

Biotehnološki procesi uzgoja termofilne bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na različitim temperaturama te istraživanje inhibitorynog utjecaja mravlje i octene kiseline

Vekić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:452404>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Lucija Vekić

**BIOTEHNOLOŠKI PROCESI
UZGOJA TERMOFILNE
BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM
460 NA RAZLIČITIM
TEMPERATURAMA TE
ISTRAŽIVANJE INHIBITORNOG
UTJECAJA MRAVLJE I OCTENE
KISELINE**

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 HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

Željela bih se zahvaliti svojem mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na svim korisnim savjetima i pomoći te uloženom vremenu i prilici da steknem znanja i razvijem sposobnosti za rad u laboratoriju kao i za pisanje diplomskog rada. Upućujem zahvale i dr. sc. Blanki Ljubas, Marini Grubišić, mag. ing. te Nenadu Marđetku, mag. ing. koji su mi pomagali i savjetovali me tijekom cijelog procesa izrade diplomskog rada te kolegici Stelli s kojom sam surađivala tijekom rada u laboratoriju. Zahvaljujem i dragom Bogu te svojoj obitelji, dečku Ivanu i prijateljima koji su mi tijekom cijelog studija bili neizmjerna podrška i oslonac.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

BIOTEHNOLOŠKI PROCESI UZGOJA TERMOFILNE BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 NA RAZLIČITIM TEMPERATURAMA TE ISTRAŽIVANJE INHIBITORNOG UTJECAJA MRAVLJE I OCTENE KISELINE

Lucija Vekić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058211431

Sažetak: Proizvodnja zelenih kemikalija iz lignoceluloznih sirovina istražuje se kao alternativa proizvodnji kemikalija iz naftnih derivata. Mliječna kiselina pripada skupini zelenih kemikalija te je zbog svojih brojnih primjena važan biotehnološki proizvod. Mliječnu kiselinu sintetizira i bakterija *Bacillus smithii* DSM 460 koja je služila kao proizvodni mikroorganizam u ovom istraživanju. Provedena su istraživanja u kojima je ova bakterija uzgojena na kemijski definiranim podlogama različitih sastava (glukoza i/ili ksiloza) pri različitim temperaturama (40, 50 i 60 °C). Osim toga proveden je i uzgoj na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa u bioreaktoru, koji je rezultirao niskim procesnim parametrima te uzgoji s dodatkom mravlje i octene kiseline kao inhibitora. Optimalna temperatura za uzgoj *B. smithii* DSM 460 i proizvodnju mliječne kiseline bila je 50 °C pri kojoj je postignut prinos mliječne kiseline 7,593 g L⁻¹ te produktivnost 0,262 g L⁻¹ h⁻¹. Pri 60 °C dobivene su nešto niže vrijednosti procesnih parametara, a pri 40 °C su prinosi i produktivnost bili vrlo niski. Dodatak mravlje i octene kiseline u nižim koncentracijama nije utjecao na rast *B. smithii* DSM 460 te na sintezu mliječne kiseline, no pri višim koncentracijama je došlo do potpune inhibicije.

Ključne riječi: *Bacillus smithii* DSM 460, mliječna kiselina, termofil, lignocelulozne sirovine, inhibicija

Rad sadrži: 68 stranica, 28 slika, 6 tablica, 144 literaturna navoda, 2 priloga

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. prof. dr. sc. Božidar Šantek (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Mario Novak (mentor)
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

Datum obrane: 21. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES FOR CULTIVATION OF THE THERMOPHILIC BACTERIUM *Bacillus smithii* DSM 460 AT DIFFERENT TEMPERATURES AND INVESTIGATION OF THE INHIBITORY EFFECT OF FORMIC AND ACETIC ACID

Lucija Vekić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058211431

Abstract: Production of green chemicals from lignocellulosic biomass is being investigated as an alternative to the production of chemicals from petroleum derivatives. Lactic acid belongs to the group of green chemicals and is an important biotechnological product due to its numerous applications. One of the producers of lactic acid is *Bacillus smithii* DSM 460, which was used for this study. This bacterium was grown on chemically defined media of various composition (glucose and/or xylose) at different temperatures (40, 50 and 60 °C). In addition, cultivation was carried out on detoxified hydrolyzate of waste beer wort in bioreactor with stirrer, which resulted in low process parameters, and cultivation with addition of formic and acetic acid as inhibitors. Optimal temperature for the cultivation of *B. smithii* DSM 460 and the production of lactic acid was 50 °C. At that temperature yield of lactic acid was stated at 7.593 g L⁻¹ and productivity at 0.262 g L⁻¹ h⁻¹. Slightly lower values of process parameters were obtained at 60 °C while yields and productivity at 40 °C were very low. Addition of formic and acetic acid at lower concentrations to the media did not affect the growth of *B. smithii* DSM 460 and the production of lactic acid, while higher concentrations resulted in complete inhibition.

Keywords: *Bacillus smithii* DSM 460, lactic acid, thermophil, lignocellulosic biomass, inhibition

Thesis contains: 68 pages, 28 figures, 6 tables, 144 references, 2 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Mario Novak, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Blanka Ljubas, PhD

Reviewers:

1. Božidar Šantek, PhD, Full professor (president)
2. Mario Novak, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (member)
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 21st, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. EKSTREMOFILI	3
2.1.1. Termofili	4
2.1.2. Rod <i>Bacillus</i> i njegova industrijska primjena	4
2.1.3. <i>Bacillus smithii</i>	6
2.2. MLIJEČNA KISELINA	7
2.2.1. Proizvodnja mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Hranjive podloge.....	16
3.1.4. Aparature i uređaji	18
3.1.4.1. Spektrofotometar	18
3.1.4.2. Centrifuge.....	19
3.1.4.3. Vage	19
3.1.4.4. Sušionik.....	19
3.1.4.5. Termostatirana treslilica za mikrobiološke uzgoje.....	19
3.1.4.6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC).....	19
3.1.4.7. Bioreaktori s miješalom	20
3.1.4.8. Visokotlačni reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina.....	22
3.1.4.9. Ostala oprema.....	23
3.2. METODE	23
3.2.1. Predobrada otpadnog pivskog tropa.....	23
3.2.2. Priprema podloge	23
3.2.3. Uzgoj bakterije <i>Bacillus smithii</i> DSM 460	24
3.2.4. Nadzor procesa uzgoja bakterije <i>Bacillus smithii</i> DSM 460	25
3.2.4.1. Određivanje optičke gustoće	25
3.2.4.2. Priprema uzoraka za UPLC analizu	25
3.2.5. Određivanje sastava otpadnog pivskog tropa	25
3.2.5.1. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini (LNTK)	26
3.2.5.2. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini (LTK).....	26

3.2.5.3. Određivanje furana spektrofotometrijski.....	27
3.2.6. Određivanje parametara uspješnosti tijekom uzgoja bakterije <i>Bacillus smithii</i> DSM 460.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 U TIKVICAMA NA PODLOZI S GLUKOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA PRI 40, 50 I 60 °C	30
4.2. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 U TIKVICAMA NA PODLOZI SA KSILOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA PRI 40, 50 I 60 °C.....	33
4.3. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 U TIKVICAMA NA PODLOZI S GLUKOZOM I KSILOZOM KAO IZVORIMA UGLJIKA PRI 40, 50 I 60 °C	36
4.4. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 U TIKVICAMA NA SIMULIRANOJ PODLOZI PRI 40, 50 I 60 °C	39
4.5. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM NA SIMULIRANOJ PODLOZI PRI 50 °C	42
4.6. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM NA DETOKSICIRANOM HIDROLIZATU OTPADNOG PIVSKOG TROPA PRI 50 °C	43
4.7. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 U TIKVICAMA NA SIMULIRANOJ PODLOZI S DODATKOM INHIBITORA (MRAVLJA I OCTENA KISELINA) PRI 50 °C.....	44
4.8. POKAZATELJI USPJEŠNOSTI UZGOJA BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460.	49
5. ZAKLJUČCI	53
6. POPIS LITERATURE.....	54
7. PRILOZI	

1. UVOD

Zelene kemikalije su održive biološke kemikalije koje se smatraju alternativom kemikalija temeljenim na fosilnim resursima (Bosma i sur., 2015a). Neke od važnijih zelenih kemikalija koje se istražuju posljednjih godina su mliječna, fumarna, sukcijska, jabučna, glutaminska i levulinska kiselina. Za njihovu proizvodnju se istražuje mogućnost upotrebe biomase kao sirovine. Glavni izazovi korištenja biomase su učiniti proces proizvodnje ekonomski isplativim s obzirom na visoke troškove postupaka predobrade kojima se dobivaju jednostavni šećeri koje mikroorganizmi mogu metabolizirati. Za proizvodnju zelenih kemikalija najčešće se koriste mezofilni mikroorganizmi koji se uglavnom uzgajaju na sirovinama prve generacije (šećerna repa, šećerna trska, kukuruz). Inženjerstvom modelnih organizama se proširuje spektar potencijalnih supstrata (Buschke i sur., 2013), no učinkovitost procesa bi se također mogla povećati upotrebom organizama koji prirodno razgrađuju šećere lignoceluloznih sirovina (Blumer-Schuetz i sur., 2014). Kako bi se dodatno povećala učinkovitost te smanjili troškovi proizvodnje zelenih kemikalija pomoću mikroorganizama, umjereno termofilni mikroorganizmi nude određene prednosti u odnosu na mezofilne. Smanjenje troškova proizvodnog procesa omogućeno je i korištenjem anaerobnih ili fakultativno anaerobnih bakterija koje ne zahtijevaju upotrebu skupih aeriranih industrijskih reaktora. Takva svojstva ima bakterija *Bacillus smithii*. Ona je fakultativno anaerobna, umjereno termofilna bakterija koja koristi C₅ i C₆ šećere kako bi proizvela mliječnu kiselinu. Mliječna kiselina je organska kiselina često korištena u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Velik interes za korištenjem mliječne kiseline proizlazi iz njene relativno visoke dodane vrijednosti te GRAS statusa (engl. *Generally Recognized As Safe*). Češće se proizvodi biotehnološkim procesima zbog mogućnosti dobivanja čistih izomera (D- ili L-mliječne kiseline). Komercijalna proizvodnja je usmjerena proizvodnji L-mliječne kiseline zbog jednostavne asimilacije u ljudskom organizmu. Druga važna industrijska primjena L-mliječne kiseline je polimerizacija za dobivanje visokokristalne polilaktične kiseline koja je prikladna za proizvodnju vlakana i filmova (Rodrigues i sur., 2017). Osim sinteze mliječne kiseline, istraživači su primijetili sposobnost bakterije *Bacillus smithii* za sintezu acetata u niskim koncentracijama.

Cilj ovoga rada bio je istražiti rast bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na definiranim podlogama koje sadrže ugljikohidrate sadržane u pretretiranim lignoceluloznim sirovinama (glukoza i/ili ksiloza), u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa te na dobivenom detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa. Istraživanja su

provedena pri različitim temperaturama (40, 50 i 60 °C) kako bi se odredila optimalna temperatura za rast bakterijske biomase kao i za proizvodnju mliječne kiseline. Istraživanja na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa i na podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa provedena su u biorektorskim sustavima na temperaturi 50 °C (veće mjerilo) dok su ostala istraživanja provedena u Erlenmeyerovim tikvicama. Obzirom da razgradnjom C₅ i C₆ šećera kao produkt nastaje i acetat, u ovome je radu istraženo inhibitorno djelovanje octene i mravlje kiseline na rast biomase te na sintezu mliječne kiseline.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. EKSTREMOFILNI

Ekstremofil je organizam koji uspijeva rasti ili čak zahtjeva fizički i geokemijski ekstremne uvjete za rast i razmnožavanje, koji su štetni za većinu ostalog živog svijeta na Zemlji. Biolozi su 1980-ih i 1990-ih godina otkrili da određeni mikroorganizmi imaju iznimnu mogućnost prilagođavanja za preživljavanje u ekstremnim uvjetima. Ti ekstremni uvjeti se odnose na ekstreme u području temperature, tlaka, zračenja, saliniteta, pH, prisutnosti toksičnih spojeva i dostupnosti vode. Sukladno tome, postoji velik broj različitih klasa ekstremofila od kojih svaka odgovara uvjetima na koje su se mikroorganizmi prilagodili (Gupta i sur., 2014). Većina ekstremofila pripada domenama arheja, bakterija i eukariota (Rothschild i Mancinelli, 2001). Nekada se ekstremofile smatralo egzotičnim organizmima koje je proučavalo samo nekoliko grupa istraživača, no zadnjih godina su se organizmi koji pripadaju skupini ekstremofila pokazali kao potencijal za korištenje u raznim industrijama, pogotovo u industriji enzima (Van den Burg, 2003). Otkriće novih ekstremofilnih mikroorganizama i njihovih enzima značajno je utjecalo na područje biokatalize.

Mnoge znanstvenike je na istraživanje ekstremofila potaknuo njihov biotehnološki potencijal vezan uz stanične i metaboličke produkte. Metabolički procesi i specifične biološke funkcije ovih mikroorganizama posredovani su enzimima i proteinima koji su odgovorni za neobična svojstva tih organizama. S obzirom na pretpostavku njihovog rasta u ekstremnim okruženjima, pretpostavlja se da su njihovi enzimi prilagođeni za optimalno funkcioniranje u takvim uvjetima. Takvi enzimi (ekstremozimi) pokazuju jedinstvene karakteristike kao što su ekstremna toplinska stabilnost, otpornost na kemijska denaturirajuća sredstva (npr. detergents), kaotropna sredstva, organska otapala i ekstremni pH (Karan i sur., 2011; Gaur i sur., 2010). Ekstremozimi imaju veliki potencijal kao industrijski biokatalizatori u uvjetima u kojima bi se „normalni“ enzimi denaturirali i izgubili aktivnost (Van den Burg, 2003; Hough i Danson, 1999; Niehaus i sur., 1999).

Puno truda je uloženo u razvoj metoda pomoću kojih se može potaknuti proizvodnja ekstremofilne biomase, enzima i biomolekula. Različite skupine istraživača su usvojile različite tehnike za poboljšanje proizvodnje biomase kao što su optimizacija sastava medija (Patel i sur., 2006; Gomes i Steiner, 2004) te korištenje različitih tehnika uzgoja (npr. šaržni, uzgoj s reciklacijom biomase ili kontinuirani uzgoj) (Schiraldi i De Rosa, 2002). Zbog poteškoća

vezanih za uzgoj ekstremofila u većem mjerilu i *downstream* procese izdvajanja ekstremozima, trenutni pokušaji su usmjereni na ekspresiju odgovarajućih gena ekstremofila u mezofilne domaćine (Eichler, 2001).

2.1.1. Termofili

Termofilni mikroorganizmi (optimalna temperatura rasta pri 50 °C ili više) su privukli pažnju znanstvenika jer su izvor termostabilnih enzima (Singh i sur., 2011). Dije se na umjerene termofile (optimalna temperatura rasta između 50 i 60 °C), ekstremne termofile (optimalna temperatura rasta između 60 i 80 °C) i hipertermofile (optimalna temperatura rasta između 80 i 110 °C). Organizmi s najvišim optimalnim temperaturama rasta (103 – 110 °C) pripadaju rodovima *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* i *Melanopyrus* (rodovi unutar arheja), u carstvu gljiva visoku optimalnu temperaturu rasta imaju porodice *Ascomycete* i *Zygomycete* (Busk i Lange, 2013), a među bakterijama optimalan rast pri najvišim temperaturama (90 – 95 °C) pokazuju *Thermotoga maritime* i *Aquifex pyrophilus* (Kumar i sur., 2011; Haki i Rakshit, 2003). Enzimi iz ovakvih mikroorganizama pokazuju jedinstvena svojstva, izuzetno su termostabilni i uglavnom su otporni na određena kemijska denaturirajuća sredstva. Razlozi korištenja termostabilnih enzima temelje se na činjenici da su prikladniji za vođenje biotehnoških procesa na povišenim temperaturama. Povećanje temperature značajno utječe na biološku dostupnost i topljivost brojnih polimernih spojeva što rezultira većim brzinama reakcija, učinkovitom bioremedijacijom i smanjenim rizikom od neželjenih mikrobnih kontaminacija (Sinha i sur., 2012; Van den Burg, 2003). Velik broj poznatih enzima za razgradnju polisaharida (npr. amilaze, celuloze, hitinaze, pektinaze, pululanaze, ksilanaze), proteaza, izomeraza, esteraza, lipaza, dehidrogenaza i DNA-modificirajućih enzima je karakteriziran iz ekstremno termofilnih ili hipertermofilnih mikroorganizama (Haki i Rakshit, 2003; Roy i sur., 2003; Bertoldo i Antranikian, 2002). Enzimi termofila pokazuju veliki potencijal u industriji detergenata, hrane, škroba, tekstila, kože, celuloze, papira te u farmaceutskoj industriji (Gupta i sur., 2014). Također, koriste se i kao modeli za razumijevanje mehanizama koji osiguravaju termostabilnost i termoaktivnost kako bi se mogli iskoristiti u proteinskom inženjerstvu (Kumar i Nussinov, 2001; Sterner i Liebel, 2001).

2.1.2. Rod *Bacillus* i njegova industrijska primjena

Bakterije roda *Bacillus* mogu biti štapićastog, ravnog ili zakrivljenog oblika, a javljaju se pojedinačno ili u parovima te povremeno u obliku dugih lanaca ili dugačkih niti. Jedna od njihovih prepoznatljivih karakteristika je stvaranje endospora koje su otporne na mnoge

nepovoljne uvjete. Mogu biti Gram-pozitivne ili Gram-negativne. Pokretljive vrste se kreću pomoć peritrihnih ili degeneriranih peritrihnih flagela. Većina *Bacillus* vrsta su aerobi ili fakultativni aerobi, no nekoliko vrsta je opisano kao striktni anaerobi. Krajnji akceptor elektrona je kisik, no u nekih vrsta može postojati alternativa. Morfologija i veličina kolonija varira ovisno o vrsti. *Bacillus* vrste su veoma raznolike po pitanju fizioloških osobina pa mogu varirati od psihrofila do termofila, acidofila ili alkalofila, a neki sojevi su i halofili. Većina vrsta proizvodi katalazu, a na oksidaza testu mogu biti pozitivne ili negativne. Vrste su uglavnom izolirane iz tla, no mogu se naći i u vodi, hrani te kliničkim uzorcima. Otpornost spora na toplinu, zračenje, dezinfekcijska sredstva i isušivanje dovodi do problema kontaminacije u operacijskim salama, kirurškim zavojima, farmaceutskim proizvodima i hrani. Većina vrsta ima mali ili nikakav patogeni potencijal i rijetko su povezane s bolestima u ljudi ili životinja, uz izuzetak bakterije *Bacillus anthracis* – uzročnika antraksa. Nekoliko drugih vrsta može uzrokovati trovanje hranom i oportunističke infekcije, a sojevi bakterije *Bacillus thuringiensis* su patogeni za beskralježnjake (Logan i Vos, 2015).

Vrste roda *Bacillus* imale su ključnu ulogu u uspostavljanju širokog spektra održivih fermentativnih procesa koji su u nekim slučajevima (npr. proizvodnja riboflavina) zamijenili stare, manje učinkovite kemijske procese. Komercijalni proizvodi koje proizvode *Bacillus* vrste uključuju posebne kemikalije, antibiotike, vitamine, prehrambene enzime te mnoge druge proizvode (Eggersdorfer i sur., 2012; Hohmann i Stahmann, 2010).

Najveću skupinu proizvoda koju proizvode *Bacillus* vrste čine enzimi za masovnu upotrebu i specijalni enzimi, koji čine oko 50 % ukupnog tržišta. Mnogi od ovih enzima imaju jedinstvena svojstva kao što su termostabilnost ili tolerancija na alkalne uvjete, široki raspon pH ili inhibicijske razine nusproizvoda, što ih čini primjenjivima u industrijskim procesima i kućanskim proizvodima (Meima i sur., 2004). Uz dostupnost klasičnih i rekombinantnih metoda, razvijene su varijante dobivene proteinskim inženjerstvom s novim ili poboljšanim katalitičkim svojstvima kako bi se iskoristile za nove komercijalne primjene (Olempska-Beer i sur., 2006; Nielsen i Borchert, 2000; Takagi, 1993; Schmidt-Dannert i sur., 1988).

Drugo važno područje komercijalne primjene proizvoda *Bacillus* vrsta je proizvodnja vitamina i finih kemikalija. Komercijalna proizvodnja uključuje proizvode kao što su purinski nukleotidi, riboflavin i poli- γ -glutaminska kiselina (Ashiuchi i sur., 2006), D-riboza, taumatin (niskokalorična zamjena za šećer), polihidroksibutirat (PHB), streptavidin i 2-acetil-1-pirolin. Svi navedeni proizvodi (osim PHB) dobivaju se korištenjem bakterije *B. subtilis* kao proizvodnog domaćina. Procesi proizvodnje primjenom domaćina *B. subtilis* uključuju i druge

vitamine kao što su biotin, pantotenat, tiamin i folna kiselina, no nijedan od navedenih nije komercijaliziran (Perkins i sur., 2009).

Jedan od glavnih trendova današnjice je zamjena proizvodnje goriva i kemikalija iz naftnih sirovina s održivim proizvodnim sustavima koji koriste obnovljive sirovine. Trenutno se koriste mnogi mikrobnih metabolički putevi koji generiraju energiju te služe u proizvodnji vrijednih kemikalija. *Bacillus* vrste imaju ključnu ulogu zbog svoje široke upotrebe kao domaćina u industrijskoj fermentaciji te jednostavnosti metaboličkog inženjerstva njegovih biosintetskih puteva. Primjeri proizvodnje biogoriva su izobutanol i H₂ (Kumar i sur., 2013; Li i sur., 2012; Blombach i Eikmanns, 2011), dok su primjeri proizvodnje biokemikalija butanendiol i polihidroksialkanoat, koji se mogu koristiti za proizvodnju biopolimera (Zhang i sur., 2013; Kumar i sur., 2013; Wang i sur., 2012; Biswas i sur., 2012). Termofilni članovi *Bacillus sensu lato* (u širem smislu), posebice *Geobacillus* vrste, već se koriste kao proizvodna platforma u industriji biogoriva druge generacije (Taylor i sur., 2009). Cilj je ostvariti rezultate iz laboratorijskog mjerenja u održivim komercijalnim procesima.

