

# Biotehnološki procesi uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na obnovljivim izvorima ugljika u svrhu dobivanja proizvoda više vrijednosti

---

Brozović, Stella

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:159:544645>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Stella Brozović

**BIOTEHNOLOŠKI PROCESI  
UZGOJA BAKTERIJE *Paenibacillus  
polymyxa* DSM 742 NA  
OBNOVLJIVIM IZVORIMA  
UGLJIKA U SVRHU DOBIVANJA  
PROIZVODA VIŠE VRIJEDNOSTI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada 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 izrađen je u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

*Ovim putem zahvaljujem svojem mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na svim savjetima, konstruktivnim kritikama, uloženom vremenu, pomoći te pruženoj prilici za izradu ovog rada i stjecanje znanja i vještina rada u laboratoriju. Također bih htjela zahvaliti dr. sc. Blanki Ljubas, mag. ing. Marini Grubišić, mag. ing. Nenadu Marđetku i ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na ljubaznosti, susretljivosti, pruženoj pomoći, savjetima i strpljenju prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada te kolegici Luciji s kojom sam provodila dane u laboratoriju. Iskreno zahvaljujem i voditelju studija prof. dr. sc. Božidaru Šanteku za svo preneseno znanje i srdačnost prilikom svakog susreta. Na kraju bih također zahvalila svojoj obitelji, prijateljima i posebno Domagoju na neizmjerne podršci i razumijevanju tijekom cijelog studija.*

## 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 BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 NA  
OBNOVLJIVIM IZVORIMA UGLJIKA U SVRHU DOBIVANJA PROIZVODA VIŠE  
VRIJEDNOSTI

*Stella Brozović*, univ. bacc. ing. biotechn. 0058210317

**Sažetak:** Pivski trop kao lignocelulozna sirovina predstavlja obnovljiv, jeftin i lako dostupan izvor ugljika i energije za dobivanje visokovrijednih proizvoda kao što su biokemikalije i biogoriva. U ovom radu istraživana je sposobnost rasta i sinteze vrijednih proizvoda metabolizma (2,3-butandiola, etanola, mliječne kiseline, acetoina, lignocelulolitičkih enzima) bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama i različitim hidrolizatima dobivenim predobradom pivskog tropa. Uzgojem u podlozi s 10 g/L kvašćevog ekstrakta (kao izvora dušika) postignut je najviši prinos 2,3-butandiola, dok su najviši prinosi etanola i acetoina postignuti uzgojem u podlozi s 10 g/L peptona. Najveća enzimsko aktivnost (3,31 U/ml) zapažena je tijekom uzgoja na ksilanu kao izvoru ugljika. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, u podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat pivskog tropa proizvedeno je 91,702 g 2,3-butandiola, 114,398 g mliječne kiseline, 67,845 g etanola i 16,224 g acetoina, što je značajno više u odnosu na šaržni način vođenja procesa. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu, glavni produkt bio je etanol (67,552 g), a ostali produkti metabolizma sintetizirani su u manjim količinama. Uzgojem na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize proizvedena je jedino mliječna kiselina (183,776 g).

**Ključne riječi:** *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, pivski trop, biokemikalije, lignocelulolitički enzimi, bioreaktor s miješalom

**Rad sadrži:** 75 stranica, 11 slika, 12 tablica, 153 literaturna navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Mario Novak

**Pomoć pri izradi:** Blanka Ljubas, dr. sc.

**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 Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES FOR CULTIVATION OF THE BACTERIUM *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 UTILIZING RENEWABLE CARBON SOURCES IN ORDER TO OBTAIN VALUABLE PRODUCTS

*Stella Brozović*, univ. bacc. ing. biotechn. 0058210317

**Abstract:** Brewers' spent grain (BSG), as a lignocellulosic material, represents a renewable and cheap carbon source to obtain high-value products such as biochemicals and biofuels. The aim of this study was to investigate growth and production potential of valuable products (2,3-butanediol, ethanol, lactic acid, acetoin, lignocellulolytic enzymes) of the bacterium *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 in chemically defined media and different hydrolysates of pretreated BSG. The highest yield of 2,3-butanediol was obtained during the cultivation in the media with 10 g/L yeast extract (as a nitrogen source), while the highest yields of ethanol and acetoin were achieved during the cultivation with 10 g/L peptone. The highest enzyme activity (3.31 U/ml) was observed during the cultivation with xylan as a carbon source. During the fed-batch cultivation in a stirred tank bioreactor (STBR), in the media that simulates the acid hydrolysate of pretreated BSG, 91.702 g of 2,3-butanediol, 114.398 g of lactic acid, 67.845 g of ethanol and 16.224 g of acetoin were produced, which is significantly higher compared to the batch cultivation. The main product obtained during the fed-batch cultivation in the STBR, on acid hydrolysate was ethanol (67.552 g), while other products were produced in smaller quantities. The only product obtained during the cultivation in the liquid phase of enzymatically hydrolyzed solid part of pretreated BSG was lactic acid (183.776 g).

