online 22. veljače 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.00090.
- Kosaric, N., Magee, R., Blaszczyk, R. (1992) Redox potential measurement for monitoring glucose and xylose conversion by *K. pneumoniae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **6**, 145–152.
- Lal, S., Tabacchioni, S. (2009) Ecology and biotechnology potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J. Microbiol.* **49**, 2-10.
- Laube, V. M., Groleau, D., Martin, S. M. (1984) 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol. Lett.* **6**, 257–262.
- López-Contreras A. M., , Kuit W., Siemerink M. A. J., Kengen S. W. M. , Springer J., Claassen P. A. M (2010) 16 - Production of longer-chain alcohols from lignocellulosic biomass: butanol,

isopropanol and 2,3-butanediol U: Woodhead Publishing Series in Energy, Bioalcohol Production, (Waldron, K., ured.) Woodhead Publishing, str. 415-460.

Ma, C. Q., Wang, A. L., Qin, J. Y., Li, L. X., Ai, X. L., Jiang, T. Y. (2009) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 49–57.

Maddox, I. S. (1996) Microbial production of 2,3-butanediol. U: Biotechnology, (Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., ured.). 2nd Edition. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, str. 269–291.

Maina, S., Mallouchos, A., Nychas, G. J. E., Freire, D. M. G., de Castro, A. M., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., Koutinas, A. (2019) Bioprocess development for (2R,3R)-butanediol and acetoin production using very high polarity cane sugar and sugarcane molasses by *Bacillus amyloliquefaciens* strain. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **94**, 2167-2177.

Maximize Market Research, Chemicals and Materials (2020) Global 2,3-Butanediol Market-Industry Analysis and Forecast (2020-2027)- By Type, Application, and Region. <<https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/global-23-butanediol-market/65350/>> Pristupljeno 23.8.2021.

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.

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.

National Center for Biotechnology Information-NCBI, PubChem (2021) PubChem Compound Summary for CID 262, 2,3-Butanediol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Butanediol> Pristupljeno 22. kolovoza 2021.

Okonkwo, C. C., Ujor, V. C., Mishra, P. K., Ezeji, T. C. (2017) Process Development for Enhanced 2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Fermentation.* **3**(32), 18-24.

- Okonkwo, C. C., Ujor, V., Ezeji, T. C. (2021) Production of 2,3-butanediol from non-detoxified wheat straw hydrolysate: Impact of microbial inhibitors on *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Ind. Crops Prod.* str. 159.
- Raza, W., Makeen, K., Wang, Y., Xu, Y., Qirong, S. (2011) Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharides produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresour. Technol.* **102**, 6095–6103.
- Schilling, C., Ciccone, R., Sieber, V., Schmid, J. (2020) Engineering of the 2,3-butanediol pathway of *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Metab. Eng.* **61**, 381-388.
- Singh, H. P., Singh, T. A. (1993) The interaction of rockphosphate, Bradyrhizobium, vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilizing microbes on soybean grown in a sub Himalayan mollisol. *Mycorrhiza* **4**, 37–43.
- Song, C. W., Park, J. M., Chung, S. C., Lee, S. Y., Song, H. (2019) Microbial production of 2,3-butanediol for industrial applications. *J. Ind. Microb. Biot.* **46**, 1583–1601.
- Stryer, L. (1991) Biokemija, 2. izd. (preveli Vuk-Pavlović, S. i sur.) Školska knjiga, Zagreb.
- Syu, M. J. (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 10-18.
- Silveira, M. M., Schmidell, W., Berbert, M. A. (1993) Effect of the air supply on the production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. *J. Biotechnol.* **31**, 93-102.
- Timmusk, S., Grantcharova, N., Wagner, E. G. H. (2005) *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl. Environ. Microb.* **71**(11), 7292-7300.
- Tinôco, D., Pateraki, C., Koutinas, A. A., Freire, D. M. G. (2021) Bioprocess Development for 2,3-Butanediol Production by *Paenibacillus* Strains. *Chem. Bio. Eng. Rev.* **8**(1), 44-62.
- Transparency Market Research, Chemicals & Materials (2020) 2,3-Butanediol Market (Application: Intermediate Chemicals, Plastics, Food Additives, Cosmetics, and Others [Pesticides and Anti-freeze Agents]) - Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2020-2030. <<https://www.transparencymarketresearch.com/2-3-butanediol-market.html>> Pristupljeno 28. kolovoza 2021.