2.1.3. *Bacillus smithii*

Bakterija *Bacillus smithii* nazvana je po američkom bakteriologu Nathanu R. Smith-u koji je dao temeljni doprinos taksonomiji roda *Bacillus* (Nakamura i sur., 1988). *Bacillus smithii* je fakultativno anaerobna, fakultativno termofilna Gram-pozitivna bakterija, izvorno identificirana kao *Bacillus coagulans* (Nakamura i sur., 1988; Hammer, 1915). Ima velik potencijal za upotrebu u biotehnološkoj industriji zbog mogućnosti fermentiranja niza različitih izvora ugljika (uključujući C₅ i C₆ šećere) (Nakamura i sur., 1988) u laktat i druge spojeve „zelene kemije“ (Bosma i sur., 2015a; Bosma i sur., 2015b). Proizvodnja „zelenih kemikalija“ pri povišenim temperaturama iz lignocelulozne biomase ima potencijal u smanjenju proizvodnih troškova takvih kemikalija. U usporedbi s bakterijama mliječne kiseline ili bakterijom *E. coli* količina potrebnih enzima za hidrolizu lignoceluloze je oko 3 puta niža pri temperaturama od 50 – 60 °C, na kojima rastu umjereno termofilni mikroorganizmi (Ou i sur., 2009). Nadalje, fermentacija pri višim temperaturama smanjuje rizik od kontaminacije i troškove hlađenja kao i topljivost produkata i supstrata (Bosma i sur., 2013; Taylor i sur., 2009). Nedavno su razvijeni genetički alati kako bi se omogućio razvoj *B. smithii* kao modelnog organizma (Bosma i sur., 2015a; Bosma i sur., 2015b).

Vegetativne stanice bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 su štapićastog oblika, veličine 0,8-1,0 x 5,0-6,0 μm te se pokreću pomoću peritrihnih flagela, dok su endospore ovalnog ili

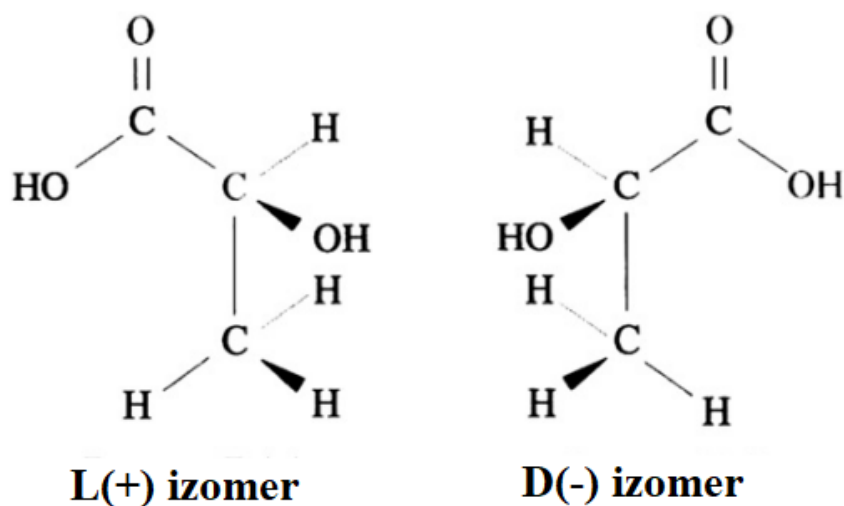
cilindričnog oblika veličine 0,6-0,8 x 1,3-1,5 μm . Stanične stijenke sadrže diaminopimelinsku kiselinu. Metabolički pripadaju grupi kemoorganotrofa, a prema potrebi za prisutnošću kisika ih ubrajamo u fakultativne anaerobe. Fakultativni su termofili (rastu pri temperaturama između 25 i 60 °C), a optimalan pH za rast je 5,7. Ovaj soj može metabolizirati D-fruktozu, D-glukozu, trehalozu, L-arabinozu, D-galaktozu, maltozu, manitol, glikogen, D-ribozu i L-ramnozu. Sadržaj nukleinskih baza G + C iznosi 40,2 mol % (Nakamura i sur., 1988).

2.2. MLIJEČNA KISELINA

Mliječna kiselina je važan industrijski proizvod zbog niza različitih povoljnih svojstava (Abdel-Rahman i sur., 2011) te se koristi kao prekursor spojeva malih (propilen glikol) ili velikih (akrilni polimeri) molekulskih masa (San-Martín i sur., 1992). Polimeri mliječne kiseline su biorazgradivi (koriste se kao materijali za pakiranje i označavanje) (San-Martín i sur., 1992) i biokompatibilni zbog čega se koriste u proizvodnji prostetskih pomagala, šavova i za interno doziranja lijekova (Chahal i Starr, 2006). Najistaknutiji polimer mliječne kiseline je polilaktična kiselina (engl. *polylactic acid*, *PLA*) (Tsuji i sur., 2008; Boswell, 2001) koja ima brojne primjene u tekstilnoj, medicinskoj i farmaceutskoj industriji (Singhvi i sur., 2010). Mliječna kiselina se u kozmetičkoj industriji koristi u proizvodnji higijenskih i estetskih proizvoda zbog hidratantnog, antimikrobnog i pomlađujućeg djelovanja na kožu te u proizvodima za oralnu higijenu. Derivati mliječne kiseline, kao što su laktatni esteri imaju široku primjenu zbog svojih higroskopnih i emulgirajućih svojstava (Gao i sur., 2011). U farmaceutskoj industriji se mliječna kiselina koristi kao dodatak u sintezi dermatoloških lijekova i protiv osteoporoze (Bai i sur., 2004). Prehrambena industrija koristi otprilike 70 % proizvedene mliječne kiseline, većinom za proizvodnju jogurta i sira (Salminen i sur., 1993). Najvažnije bakterijske vrste za proizvodnju mliječne kiseline u jogurtu su *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus*, procesom kofermentacije. Tijekom proizvodnje sira, sintezom i oslobađanjem mliječne kiseline snižava se pH vrijednost što potiče agregaciju kazeinskih micela. Tijekom proizvodnje žitarica mliječna kiselina nastaje spontano, zbog prisutnosti mikroorganizama koji provode mliječno-kiselu fermentaciju što dovodi do promjene arome i okusa pripravaka te uzrokuje snižavanje pH što sprječava rast patogenih bakterija (Lee i Lee, 1993).

Mliječna kiselina (2-hidroksipropanska kiselina) je organska kiselina široko rasprostranjena u prirodi. Ona je najjednostavnija 2-hidroksikarboksilna kiselina s kiralnim ugljikovim atomom te postoji u dva enantiomerna oblika (slika 1). Kemijska reaktivnost

mliječne kiseline određena je fizikalno–kemijskim svojstvima među kojima su kiseli karakter u vodenom mediju, bifunkcionalna reaktivnost povezana s prisutnošću hidroksilne i karboksilne skupine (velika reakcijska svestranost) i asimetrična optička aktivnost C₂ ugljikovog atoma (Martinez i sur., 2013).

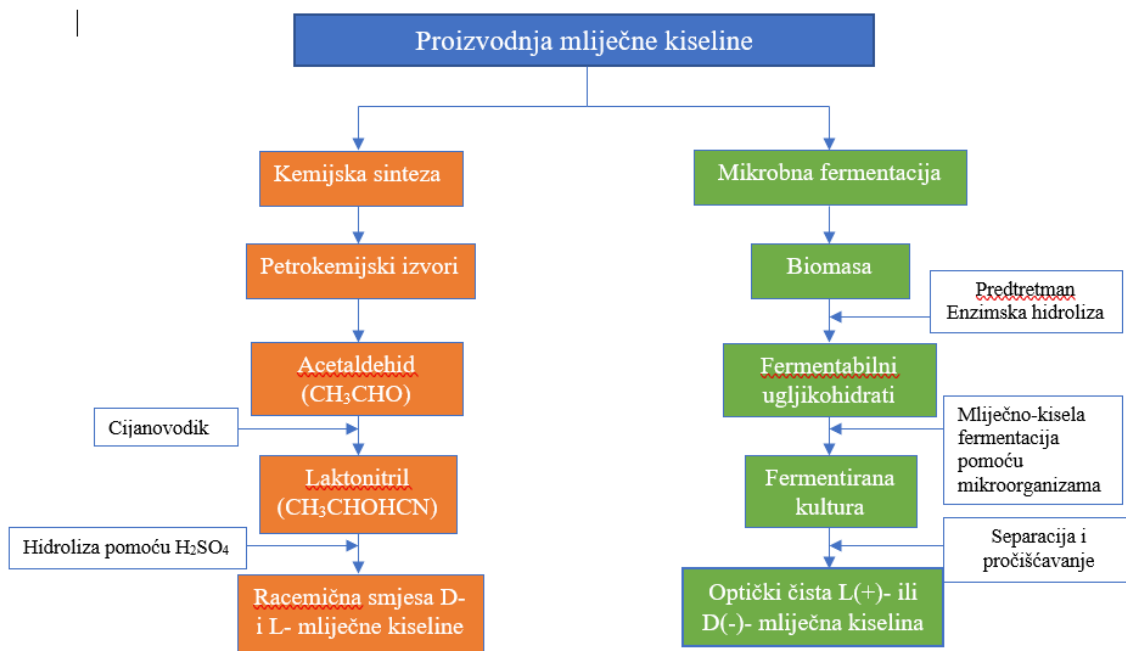


Slika 1. Struktura L(+) i D(-) izomera mliječne kiseline (Martinez i sur., 2013)

Proizvodnja mliječne kiseline kemijskom sintezom odvija se u tekućoj fazi pod visokim tlakom pri čemu acetaldehid reagira s cijanovodikom u prisutnosti baze kako bi se dobio laktonitril. Nakon njegovog izdvajanja i pročišćavanja destilacijom, dodaju se klorovodična ili sumporna kiselina pri čemu dolazi do hidrolize laktonitrila u mliječnu kiselinu. Zatim dolazi do reakcije s metanolom (esterifikacija) kako bi se dobio metil-laktat, nakon čega se pročišćava destilacijom. U zadnjem koraku se pročišćeni metil-laktat hidrolizira u zakiseljenom vodenom mediju pri čemu nastaju mliječna kiselina i metanol, koji se reciklira u procesu (Dey i Pal, 2012; Narayanan i sur., 2004). Ostali kemijski putevi sinteze mliječne kiseline uključuju razgradnju šećera kataliziranu bazom, oksidaciju propilen-glikola, ugljikovog monoksida i vode pri visokim temperaturama i tlaku, hidrolizu kloropropionske kiseline, oksidaciju propilena dušičnom kiselinom i druge (John i sur., 2007a). Kemijskom sintezom se proizvodi racemična smjesa D- i L-izomera mliječne kiseline.

Mliječna (laktična) fermentacija drugi je način proizvodnje mliječne kiseline (slika 2). Proces fermentacije relativno je brz, ima visoke prinose te selektivno može voditi do proizvodnje jednog stereoisomera ili racemične smjese (Axelsson, 2004). Nakon pripreme hranjive podloge u kojoj se nalaze hranjive tvari te otopine šećera, odabrani mikroorganizam se inokulira te počinje proces fermentacije. Na početku procesa je potrebno odabrati te tijekom

procesa održavati najpovoljnije uvjete fermentacije kao što su temperatura, pH, aeracija, brzina miješanja i slično, a uvjeti se određuju ovisno o proizvodnom mikroorganizmu. Komercijalna mliječna kiselina proizvodi se fermentacijom škroba ili rafiniranih šećera, a upravo visoka cijena sirovina predstavlja ozbiljnu prepreku fermentativnom načinu proizvodnje mliječne kiseline (Datta i sur., 1995). Jeftine, obnovljive i neprehrambene sirovine od velikog su interesa za proizvodnju mliječne kiseline, posebice lignocelulozna biomasa iz poljoprivrednih, agroindustrijskih i šumskih izvora.



Slika 2. Postupak proizvodnje mliječne kiseline kemijskim postupkom i mikrobnom fermentacijom (Tan i sur., 2017)

Svjetska potražnja mliječne kiseline 2007. godine procijenjena je na 130,000-150,000 m³ god⁻¹ pri čemu je komercijalna cijena mliječne kiseline za upotrebu u hrani u rasponu od 1,38 US\$ kg⁻¹ (50 %-tne čistoće) do 1,54 US\$ kg⁻¹ (88 %-tne čistoće) (John i sur., 2007b). Predviđa se da će proizvodnja mliječne kiseline u nadolazećim godinama biti u značajnom porastu, uglavnom za proizvodnju PLA (Mujtaba i sur., 2012).

2.2.1. Proizvodnja mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozna biomasa je organska tvar bioloških materijala te predstavlja najobilniji globalni izvor biomase koji je u većoj mjeri neiskorišten (Lin i Tanaka, 2006). Uglavnom je

sastavljena od celuloze (netopiva vlakna 1,4-glukana), hemiceluloze (uglavnom građeni od polisaharida ksilana, manana i glukana) i lignina (složena polifenolna struktura) te manjih količina minerala, ulja i drugih spojeva (Balat, 2011; Yang i sur., 2009; Molina-Sabio i Rodríguez-Reinoso, 2004). Lignocelulozna biomasa uključuje šumske ostatke i ostatke usjeva (Chen i Lee, 1997; Melzoch i sur., 1997), čvrsti komunalni otpad (John i sur., 2007b), stari papir (McCaskey i sur., 1994) i drvo (Linko i sur., 1984). Udio sastavnica biomase varira ovisno o vrsti, a između mekog i tvrdog drva su vidljive jasne razlike u udjelu pojedinih komponenata. Ukupni sadržaj celuloze i hemiceluloze veći je u tvrdom drvetu (78,8 %) nego u mekom (70,3 %), dok je ukupni sadržaj lignina veći u mekom drvetu (29,2 %) nego u tvrdom drvetu (21,7 %) (Balat, 2009). Sadržaj celuloze, hemiceluloze i lignina ovisi o tipu lignocelulozne biomase što upućuje na odabir odgovarajućeg materijala za proces fermentacije. Celuloza, glavna komponenta biljne biomase (30-60 % suhe tvari sirovine) je homopolisaharid sastavljen od β -D-glukopiranoznih jedinica povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Orijehtacija veza i mogućnost stvaranja vodikovih veza čini strukturu polimera čvrstom te otežava mogućnost razgradnje. Hemiceluloza (20-40 % ukupne suhe tvari sirovine) je razgranati heterogeni polimer sastavljen od pentoza (ksiloza i arabinoza), heksoza (galaktoza, glukoza i manosa) i kiselih šećera (Saha, 2000). Manosa je dominantan šećer hemiceluloze u mekom drvetu, dok je ksiloza dominantna u tvrdom drvetu te poljoprivrednim ostacima (Taherzadeh i Karimi, 2008). Hemiceluloza se lakše hidrolizira u odnosu na celulozu zbog svoje razgranate i amorfne strukture. Lignin (15-25 % ukupne suhe tvari sirovine) je aromatski polimer građen od fenilpropanoidnih prekursora. Fenilpropanske jedinice lignina (siringil, gvajacil i hidroksifenol) povezane su skupinom veza koje formiraju kompleksan matriks (Demirbas, 2008). Matriks se sastoji od niza raznih funkcionalnih grupa (npr. hidroksilne, metoksilne, karbonilne) koje čine strukturu visoko polarnom (Feldman i sur., 1991). Lignin se smatra komponentom koja je teško iskoristiva kao supstrat za fermentaciju jer čini biomasu otpornom na kemijsku i biološku razgradnju (Taherzadeh i Karimi, 2008).

Unatoč održivosti i dostupnosti lignoceluloznih sirovina za proizvodnju, komercijalna proizvodnja mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina još uvijek je problematična zbog kompleksnosti sirovine. Biokemijska konverzija lignocelulozne biomase zahtijeva više koraka obrade kako bi u konačnici imali monomerne šećere (npr. glukoza, ksiloza, arabinoza, manosa) koje bakterije mogu koristiti u procesu fermentacije. Nakon uspostave odgovarajuće tehnologije te njezine komercijalizacije, iz lignoceluloznih sirovina bi se mogao proizvoditi

široki spektar vrijednih proizvoda. Konvencionalni procesi za proizvodnju mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina sastoje se od slijedeća četiri koraka (Abdel-Rahman i sur., 2011):

1. Predtretman – razbijanje strukture lignoceluloznog matriksa
2. Enzimaska hidroliza – depolimerizacija lignoceluloze u fermentativne šećere kao su glukoza i ksiloza pomoću hidrolitičkih enzima
3. Fermentacija – pretvorba šećera u mliječnu kiselinu, uglavnom pomoću bakterija mliječne kiseline
4. Separacija i pročišćavanje mliječne kiseline – postupci kojima se dobiva mliječna kiselina odgovarajuće čistoće (kako bi se zadovoljili standardi komercijalne primjene)

Glavni ciljevi predobrade lignocelulozne biomase su uklanjanje lignina, separacija celuloze i hemiceluloze, povećanje površine sirovine, djelomična depolimerizacija celuloze i povećanje poroznosti sirovine radi lakše dostupnosti hidrolitičkim enzimima u idućem koraku procesa (Hendriks i Zeeman, 2009; Kumar i sur., 2009; Zhang i sur., 2009; Chandel i sur., 2007; Taherzadeh i Karimi, 2007; Sun i Cheng, 2002). Predobrada uključuje fizikalne (mljevenje i drobljenje), kemijske (alkalne otopine, razrijeđene kiseline, oksidansi i organska otapala), fizikalno-kemijske (eksplozija parom, hidrotermoliza i mokra oksidacija) i biološke (mikroorganizmi i enzimi) metode. Neke metode razaraju kompleks lignin-ugljikohidrati, a druge remete visoko uređenu kristalnu strukturu celuloze (Sun i sur., 1995). Različite metode predobrade su detaljno razvijene, uključujući eksploziju amonijevim vlaknima i perkolaciju recikliranog amonijaka (Jørgensen i sur., 2007), predobradu vapnom (Kaar i Holtzaple, 2000), *organosolv* (Pan i sur., 2006), vruću tekuću vodu (Antal, 1996), ionske tekućine (Dadi i sur., 2006), alkalni predtretman (Lau i sur., 2008), predobradu razrijeđenom kiselinom i eksploziju pare (Yang i Wyman, 2008; Mosier i sur., 2005; Laser i sur., 2002; Parisi, 1989) i enzimsku predobradu (Anderson i sur., 2005; Converse, 1993; Hayn i sur., 1993; Ladisch i sur., 1983). Između prethodno nabrojanih metoda, predobrada razrijeđenom kiselinom je najčešće korištena metoda (Wyman i sur., 2005). Proces predobrade kritični je korak u biokonverziji lignoceluloze. Ukoliko predobrada nije bila dovoljno učinkovita, idući korak saharifikacije hidrolitičkim enzimima je otežan, a u težim slučajevima predobrada može izazvati nastanak toksičnih spojeva koji inhibiraju mikrobni rast i metabolizam (Kodali i Pogaku, 2006). Stoga proces predobrade ima velik potencijal utjecati na troškove *down-stream* procesa određivanjem toksičnosti fermentacije, brzine enzimske hidrolize, enzimske zasićenosti, snage miješanja, koncentracije produkata, pročišćavanja proizvoda, zahtjeva za obradu otpada i ostalih procesnih parametara.

Enzimaska hidroliza je najbolji način za dobivanje fermentativnih šećera iz lignocelulozne biomase te je neophodna kako bi bakterije mliječne kiseline iskoristile polisaharide kao izvore ugljika (Lin i Tanaka, 2006; Taniguchi i sur., 2005; Yu i Zhang, 2004; Ogier i sur., 1999; Lynd i sur., 1996; Hinman i sur., 1992). Cilj enzimske hidrolize je depolimerizacija polisaharida u čvrstoj netopljivoj frakciji koja ostaje nakon predobrade. Glavni enzimi potrebni za konverziju celuloze i hemiceluloze u topive šećere su celulaze i hemicelulaze. Za maksimizaciju učinkovitosti enzimske hidrolize potrebne su mješavine ovih enzima kako bi se poboljšala hidroliza hemiceluloze i time povećao pristup celulazi koja dovodi do skraćivanja vremena hidrolize i smanjenja troškova procesa (Zhang i sur., 2010; Tu i Saddler, 2010; Öhgren i sur., 2007). Na brzinu enzimske hidrolize celuloze uvelike utječe njezin stupanj polimerizacije (Kumar i sur., 2008; Cohen i sur., 2005; Chang i Holtzaple, 2000). Učinkovita razgradnja celuloze zahtjeva sinergističku reakciju slijedeće tri klase enzima: (a) endo- β -1,4-glukanaze (nasumična hidroliza intramolekulskih β -1,4-glukozidnih veza celuloznih lanaca i ugradnja molekula vode na β -1,4-glukozidnu vezu, stvarajući novi reducirajući i ne-reducirajući kraj lanca); (b) egzo- β -1,4-glukanaze ili celobiohidrolaze (cijepaju krajeve lanaca celuloze, oslobađajući molekule celobioze ili glukoze); (c) β -glukozidaze ili celobiazze (završavaju proces hidrolize celuloze cijepajući celobiozu na dvije molekule glukoze (Lynd i sur., 2002)). Za razliku od celuloze, ksilani su kemijski dosta kompleksniji te je za njihovu razgradnju potrebno više enzima. Enzimaska hidroliza hemiceluloze zahtjeva endo-1,4- β -ksilanazu, β -ksilozidazu, β -glukuronidazu, α -L-arabinofuranozidazu i acetilksilan esterazu koji djeluju na razgradnju i saharifikaciju ksilana (Carvalho i sur., 2008; Saha, 2004) te β -mananazu i α -manozidazu koje cijepaju okosnicu polimera glukomanana (Kumar i sur., 2008). Iako je za hidrolizu ksilana potrebno više enzima nego za hidrolizu celuloze, ksilan je dostupniji enzimima jer ne tvori kristalnu strukturu za razliku od celuloze (Keshwani i Cheng, 2009).