**Keywords:** *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, brewers' spent grains, biochemicals, lignocellulolytic enzymes, stirred tank bioreactor

**Thesis contains:** 75 pages, 11 figures, 12 tables, 153 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** 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 21<sup>st</sup>, 2022



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. BAKTERIJE RODA <i>Paenibacillus</i> .....	2
2.2. <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	2
2.3. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	3
2.3.1. Biotehnoška proizvodnja 2,3-butandiola.....	4
2.3.2. Proizvodnja hidrolitičkih enzima.....	5
2.4. PRIMJENA BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> U POLJOPRIVREDI .....	6
2.4.1. Fiksacija dušika .....	7
2.4.2. Solubilizacija fosfora i dobava željeza .....	7
2.4.3. Proizvodnja fitohormona .....	8
2.4.4. Proizvodnja antimikrobnih spojeva .....	8
2.5. LIGNOCELULOZNE SIROVINE KAO OBNOVLJIVI IZVORI UGLJIK A .....	10
2.5.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina .....	11
2.5.2. Otpadni pivski trop .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI .....	15
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	15
3.1.2. Kemikalije, enzimi i sirovine.....	15
3.1.3. Hranjive podloge .....	17
3.1.4. Oprema i uređaji .....	21
3.2. METODE .....	25
3.2.1. Priprema inokuluma .....	25
3.2.2. Predobrada otpadnog pivskog tropa .....	25
3.2.3. Priprema hranjivih podloga .....	26
3.2.4. Provedba i nadzor uzgoja bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 .....	28
3.2.5. Analitičke metode.....	30
3.2.6. Proračun parametara uspješnosti provedenih uzgoja.....	33
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>35</b>
4.1. UZGOJ BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 NA PODLOGAMA S RAZLIČITIM IZVORIMA DUŠIKA.....	36
4.2. UZGOJ BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIK A U SVRHU INDUKCIJE SINTEZE LIGNOCELULOLITIČKIH ENZIMA .....	42

4.3. UZGOJI BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, U PODLOZI KOJA SIMULIRA SASTAV KISELINSKOG HIDROLIZATA OTPADNOG PIVSKOG TROPA .....	44
4.4. ŠARŽNI UZGOJ BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 S PRITOKOM SUPSTRATA, U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, NA KISELINSKOM HIDROLIZATU OTPADNOG PIVSKOG TROPA .....	51
4.5. ŠARŽNI UZGOJ BAKTERIJE <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 S PRITOKOM SUPSTRATA, U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, NA ENZIMSKOM HIDROLIZATU ČVRSTE FAZE ZAOSTALE NAKON KISELINSKE HIDROLIZE OTPADNOG PIVSKOG TROPA .....	55
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>59</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>60</b>
<b>7. PRILOZI</b>	

# 1. UVOD

Zahtjevi za ublažavanjem klimatskih promjena i smanjenjem potrebe za fosilnim gorivima potiču razvoj održivih metoda/pristupa iskorištavanja lignoceluloznih sirovina, kao obnovljivih i lako dostupnih alternativnih izvora energije za dobivanje visokovrijednih proizvoda kao što su biogoriva i biokemikalije (Chandel i sur., 2018). Obzirom da se lignocelulozna biomasa uglavnom sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina koji čine složenu strukturu prirodno otpornu na djelovanje enzima, potrebno je provesti određene korake predobrade kojom se dobivaju fermentabilni šećeri koje mikroorganizmi mogu metabolizirati (Zoghلامي i Paës, 2019). Bakterija *Paenibacillus polymyxa* privukla je značajan interes zahvaljujući velikom potencijalu primjene u održivoj poljoprivredi i biotehnološkim procesima proizvodnje biokemikalija, polimera i enzima (Lal i Tabacchioni, 2009). Ova bakterija proizvodi široku paletu sekundarnih metabolita uključujući fitohormone, polisaharide i antimikrobne spojeve koji sudjeluju u prilagodbi na različite okolišne uvjete (Grady i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je istražiti sposobnost rasta i proizvodnje vrijednih produkata metabolizma bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim i kompleksnim hranjivim podlogama dobivenim predobradom lignocelulozne sirovine. Proveden je niz eksperimenata kojima se istraživao utjecaj različitih izvora dušika u podlozi te sposobnost proizvodnje lignocelulolitičkih enzima u Erlenmeyerovim tikvicama. Sposobnost rasta, potrošnje supstrata i proizvodnje 2,3-butandiola, etanola, mliječne kiseline i acetoina istraživana je u bioreaktoru s miješalom, različitim načinima vođenja procesa, na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa te na kompleksnim hranjivim podlogama dobivenim kiselinskom hidrolizom pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru i enzimskom hidrolizom zaostale čvrste faze nakon kiselinske hidrolize pivskog tropa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE RODA *Paenibacillus*