- van Haveren, J., Scott, E. L., Sanders, J. (2008) Bulk chemicals from biomass. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **2**, 41-57.
- Van Houdt, R., Aertsen, A., Michiels, C. W. (2007) Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH- 1N. *Res. Microbiol.* **158**, 379–385.
- Voloch, M., Jansen, N. B., Ladish, M. R., Tsao, G. T., Narayan, R., Rodwell, V. W. (1985) 2,3-Butanediol. U: Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine, (Blanch, H.W., Drew, S., Wang, D.I.C., ured.). Pergamon/ Elsevier, Oxford, str. 933–944.
- von der Weid, I. A., Paiva, E., Nóbrega, A., van Elsas, J. D., Seldin, L. (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Res. Microbiol.* **151**, 369–381.
- Wang, C., Huang, T., Liang, T., Fang, C., Wang, S. (2011) Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023. *N. Biotech.* **28**, 559–565.
- Wu, K. J., Saratale, G. D., Lo, Y. C., Chen, W. M., Tseng, Z. J., Chang, M. C. (2008) Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **99**, 7966-7970.
- Xiao, Z., Xu, P. (2007) Acetoin metabolism in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **33**, 127–140.
- Yang, Z., Zhang, Z. (2019) Recent advances on production of 2,3-butanediol using engineered microbes. *Biotechnol. adv.* **37**(4), 569-578.
- Zittel W., Schindler J. (2009) Projections of Fossil Energy and Supply until 2050 (2100): Implications for Longer-term Energy Supply Security. U: Facing Global Environmental Change: Environmental, Human, Energy, Food, Health and Water Security Concepts, (Brauch H. G., Behera N. C., Kameri-Mbote P., Grin J., Oswald Spring U., Chourou B., Mesjasz C., Krummenacher H., ured.), Springer Science & Business Media, Berlin, pogl. 25.
- Zhang, L. Y., Yang, Y. L., Sun, J. A., Shen, Y. L., Wei, D. Z., Zhu, J. W. (2010) Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. *Bioresour. Technol.* **101**, 1961–1967.

7. PRILOZI

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

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
GLC	Glukoza	-
XYL	Ksiloza	-
2,3-BDL	2,3-butandiol	-
MK	Mliječna kiselina	-
EtOH	Etanol	-
OD	Optička gustoća	-
X	Biomasa	-
t	Vrijeme uzgoja	H
M	Molarna koncentracija	mol L ⁻¹
γ	Masena koncentracija	g L ⁻¹
γ_{glukoza}	Masena koncentracija glukoze	g L ⁻¹
γ_{ksiloza}	Masena koncentracija ksiloze	g L ⁻¹
γ_{acetat}	Masena koncentracija acetata	g L ⁻¹
ΔS_{GLC}	Potrošnja glukoze	g L ⁻¹
ΔS_{XYL}	Potrošnja ksiloze	g L ⁻¹
$Y_{2,3\text{-BDL}}$	Prinos 2,3-butandiola	g L ⁻¹
Y_{MK}	Prinos mliječne kiseline	g L ⁻¹
Y_{EtOH}	Prinos etanola	g L ⁻¹

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

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
$Y_{2,3\text{-BDL/GLC}}$	Koeficijent konverzije glukoze u 2,3-butandiol	g g^{-1}
$Y_{2,3\text{-BDL/XYL}}$	Koeficijent konverzije ksiloze u 2,3-butandiol	g g^{-1}
$\text{Pr}_{2,3\text{-BDL}}$	Produktivnost proizvodnje 2,3-butandiola	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
SSF	Simultana saharifikacija i fermentacija	-

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

dr. Rajković

Potpis