Hidrolizat lignocelulozne biomase je mješavina heksoza (npr. glukoza) i pentoza (npr. ksiloza i arabinoza). Učinkovito iskorištenje šećera izvedenih iz celuloze i hemiceluloze može smanjiti proizvodne troškove biomaterijala za čak 25 % (Hinman i sur., 1989). Tehnologija fermentacije mora biti ekonomski isplativija u odnosu na kemijsku sintezu kako bi se takav proces koristio na industrijskoj razini (Bustos i sur., 2007). Ključni ekonomski pokazatelji u procesu fermentacije su visoki prinos proizvoda, visoka produktivnost i koncentracija nastalog proizvoda. Veliki broj istraživanja procesa fermentacije za maksimizaciju prinosa mliječne kiseline i produktivnosti radio se pomoću bakterija mliječne kiseline. Neki od lignoceluloznih

materijala za proizvodnju mliječne kiseline pomoću bakterija mliječne kiselinu su ljuške sjemena pamuka (Vickroy, 1985), klip kukuruza (Guo i sur., 2010; Wang i sur., 2010; Moldes i sur., 2006; Shen i Xia, 2006), hidrolizat drva (Wee i sur., 2004), mulj i bagasa od prešane šećerne trske (Laopaiboon i sur., 2010; Xavier i Lonsane, 1994), otpad od prerade mrkve (Pandey i sur., 2001) i dr.

U procesu kemijske separacije mliječne kiseline tradicionalno se koristio kalcijev karbonat kako bi se neutralizirala fermentacijska smjesa. Smjesa kalcijevog laktata se zatim filtrirala kako bi se uklonile stanice, tretirala ugljikom, obezbojila, isparavala i na kraju zakiselila kako bi dobili mliječnu kiselinu i netopivi kalcijev sulfat (Datta i Henry, 2006). Čista mliječna kiselina je dobivena hidrolizom, esterifikacijom i destilacijom. Nedostaci ovoga procesa su proizvodnja velike količine kalcijevog sulfata (gipsa) kao nusprodukta te velike količine potrošene sumporne kiseline (Qin i sur., 2010). Alternative tradicionalnom procesu separacije i pročišćavanja mliječne kiseline su adsorpcija (Chen i Ju, 1998), reaktivna destilacija (Kumar i sur., 2006), ultrafiltracija i elektrodijaliza (Datta i Henry, 2006; Hábová i sur., 2004; Choi i sur., 2002; Madzingaidzo i sur., 2002) i nanofiltracija (Gonzalez i sur., 2008; Li i Shahbazi, 2006), u kojima se ne proizvodi otpadna sol. Ovi postupci su energetske i ekonomske učinkovitiji u usporedbi s tradicionalnim procesom. Osim toga, ovi procesi ne zahtijevaju potencijalno skupa otapala ili adsorbense, nema energetske intenzivnih faznih promjena te imaju potencijal za istovremeno odvajanje i koncentriranje mliječne kiseline (Li i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Tijekom istraživanja kao radni mikroorganizam je korištena termofilna bakterija *Bacillus smithii* DSM 460 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

3.1.2. Kemikalije

U tablici 1 prikazane su sve kemikalije korištene pri eksperimentalnom istraživanju.

Tablica 1. Kemikalije korištene u istraživanju

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka
kalijev dihidrogenfosfat	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogenfosfat	≥ 98 %	Kemika, Hrvatska
amonijev acetat	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
amonijev sulfat	≥ 99 %	Honeywell, SAD
mravlja kiselina	» 98 %	Honeywell, SAD
octena kiselina	99,5 %	Avantor, SAD
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska

kobaltov klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	99 %	Honeywell, SAD
borna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
cinkov klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev tartarat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
etanol	96 %	GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
natrijev hidroksid	≥98 %	Merck KGaA, Njemačka
sumporna kiselina	96 %	Merck KgaA, Njemačka
agar	tehnički	Biolife, Italija
DL-mliječna kiselina	85 %	Sigma-Aldrich, SAD
aktivni ugljen	p.a.	Kemika, Hrvatska
CSL	za upotrebu u biotehnologiji	Dynamite Baits, UK
protupjenič	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov sulfat heptahidrat	99 %	Merck KGaA, Njemačka

Osim istraživanja na kemijski definiranim podlogama, za istraživanje u bioreaktoru s miješalom se koristio detoksicirani hidrolizat otpadnog pivskog tropa kao lignocelulozna sirovina. Pivski trop je dobiven tijekom proizvodnje piva u mikropivovari Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Sastav otpadnog pivskog tropa, određen nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Kemijski sastav suhe tvari otpadnog pivskog tropa i čvrste faze nakon kiselinske hidrolize pivskog tropa

Tvar	Maseni udio u otpadnom pivskom tropu (%)	Maseni udio u čvrstoj fazi nakon kiselinske hidrolize (%)
glukoza	23,80	30,78
ksiloza	14,74	6,86
arabinoza	19,19	6,61
topivi lignin	15,46	5,81
netopivi lignin	16,58	46,13
furani	0,01	0,0045
mravlja kiselina	0	0
octena kiselina	0	0

*ostatak do 100% čini pepeo

3.1.3. Hranjive podloge

Za održavanje radne kulture, proizvodnju inokuluma te za uzgoje provedene u bioreaktorima i Erlenmeyerovim tikvicama koristile su se podloge sastava navedenim u tablicama 3-6.

Sastav podloge za uzgoj inokuluma bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 prikazan je u tablici 3. Čvrsta podloga za održavanje radne kulture istog je sastava kao podloga za uzgoj inokuluma uz dodatak agara u koncentraciji 15 g L⁻¹. Sastav podloga za uzgoje ove bakterije u bioreaktoru i Erlenmeyerovim tikvicama prikazan je u tablici 4, a koncentracije elemenata u tragovima koje su dodavane u podloge za uzgoj bakterije kao i za uzgoj inokuluma, prikazane su u tablici 5. Jedan od uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom proveden je na kompleksnoj hranjivoj podlozi - detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa. Hidrolizat otpadnog pivskog tropa dobiven je tretmanom razrijeđenom kiselinom u visokotlačnom reaktoru. Nakon toga je provedena detoksikacija kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa pomoću aktivnog ugljena, a sastav tako dobivene podloge naveden je u tablici 6. Podloga 4, čiji je sastav naveden u tablici 4, je podloga koja simulira sastav otpadnog pivskog tropa dobivenog prethodno navedenim tretmanom. Sastav hidrolizata dobiven je nakon provedbe projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717).

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

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

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

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

*bioreaktor s miješalom

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

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

Tablica 6. Kemijski sastav kompleksne hranjive podloge za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom

Tvar	Podloga DKH (detoksicirani kiselinski hidrolizat) γ [g L⁻¹]
glukoza	11,40
ksiloza	7,89
arabinoza	4,50
mravlja kiselina	1,49
octena kiselina	0,68

3.1.4. Aparature i uređaji

3.1.4.1. Spektrofotometar

Spektrofotometar „Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies, SAD“ korišten je za određivanje promjene optičke gustoće hranjive podloge. Promjena optičke gustoće pokazatelj je rasta stanica bakterija *Bacillus smithii* DSM 460. Prije određivanja optičke gustoće, uzorak suspenzije bakterijske biomase je homogeniziran te potom prebačen u staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Optička gustoća se određivala za originalni uzorak (0. razrjeđenje) pri valnoj duljini od 600 nm. Spektrofotometrijski su određeni i udio lignina topivog u kiselini (apsorbancija očitana pri 205 nm) te furani (apsorbancija očitana pri

284 i 320 nm). Za mjerenje apsorbancije furana i lignina korištene su kvarcne kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

3.1.4.2. Centrifuge

Za odvajanje tekućeg i čvrstog dijela kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa korištena je centrifuga „Beckman, Model J-21B, Njemačka“. Za izdvajanje biomase iz uzoraka korištena je centrifuga „Thermo Scientific SL 8R, SAD“. Centrifugiranje se vršilo pri broju okretaja od 8000 o min⁻¹. Dobiveni supernatant je korišten za pripremu uzoraka za UPLC, pri čemu je ponovno centrifugiran na centrifugi „Witeg CF-10, Njemačka“ pri 13000 o min⁻¹.

3.1.4.3. Vage

Analitička vaga „ALC210.4; Acculab, SAD“ korištena je za vaganje kemikalija potrebnih u malim količinama. Za sve ostale odvage korištena je tehnička vaga „Tehtnica“ ET-1211, Slovenija.

3.1.4.4. Sušionik

Za sušenje hidroliziranog pivskog tropa korišten je sušionik „Instrumentaria ST-50, Hrvatska“.

3.1.4.5. Termostatirana tresilica za mikrobiološke uzgoje

Za uzgoje bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u Erlenmeyerovim tikvicama te pripremu inokuluma korištena je termostatirana tresilica za mikrobiološke uzgoje BIOSAN, Latvija (Environmental shaker incubator ES 20/60). Tresilica je zatvorenog tipa te se može koristiti u rasponu temperatura od 10 do 80 °C i pri rasponu broja okretaja od 50 do 250 o min⁻¹.

3.1.4.6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)

Koncentracije supstrata i produkata fermentacije određene su uređajem za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) (slika 3). Uređaj se sastoji od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump, SAD), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler, SAD) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex, SAD) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa (**OpenLAB CDS**). Prije analize uzoraka, pripremana je 0,0025 M otopina sumporne kiseline koja je korištena kao mobilna faza. Volumen analiziranog uzorka je bio 10 µL, a protok mobilne faze 0,6 mL min⁻¹.



Slika 3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC) (izvor: vlastita fotografija)

3.1.4.7. Bioreaktori s miješalom

Za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na podlozi 4 (tablica 4) korišten je bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) (slika 4). Izrađen je od nehrđajućeg čelika te je ukupnog volumena od 30 L. Miješalo ima tri turbine postavljene na tri visine, od kojih svaka ima 6 ravnih lopatica. Elektromotor koji pokreće miješalo ima snagu 0,9 kW. Kontrolnom jedinicom bioreaktora može se regulirati i pratiti pH vrijednost i temperatura podloge, brzina okretaja miješala, protok zraka u reaktor, razina pjene i podloge kao i parcijalni tlak kisika u podlozi (polarografska kisikova elektroda). Hranjiva podloga se sterilizira *in situ* pomoću indirektno vodene pare preko dvostrukog plašta. Bioreaktor ima izlaz za izuzimanje uzoraka koji se može sterilizirati parom, kao i *in situ* sterilizabilan izlaz za pražnjenje reaktora (Matoković, 2020).



Slika 4. Bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (izvor: vlastita fotografija)

U staklenom bioreaktoru s miješalom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) proveden je uzgoj bakterije *Bacillus smithi* DSM 460 na DKH otpadnog pivskog tropa (slika 5). Korisni volumen reaktora iznosi 1,5 L. Miješalo ima jednu turbinu sa 6 ravnih lopatica. Bioreaktor je povezan s upravljačkom pločom preko koje se provodi automatska regulacija temperature i pH-vrijednosti.



Slika 5. Bioreaktor s miješalom Biostat MD (izvor: vlastita fotografija)

3.1.4.8. Visokotlačni reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina

Visokotlačni reaktor tvrtke „Marus-ATM“ (Zagreb, Hrvatska) korišten je za obradu otpadnog pivskog tropa slabom kiselinom. Ukupni volumen reaktora iznosi 20 L. Sirovina (otpadni pivski trop) se stavlja u perforiranu košaru te se prelijeva razrijeđenom sumpornom kiselinom. Reaktor se grije preko plašta koji sadrži termičko ulje. Ono se grije u vanjskoj posudi pomoću električnih grijača. Pumpa omogućuje strujanje zagrijanog ulja unutar plašta reaktora. Mjeri se temperatura sadržaja u reaktoru te temperatura termičkog ulja, koja se može regulirati pomoću kontrolne jedinice. Na kraju procesa otvara se ventil za paru te se ona ispušta iz reaktora. Kada se smjesa ohladi, otvara se ventil na dnu reaktora koji služi za ispuštanje tekućeg dijela hidrolizata. Čvrsti dio se vadi s gornje strane, nakon otvaranja poklopca (Kelemen i Sarić, 2021).

3.1.4.9. Ostala oprema

Hranjive podloge i laboratorijsko posuđe sterilizirani su korištenjem autoklava tvrtke Sutjeska. Za pohranu uzoraka korišten je zamrzivač tvrtke „Gorenje“ (Slovenija) u kojem su uzorci bili čuvani na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzgoj u tikvicama proveden je na tresilici RM 71 (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka). Vrtložna (vortex) miješalica korištena je za homogenizaciju uzoraka prije analize. Za pripremu mobilne faze korišten je vakuum pumpa (ILMVAC GmbH, Njemačka) i ultrazvučna kupelj. Od ostalog pribora korišteno je stakleno i plastično laboratorijsko posuđe, jednokratni plastični pribor, plamenici, digestor te magnetna miješalica.

3.2. METODE

3.2.1. Predobrada otpadnog pivskog tropa

Za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom kao sirovina je korišten otpadni pivski trop. Najprije je provedena kiselinska hidroliza u visokotlačnom reaktoru na $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 10 minuta (Marđetko i sur., 2018). Za predobradu 1 kg suhe tvari pivskog tropa bilo je potrebno 10 L 0,5 %-tne otopine H_2SO_4 . Nakon obrade odvojene su dvije šarže kojima je dobiveno 12,3 L tekuće faze (kiselinski hidrolizat pivskog tropa) i 370 g čvrste faze (nehidrolizirani ostatak pivskog tropa). Za kiselinski hidrolizat (KH) pivskog tropa je potom napravljena detoksikacija. KH pivskog tropa je centrifugiran 30 minuta pri 5000 o min^{-1} . Nakon centrifugiranja je tekući dio dekantiran u tikvicu te je dodatkom natrijevog hidroksida pH vrijednost podešena između 5,5 i 6. U tikvicu je dodano 65 g aktivnog ugljena nakon čega je stavljena na magnetsku miješalicu (1 sat). Nakon miješanja, tekući dio KH s aktivnim ugljenom je centrifugiran ($5000\text{ o min}^{-1}/30\text{ minuta}$) te filtriran vakuum filtracijom pomoću Büchnerovog lijevka.

3.2.2. Priprema podloge

Hranjiva podloga za uzgoj inokuma bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pripremljena je prema sastavu u tablici 4. Tvari su dodane u određeni odnosno izračunati volumen demineralizirane vode. Podloge su sterilizirane u Erlenmeyerovim tikvicama u autoklavu, a sterilizacija se provodila 20 minuta pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. U ohlađene podloge je na kraju dodana otopina elemenata u tragovima. Čvrste podloge za održavanje kulture pripremane su prema istom sastavu uz dodatak agara koncentracije 15 g L^{-1} .

Kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 razlikovale su se prema dodanim izvorima ugljika (glukoza, ksiloza ili glukoza i ksiloza) (tablica 4). Podloga 4 (tablica 4) je kemijski definirana podloga koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa, a korištena za uzgoj u tikvicama i u bioreaktoru.

Hranjive podloge, čiji je sastav naveden u tablici 4, pripremljene su tako da su se u određeni volumen demineralizirane vode dodale odvagane mase kemikalija prema zadanim koncentracijama. Podloge su sterilizirane 20 minuta pri 121 °C te je nakon hlađenja u njih sterilno dodano 450 µL koncentrirane otopine elemenata u tragovima.

Kod pripreme podloge za bioreaktor s miješalom, odvagana masa kemikalija (podloga 4) je dodana u 4,5 L demineralizirane vode. Podloga je prebačena u bioreaktor gdje je provedena *in situ* sterilizacija u bioreaktoru tijekom 20 minuta pri 121 °C. Nakon hlađenja je dodano 15 mL elemenata u tragovima te je pH vrijednost podešena na 6,5, a temperatura na 50 °C.

DKH otpadnog pivskog tropa korišten je za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom. U menzuri je odmjerena 1 L DKH te je sadržaj stavljen na centrifugiranje (4500 o min⁻¹ / 30 minuta). Nakon centrifugiranja je u DKH pivskog tropa dodano 10 g glukoze. Sadržaj je prepumpnan u bioreaktor s miješalom koji je stavljen u autoklav na sterilizaciju 15 minuta pri 121 °C. pH vrijednost je podešena na 6,5, a temperatura na 50 °C.

3.2.3. Uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460

Nakon što su pripremljene hranjive podloge (opisano u prethodnom poglavlju), slijedio je uzgoj inokuluma te inokulacija i uzgoj u tikvicama/bioreaktoru. Inokulum je pripremljen prenošenjem bakterijske biomase sa čvrste podloge u Petrijevim zdjelicama, pomoću sterilne mikrobiološke ušice, u Erlenmeyerovu tikvicu sa 100 mL podloge za inokulum, u sterilnim uvjetima. Inokulum je uzgajan u termostatiranoj tresilici pri 130 o min⁻¹ na temperaturi od 50 °C. Nakon 24 sata uzgoja inokuluma, sterilno je izuzeto 10 mL inokuluma i dodano u pripremljene podloge za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 (pripremljene prema tablici 3), čime je započeo uzgoj. Tikvice su bile zatvorene čepovima s vreljnjačom te je uzgoj proveden mikroaerofilno. Uzgoj se vodio u termostatiranoj tresilici pri 130 o min⁻¹ pri željenoj temperaturi (40, 50 ili 60 °C). Tijekom uzgoja su uzimani uzorci kojima je praćena koncentracija biomase (spektrofotometrijski) te koncentracije supstrata i produkta (UPLC analiza).

Za uzgoj u bioreaktorima s miješalom pripremljeno je 500 mL inokuluma, a inokulum je pripremljen na isti način kao i kod uzgoja u tikvicama (u 5 tikvica sa 100 ml podloge za inokulum nacijepljena je bakterijska biomasa s čvrste podloge). Svi uzgoji su vođeni u mikroaerofilnim uvjetima, pri 250 o min⁻¹, na temperaturi 50 °C. Kao i kod uzgoja u tikvicama, uzgoj je praćen sterilnim izuzimanjem uzoraka u pravilnim razmacima koji su analizirani na isti način.

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

Tijekom uzgoja u tikvicama ili bioreaktoru uzimani su uzorci od 5 mL u pravilnim vremenskim intervalima. Uzorci su najprije homogenizirani te im je potom očitavana apsorbanacija na spektrofotometru pri 600 nm. Zatim se uzorci centrifugiraju (8000 o min⁻¹ / 5 minuta) te je supernatant odvajan za UPLC analizu.

3.2.4.1. Određivanje optičke gustoće

Optička gustoća uzoraka očitavana je na spektrofotometru „Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies, SAD“ pri valnoj duljini od 600 nm.

3.2.4.2. Priprema uzoraka za UPLC analizu

Za pripremu uzoraka za UPLC analizu izuzeto je 750 µL supernatanta uzorka te je dodano 750 µL 10 %-tne ZnSO₄, kako bi se vezali proteini i nečistoće nastale tijekom uzgoja. Sadržaj je homogeniziran i ostavljen u mirovanju 10 minuta. Uzorci su potom centrifugirani 5 minuta na 13000 o min⁻¹. Za uzorke čiji je uzgoj proveden u tikvicama na podlogama 1 i 2 (tablica 3), supernatant je nakon centrifugiranja filtriran kroz mikrobiološki filter (0,2 µm, Sartorius, Njemačka) u staklenu vialu te je tako pripremljen uzorak korišten za UPLC analizu. Uzorci iz uzgoja provedenih na podlogama 3 i 4 (tablica 3) te na DKH otpadnog pivskog tropa su razrijeđeni još 2 puta (nakon prvotnog razrijeđenja s cinkovim sulfatom, u 750 µL supernatanta dodano je 750 µL demineralizirane vode), homogenizirani te potom filtrirani kroz mikrobiološki filter u staklenu vialu kako bi se provela UPLC analiza.

3.2.5. Određivanje sastava otpadnog pivskog tropa

Određivanje sastava otpadnog pivskog tropa i čvrste faze dobivene nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru provedeno je nakon prethodne dvostupanjske kiselinske hidrolize prema propisu Nacionalnog laboratorija za obnovljive izvore energije (engl. *National Renewable Energy Laboratory, NREL*). Uzorak je najprije osušen te zatim usitnjen u tarioniku. Na analitičkoj vagi je odvagano oko 0,4 g suhe tvari uzorka

koji je stavljen u tikvicu s okruglim dnom. Zatim je dodano 4 mL sumporne kiseline (72 % w/w) i stavljeno u termostat na 30 °C uz povremeno miješanje staklenim štapićem. Nakon što je stajao u termostatu 1 sat, u uzorak pomiješan sa sumpornom kiselinom je dodano 112 mL demineralizirane vode, čime je koncentracija sumporne kiseline u smjesi smanjena na 4 % (w/w). Tikvica je pričvršćena na povratno hladilo te je njezin sadržaj zagrijan do vrenja. Sadržaj se potom kuhao 4 sata, uz povremeno miješanje. Nakon hidrolize uzorci su ohlađeni pod mlazom vode i filtrirani preko Büchnerovog lijevka u kojem se nalazio osušeni i izvagani filter papir. Volumen dobivenog filtrata je izmjeren menzурom te je korišten za analizu topljivog lignina i monosaharida. Zaostali talog ispiran je s vrućom vodom do neutralne pH-vrijednosti i potom korišten za analizu netopljivog lignina. Udio lignina topljivog u kiselini te koncentracija furana u filtratu određeni je spektrofotometrijski neposredno nakon hidrolize. Ostatak filtrata je korišten za analizu ugljikohidrata i drugih tvari UPLC metodom. Rezultati dvostupanjske kiselinske hidrolize nalaze se u tablici 2.