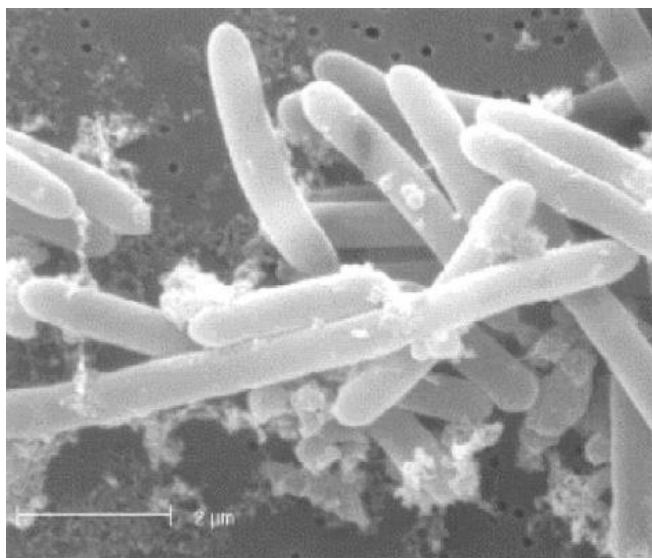
Bakterije koje pripadaju rodu *Paenibacillus* izolirane su iz različitih staništa, no većina ih je pronađena u tlu. Često su povezane s korijenjem biljaka (rizobakterije), promoviraju njihov rast te se mogu primijeniti u poljoprivredi. Mnoge vrste proizvode antimikrobne spojeve (s primjenom u medicini ili kao pesticidi) i enzime s potencijalom primjene u bioremedijaciji ili za proizvodnju vrijednih kemikalija. Međutim, neke vrste su patogene za pčele ili druge beskralješnjake (Grady i sur., 2016).

Vrste roda *Paenibacillus* izvorno su bile uključene u rod *Bacillus* temeljem morfoloških karakteristika zajedničkih s vrstom *Bacillus subtilis* koja je izolirana 1872. godine. Bilo koja bakterija štapićastog oblika, aerobna ili fakultativno anaerobna koja ima sposobnost stvaranja endospora bila je klasificirana kao *Bacillus*. Međutim, te karakteristike same po sebi nisu prikladne za grupiranje vrsta u jedan rod (Zeigler, 2013). Točniji prikaz filogenetskih odnosa među ovim bakterijama postignut je 1991. godine određivanjem 16S rRNA sekvenci standardnih sojeva vrsta, tada klasificiranih kao *Bacillus* (Ash i sur., 1991). Filogenetskim analizama pokazano je da su te sekvence segregirane u najmanje 5 različitih klastera od kojih je jedan dodijeljen novom rodu *Paenibacillus*. Naziv *Paenibacillus* potječe od latinske riječi *paene* što znači skoro, gotovo kao *Bacillus* (Ash i sur., 1993). Trenutno je *Paenibacillus* jedan od osam rodova uključenih u porodicu *Paenibacillaceae* (Zeigler, 2013).

### 2.2. *Paenibacillus polymyxa*

Bakterija *Paenibacillus polymyxa* (poznata i kao *Bacillus polymyxa*) je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, sporulirajuća, štapićasta bakterija (slika 1) s peritrihijalnim flagelama (Ash i sur., 1993). Nastanjuje različite ekološke niše kao što su tla, korijenje, rizosfera raznih usjeva uključujući pšenicu, kukuruz, sirak, šećernu trsku i ječam (Guemouri-Athmani i sur., 2000; von der Weid i sur., 2000), šumsko drveće (Holl i Chanway, 1992) i morski sedimenti (Ravi i sur., 2007). U rizosferi, *Paenibacillus polymyxa* uključena je u proces fiksacije dušika (Padda i sur., 2017; Heulin i sur., 1994), solubilizacije fosfora u tlu (Zhou i sur., 2020; Eastman i sur., 2014), proizvodnje antibiotika (Choi i sur., 2007; He i sur., 2007; Piuri i sur., 1998; Rosado i Seldin, 1993), fitohormona (Phi i sur., 2010), egzopolisaharida (Haggag, 2007), hitinaza (Mavingui i Heulin, 1994), hidrolitičkih enzima (Nielsen i Sørensen, 1997) te povećanja poroznosti tla (Gouzou i sur., 1993). Pokazuje antagonističku aktivnost prema

različitim biljnim patogenim organizmima uključujući bakterije, funge, oomicete i nematode (Chávez-Ramírez i sur., 2020; Son i sur., 2009; Timmusk i sur., 2009; Haggag i Timmusk, 2008; Khan i sur., 2008). Također, pokazuje inhibitornu aktivnost prema nekim ljudskim i životinjskim patogenim mikroorganizmima (Seldin i sur., 1999).



**Slika 1.** Stanice bakterije *Paenibacillus polymyxa* (Raza i sur., 2008)

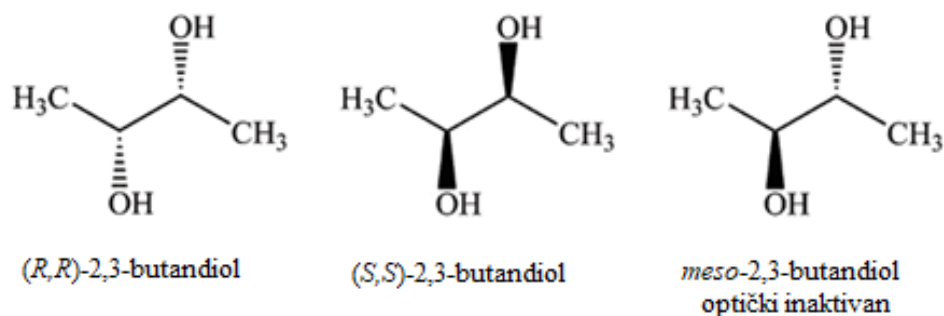
### **2.3. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa***

Zahvaljujući učinkovitoj proizvodnji niza različitih spojeva, *Paenibacillus polymyxa* ima veliki potencijal primjene u biotehnologiji (Lal i Tabacchioni, 2009). Nekoliko sojeva proizvodi enzime koji razgrađuju staničnu stijenku primjerice,  $\beta$ -1,3-glukanaze, celulaze, hitinaze, proteaze, ksilanaze i  $\beta$ -glukozidaze (Isorna i sur., 2007; Budi i sur., 2000; Pham i sur., 1998). Također, neki sojevi proizvode egzopolisaharide (Prado Acosta i sur., 2005). Mikrobnii egzopolisaharidi su primarni ili sekundarni metaboliti s primjenom u medicini, prehrambenoj industriji, kozmetičkoj industriji, za uklanjanje metalnih iona iz otpadnih voda te za preradu minerala (Lal i Tabacchioni, 2009). Još jedan industrijski važan proizvod bakterije *Paenibacillus polymyxa* je optički aktivan 2,3-butandiol (Nakashimada i sur., 1998; Ui i sur., 1983). Osim 2,3-butandiola, *P. polymyxa* može proizvesti etanol, formijat, laktat, acetat i sukcinat (Hakizimana i sur., 2020). Produkti *P. polymyxa* također se mogu primijeniti u medicini. Primjerice, fibrinolitički enzimi mogu razgraditi fibrin u krvnim ugrušcima kako bi se pomogle spriječiti ili izliječiti trombotske bolesti (Lu i sur., 2007). Polimiksin B i E primjenjuju se kao zadnja linija liječenja internih infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama (Velkov i sur., 2010). Različiti derivati levana (egzopolisaharida iz *Paenibacillus*

*polymyxa* EJS-3) pokazuju antioksidativno i antitumorsko djelovanje *in vitro* (Liu i sur., 2012). *Paenibacillus polymyxa* JB115, izolirana iz korejskog tla, proizvodi  $\beta$ -glukan. Glukan velike molekulske mase (iznad 100 kDa) može se koristiti kao dodatak stočnoj hrani za jačanje imuniteta i kao potencijalno antitumorsko sredstvo (Jung i sur., 2007). Nadalje, neki sojevi *Paenibacillus* vrsta, uključujući *P. polymyxa*, mogu poticati bioflokulaciju iona teških metala ili kiselih bojila, stoga bi se mogli primijeniti u bioremedijaciji za uklanjanje kontaminanata iz različitih otpadnih voda (Grady i sur., 2016).

### 2.3.1. Biotehnoška proizvodnja 2,3-butandiola

2,3-butandiol je organska molekula s četiri ugljikova atoma i dvije hidroksilne skupine vezane na drugi i treći ugljikov atom (diol). Ima dva kiralna centra, stoga postoje tri stereoisomera 2,3-butandiola (slika 2). Optički aktivni enantiomeri su (*R,R*)- i (*S,S*)-2,3-butandiol, dok je *meso*-2,3-butandiol optički inaktivan (Xie i sur., 2017). Bakterija *Paenibacillus polymyxa* proizvodi optički aktivan (*R,R*)-2,3-butandiol (optičke čistoće veće od 98 %) iz različitih ugljikohidrata (Ui i sur., 1983). S industrijskog stajališta, važno je napomenuti da je bakterija *P. polymyxa* (nepatogeni producent 2,3-butandiola) jedna od rijetkih organizama koji proizvodi (*R,R*)-2,3-butandiol u čistom obliku, bez potrebe za primjenom genetičkog inženjerstva (Jeong i sur., 2019). Jedan mol glukoze konvertira se u dva mola piruvata koji se zatim prevode u jedan mol 2,3-butandiola i dva mola NADH. Obzirom da se samo jedan mol NADH reoksidira tijekom formiranja jednog mola 2,3-butandiola, moraju se generirati drugi metaboliti za reoksidaciju NADH. Teorijski prinos 2,3-butandiola koji se može dobiti iz glukoze iznosi 0,67 mol/mol (Lal i Tabacchioni, 2009).



**Slika 2.** Prikaz stereoisomera 2,3-butandiola (prema Xie i sur., 2017)

2,3-butandiol važan je intermedijarni metabolit koji modulira izlučivanje bakterijskih sekundarnih metabolita stabilizacijom enzima povezanih s njihovom biosintezom (Garg i Jain, 1995). Primjenom metaboličkog inženjerstva za disrupciju gena *sacB*, soja *Paenibacillus*

*polymyxa* DSM 365, koji kodira za levansaharazu (enzim odgovoran za biosintezu levana, glavnog egzopolisaharida bakterije *P. polymyxa*), povećana je proizvodnja 2,3-butandiola do 27 % tijekom uzgoja na saharozi (Okonkwo i sur., 2018). Općenito se anaerobni uzgoj smatra prikladnijom tehnikom za poboljšanje proizvodnje 2,3-butandiola u usporedbi s mikroaerobnom kultivacijom jer aeracija smanjuje optičku čistoću 2,3-butandiola kojeg proizvodi *P. polymyxa* (Nakashimada i sur., 2000; Nakashimada i sur., 1998). Utjecaj različitih procesnih parametara (pH, opskrba kisikom, koncentracija supstrata) na proizvodnju i stupanj čistoće 2,3-butandiola pod anaerobnim i mikroaerobnim uvjetima istražili su Nakashimada i sur. (2000; 1998). Pokazano je da se dodatkom acetata (150 mM) povećala proizvodnja 2,3-butandiola za 40 % tijekom šaržnog uzgoja bakterije *P. polymyxa*. Daljnje povećanje proizvodnje 2,3-butandiola postignuto je istovremenim dodatkom glukoze i acetata tijekom šaržnog uzgoja *P. polymyxa* s pritokom supstrata. Nadalje, Marwoto i sur., (2002) uočili su da se povećanjem temperature uzgoja s 30 °C na 39 °C, povećala proizvodnja (*R,R*)-2,3-butandiola tijekom anaerobnog šaržnog i kontinuiranog uzgoja *P. polymyxa* na ksilozi za 39 %, odnosno 52 %. Međutim, prilikom korištenja glukoze kao supstrata temperatura nije imala utjecaj na proizvodnju (*R,R*)-2,3-butandiola.