3.2.5.1. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini (LNTK)

Talog zaostao na filter papiru nakon provedene dvostupanjske kiselinske hidrolize prebačen je u prethodno osušenu i odvagano Petrijevu zdjelicu te je stavljen na sušenje do konstantne mase pri 105 °C. Nakon hlađenja u eksikatoru, filter papir s talogom je izvagan te je izračunat udio lignina netopljivog u kiselini prema jednadžbi:

$$w(LNTK; \%) = \frac{m_{\text{osušeni filter s talogom}} - m_{\text{filter}}}{m_{\text{uzorka}}} * 100\% \quad [1]$$

3.2.5.2. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini (LTK)

Udio lignina topljivog u kiselini određen je spektrofotometrijski, iz filtrata hidrolizata nakon provedene dvostupanjske kiselinske hidrolize te također prije i nakon detoksikacije. Apsorbancija je određena pri valnoj duljini od 205 nm u kvarcnim kivetama, a kao slijepa proba je korišten zrak. Pripremljeno je razrjeđenje filtrata kako bi očitana apsorbancija bila između 0,7 i 1. Udio lignina topljivog u kiselini je izračunat prema jednadžbi:

$$w(LTK; \%) = \frac{A * D * V}{\alpha * b * m} \quad [2]$$

gdje su:

$w(LTK)$ = udio lignina topljivog u kiselini [%]

A = apsorbancija uzorka izmjerena pri 205 nm

D = faktor razrjeđenja

V = volumen filtrata

α = koeficijent ekstrinkcije lignina [$\text{g L}^{-1} \text{cm}^{-1}$] (prema metodi TAPPI UM250 iznosi $110 \text{ g L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = širina kivete (iznosi 1 cm)

m = masa uzorka za analizu

3.2.5.3. Određivanje furana spektrofotometrijski

Nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize te prije i nakon detoksikacije u tekućoj fazi je spektrofotometrijski određena koncentracija furana. Apsorbancija je mjerena pri 284 i 320 nm (prema metodi iz rada Martinez i sur., 2000). Uzorak je razrijeđen demineraliziranom vodom (1000 x) te su izmjerene apsorbancije pri navedenim valnim duljinama, koristeći kvarcne kivete. Izmjerenim apsorbancijama je izračunata razlika, a koncentracija furana je određena iz baždarnog pravca. Baždarni pravac je izrađen mjerenjem apsorbancije otopina furana poznate koncentracije, a dobivena jednadžba baždarnog pravca je:

$$\gamma = \frac{\Delta A - 0,0173}{191,02} [\text{g L}^{-1}] \quad [3]$$

gdje je:

γ = masena koncentracija furana [g L^{-1}]

$$\Delta A = A_{284} - A_{320}$$

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

Pokazatelji uspješnosti biotehnološkog procesa izračunati su pomoću slijedećih jednadžbi:

1. Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_0 - S \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [4]$$

S_0 = koncentracija supstrata na početku uzgoja

S = koncentracija supstrata na kraju uzgoja

2. Prinos mase biomase (Y_x)

$$Y_x = X - X_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [5]$$

X_0 = koncentracija biomase na početku uzgoja

X = koncentracija biomase na kraju uzgoja

3. Prinos mliječne kiseline (Y_{MK})

$$Y_{MK} = MK - MK_0 \quad [g L^{-1}] \quad [6]$$

MK_0 = koncentracija mliječne kiseline na početku uzgoja

MK = koncentracija mliječne kiseline na kraju uzgoja

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

$$Y_{P/S} = (MK - MK_0) / (S_0 - S) \quad [g g^{-1}] \quad [7]$$

5. Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline (Pr)

$$Pr = Y_{MK} / t_{uk} \quad [g L^{-1} h^{-1}] \quad [8]$$

t_{uk} = ukupno vrijeme trajanja uzgoja

Specifična brzina potrošnje supstrata ($r_s; h^{-1}$), specifična brzina rasta ($\mu; h^{-1}$) i specifična brzina sinteze produkta ($r_p; h^{-1}$) određene su kao reakcije prvog reda (Marđetko i sur., 2018; Holwerda i Lynd, 2013; Doran i sur., 1998) iz eksperimentalnih podataka. Linearizacija podataka napravljena je prema jednadžbama:

$$\ln S = \ln S_0 + r_s * t$$

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

$$\ln P = \ln P_0 + r_p * t$$

gdje su r_s , μ i r_p određeni kao koeficijenti smjera pravca linearizirane regresijske funkcije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati prikazani u ovome radu dobiveni su provođenjem niza eksperimenata u kojima je bakterija *Bacillus smithii* DSM 460 uzgojena na podlogama s različitim izvorima ugljika kao i u podlozi DKH otpadnog pivskog tropa. Cilj eksperimenata bio je odrediti optimalnu temperaturu pri kojoj bakterija *B. smithii* DSM 460 proizvodi najviše koncentracije mliječne kiseline, utjecaj izvora ugljika na rast bakterije i proizvodnju mliječne kiseline i istražiti utjecaj inhibitora (mravlje i octene kiseline) na rast bakterije. Naposljetku, u ovome radu je istražena i mogućnost rasta bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na sekundarnoj lignoceluloznoj sirovini, pri čemu je kao sirovina korišten otpadni pivski trop. U ovome poglavlju slijedi grafički prikaz promjena koncentracija supstrata, biomase te produkta tijekom uzgoja, a nakon toga grafički prikaz pokazatelja uspješnosti procesa te rasprava dobivenih rezultata.

U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u tikvicama na podlozi s glukozom kao izvorom ugljika pri 40, 50 i 60 °C.

U poglavlju 4.2. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u tikvicama na podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika pri 40, 50 i 60 °C.

U poglavlju 4.3. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u tikvicama na podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika pri 40, 50 i 60 °C.

U poglavlju 4.4. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u tikvicama na simuliranoj podlozi pri 40, 50 i 60 °C.

U poglavlju 4.5. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom na simuliranoj podlozi pri 50 °C.

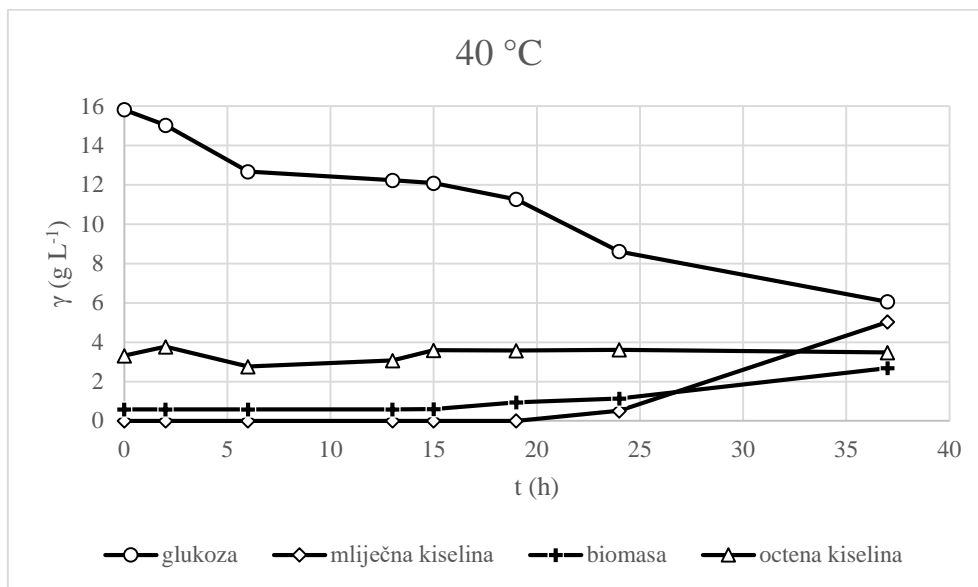
U poglavlju 4.6. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa pri 50 °C.

U poglavlju 4.7. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u tikvicama na simuliranoj podlozi s dodatkom inhibitora pri 50 °C.

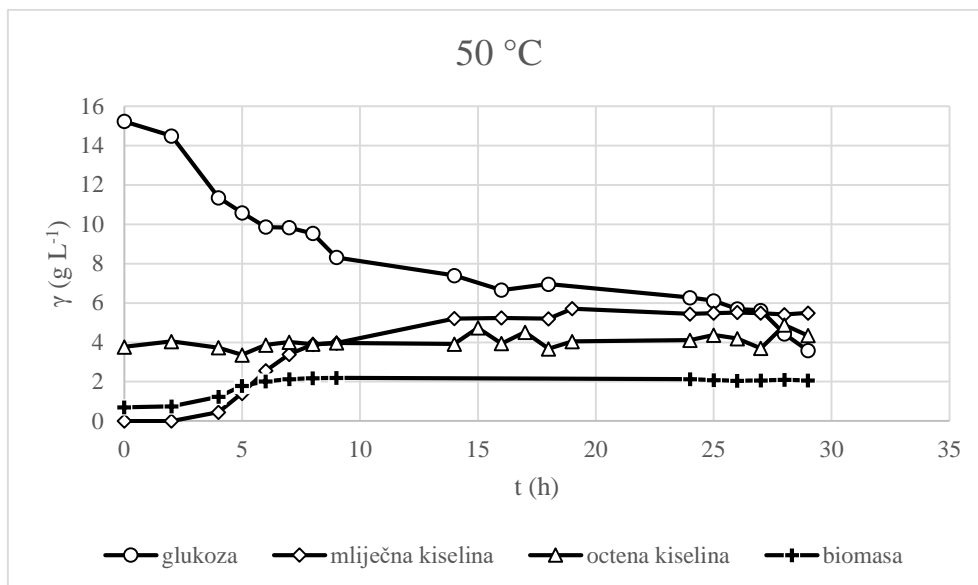
U poglavlju 4.8. prikazani su pokazatelji uspješnosti uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460.

4.1. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 U TIKVICAMA NA PODLOZI S GLUKOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA PRI 40, 50 I 60 °C

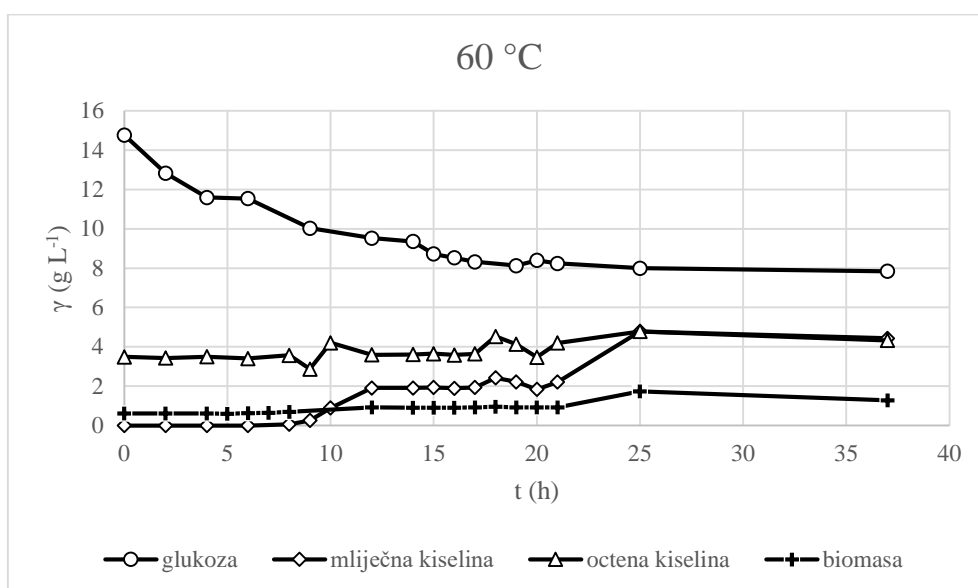
U ovome poglavlju dan je prikaz rezultata uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 na glukozi kao izvoru ugljika pri različitim temperaturama (40, 50 i 60 °C) kako bi se pratila sinteza mliječne kiseline. Rezultati potrošnje supstrata, sinteze produkta i rast biomase prikazani su grafički (slike 6-8). Sastav i priprema podloge, priprema inokuluma te vođenje uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 prikazani su u poglavlju Eksperimentalni dio.



Slika 6. Prikaz promjene koncentracije glukoze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom kao izvorom ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 40 °C



Slika 7. Prikaz promjene koncentracije glukoze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom kao izvorom ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 8. Prikaz promjene koncentracije glukoze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom kao izvorom ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$

Uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na glukozu kao izvoru ugljika pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ praćen je 37 sati. Tijekom uzgoja je utrošeno je $9,763 \text{ g L}^{-1}$ glukoze, a prinos bakterijske biomase je iznosio $2,108 \text{ g L}^{-1}$. Postignut je prinos mliječne kiseline od $5,032 \text{ g L}^{-1}$, dok je prinos octene kiseline iznosio $0,161 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata (glukoze) u mliječnu kiselinu

iznosio je $0,515 \text{ g g}^{-1}$, a ukupna produktivnost mliječne kiseline $0,136 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Maksimalna brzina potrošnje supstrata postignuta je između 19. i 24. sata te je bila $0,054 \text{ h}^{-1}$, a specifična brzina potrošnje supstrata je bila $0,025 \text{ h}^{-1}$.

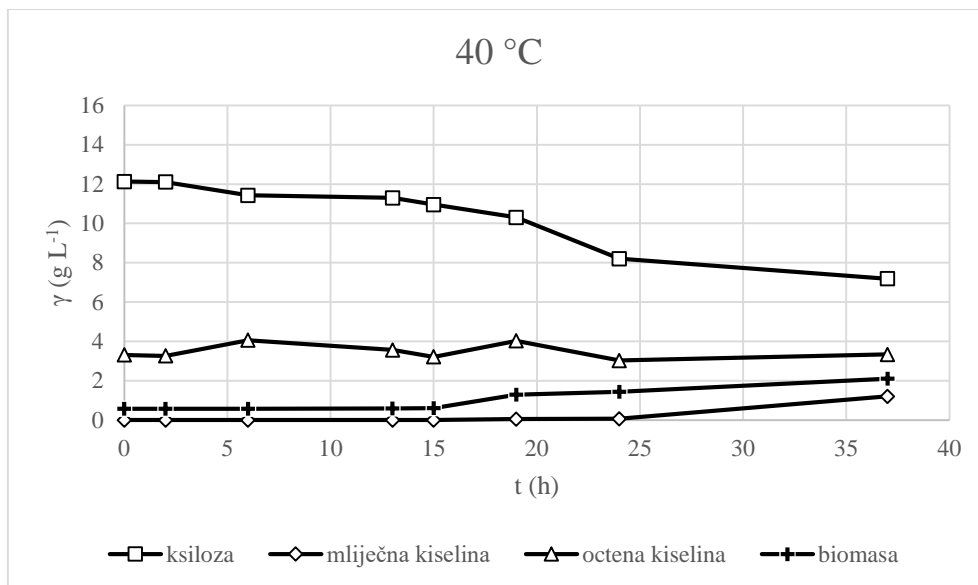
Tijekom 29 sati uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 pri temperaturi $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ na glukozu kao izvoru ugljika utrošeno je $11,652 \text{ g L}^{-1}$ glukoze. Specifična brzina potrošnje supstrata bila je $0,037 \text{ h}^{-1}$, a maksimalna brzina potrošnje supstrata je ostvarena između 26. i 27. sata te je iznosila $0,239 \text{ h}^{-1}$. Prinos biomase bio je niži u odnosu na uzgoj *B. smithii* DSM 460 pri $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i iznosio je $1,369 \text{ g L}^{-1}$, dok je prinos mliječne kiseline bio viši te je iznosio $5,496 \text{ g L}^{-1}$. Također, postignut je i viši prinos octene kiseline ($0,583 \text{ g L}^{-1}$). Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu bio je $0,472 \text{ g g}^{-1}$, a ukupna produktivnost mliječne kiseline $0,190 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 pri $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ na glukozu kao izvoru ugljika rezultirao je potrošnjom supstrata od $6,924 \text{ g L}^{-1}$, što je znatno manje u odnosu na uzgoje pri 40 i $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Prinos biomase je također bio niži u odnosu na prethodna dva uzgoja (na 40 i $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$) te je iznosio $0,669 \text{ g L}^{-1}$. Prinos mliječne kiseline bio je $4,430 \text{ g L}^{-1}$, a prinos octene kiseline $0,840 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u proizvod (mliječnu kiselinu) iznosilo je $0,640 \text{ g g}^{-1}$, što je najviša postignuta vrijednost promatramo li uzgoje *B. smithii* DSM 460 na glukozu kao supstratu. Ukupna produktivnost iznosila je $0,120 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Postignuta je specifična brzina potrošnje supstrata u iznosu $0,0178 \text{ h}^{-1}$, a maksimalna brzina potrošnje supstrata uočena je između 14. i 15. sata uzgoja u iznosu od $0,070 \text{ h}^{-1}$.

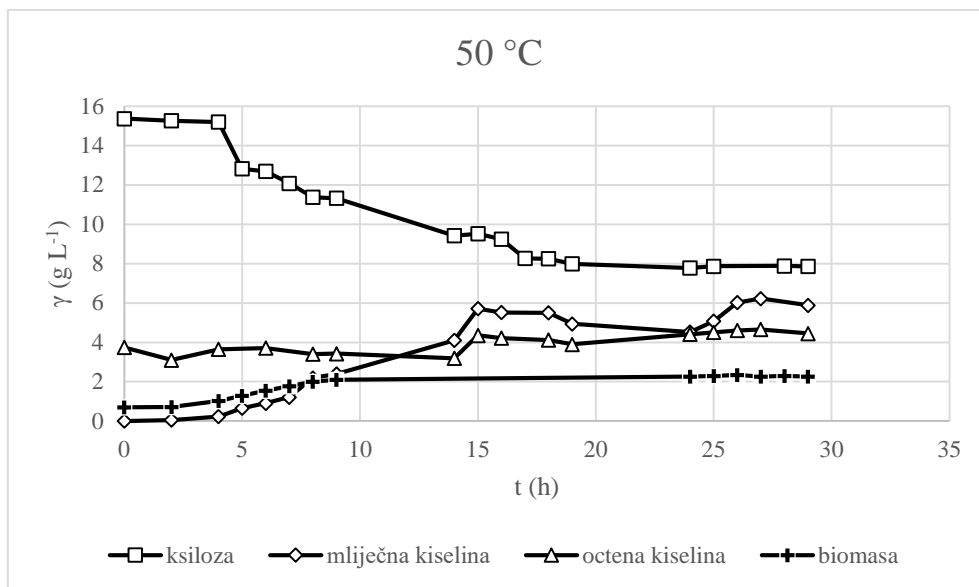
Sarić (2021) je provodio uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na glukozu kao izvoru ugljika pri 45 i $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 na $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ rezultirao je prinosom biomase od $2,192 \text{ g L}^{-1}$ te prinosom mliječne kiseline od $7,864 \text{ g L}^{-1}$ te se može primijetiti da su postignute više vrijednosti u odnosu na rezultate dobivene ovim istraživanjem, na glukozu kao izvoru ugljika. Tijekom uzgoja na $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ također su dobivene više vrijednosti u odnosu na istraživanja prikazana u ovome poglavlju, a prinosi biomase i mliječne kiseline iznosili su $2,312 \text{ g L}^{-1}$ odnosno $8,520 \text{ g L}^{-1}$. Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline je za uzgoj pri $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ iznosila $0,164 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a pri $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $0,178 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Usporedbom produktivnosti proizvodnje mliječne kiseline pri različitim temperaturama vidljivo je da je najveća pri $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a najmanja pri $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 U TIKVICAMA NA PODLOZI SA KSILOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA PRI 40, 50 I 60 °C

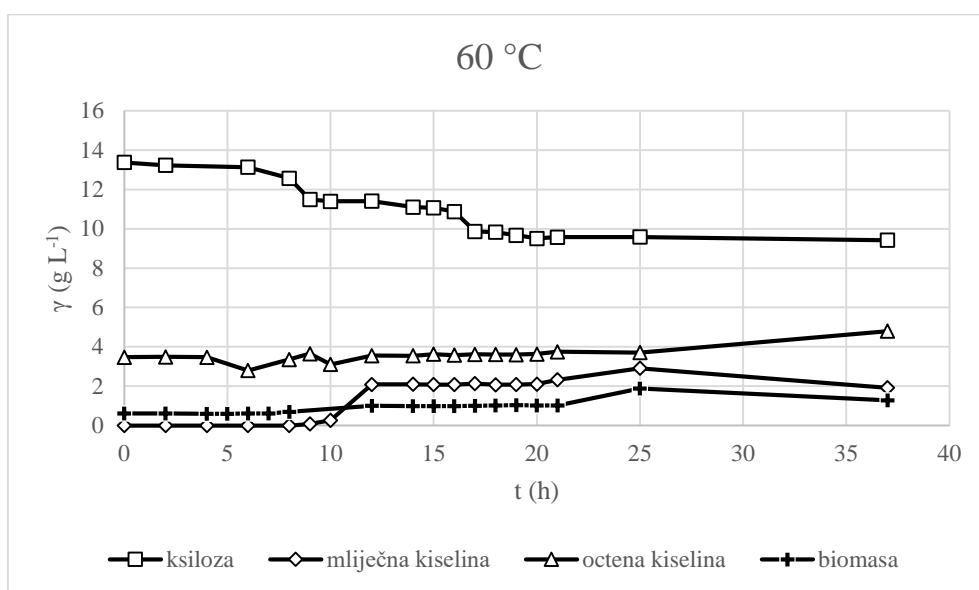
Uz glukozu, ksiloza je jedna od glavnih sastavnica lignoceluloznih sirovina te su stoga provedeni eksperimenti sa ksilozom kao izvorom ugljika za uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 pri različitim temperaturama (40, 50 i 60 °C). Tijekom provedbe uzgoja u podlozi sa ksilozom promatrana je njena potrošnja te proizvodnja bakterijske biomase i mliječne kiseline. U poglavljima 3.1.3., 3.2.2. i 3.2.3. prikazani su sastav i priprema podloge te praćenje uzgoja. Rezultati promjena koncentracija su prikazani grafički na slikama 9-11.



Slika 9. Prikaz promjene koncentracije ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 40 °C



Slika 10. Prikaz promjene koncentracije ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 11. Prikaz promjene koncentracije ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$

Uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ praćen je 37 sati. Tijekom uzgoja utrošeno je $4,939 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze, a postignut je prinos biomase od $1,527 \text{ g L}^{-1}$. Prinosi mliječne te octene kiseline bili su niski, za mliječnu kiselinu iznosio je $1,203 \text{ g L}^{-1}$, a za octenu kiselinu $0,023 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata (ksiloze)

u mliječnu kiselinu iznosio je $0,244 \text{ g g}^{-1}$. Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline bila je $0,033 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Maksimalna brzina potrošnje supstrata postignuta je između 19. i 24. sata u iznosu $0,046 \text{ h}^{-1}$, dok je specifična brzina potrošnje supstrata bila $0,015 \text{ h}^{-1}$.

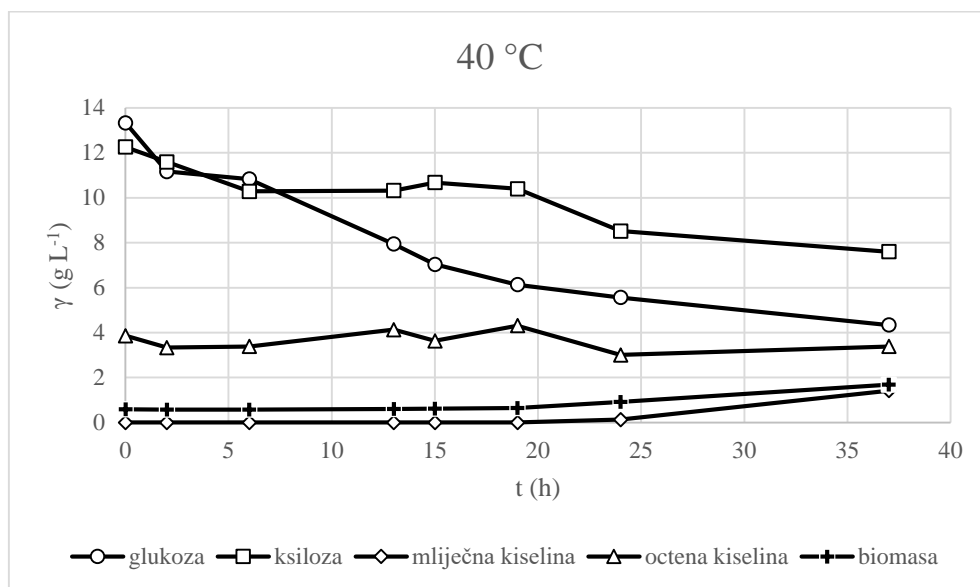
Tijekom 29 sati uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 na ksilozi kao supstratu pri $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ utrošeno je $7,508 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. Postignuti prinos biomase iznosio je $1,558 \text{ g L}^{-1}$, a prinos mliječne kiseline $6,229 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,830 \text{ g g}^{-1}$, a ukupna produktivnost proizvodnje mliječne kiseline $0,215 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, što je značajno više u odnosu na uzgoj pri $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Prinos octene kiseline iznosio je $0,712 \text{ g L}^{-1}$. Specifična brzina potrošnje supstrata bila je $0,026 \text{ h}^{-1}$, a maksimalna brzina potrošnje supstrata $0,170 \text{ h}^{-1}$ te je postignuta između 4. i 5. sata uzgoja.

Prilikom uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 pri $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ na ksilozi kao izvoru ugljika utrošeno je $3,952 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze, dok je prinos mliječne kiseline iznosio $2,914 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u proizvod iznosio je $0,737 \text{ g g}^{-1}$. Ukupna produktivnost proizvodnje mliječne kiseline iznosila je $0,079 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Tijekom uzgoja postignut je prinos biomase od $0,677 \text{ g L}^{-1}$ te prinos octene kiseline od $1,323 \text{ g L}^{-1}$, što je najviši postignuti prinos octene kiseline u odnosu na rezultate eksperimenata u ovome poglavlju. Specifična brzina potrošnje supstrata iznosila je $0,018 \text{ h}^{-1}$, a između 16. i 17. sata uzgoja postignuta je maksimalna brzina potrošnje uzgoja u iznosu $0,097 \text{ h}^{-1}$.

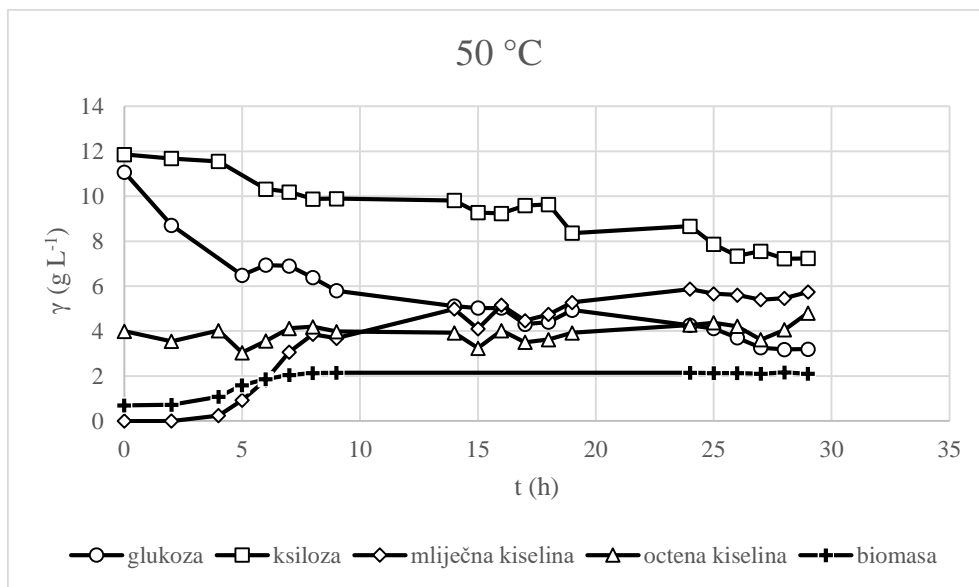
Istraživanja s bakterijom *Bacillus smithii* DSM 460 na ksilozi kao izvoru ugljika proveo je i Sarić (2021). On je provodio uzgoje pri 45 i $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ te su dobiveni prinosi $2,783 \text{ g L}^{-1}$ (biomasa) i $4,992 \text{ g L}^{-1}$ (mliječna kiselina) pri $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ odnosno $2,826 \text{ g L}^{-1}$ (biomasa) i $7,112 \text{ g L}^{-1}$ (mliječna kiselina) pri $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobivene su produktivnosti mliječne kiseline od $0,104 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (uzgoj pri $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$) te $0,148 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ukoliko usporedimo produktivnost mliječne kiseline pri svim navedenim temperaturama uzgoja ($40, 45, 50, 55$ i $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) možemo primijetiti da je najveća vrijednost zabilježena pri temperaturi $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,215 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a najniža pri $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,033 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

4.3. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 U TIKVICAMA NA PODLOZI S GLUKOZOM I KSILOZOM KAO IZVORIMA UGLJIKA PRI 40, 50 I 60 °C

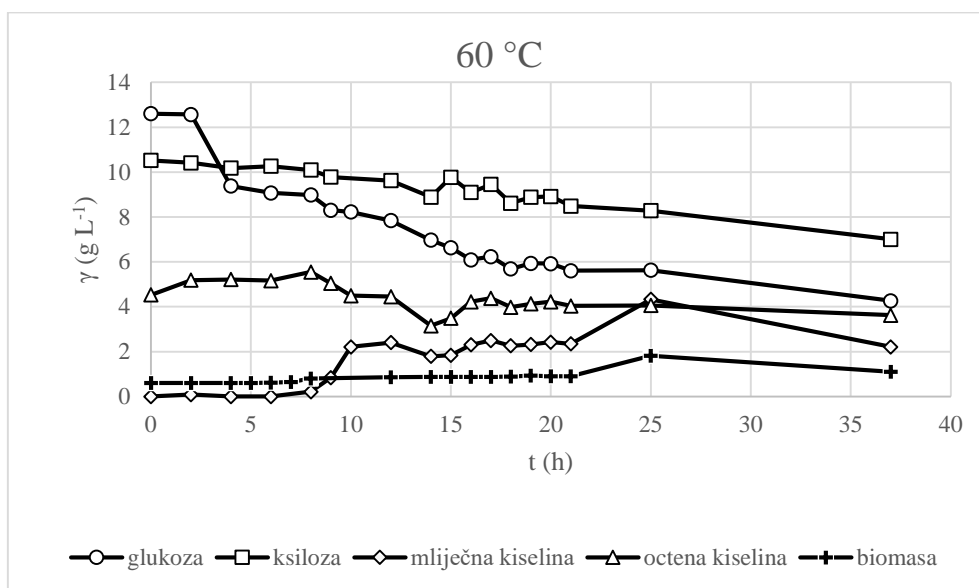
U ovome setu eksperimenata provedeni su uzgoji bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pri različitim temperaturama (40 °C; 50 °C; 60 °C) te su za uzgoj korištene podloge s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika. Cilj je bio istražiti dolazi li do poboljšanja proizvodnje mliječne kiseline u odnosu na eksperimente koji su provedeni s glukozom/ksilozom kao jedinim izvorom ugljika te istražiti utjecaj temperature na rast bakterija te na proizvodnju mliječne kiseline. Sastav i priprema podloge opisani su u poglavljima 3.1.3. i 3.2.2., a vođenje uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 u poglavlju 3.2.3. Promjene koncentracija supstrata, biomase i produkata prikazani su grafički (slike 12-14).



Slika 12. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 40 °C



Slika 13. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 50 °C



Slika 14. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 60 °C

Tijekom 37 sati uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 s glukozom i ksilozom u podlozi pri 40 °C utrošeno je 8,996 g L⁻¹ glukoze i 4,658 g L⁻¹ ksiloze. Prinos biomase iznosio je 1,105 g L⁻¹, prinos mliječne kiseline 1,421 g L⁻¹, a prinos octene kiseline nije uočen. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu bio je 0,104 g g⁻¹, a ukupna produktivnost 0,039 g L⁻¹

h^{-1} . Specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je $0,031 \text{ h}^{-1}$, a specifična brzina potrošnje ksiloze $0,012 \text{ h}^{-1}$. Maksimalna brzina potrošnje supstrata ($0,116 \text{ h}^{-1}$) uočena je u prva dva sata uzgoja.

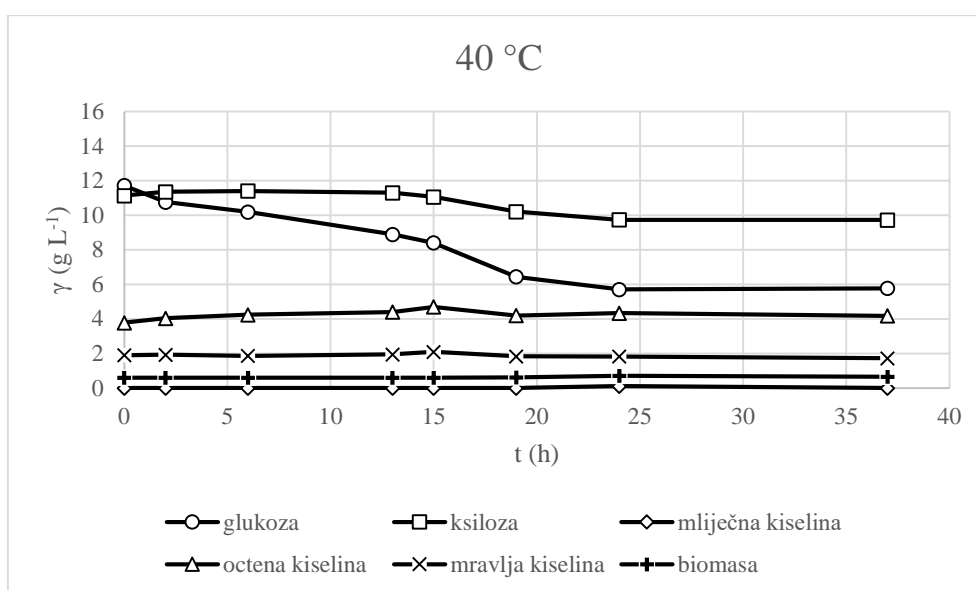
Uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika pri $50 \text{ }^\circ\text{C}$ praćen je 29 sati. Tijekom uzgoja je utrošeno $7,875 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i $4,619 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze, a postignut je prinos biomase od $1,406 \text{ g L}^{-1}$. Prinos mliječne kiseline bio je viši nego uzgojem pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ te je iznosio $5,740 \text{ g L}^{-1}$ te za octenu kiselinu $0,809 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,459 \text{ g g}^{-1}$ te je i tu postignuta viša vrijednost u odnosu na uzgoj pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline bila je $0,198 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Maksimalna brzina potrošnje supstrata postignuta je između 25. i 26. sata uzgoja u iznosu $0,175 \text{ h}^{-1}$, dok je specifična brzina potrošnje glukoze bila $0,035 \text{ h}^{-1}$, a ksiloze $0,016 \text{ h}^{-1}$.

Uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$ na glukozu i ksilozi (koje su služile kao supstrati) rezultirao je potrošnjom glukoze od $8,336 \text{ g L}^{-1}$ te potrošnjom ksiloze od $3,511 \text{ g L}^{-1}$. Prinos biomase je bio niži u odnosu na prethodna dva uzgoja (na 40 i $50 \text{ }^\circ\text{C}$) te je iznosio $0,499 \text{ g L}^{-1}$. Prinos mliječne kiseline bio je $4,333 \text{ g L}^{-1}$, a prinos octene kiseline nije zabilježen. Koeficijent konverzije supstrata u proizvod (mliječnu kiselinu) iznosio je $0,366 \text{ g g}^{-1}$. Ukupna produktivnost je bila nešto niža u odnosu na uzgoj pri $50 \text{ }^\circ\text{C}$ te je iznosila $0,117 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Specifične brzine potrošnje glukoze i ksiloze su bile približnih vrijednosti za sva tri uzgoja navedena u ovom poglavlju, a u ovome eksperimentu su iznosile $0,031 \text{ h}^{-1}$ odnosno $0,011 \text{ h}^{-1}$. Maksimalna brzina potrošnje supstrata uočena je između 17. i 18. sata uzgoja u iznosu od $0,174 \text{ h}^{-1}$.

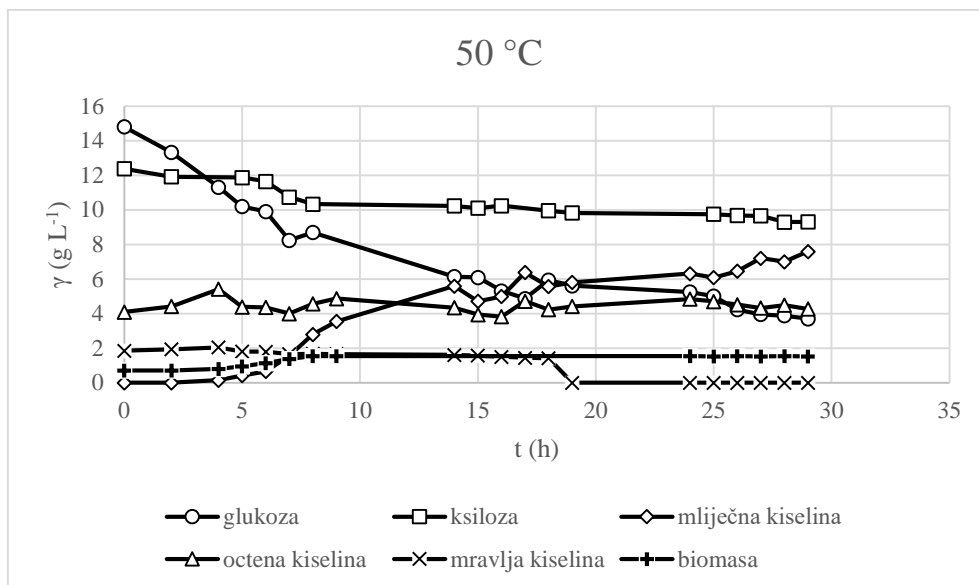
Eksperimenti s glukozom i ksilozom u podlozi za uzgoj *B. smithii* DSM 460 provedeni su i pri 45 odnosno $55 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sarić, 2021). Prinos biomase pri $45 \text{ }^\circ\text{C}$ iznosio je $2,194 \text{ g L}^{-1}$, a prinos mliječne kiseline $5,510 \text{ g L}^{-1}$. Uzgojem pri $55 \text{ }^\circ\text{C}$ dobiveni su prinosi $2,716 \text{ g L}^{-1}$ (za biomasu) i $8,167 \text{ g L}^{-1}$ (za mliječnu kiselinu). Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline pri $55 \text{ }^\circ\text{C}$ bila je nešto niža u odnosu na produktivnost pri $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ($0,198 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) te je iznosila $0,170 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a za uzgoj pri $45 \text{ }^\circ\text{C}$ je postignuta produktivnost iznosila $0,115 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

4.4. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 U TIKVICAMA NA SIMULIRANOJ PODLOZI PRI 40, 50 I 60 °C

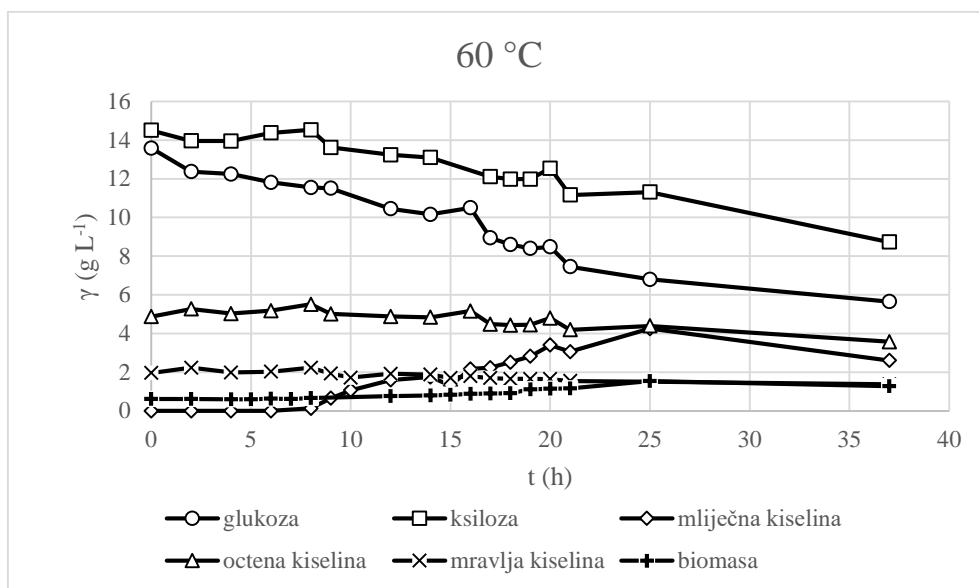
U ovome setu eksperimenata provedeni su uzgoji bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi kojom se simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa kako bi se dobio vrijedan biotehnološki proizvod – mliječna kiselina. Uzgoji su provedeni pri 40, 50 i 60 °C kako bi se utvrdilo koja je od tih temperatura najoptimalnija za rast biomase kao i za sintezu mliječne kiseline. Sastav podloge opisan je u poglavlja 3.1.3., dok je priprema podloge opisana u poglavlju 3.2.2. Vođenje uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 opisano je u poglavlju 3.2.3. Rezultati ovih uzgoja prikazani su grafički (slike 15-17).



Slika 15. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 40 °C



Slika 16. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog troja na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 50 °C



Slika 17. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog troja na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 60 °C

Uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog troja pri 40 °C praćen je 37 sati. Sastav podloge uključuje glukoze i ksiloze

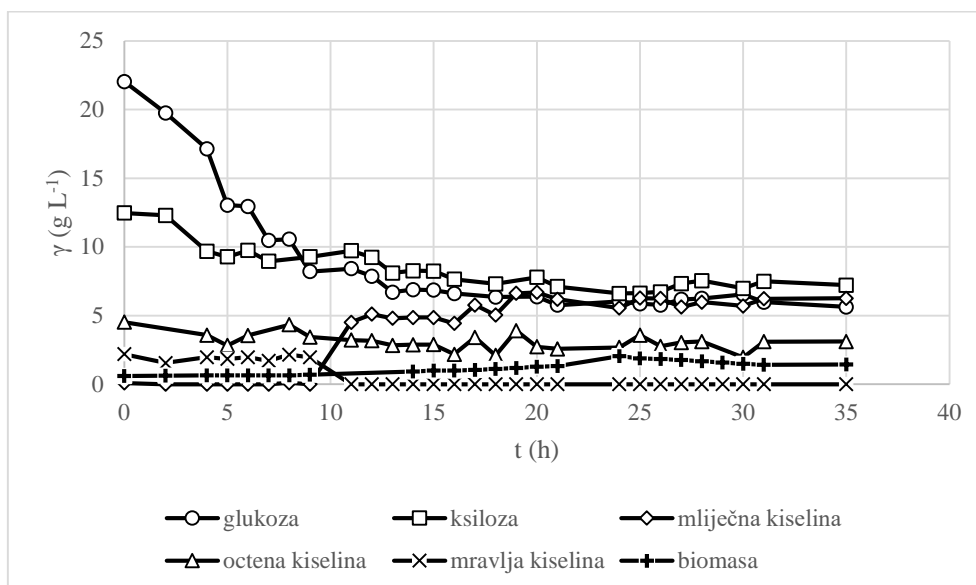
kao izvora ugljika, a tijekom uzgoja je utrošeno je 5,951 g L⁻¹ glukoze i 1,411 g L⁻¹ ksiloze. Prinos bakterijske biomase je iznosio 0,057 g L⁻¹. Postignuti prinos mliječne kiseline je 0,109 g L⁻¹, dok je prinos octene kiseline iznosio 0,395 g L⁻¹. Konverzija supstrata u mliječnu kiselinu iznosila je 0,015 g g⁻¹, a ukupna produktivnost mliječne kiseline bila je vrlo niska te je iznosila 0,003 g L⁻¹ h⁻¹. Maksimalna brzina potrošnje supstrata postignuta je između 15. i 19. sata te je bila 0,087 h⁻¹, a specifična brzina potrošnje glukoze je bila 0,022 h⁻¹.