Nakon fermentacije, 2,3-butandiol može se izdvojiti iz podloge tehnikama kao što su stripiranje, ekstrakcija otapalom, reverzna osmoza, pervaporacija, izoljavanje s KCl ili K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Xiu i Zeng, 2008). Izdvojeni 2,3-butandiol može se konvertirati u 1,3-butadien, spoj koji se koristi u proizvodnji sintetičke gume. Mnogi drugi derivati 2,3-butandiola koriste se u proizvodnji sredstava protiv smrzavanja, otapala, plastike, lijekova, kozmetičkih proizvoda i losiona. Također, može se koristiti kao aroma u prehrambenim proizvodima konverzijom u diacetil. Dehidracijom 2,3-butandiola nastaje metil-etil-keton koji se može koristiti kao aditiv u tekućem gorivu (Syu, 2001). Ogrjevna vrijednost 2,3-butandiola iznosi 27,198 J/g što je usporedivo s vrijednostima drugih goriva kao što su etanol (29,055 J/g), metanol (22,081 J/g) i butanol (32,010 J/g) (Flickinger, 1980).

### 2.3.2. Proizvodnja hidrolitičkih enzima

*Paenibacillus* vrste proizvode razne enzime s potencijalom primjene u industrijskim procesima proizvodnje deterdženata, tekstila, papira, biogoriva te u prehrambenoj industriji (Grady i sur., 2016). Industrija deterdženata primarni je potrošač industrijskih enzima. Proteaze, lipaze, amilaze, a ponekad i hemicelulaze koriste se za razgradnju hrane i drugih organskih ostataka, dok se celulaze koriste za uklanjanje kuglica vlakana koje nastaju na

tkanini tijekom pranja i nošenja odjeće na bazi pamuka. U tekstilnoj industriji primjenjuju se pektinaze, proteaze i lipaze za uklanjanje nečistoća s pamuka. Nadalje, mikrobnii enzimi koriste se za uklanjanje lignina u proizvodnji papira i biogoriva iz lignoceluloznih sirovina. Nakon uklanjanja lignina, celulaze i hemicelulaze provode proces hidrolize vlakana za proizvodnju bioetanolu ili biobutanola. Također, lipaze se mogu primijeniti za katalizu transesterifikacije tijekom proizvodnje biodizela. U prehrambenoj industriji, amilaze konvertiraju škrob u šećer npr. za dobivanje visoko fruktoznog kukuruznog sirupa te za dobivanje prekursora u proizvodnji alkoholnih pića. Celulaze i pektinaze koriste se za bistrenje sokova, a zajedno s hemicelulazama koriste se za poboljšanje nutritivne vrijednosti stočne hrane (Saxena i sur., 2015). Soj *P. polymyxa* E681 izlučuje različite hidrolitičke enzime uključujući proteaze, amilaze, celulaze i mananaze koji se, osim potencijalne primjene u industriji, mogu primijeniti za suzbijanje biljnih patogenih gljivica i bakterija (biokontrola) (Bach i sur., 2016). Nadalje, uočeno je da soj *P. polymyxa* B-17 proizvodi termostabilnu proteazu, pri čemu je temperaturni optimum iznosio 50 °C, a značajna aktivnost zadržana je i pri 70 °C. Proteaza je također pokazala aktivnost u širokom rasponu pH vrijednosti (5,5 - 10), a inhibirana je sredstvima za keliranje metala (Matta i Punj, 1998). Prema istraživanju Pham i sur. (1998), *P. polymyxa* ima sposobnost proizvodnje ksilanaza tijekom uzgoja na lignoceluloznim sirovinama. Utvrđeno je da ksilan ili supstrati koji sadrže ksilan (kao što je pšenična slama) induciraju maksimalnu proizvodnju ksilanaza. Kvašćev ekstrakt pokazao se kao optimalan izvor dušika za proizvodnju ksilanaza. Nadalje, prema rezultatima istraživanja Gastelum-Arellanez i sur. (2014) soj *P. polymyxa* BEb-40 mogao bi biti perspektivan mikroorganizam za proizvodnju endoglukanaza, s mogućnostima primjene za razgradnju lignocelulozne biomase.