Tijekom 29 sati uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 na simuliranoj podlozi otpadnog hidrolizata pivskog tropa (korišteni izvori ugljika su glukoza i ksiloza) pri 50 °C utrošeno je 3,076 g L⁻¹ ksiloze i 11,114 g L⁻¹ glukoze. Postignuti prinos biomase iznosio je 0,819 g L⁻¹, a prinos mliječne kiseline 7,593 g L⁻¹. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je 0,535 g g⁻¹, a ukupna produktivnost proizvodnje mliječne kiseline 0,262 g L⁻¹ h⁻¹. Vidljivo je da su svi parametri uzgoja pri 50 °C znatno veći u odnosu na one kod uzgoja pri 40 °C. Prinos octene kiseline je jedini parametar koji je imao nižu vrijednost u ovome uzgoju (u odnosu na uzgoj pri 40 °C) te je iznosio 0,174 g L⁻¹. Maksimalna brzina potrošnje supstrata 0,265 h⁻¹ je postignuta između 6. i 7. sata uzgoja, a specifična brzina potrošnje glukoze i ksiloze 0,043 odnosno 0,009 h⁻¹.

Uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 pri 60 °C na simuliranoj podlozi hidrolizata otpadnog pivskog tropa (u podlozi su korištene glukoza i ksiloza) rezultirao je potrošnjom glukoze od 7,932 g L⁻¹ te potrošnjom ksiloze od 5,775 g L⁻¹. Prinos biomase je bio niži u odnosu na prethodni uzgoj (na 50 °C) te je iznosio 0,656 g L⁻¹. Prinos mliječne kiseline je također bio niži (4,333 g L⁻¹), a prinos octene kiseline nije zabilježen. Koeficijent konverzije supstrata u proizvod (mliječnu kiselinu) iznosio je 0,310 g g⁻¹. Ukupna produktivnost je bila nešto niža u odnosu na uzgoj pri 50 °C te je iznosila 0,115 g L⁻¹ h⁻¹. Specifične brzine potrošnje glukoze i ksiloze u ovome eksperimentu su iznosile 0,031 h⁻¹ odnosno 0,011 h⁻¹. Maksimalna brzina potrošnje supstrata uočena je između 19. i 20. sata uzgoja u iznosu od 0,246 h⁻¹.

4.5. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM NA SIMULIRANOJ PODLOZI PRI 50 °C

U ovome eksperimentu je proveden šaržni uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi kojom se simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa u bioreaktoru s miješalom pri temperaturi 50 °C. Osim temperature, tijekom uzgoja je pH vrijednost regulirana na 6,3 te broj okretaja miješala na 250 o min⁻¹. Kao i u prethodnom poglavlju (gdje je uzgoj proveden na podlozi istoga sastava, u tikvicama) cilj je bio istražiti utjecaj simulirane podloge na proizvodnju mliječne kiseline, pri čemu su u simuliranoj podlozi kao izvori ugljika korištene glukoza i ksiloza (u zadanim koncentracijama). Promjene koncentracija supstrata, biomase i produkata su prikazani grafički, na slici 18.

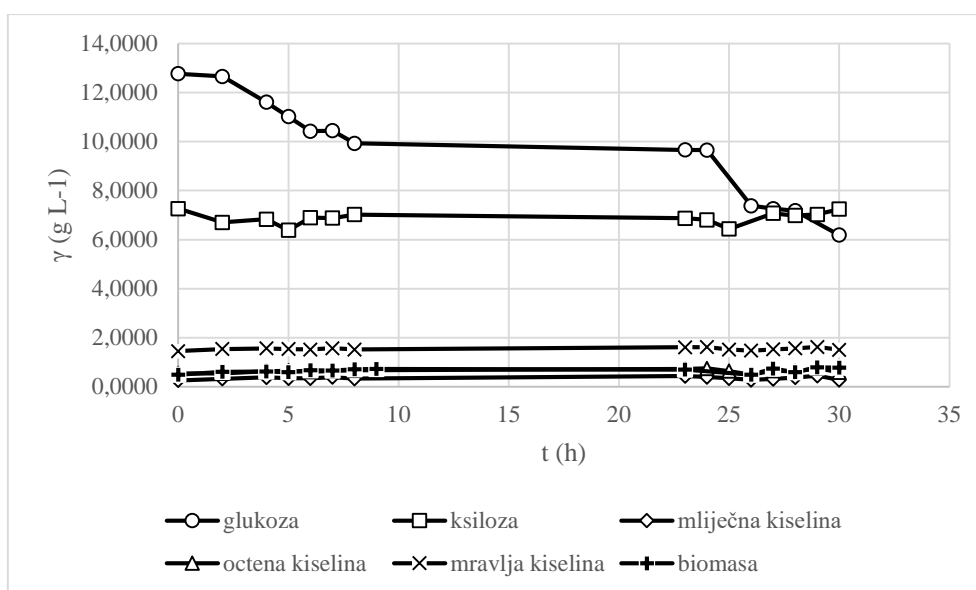


Slika 18. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, biomase te octene i mravlje kiseline tijekom šaržnog načina uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata pivskog tropa u bioreaktoru s miješalom

Šaržni uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa praćen je 35 sati. Sastav podloge uključuje korištenje glukoze i ksiloze kao izvora ugljika, a tijekom uzgoja je utrošeno je 16,406 g L⁻¹ glukoze i 5,260 g L⁻¹ ksiloze. Prinos bakterijske biomase je iznosio 0,825 g L⁻¹. Postignut je prinos mliječne kiseline od 6,259 g L⁻¹. Konverzija supstrata u mliječnu kiselinu iznosila je 0,289 g g⁻¹, a ukupna produktivnost mliječne kiseline 0,179 g L⁻¹ h⁻¹. Maksimalna brzina potrošnje supstrata postignuta je između 4. i 5. sata te je bila 0,317 h⁻¹, a specifična brzine potrošnje glukoze i ksiloze 0,065 h⁻¹ odnosno 0,015 h⁻¹.

4.6. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM NA DETOKSICIRANOM HIDROLIZATU OTPADNOG PIVSKOG TROPA PRI 50 °C

Šaržni uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom proveden je i na prethodno DKH otpadnog pivskog tropa kako bi se istražio potencijal sekundarnih lignoceluloznih sirovina u biotehnološkoj proizvodnji mliječne kiseline. Uzgoj je proveden na temperaturi 50 °C, pri pH vrijednosti 6,5 te s brojem okretaja miješala 250 o min⁻¹. Predobrada otpadnog pivskog tropa i priprema podloge opisani su u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2., a vođenje procesa u poglavlju 3.2.3. Rezultati provedenog uzgoja prikazani su grafički na slici 19.

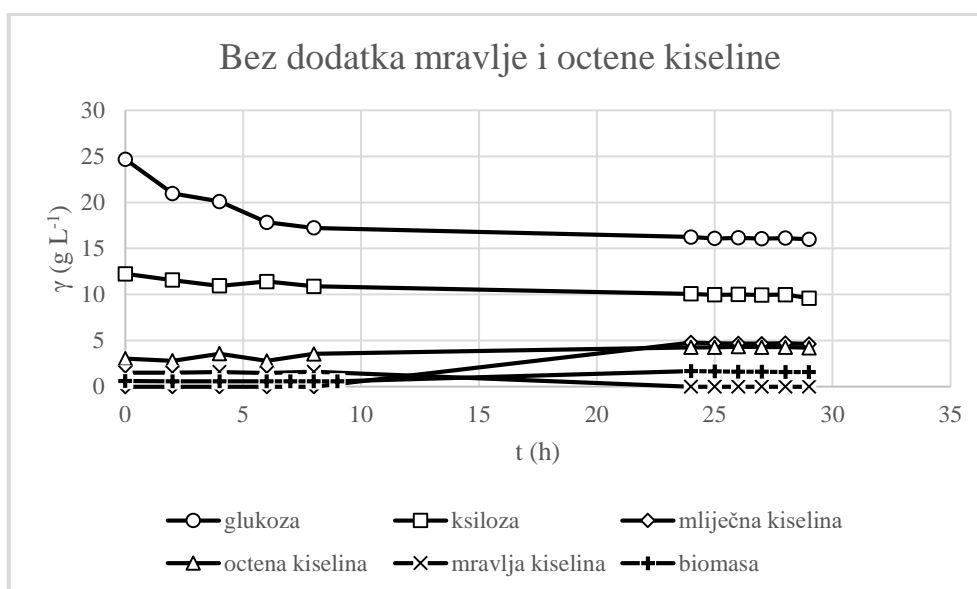


Slika 19. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, biomase te octene i mravlje kiseline tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa u bioreaktoru s miješalom

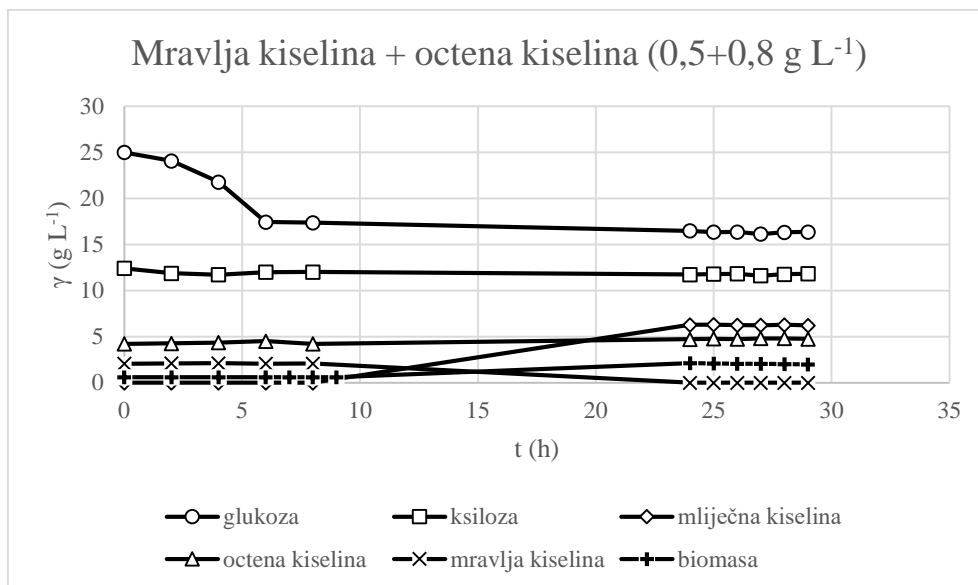
Tijekom šaržnog uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 na DKH otpadnog pivskog tropa u bioreaktoru s miješalom praćena je promjena koncentracija glukoze i ksiloze. Tijekom uzgoja je utrošeno 6,574 g L⁻¹ glukoze i 0,021 g L⁻¹ ksiloze. Prinosi biomase i mliječne kiseline bili su niski te su iznosili 0,276 odnosno 0,188 g L⁻¹. Prinos octene kiseline je bio 0,211 g L⁻¹. S obzirom na niske vrijednosti prinosa biomase i mliječne kiseline, koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu te produktivnost također imaju niske vrijednosti pa je koeficijent konverzije supstrata iznosio 0,029 g g⁻¹, a produktivnost proizvodnje mliječne kiseline 0,006 g L⁻¹ h⁻¹.

4.7. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 U TIKVICAMA NA SIMULIRANOJ PODLOZI S DODATKOM INHIBITORA (MRAVLJA I OCTENA KISELINA) PRI 50 °C

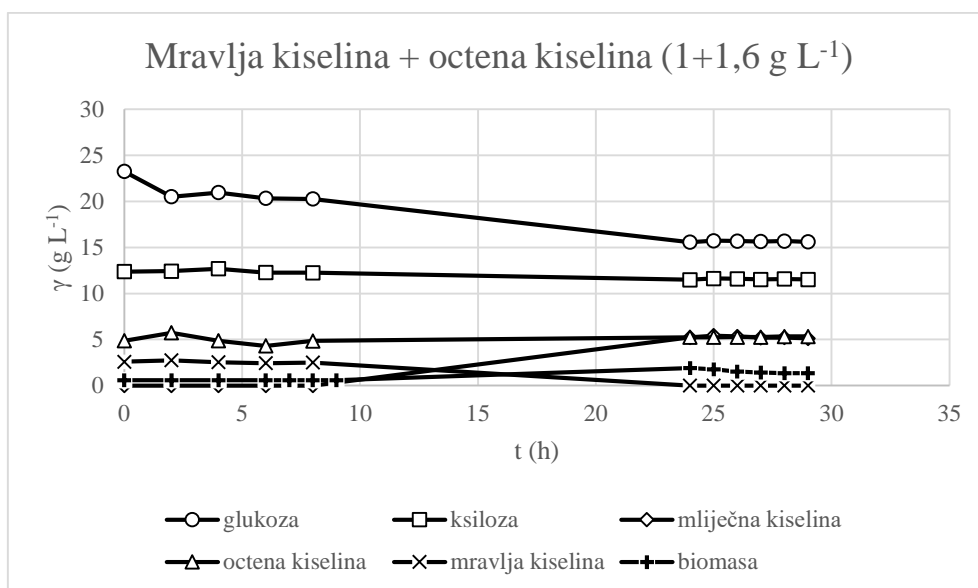
Ovaj niz eksperimenata je proveden kako bi se utvrdilo pri kojim koncentracijama mravlje i octene kiseline dolazi do inhibicije rasta bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 te time i do inhibicije proizvodnje mliječne kiseline. Uzgoji su provedeni u tikvicama, pri 50 °C u podlozi koja simulira sastav otpadnog pivskog tropa. U 5 različitim tikvica su dodavane mravlja i octena kiselina u različitim omjerima (koncentracije kiseline: 0,5 + 0,8 g L⁻¹; 1,0 + 1,6 g L⁻¹; 2,0 + 3,2 g L⁻¹; 4,0 + 6,4 g L⁻¹; 8,0 + 12,8 g L⁻¹), a jedna tikvica je služila kao kontrola (bez dodatka mravlje i octene kiseline). Sastav podloge opisan je u poglavlja 3.1.3., a priprema podloge u poglavlju 3.2.2. Vođenje uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 opisano je u poglavlju 3.2.3. Grafički prikaz rezultata nalazi se na slikama 20-25.



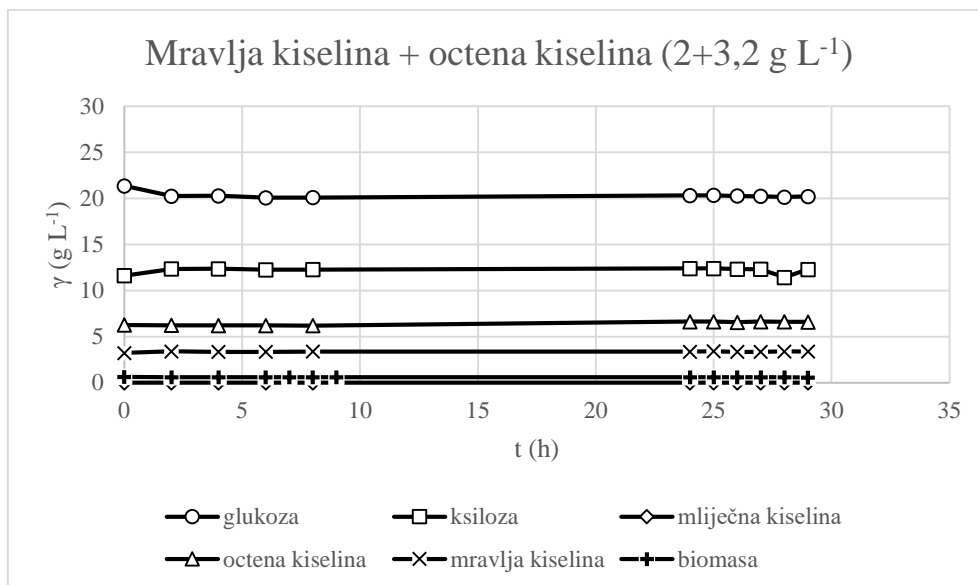
Slika 20. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od 50 °C bez dodatka inhibitora (mravlja i octena kiselina)



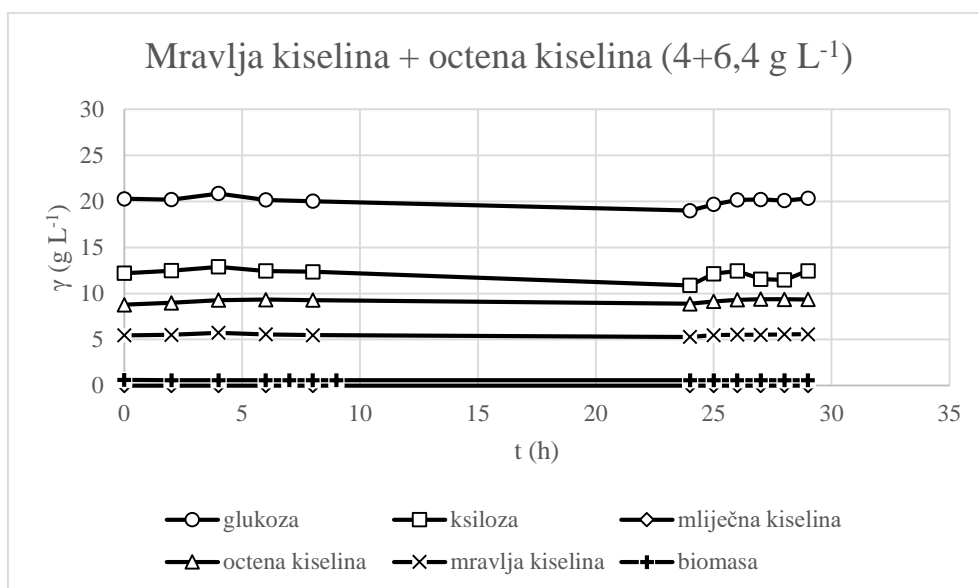
Slika 21. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ s dodatkom inhibitora (mravlja + octena kiselina) u koncentracijama (0,5 + 0,8 g L⁻¹)¹⁾



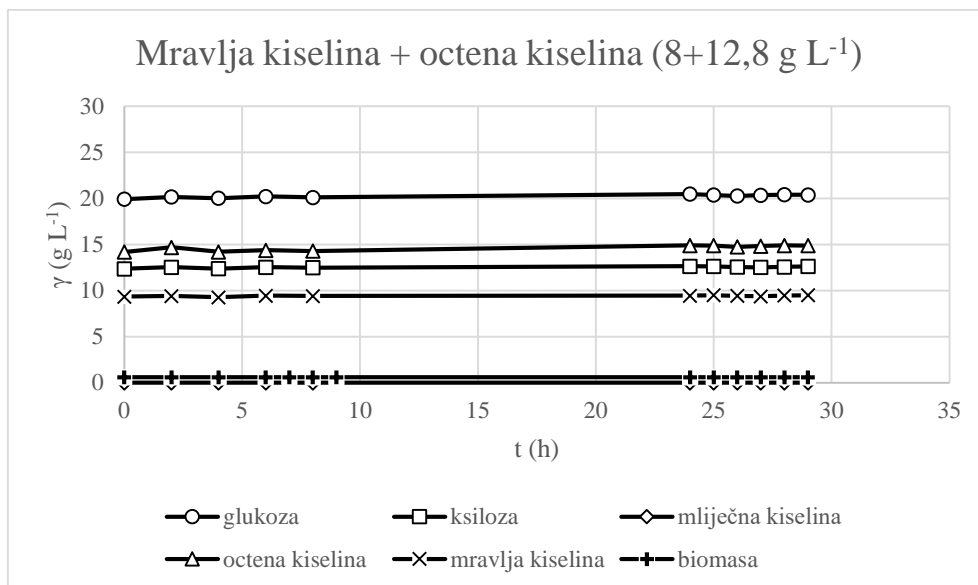
Slika 22. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ s dodatkom inhibitora (mravlja + octena kiselina) u koncentracijama (1,0 + 1,6 g L⁻¹)¹⁾



Slika 23. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ s dodatkom inhibitora (mravlja + octena kiselina) u koncentracijama (2,0 + 3,2 g L⁻¹)¹⁾



Slika 24. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ s dodatkom inhibitora (mravlja + octena kiselina) u koncentracijama (4,0 + 6,4 g L⁻¹)¹⁾



Slika 25. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa na treslici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ s dodatkom inhibitora (mravlja + octena kiselina) u koncentracijama ($8 + 12,8 \text{ g L}^{-1}$)

Na slici 20 prikazana je promjena koncentracija supstrata (glukoza i ksiloza), biomase, produkta (mliječna kiselina) te inhibitora (mravlja i octena kiselina) tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460. Uzgoj je praćen 29 sati, a u tom periodu je došlo do potrošnje $8,698 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i $2,648 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. Prinos biomase je iznosio $1,000 \text{ g L}^{-1}$, a prinos mliječne kiseline $4,643 \text{ g L}^{-1}$. S obzirom da tijekom uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 octena kiselina nastaje kao produkt, prinos je iznosio $1,184 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,409 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost mliječne kiseline $0,160 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Određene su specifične brzine potrošnje te je za glukozu iznosila $0,044 \text{ h}^{-1}$, a za ksilozu $0,013 \text{ h}^{-1}$.