#### **2.4. PRIMJENA BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* U POLJOPRIVREDI**

Mikroorganizmi iz tla mogu pospješiti rast biljaka proizvodnjom različitih fitohormona (citokinina, auksina, giberelina), sposobnošću fiksacije dušika ili suzbijanjem bolesti biljaka uzrokovanih štetnim mikroorganizmima (van Loon, 2007; Bloemberg i Lugtenberg, 2001). Među rizobakterijama koje potiču rast biljaka (eng. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*, *PGPR*) poznato je da *P. polymyxa* ima širok spektar biljnih domaćina (Lal i Tabacchioni, 2009). Poticanje rasta biljaka, mjereno parametrima kao što su duljina korijena i izdanka, opisano je za uljanu repicu, kivi, papriku, lubenicu, rižu (*Oryza sativa*), kukuruz, krumpir, krastavac, rajčicu, bor, *Arabidopsis thaliana* i pojedine ukrasne biljke (Khan i sur., 2020; Yang, 2019; Jeong i sur., 2019; Abdallah i sur., 2019; Weselowski i sur., 2016; Puri i sur., 2016;



Padda i sur., 2016; Kwon i sur., 2016; Xu i Kim, 2014; Anand i sur., 2013; Lamsal i sur., 2012; Phi i sur., 2010; Erturk i sur., 2010; Maes i Baeyen, 2003; Bent i sur., 2001).

#### 2.4.1. Fiksacija dušika

Atmosferski dušik ( $N_2$ ) relativno je inertan i mora se fiksirati u upotrebljiv kemijski oblik prije ugradnje u aminokiseline, nukleotide i druge metabolite. Obzirom da eukarioti nemaju sposobnost fiksacije vlastitog dušika, njegova bioraspoloživost u tlu glavni je ograničavajući faktor rasta biljaka (Grady i sur., 2016). Jedan od načina na koji PGPR mogu pospješiti rast biljaka je povećanje dobave hranjivih tvari (dušika, fosfata ili željeza). Mnogo sojeva *P. polymyxa* sadrži gene za fiksaciju dušika pomoću kojih pretvaraju atmosferski dušik u amonijak, izvor dušika koristan biljkama (Langendries i Goormachtig, 2021). Tehnikom izotopnog markiranja otkriveno je da soj *P. polymyxa* P2b-2R ima sposobnost fiksiranja atmosferskog dušika i njegove dobave biljci domaćinu, što je povećalo sadržaj dušika u biljci (Padda i sur., 2017; Puri i sur., 2016; Padda i sur., 2016; Anand i sur., 2013; Bal i Chanway, 2012). Za razne biljke poput rajčice, uljane repice, kukuruza, bora (*Pinus contorta*) povećanje sadržaja fiksiranog folijarnog dušika djelovanjem *P. polymyxa* P2b-2R popraćeno je poboljšanjem rasta biljaka (Padda i sur., 2017; Puri i sur., 2016; Padda i sur., 2016; Anand i sur., 2013; Bal i Chanway, 2012). Međutim, kada je isti soj korišten za inokulaciju zapadnog crvenog cedra (*Thuja plicata*) i bora u sterilnom pijesku, fiksirani atmosferski dušik mogao se detektirati u lišću, ali je imao negativan učinak na rast biljaka (Anand i sur., 2013; Bal i Chanway, 2012). Ovi rezultati pokazuju da sposobnost fiksacije dušika nije dovoljna da se bakterijski soj smatra učinkovitim PGPR za sve biljne domaćine, u svim uvjetima rasta (Langendries i Goormachtig, 2021).

#### 2.4.2. Solubilizacija fosfora i dobava željeza

Uz dušik, fosfor je drugi najvažniji element koji ograničava rast biljaka. Iako tlo sadrži velike količine fosfora, samo 0,1 % nalazi se u topljivom obliku koji korijen biljke može preuzeti. Ostatak tvori netopljive mineralne komplekse ili je imobiliziran u organskoj tvari (Sharma i sur., 2013). Rezultati istraživanja Wang i sur. (2012) pokazuju da bakterije roda *Paenibacillus* (*P. polymyxa* i *P. macerans*) imaju sposobnost solubilizacije fosfata. Analize genoma sugeriraju da većina vrsta *Paenibacillus* (uključujući *P. polymyxa*) može solubilizirati fosfor proizvodnjom glukonske kiseline jer sadrže gene koji kodiraju za enzime glukoza-1-dehidrogenazu i dehidrogenazu glukonske kiseline (engl. *gluconic acid dehydrogenase*). U

analiziranim genomima također su pronađeni geni za unos i razgradnju fosfonata te fosfat-specifični transportni sustav (Xie i sur., 2016).

Poput fosfora, željezo se u velikim količinama nalazi u tlu, uglavnom u obliku koji nije biološki raspoloživ (većinom stvara netopljive  $\text{Fe}^{3+}$  hidrokside). Većina mikroorganizama reducira  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  pomoću reduktaza ili ga solubilizira izvanstaničnim, niskomolekularnim spojevima za keliranje  $\text{Fe}^{3+}$  koji se nazivaju siderofori (Raza i Shen, 2010). Topljivi kompleksi  $\text{Fe}^{3+}$  i siderofora dostupni su biljkama i mikroorganizmima obzirom da ih prepoznaju specifični membranski receptori stanica (Wen i sur., 2011). Najčešći mehanizam kojima *P. polymyxa* pospješuje dobavu željeza biljkama je proizvodnja siderofora (Khan i sur., 2020; Raza i Shen, 2010; Phi i sur.; 2010). No, postoje i drugi mehanizmi primjerice, soj *P. polymyxa* BFKC01 aktivira transkripciju biljnih gena uključenih u stanični odgovor na nedostatak željeza (Zhou i sur., 2016).