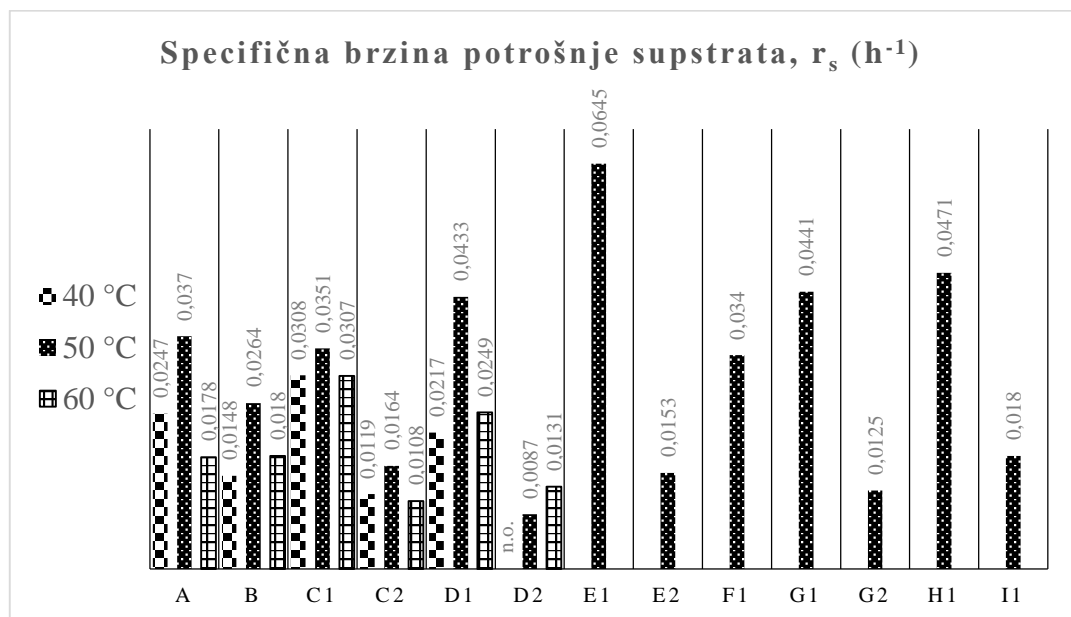
Slika 21 prikazuje rezultate uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira hidrolizat otpadnog pivskog tropa u koju je dodano $0,5 \text{ g L}^{-1}$ mravlje te $0,8 \text{ g L}^{-1}$ octene kiseline, koje su dodane kao inhibitori. Potrošnja supstrata (glukoze i ksiloze) iznosila je $8,633 \text{ g L}^{-1}$ za glukožu te $0,582 \text{ g L}^{-1}$ za ksiložu. Na slici je vidljivo da je nakon 24. sata uzgoja koncentracija mravlje kiseline pala na nulu, odnosno, došlo je do potrošnje inhibitora (mravlja kiselina). Prinosi mliječne kiseline i biomase bili su viši nego u uzgoju prikazanom na slici 20 (bez dodatka inhibitora) te su iznosili $6,210 \text{ g L}^{-1}$ (mliječna kiselina) odnosno $1,391 \text{ g L}^{-1}$. Osim prinosa, postignute su i više vrijednosti koeficijenta konverzije supstrata u mliječnu kiselinu ($0,674 \text{ g g}^{-1}$) te produktivnosti mliječne kiseline ($0,214 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Specifična brzina potrošnje ksiloze nije određena, a za glukožu je iznosila $0,047 \text{ h}^{-1}$.

Uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 u podlozi u koju su dodani inhibitori mravlja i octene kiseline (koncentracije: 1 + 1,6 g L⁻¹) prikazani su na slici 22. Došlo je do potrošnje glukoze od 7,643 g L⁻¹ te ksiloze u iznosu 0,845 g L⁻¹. U ovome uzgoju je također vidljivo da nakon 24. sata uzgoja u podlozi nije prisutna mravlja kiselina. Prinos biomase bio je dosta niži u odnosu na prethodni (slika 21) te je iznosio 0,753 g L⁻¹. Prinos mliječne kiseline bio je 5,137 g L⁻¹, a prinos octene kiseline 0,466 g L⁻¹. Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline iznosila je 0,177 g L⁻¹ h⁻¹, a koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu 0,605 g g⁻¹.

Uzgoji bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 s dodatkom viših koncentracija mravlje i octene kiseline (2,0 + 3,2 g L⁻¹; 4,0 + 6,4 g L⁻¹; 8,0 + 12,8 g L⁻¹) potpuno su inhibirali rast bakterijske biomase te proizvodnju mliječne kiseline. Koncentracije glukoze i ksiloze su ostale približno jednake, a odstupanja njihovih početnih koncentracija, koja su vidljiva na slikama 23-25, vjerojatno su nastala kao posljedica pogreške prilikom analize uzoraka.

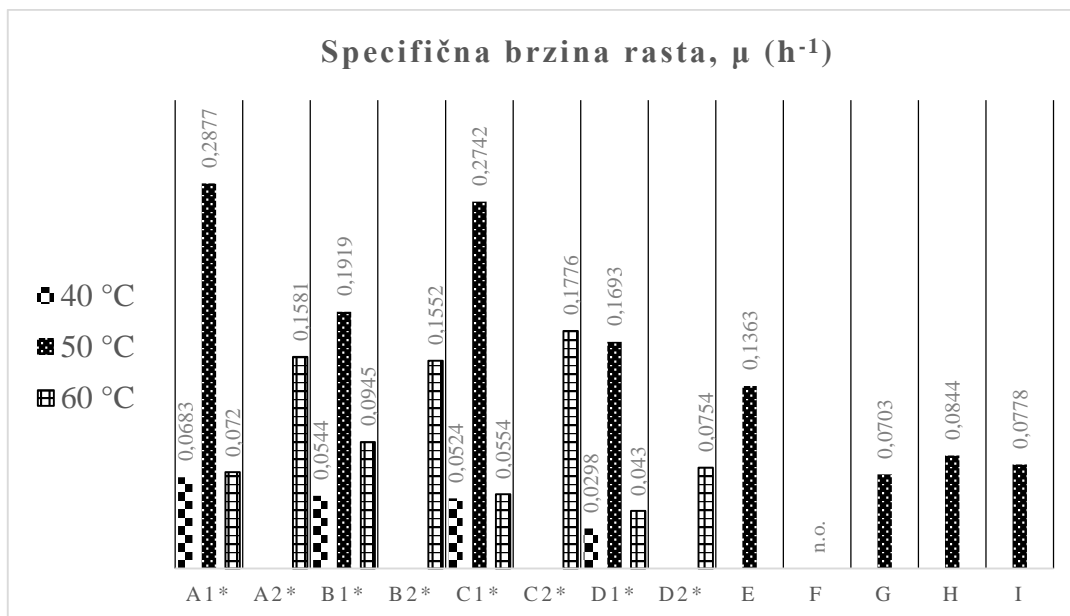
4.8. POKAZATELJI USPJEŠNOSTI UZGOJA BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460

U ovome poglavlju su prikazane specifične brzine potrošnje supstrata (glukoza i/ili ksiloza), rasta mikroorganizma (*Bacillus smithii* DSM 460) i sinteze produkta (mliječna kiselina). Na slikama 26-28 grafički su prikazane izračunate vrijednosti navedenih parametara. O specifičnoj brzini rasta ovise i brzina potrošnja supstrata i sinteze produkta te nam ovaj prikaz omogućuje odrediti uvjete u kojima su te brzine najviše.



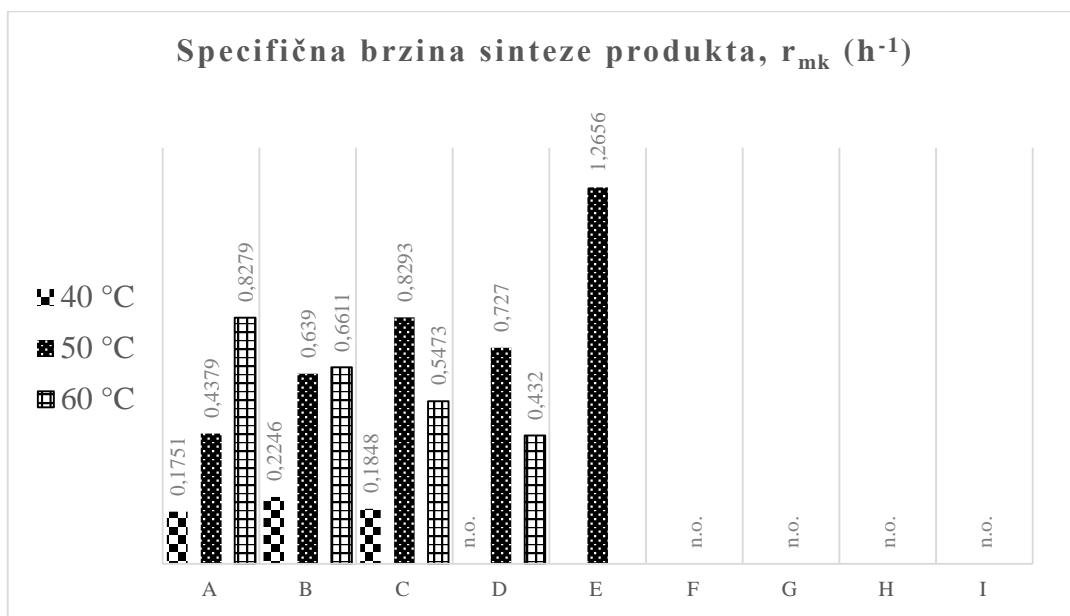
Slika 26. Prikaz specifične brzine potrošnje supstrata (glukoza i/ili ksiloza) pri različitim temperaturama te u podlogama različitih sastava.

Oznake: **A** (uzgoji na podlozi 1), **B** (uzgoji na podlozi 2), **C** (uzgoji na podlozi 3*), **D** (uzgoji na podlozi 4*), **E** (šaržni uzgoj u bioreaktoru na podlozi 4*), **F** (šaržni uzgoj u bioreaktoru na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa*), **G, H, I** (uzgoji s dodatkom inhibitora*)
* podloge koje sadrže glukoza i ksiloza kao izvore ugljika (**1** – oznaka za specifičnu potrošnju glukoze; **2** – oznaka za specifičnu potrošnju ksiloze)



Slika 27. Prikaz specifične brzine rasta bakterije *B. smithii* DSM 460 pri različitim temperaturama te u podlogama različitih sastava.

Oznake: **A** (uzgoji na podlozi 1), **B** (uzgoji na podlozi 2), **C** (uzgoji na podlozi 3), **D** (uzgoji na podlozi 4), **E** (šaržni uzgoj u bioreaktoru na podlozi 4), **F** (šaržni uzgoj u bioreaktoru na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog troja), **G, H, I** (uzgoji s dodatkom inhibitora)
 * specifične brzine rasta pri 60 °C su određene u dvije faze (**1** – prva faza eksponencijalnog rasta; **2** – druga faza eksponencijalnog rasta)



Slika 28. Prikaz specifične brzine sinteze proizvoda (mliječna kiselina) pri različitim temperaturama te u podlogama različitih sastava.

Oznake: **A** (uzgoji na podlozi 1), **B** (uzgoji na podlozi 2), **C** (uzgoji na podlozi 3), **D** (uzgoji na podlozi 4), **E** (šaržni uzgoj u bioreaktoru na podlozi 4), **F** (šaržni uzgoj u bioreaktoru na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa), **G, H, I** (uzgoji s dodatkom inhibitora); n.o. – nije određeno

Na slici 26 prikazane su specifične brzine potrošnje glukoze i ksiloze tijekom različitih uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460. Uzgoji označeni slovima „E“, „F“, „G“, „H“, „I“ provedeni su pri temperaturi od 50 °C. Rezultati uzgoja označenog slovom „D“ prikazani su u poglavlju 4.4. pri čemu specifična brzina potrošnje ksiloze pri 40 °C nije određena (na slici označeno s „n.o.“). Također, specifična brzina potrošnje ksiloze nije određena ni za uzgoje označene slovima „F“, „H“, „I“. Uzgoji označeni slovima „G“, „H“ i „I“ uzgoji su bakterije *B. smithii* DSM 460 provedeni u podlozi koja simulira hidrolizat pivskog tropa s dodatkom inhibitora. Oznaka G se odnosi na kontrolu, odnosno uzgoj bakterije na podlozi bez dodatka inhibitora, oznaka H na dodatak mravlje i octene kiseline u podlogu u koncentracijama 0,5 g L⁻¹ odnosno 0,8 g L⁻¹, a oznaka I na dodatak mravlje i octene kiseline u podlogu u koncentracijama 1,0 g L⁻¹ (mravlja kiselina) i 1,6 g L⁻¹ (octena kiselina). Dodatkom većih koncentracija mravlje i octene kiseline nije došlo do potrošnje supstrata, kao ni do rasta bakterijske biomase ili sinteze produkta (prethodno navedeno u poglavlju 4.7.) te stoga specifične brzine potrošnje supstrata za te uzgoje nisu prikazane. Usporede li uzgoji pri različitim temperaturama prikazani na slici 26 može se primijetiti da je pri temperaturi 50 °C potrošnja glukoze i ksiloze najveća (iznimka je uzgoj na simuliranoj podlozi pivskog tropa gdje je specifična potrošnja ksiloze pri 60 °C veća u odnosu na uzgoj u istoj podlozi pri 50 °C). Također, u svim uzgojima je specifična brzina potrošnje glukoze viša u odnosu na specifičnu brzinu potrošnje ksiloze, što je očekivano jer *B. smithii* DSM 460 preferirano metabolizira glukozu. Najviša specifična brzina potrošnje supstrata (glukoze) postignuta je tijekom uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 u bioreaktoru na podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa pri 50 °C te iznosi 0,0645 h⁻¹.

Slika 27 prikazuje specifične brzine rasta bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 za uzgoje pri različitim temperaturama i u podlogama različitih sastava. Za uzgoje bakterije *B. smithii* DSM 460 u tikvicama na različitim podlogama (P1, P2, P3, P4; sastav prikazan u poglavlju 3.1.3., tablica 4) pri 60 °C specifične brzine rasta su prikazane u dvije faze s obzirom da su tijekom uzgoja primijećene dvije eksponencijalne faze rasta. Za uzgoj bakterije *B. smithii* DSM 460 na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa (oznaka F) nije bilo moguće odrediti specifičnu brzinu rasta (n.o. – nije određeno). Također, kao što je navedeno u prethodnom odlomku, uzgoji bakterije *B. smithii* DSM 460 s dodatkom viših koncentracijama mravlje i

octene kiseline u potpunosti su inhibirani pa nije došlo do potrošnje supstrata kao ni do rasta biomase i sinteze mliječne kiseline te stoga nisu prikazani na slici (slika 27). Na slici 27 se može primijetiti da je najveća specifična brzina rasta bakterije postignuta pri temperaturi 50 °C, neovisno o sastavu podloge te da su pri 40 °C ostvarene najniže specifične brzine rasta. Takvi rezultati sugeriraju da je optimalna temperatura za rast bakterije *B. smithii* DSM 460 50 °C.

Specifične brzine sinteze mliječne kiseline tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 prikazane su na slici 28. Specifične brzine sinteze mliječne kiseline nisu određene za uzgoje u podlogama s dodatkom inhibitora (G, H, I), u detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa (F) te u podlozi koja simulira sastav otpadnog pivskog tropa pri temperaturi 40 °C (D). Najviša specifična brzina sinteze mliječne kiseline dobivena je tijekom uzgoja *B. smithii* DSM 460 u bioreaktoru pri 50 °C na podlozi koja simulira sastav otpadnog pivskog tropa te je iznosila 1,2656 g L⁻¹. Na slici 28 također možemo primijetiti da su uzgojem bakterije u podlozi 1 (glukoza kao izvor ugljika) i podlozi 2 (ksiloza kao izvor ugljika) pri 60 °C postignute više vrijednosti specifične brzine sinteze mliječne kiseline nego pri 50 °C iako su pri 50 °C postignuti viši prinosi mliječne kiseline. Uzgoji pri 40 °C rezultirali su najnižim specifičnim brzinama sinteze mliječne kiseline.

5. ZAKLJUČCI

Iz istraživanja provedenih u ovome radu mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Temperatura od 40 °C preniska je za učinkovit uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 kao i za njenu sintezu mliječne kiseline neovisno o sastavu podloge (glukoza i/ili ksiloza).
2. Optimalna temperatura za rast bakterije *B. smithii* DSM 460 te sintezu mliječne kiseline je 50 °C jer su pri toj temperaturi postignuti najviše vrijednosti procesnih parametara. Najviši stupanj konverzije supstrata u mliječnu kiselinu (0,83 g g⁻¹) postignut je u podlozi s ksilozom kao izvorom ugljika, a najveća produktivnost (0,262 g L⁻¹ h⁻¹) i prinos mliječne kiseline (7,593 g L⁻¹) u podlozi koja simulira sastav otpadnog pivskog tropa.
3. Rezultati dobiveni uzgojem *B. smithii* DSM 460 pri 60 °C pokazuju da pri toj temperaturi bakterija i dalje postiže zamjetne vrijednosti prinosa i produktivnosti mliječne kiseline, a najviše vrijednosti su postignute u podlozi s glukozom kao izvorom ugljika (prinos mliječne kiseline: 4,43 g L⁻¹; produktivnost mliječne kiseline: 0,12 g L⁻¹ h⁻¹).
4. Uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na detoksiciranom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa u bioreaktoru s miješalom pri 50 °C rezultirao je niskim vrijednostima procesnih parametara te je stoga potrebno provesti daljnja istraživanja za pronalazak bolje metode predobrade sirovine odnosno istražiti potencijal drugih lignoceluloznih sirovina koje bi mogle dati bolje rezultate.
5. Dodatkom niskih koncentracija inhibitora (mravlja i octena kiselina) u podlogu postignuti su viši prinosi mliječne kiseline (6,210 g L⁻¹ uz dodatak mravlje i octene kiseline u koncentracijama 0,5 + 0,8 g L⁻¹; 5,137 g L⁻¹ uz dodatak mravlje i octene kiseline u koncentracijama 1,0 + 1,6 g L⁻¹) u odnosu na kontrolu (4,643 g L⁻¹). Dodatkom viših koncentracija inhibitora u podlogu došlo je do potpune inhibicije.

6. POPIS LITERATURE

Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K (2011) Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J Biotechnol* **156**, 286-301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>

Anderson WF, Peterson J, Akin DE, Morrison WH (2005) Enzyme Pretreatment of Grass Lignocellulose for Potential High-Value Co-products and an Improved Fermentable Substrate. Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, ABAB Symposium, Humana Press.

Antal Jr. M (1996) Water: a traditional solvent pregnant with new applications. Proceedings of the 12th International Conference on the Properties of Water and Steam, Begell House, New York, str. 24–32.

Ashiuchi M, Shimanouchi K, Horiuchi T, Kamei T, Misono H (2006) Genetically engineered poly-gamma-glutamate producer from *Bacillus subtilis* ISW1214. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 1794–1797. <https://doi.org/10.1271/bbb.60082>

Axelsson L (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A (ured.) Microbiological and functional aspects, Marcel Dekker, Inc., New York, str. 1-66.

Bai DM, Zhao XM, Li XG, Xu SM (2004) Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L (+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochem Eng J* **18**, 41-48. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00126-8)

Balat M (2009) Gasification of biomass to produce gaseous products. *Energy Sources, Part A*, **31**, 516-526. <https://doi.org/10.1080/15567030802466847>

Balat M (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers Manag* **52**, 858-875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>

Bertoldo C, Antranikian G (2002) Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 151-160. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00311-3)

- Biswas R, Yamaoka M, Nakayama H, Kondo T, Yoshida K, Bisaria VS, i sur. (2012) Enhanced production of 2,3-butanediol by engineered *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**(3), 651–658. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3774-5>
- Blombach B, Eikmanns BJ (2011) Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Bioeng Bugs* **2**, 346–350. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.6.17845>
- Blumer-Schuetz SE, Brown SD, Sander KB, Bayer EA, Kataeva I, Zurawski JV i sur. (2014) Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 393–448. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12044>
- Bosma EF, van de Weijer AH, Daas MJ, van der Oost J, de Vos WM, van Kranenburg R (2015a) Isolation and screening of thermophilic bacilli from compost for electrotransformation and fermentation: characterization of *Bacillus smithii* ET 138 as a new biocatalyst. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 1874–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.03640-14>
- Bosma EF, van de Weijer AH, van der Vlist L, de Vos WM, van der Oost J, van Kranenburg R (2015b) Establishment of markerless gene deletion tools in thermophilic *Bacillus smithii* and construction of multiple mutant strains. *Microb Cell Fact* **14**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0286-5>
- Bosma EF, van der Oost J, de Vos WM, van Kranenburg R (2013) Sustainable production of bio-based chemicals by extremophiles. *Curr Biotechnol* **2**, 360–379. DOI: 10.2174/18722083113076660028
- Boswell C (2001) Bioplastics aren't the stretch they once seemed. *Chemical Market Reporter* **260**, 15–15.
- Buschke N, Schäfer R, Becker J, Wittmann C (2013) Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications—optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. *Bioresour Technol* **135**, 544–554. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.047>
- Busk PK, Lange L (2013) Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. *AMB Express* **3**, 1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-47>
- Bustos G, De la Torre N, Moldes AB, Cruz JM, Domínguez JM (2007) Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates through continuous production of lactic acid

and biosurfactants by *L. pentosus*. *J Food Eng* **78**, 405-412.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.008>

Carvalho F, Duarte LC, Giri FM (2008) Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J Sci Ind Res* **67**, 849–864.

Chahal SP, Starr JN (2006) Lactic acid. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Widnes: Croda Colloids Ltd., str. 1-9. https://doi.org/10.1002/14356007.a15_097.pub2

Chandel AK, Chan ES, Rudravaram R, Narasu ML, Rao LV, Ravindra P (2007) Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol Mol Biol Rev* **2**, 14-32.