#### 2.4.3. Proizvodnja fitohormona

Auksini su biljni hormoni ključni za regulaciju ekspresije gena i razvoja biljke. Sudjeluju u staničnoj diobi, elongaciji, razvoju plodova i sl. U prirodi je najzastupljenija indol-3-octena kiselina (IAA) (Delker i sur., 2008). Iako biljke proizvode vlastite fitohormone, također mogu koristiti fitohormone koje proizvedu drugi organizmi (Grady i sur., 2016). Osim biljaka, IAA mogu sintetizirati fungi i bakterije, uključujući rod *Paenibacillus* (Duca i sur., 2014). Nekoliko sojeva *P. polymyxa* proizvodi IAA *in vitro* (Khan i sur., 2020; Weselowski i sur., 2016; Phi i sur., 2010; Erturk i sur., 2010; Holl i sur., 1988). Analiza proteoma sadnica *Arabidopsis thaliana* tretiranih sojem *P. polymyxa* E681 pokazala je da se biosinteza auksina u biljci aktivira nakon inokulacije spomenutom bakterijom (Kwon i sur., 2016). Također, citokinini, pirolokinolin kinon (PQQ) i dugolančani hlapljivi spojevi koje proizvodi soj E681 mogući su bakterijski čimbenici za poticanje rasta biljaka (Lee i sur., 2012; Seul i sur., 2007).

#### 2.4.4. Proizvodnja antimikrobnih spojeva

*Paenibacillus* vrste imaju brojne sposobnosti biokontrole. Mogu neutralizirati različite vrste fitopatogena i insekata proizvodnjom različitih biocidnih tvari ili induciranjem mehanizama obrane od napada patogenih organizama u samim biljkama (Grady i sur., 2016). Pokazano je da *P. polymyxa* pruža zaštitu brojnim biljkama uključujući cvjetaču (Pichard i Thouvenot, 1999), grašak (Wakelin i sur., 2002), ginseng (Jeon i sur., 2003), krastavac (Yang i sur., 2004), slanetak (Akhtar i Siddiqui, 2007), kikiriki (Haggag, 2007), soju (Zhou i sur.,

2008) i papriku (Phi i sur., 2010). Antimikrobni spojevi koje proizvodi *P. polymyxa* uključuju peptide, enzime i hlapljive organske spojeve (engl. *volatile organic compounds, VOC*) (Grady i sur., 2016). Soj *P. polymyxa* WR-2 proizvodi čak 42 hlapljiva organska spoja od kojih preko 30 pokazuje određeni stupanj antifungalnog djelovanja protiv plijesni *Fusarium oxysporum*, uključujući 13 spojeva koji u potpunosti inhibiraju rast plijesni. Od proizvedenih VOC glavni antifungalni spojevi koji inhibiraju rast plijesni su: benzotiazol, benzaldehid, undekanal, dodekanal, heksadekanal, fenol i 2-tridekanon (Raza i sur., 2015).

Antimikrobni peptidi izuzetno su značajni u poljoprivredi, no pročišćeni ili sintetizirani peptidi također imaju (potencijalnu) primjenu u medicini i prehrambenoj industriji. Mogu biti ribosomski sintetizirani bakteriocini ili neribosomski peptidi. Bakteriocini su ribosomski sintetizirani peptidni antibiotici koji inhibiraju rast srodnih bakterijskih vrsta. Poznato je da *Paenibacillus* vrste proizvode najmanje dvije od tri klase bakteriocina – lantibiotike i pediocine (Grady i sur., 2016). Lantibiotici sadrže aminokiseline lantionin i metilantionin te prolaze opsežne post-translacijske modifikacije. Lantibiotik paenibacilin iz *P. polymyxa* OSY-DF pokazuje antimikrobno djelovanje prema *Listeria monocytogenes*, meticilin-rezistentnom *Staphylococcus aureus* i drugim gram-pozitivnim bakterijama (Huang i Yousef, 2015). Utvrđeno je da soj *P. polymyxa* NRRL B-30509 uz polimiksin proizvodi i lantibiotik nazvan paenicidin A (Lohans i sur., 2012). Nadalje, *P. polymyxa* proizvodi pediocine (SRCAM 37 i SRCAM 602), nemodificirane i linearne peptide (Abriouel i sur., 2011).

Za razliku od bakteriocina, mnogi antimikrobni peptidi u *Paenibacillus* vrstama sintetiziraju se neribosomalno, neovisno o RNA, na multienzimskim kompleksima – neribosomskim peptid-sintetazama (engl. *nonribosomal peptide synthetases, NRPS*). Svaki modul NRPS uključuje jednu ili više specifičnih aminokiselina u peptidni lanac. Sintetizirani peptidi imaju raznolike strukture te povećanu otpornost na proteolitičke enzime. Neribosomski lipopeptidi mogu biti linearni kationski, ciklički kationski ili ciklički nekationski (Cochrane i Vederas, 2014). Najbolje istraženi ciklički kationski lipopeptidi iz *Paenibacillus* vrsta su polimiksini, prvi put izolirani 1947. godine iz *P. polymyxa* (Stansly i Schlosser, 1947), no mogu ih proizvoditi i drugi sojevi vrsta *P. alvei* (Tambadou i sur., 2015) i *P. kobensis* (Martin i sur., 2003). Polimiksini uključuju polimiksin A, B, C, D, E (poznat i kao kolistin), M (poznat i kao mattacin), P, S i T (Tambadou i sur., 2015; Mousa i Raizada, 2015; Shoji i sur., 1977a; Shoji i sur., 1997b). Vežu se za lipid A na vanjskoj membrani gram-negativnih bakterija da bi došlo do disrupcije vanjske membrane, a zatim permeabilizacije i disrupcije unutarnje membrane. U većini slučajeva rezistencija se pojavljuje kod sojeva s modifikacijom lipida A čime se