Chang VS, Holtzapple M (2000) Fundamentals factors affecting biomass reactivity. *Appl Biochem Biotechnol* **84–86**, 5–37.

Chen CC, Ju LK (1998) Adsorption characteristics of polyvinylpyridine and activated carbon for lactic acid recovery from fermentation of *Lactobacillus delbrueckii*. *Sep Sci Technol* **33**, 1423–1437. <https://doi.org/10.1080/01496399808545058>

Chen R, Lee YY (1997) Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass. *Appl Biochem Biotechnol* **63**, 435-448.
<https://doi.org/10.1007/BF02920444>

Choi JH, Kim SH, Moon SH (2002) Recovery of lactic acid from sodium lactate by ion substitution using ion-exchange membrane. *Sep Purif Technol* **28**, 69-79.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(02)00014-X)

Cohen R, Suzuki MR, Hammel KE (2005) Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2412-2417. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2412-2417.2005>

Converse AO (1993) Substrate factors limiting enzymatic hydrolysis. U: Saddler JN (ured.), Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues. CAB International, Wallingford, UK, str. 93–106.

Dadi AP, Varanasi S, Schall CA (2006) Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol Bioeng* **95**, 904-910.
<https://doi.org/10.1002/bit.21047>

- Datta R, Henry M (2006) Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies—a review. *J Chem Technol Biotechnol* **81**, 1119-1129. <https://doi.org/10.1002/jctb.1486>
- Datta R, Tsai SP, Bonsignore P, Moon SH, Frank JR (1995) Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol Rev* **16**, 221-231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00168.x>
- Demirbas A (2007) Products from lignocellulosic materials via degradation processes. *Energy Source Part A* **30**, 27-37. <https://doi.org/10.1080/00908310600626705>
- Dey P, Pal P (2012) Direct production of L (+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions. *J Membr Sci* **389**, 355-362. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.10.051>
- Doran JW, Elliott ET, Paustian K (1998) Soil microbial activity, nitrogen cycling, and long-term changes in organic carbon pools as related to fallow tillage management. *Soil Till Res* **49**, 3-18. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(98\)00150-0](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(98)00150-0)
- Eggersdorfer M, Laudert D, Letinois U, McClymont T, Medlock J, Netscher T, i sur. (2012) One hundred years of vitamins—A success story of the natural sciences. *Angew Chem Int Ed* **51**, 12960-12990. <https://doi.org/10.1002/anie.201205886>
- Eichler J (2001) Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv* **19**, 261-278. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00061-1)
- Feldman D, Banu D, Natansohn A, Wang J (1991) Structure–properties relations of thermally cured epoxy–lignin polyblends. *J Appl Poly Sci* **42**, 1537-1550. <https://doi.org/10.1002/app.1991.070420607>
- Gao C, Ma C, Xu P (2011) Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnol Adv* **29**, 930-939. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>
- Gaur R, Grover T, Sharma R, Kapoor S, Khare SK (2010) Purification and characterization of a solvent stable aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning and analysis of aminopeptidase gene conferring solvent stability. *Process Biochem* **45**, 757-764. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.017>
- Gomes J, Steiner W (2004) The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol Biotechnol* **42**, 223-225. <https://hrcak.srce.hr/110869>

- Gonzalez MI, Alvarez S, Riera FA, Álvarez R (2008) Lactic acid recovery from whey ultrafiltrate fermentation broths and artificial solutions by nanofiltration. *Desalination* **228**, 84-96. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.08.009>
- Guo W, Jia W, Li Y, Chen S (2010) Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocellulosics. *Appl Biochem Biotechnol* **161**, 124-136. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8857-8>
- Gupta GN, Srivastava S, Khare SK, Prakash V (2014) Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *Int J Agric Environ Biotechnol* **7(2)**, 371. DOI: 10.5958/2230-732X.2014.00258.7
- Hábová V, Melzoch K, Rychtera M, Sekavová B (2004) Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth. *Desalination* **162**, 361-372. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(04\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(04)00070-0)
- Haki GD, Rakshit SK (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* **89**, 17-34. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6)
- Hammer B (1915) Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. *Iowa Agricultural Experimental Station Research Bulletin* **19**, 119–31.
- Hayn M, Steiner W, Klinger R, Steinmtiller H, Sinner M, Esterbauer H (1993) Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. In: Saddler, J.N. (Ed.) *Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*, CAB International, Wallingford, str. 33–72.
- Hendriks ATWM, Zeeman G (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* **100**, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Hinman ND, Schell DJ, Riley J, Bergeron PW, Walter PJ (1992) Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Appl Biochem Biotechnol* **34**, 639-649. <https://doi.org/10.1007/BF02920584>
- Hinman ND, Wright JD, Hogland W, Wyman CE (1989) Xylose fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* **20**, 391-401. <https://doi.org/10.1007/BF02936498>
- Hohmann HP, Stahmann KP (2010) *Biotechnology of riboflavin production*, Elsevier, Oxford, str. 115–139.

- Holwerda EK, Lynd LR (2013) Testing alternative kinetic models for utilization of crystalline cellulose (Avicel) by batch cultures of *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Bioeng* **110**, 2389-2394. <https://doi.org/10.1002/bit.24914>
- Hough DW, Danson MJ (1999) Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 39-46. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)80008-8)
- John RP, Nampoothiri KM, Pandey A (2007b) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 524-534. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>
- John RP, Sukumaran RK, Nampoothiri KM, Pandey A (2007a) Statistical optimization of simultaneous saccharification and L (+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochem Eng J* **36**, 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.02.028>
- Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuel Bioprod Biorefin* **1**, 119-134. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>
- Kaar WE, Holtzaple MT (2000) Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass Bioenerg* **18**, 189-199. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00091-4)
- Karan R, Singh RKM, Kapoor S, Khare SK (2011) Gene identification and molecular characterization of solvent stable protease from a moderately haloalkaliphilic bacterium, *Geomicrobium* sp. EMB2. *J Microbiol Biotechnol* **21**, 129-135. <https://doi.org/10.4014/jmb.1007.07064>
- Kelemen Z, Sarić M (2021) Biorafinerijski pristup iskorištavanju otpadne trave i pivskog tropa za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva s pomoću odabranih vrsta mikroorganizama (rad za Rektorovu nagradu), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Keshwani DR, Cheng JJ (2009) Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. *Bioresour Technol* **100**, 1515-1523. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.035>
- Kodali B, Pogaku R (2006) Pretreatment studies of rice bran for the effective production of cellulose. *Elect J Environ Agric Food Chem* **5**, 1253-1264.

Kumar L, Awasthi G, Singh B (2011) Extremophiles: a novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology* **10**, 121-135.

Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res* **48**, 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>

Kumar P, Patel SK, Lee JK, Kalia VC (2013) Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnol Adv* **31**, 1543–1561. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>

Kumar R, Nanavati H, Noronha SB, Mahajani SM (2006) A continuous process for the recovery of lactic acid by reactive distillation. *J Chem Technol Biotechnol* **81**, 1767-1777. <https://doi.org/10.1002/jctb.1603>

Kumar R, Singh, S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 377-391. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0327-8>

Kumar S, Nussinov R (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci* **58**, 1216–1233. DOI:10.1007/pl00000935

Ladisich MR, Lin KW, Voloch M, Tsao GT (1983) Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb Technol* **5**, 82-102. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(83\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(83)90042-X)

Laopaiboon P, Thani A, Leelavatcharamas V, Laopaiboon L (2010) Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresour Technol* **101**, 1036-1043. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.091>

Laser M, Schulman D, Allen SG, Lichwa J, Antal Jr MJ, Lynd LR (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour Technol* **81**, 33-44. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00103-1)

Lau MW, Dale BE, Balan V (2008) Ethanolic fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation. *Biotechnol Bioeng* **99**, 529-539. <https://doi.org/10.1002/bit.21609>

Lee KS, Lee DS (1993) A kinetic model for lactic acid production in Kimchi, a Korean fermented vegetable dish. *J Ferment Bioeng* **75**, 392-394. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90142-U](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90142-U)

Li S, Jia X, Wen J (2012) Improved 2-methyl-1-propanol production in an engineered *Bacillus subtilis* by constructing inducible pathways. *Biotechnol Lett* **34**, 2253–2258. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1041-1>

Li Y, Shahbazi A (2006) Lactic acid recovery from cheese whey fermentation broth using combined ultrafiltration and nanofiltration membranes. U: Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Humana Press, str. 985-996.

Li Y, Shahbazi A, Williams K, Wan C (2007) Separate and concentrate lactic acid using combination of nanofiltration and reverse osmosis membranes. U: Biotechnology for Fuels and Chemicals, Humana Press, str. 369-377.

Lin Y, Tanaka S (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 627-642. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>

Linko P, Stenroos SL, Linko YY, Koistinen T, Harju M, Heikonen M (1984) Applications of immobilized lactic acid bacteria. *Ann N Y Acad Sci* **434**, 406-417. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1984.tb29862.x>

Logan NA, Vos PD (2015) *Bacillus*. U: Whitman WB (ured.) Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, 1. izd., John Wiley & Sons, Inc., str. 1-163.

Lynd LR, Elander RT, Wyman CE (1996) Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. U: Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Humana Press, Totowa, str. 741-761.

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 506-577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>

Madzingaidzo L, Danner H, Braun R (2002) Process development and optimisation of lactic acid purification using electrodialysis. *J Biotechnol* **96**, 223-239. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00049-4)

Mardetko N, Novak M, Trontel A, Grubišić M, Galić M i Šantek B (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically

Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biochem Eng Q* **32**, 483-499.
<https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1409>

Martinez FAC, Balciunas EM, Salgado JM, González JMD, Converti A, de Souza Oliveira RP (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Technol* **30**, 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>

Matoković V (2020) Utjecaj izvora dušika, ugljika i svjetlosti na kinetiku rasta nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

McCaskey TA, Zhou SD, Britt SN, Strickland R (1994) Bioconversion of municipal solid waste to lactic acid by *Lactobacillus* species. *Appl Biochem Biotechnol* **45**, 555-568.
<https://doi.org/10.1007/BF02941830>

Meima RB, van Dijl JM, Holsappel S, Bron S (2004) Expression systems in *Bacillus*. U: Baneyx F (ured.) Protein Expression Technologies: Current Status and Future Trends, Horizon Bioscience, Wymondham, str. 199–252.

Melzoch K, Votruba J, Hábová V, Rychtera M (1997) Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate. *J Biotechnol* **56**, 25-31.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00074-6)

Moldes AB, Torrado A, Converti A, Dominguez JM (2006) Complete bioconversion of hemicellulosic sugars from agricultural residues into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *Appl Biochem Biotechnol* **135**, 219-227. <https://doi.org/10.1385/ABAB:135:3:219>

Molina-Sabio M, Rodríguez-Reinoso F (2004). Role of chemical activation in the development of carbon porosity. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp* **241**, 15-25.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.04.007>

Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, i sur. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* **96**, 673-686.

Mujtaba IM, Edreder EA, Emtir M (2012) Significant thermal energy reduction in lactic acid production process. *Applied energy* **89**(1), 74-80.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.031>

- Nakamura LK, Blumenstock I, Claus D (1988) Taxonomic Study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a Proposal for *Bacillus smithii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **38**, 63-73. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-63>
- Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A (2004) L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electron J Biotechnol* **7**, 167-178.
- Niehaus F, Bertoldo C, Kähler M, Antranikian G (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 711-729. <https://doi.org/10.1007/s002530051456>
- Nielsen JE, Borchert TV (2000) Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 253–274. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00240-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00240-5)
- Ogier JC, Leygue JP, Ballerini D, Rigal L, Pourquie J (1999) Ethanol production from lignocellulosic biomass; Production dethanol a partir de biomasse lignocellulosique. *Revue de l'Institut Francais du Petrole*, **54**.
- Öhgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G (2007) Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour Technol* **98**, 2503-2510. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.003>
- Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—A review. *Regul Toxicol Pharmacol* **45**, 144–158. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.05.001>
- Ou MS, Mohammed N, Ingram LO, Shanmugam KT (2009) Thermophilic *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalysts. *Appl Biochem Biotechnol* **155**, 76-82. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8509-4>
- Pan X, Gilkes N, Kadla J, Pye K, Saka S, Gregg D, i sur. (2006) Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: Optimization of process yields. *Biotechnol Bioeng* **94**, 851-861. <https://doi.org/10.1002/bit.20905>
- Pandey A, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Nigam P (2001) Production of organic acids by solid state fermentation. U: Pandey A, Soccol CR, Larroche C (ured.) Current Developments in Solid-state Fermentation, Springer, New York, str. 205-229.

Parisi F (1989) Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **38**, 53–87. <https://doi.org/10.1007/BFb0007859>

Patel RK, Dodia MS, Joshi RH, Singh SP (2006) Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochem* **41**, 2002-2009. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.016>

Perkins JB, Wyss M, Hohmann HP, Sauer U (2009) Metabolic engineering in *Bacillus subtilis*. U: Smolke CD (ured.) The Metabolic Pathway Engineering Handbook, CRC Press, Boca Raton, str. 23-36.

Qin J, Wang X, Zheng Z, Ma C, Tang H, Xu P (2010) Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. *Bioresour Technol* **101**, 7570-7576. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.037>

Rodrigues C, Vandenberghe LPS, Woiciechowski AL, de Oliveira J, Letti LAJ, Soccol CR (2017) Production and application of lactic acid. U: Pandey A, Negi S, Soccol CR (ured.) Current developments in biotechnology and bioengineering, Elsevier, str. 543-556.

Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**, 1092-1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>

Roy I, Sardar M, Gupta MN (2003) Hydrolysis of chitin by Pectinex™. *Enzyme Microb Technol* **32**, 582-588.

Saha BC (2000) α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv* **18**, 403-423. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00044-6)

Saha BC (2004) Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology, ACS Symp. Ser. **889**, 2–34. DOI: 10.1021/bk-2004-0889.ch001

Salminen S, Ouwehand A, Wright AV, Daly C (1993) U: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (ured.) Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects, Marcel Dekker, Inc., New York, str. 429-432.

San-Martín M, Pazos C, Coca J (1992) Reactive extraction of lactic acid with alamine 336 in the presence of salts and lactose. *J Chem Technol Biotechnol* **54**, 1-6. <https://doi.org/10.1002/jctb.280540102>

Sarić M (2021) Proizvodnja i izolacija mliječne kiseline pomoću termofilne bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Schiraldi C, De Rosa M (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol* **20**, 515-521. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02073-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02073-5)

Schmidt-Dannert C, Pleiss J, Schmid RD (1988) A toolbox of recombinant lipases for industrial applications. *Ann N Y Acad Sci* **864**, 14–22. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10284.x>

Shen X, Xia L (2006) Lactic acid production from cellulosic material by synergetic hydrolysis and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* **133**, 251-262. <https://doi.org/10.1385/ABAB:133:3:251>

Singh S, Shukla L, Nain L, Khare S (2011) Detection and characterization of new thermostable endoglucanase from *Aspergillus awamori* strain F 18. *J Mycol Plant Pathol* **41**, 97-103.

Singhvi M, Joshi D, Adsul M, Varma A, Gokhale D (2010) D-(–)-Lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-2 4. *Green Chem* **12**, 1106-1109. <https://doi.org/10.1039/B925975A>

Sinha A, Pant KK, Khare SK (2012) Studies on mercury bioremediation by alginate immobilized mercury tolerant *Bacillus cereus* cells. *Int Biodeter Biodegr* **71**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.12.014>

Sterner R, Liebl W (2001) Thermophilic Adaptation of Proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**, 39–106. DOI:10.1080/20014091074174

Sun R, Lawther JM, Banks WB (1995) Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Ind Crops Prod* **4**, 127-145. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(95\)00025-8](https://doi.org/10.1016/0926-6690(95)00025-8)

Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* **83**, 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

Taherzadeh MJ, Karimi K (2007) Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources* **2**, 707-738. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:hb:diva-2297>

Taherzadeh MJ, Karimi K (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci* **9**, 1621-1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>

Takagi H (1993) Protein engineering on subtilisin. *Int J Biochem* **25**, 307–312. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(93\)90617-N](https://doi.org/10.1016/0020-711X(93)90617-N)

Tan J, Abdel-Rahman MA, Sonomoto K (2017) Biorefinery-based lactic acid fermentation: microbial production of pure monomer product. U: Di Lorenzo M, Androsch R (ured.) *Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid)*, Springer, Cham, str. 27-66. https://doi.org/10.1007/12_2016_11

Taniguchi M, Hoshina M, Tanabe S, Higuchi Y, Sakai K, Ohtsubo S, i sur. (2005) Production of L-lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation using unsterilized defatted rice bran as a carbon source and nutrient components. *Food Sci Technol Res* **11**, 400-406. <https://doi.org/10.3136/fstr.11.400>

Taylor MP, Eley KL, Martin S, Tuffin MI, Burton SG, Cowan DA (2009) Thermophilic ethanologensis: Future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends Biotechnol* **27**, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.03.006>

Tsuji H, Saeki T, Tsukegi T, Daimon H, Fujie K (2008) Comparative study on hydrolytic degradation and monomer recovery of poly (L-lactic acid) in the solid and in the melt. *Polym Degrad Stab* **93**, 1956-1963. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.06.009>

Tu M, Saddler JN (2010) Potential enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood. *Appl Biochem Biotechnol* **161**, 274-287. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8869-4>

Van Den Burg B (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* **6**, 213-218. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2)

Vickroy TB (1985) Lactic acid. U: Blanch HW, Drew S (ured.) *Comprehensive Biotechnology—The Principles, Applications and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*, 2. izd., Pergamon Press, Toronto, str. 761–776.

Wang L, Zhao B, Liu B, Yu B, Ma C, Su F, i sur. (2010) Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose

utilizing *Bacillus* sp. strain. *Bioresour Technol* **101**, 7908-7915. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.031>

Wang M, Fu J, Zhang X, Chen T (2012) Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced production of acetoin. *Biotechnol Lett* **34**, 1877–1885. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0981-9>

Wee YJ, Yun JS, Park DH, Ryu HW (2004) Biotechnological production of L (+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotechnol Lett* **26**, 71-74. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.00000009464.23026.e0>

Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol* **96**, 1959-1966. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.010>

Xavier S, Lonsane BK (1994) Sugar-cane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid-state fermentation system. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 291-295. <https://doi.org/10.1007/BF00221221>

Yang B, Wyman CE (2008) Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuel Bioprod Biorefin: Innovation for a sustainable economy* **2**, 26-40. <https://doi.org/10.1002/bbb.49>

Yang SJ, Kataeva I, Hamilton-Brehm SD, Engle NL, Tschaplinski TJ, Doepcke C, i sur. (2009) Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment, by the thermophilic anaerobe “*Anaerocellum thermophilum*” DSM 6725. *Appl Environ Microbiol* **75**, 4762-4769. <https://doi.org/10.1128/AEM.00236-09>

Yu Z, Zhang H (2003) Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* **90**, 95-100. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00093-2)

Zeigler DR, Perkins JB (2021) The genus bacillus. U: Green LH, Goldman E (ured.) Practical handbook of microbiology, 4. izd., CRC Press, Boca Raton, str. 249-278.

Zhang M, Su R, Qi W, He Z (2010) Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. *Appl Biochem Biotechnol* **160**, 1407-1414. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8602-3>

Zhang X, Zhang R, Bao T, Yang T, Xu M, Li H, i sur. (2013) Moderate expression of the transcriptional regulator ALsR enhances acetoin production by *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **40**, 1067–1076. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1303-5>

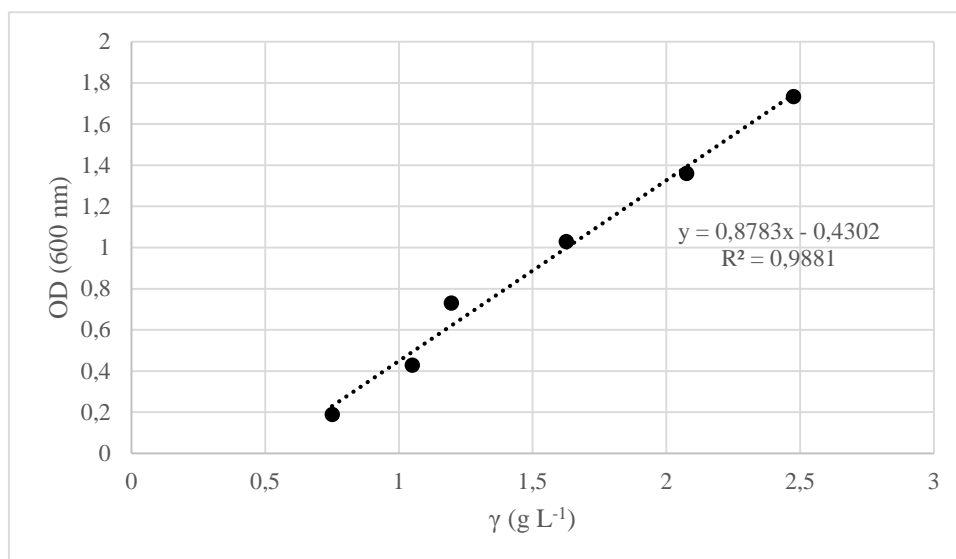
Zheng Y, Pan Z, Zhang R (2009) Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric Biol Eng* **2**, 51-68. DOI: 10.3965/j.issn.1934-6344.2009.03.051-068

7. PRILOZI

Prilog 1. Standardi korišteni za UPLC analizu

Tvar	RT (min)	Jednadžba kalibracijskog pravca	R ²
glukoza	4,766	$y = 143593x - 2189,5$	0,9998
ksiloza	5,134	$y = 126445x - 484,34$	0,9998
mliječna kiselina	6,709	$y = 70479x - 529,71$	0,9998
octena kiselina	8,035	$y = 68165x - 2182,8$	0,9983
mravlja kiselina	7,055	$y = 47144x - 14705$	0,9924

Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije bakterijske biomase



IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (LUCIJA VEKIĆ) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Lucija Vekić

Vlastoručni potpis