smanjuje njegov neto negativan naboj, a time i afinitet za polimiksin (Cochrane i Vederas, 2014). Industrijska proizvodnja polimiksina B i E provodi se pomoću sojeva *P. polymyxa* (Tambadou i sur., 2015). Koriste se u antibiotskim kremama Neosporinu® i Polysporinu® (obje sadrže polimiksin B) za liječenje i prevenciju lokalnih infekcija kože te kao zadnja linija liječenja internih infekcija multirezistentnim bakterijama (Velkov i sur., 2010). Polimiksin B se također nalazi u Maxitrol® masti i kapima za oko (HALMED, 2021). Polimiksini su se intenzivno koristili od 1940-ih do 1970-ih godina za liječenje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama, no njihova klinička upotreba ograničena je zbog toksičnosti za središnji živčani sustav i bubrege (Grady i sur., 2016). Sintetičkim modifikacijama mogu se dobiti polimiksini s poboljšanim farmakokinetičkim svojstvima i aktivnošću protiv rezistentnih bakterija (Velkov i sur., 2014). Ciklički nekationski lipopeptidi su fusaricidini pronađeni u *P. polymyxa* KT-8 (Kajimura i Kaneda, 1996). Fusaricidini pokazuju antagonističku aktivnost prema fungima, uključujući mnoge važne fitopatogene te razne gram-pozitivne bakterije. Prirodne i sintetički modificirane strukture mogu se kemijski sintetizirati čime se poboljšava stabilnost i smanjuje nespecifična citotoksičnost prema humanim stanicama (Bionda i sur., 2013).

## **2.5. LIGNOCELULOZNE SIROVINE KAO OBNOVLJIVI IZVORI UGLJIKA**

Iscrpljivanje rezervi fosilnih goriva i rastuća potreba za energijom povećali su potražnju za alternativnim i čistim izvorom energije (Mankar i sur., 2021). Lignocelulozna biomasa predstavlja održivu alternativu fosilnim izvorima ugljika za proizvodnju biogoriva druge generacije i proizvodnju biokemikalija, bez ugrožavanja globalne sigurnosti hrane (Chandel i sur., 2018). Lignocelulozna biomasa obnovljiv je izvor organskog materijala biljnog podrijetla. U lignocelulozne sirovine se ubrajaju poljoprivredni i drvni ostaci, energetske usjevi, otpad drvne industrije, aktivni mulj, komunalni otpad te otpad iz prehrambene industrije (Ivančić Šantek i sur., 2016; Ullah i sur., 2015). Tri glavne komponente lignocelulozne biomase su celuloza (35 - 50 %), hemiceluloza (20 - 35 %) i lignin (5 - 30 %) (Kassaye i sur., 2016). Udio ovih komponenti može značajno varirati ovisno o izvoru sirovine, pri čemu većina sirovina sadrži najviše celuloze (Mankar i sur., 2021). Celuloza je linearni polisaharid koji se sastoji od  $\beta$ -D-glukopiranoznih jedinica međusobno povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama (Dora i sur., 2012). Kristalna struktura, visok stupanj polimerizacije (do 10 000 jedinica) te prisutnost inter- i intramolekulskih vodikovih veza između slobodnih hidroksilnih skupina celuloze, čine ju vrlo otpornom na kemijsku i enzimsku hidrolizu (Kassaye i sur., 2016). Dvije jedinice glukoze u

lancu celuloze čine celobiozu (dimer). Hemiceluloza se odnosi na skupinu heteropolimera, a sadrži različite monosaharidne podjedinice (pentoze i heksoze) koje tvore ksilane, arabinoksilane, manane, glukomanane, ksiloglukane i dr. (McKendry, 2002). Stupanj polimerizacije hemiceluloze u rasponu je od 100 do 200 jedinica, što je puno manje u odnosu na celulozu (Mota i sur., 2018). Hemiceluloza lignocelulozne biomase može biti acetilirana što uzrokuje ometanje vezanja enzima na celulozu i promjenu njene hidrofobnosti (Pan i sur., 2006). Hemiceluloza je amorfna struktura manje čvrstoće i lako se hidrolizira razrijeđenim kiselinama ili lužinama te hemicelulazama (Isikgor i Becer, 2015). Hemicelulozna frakcija djeluje kao vezivno sredstvo celuloze i lignina te povećava krutost lignocelulozne biomase (Quereshi i sur., 2020). Lignin je vrlo složeni amorfni heteropolimer građen od fenilpropanskih jedinica (*p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol) međusobno povezanih kovalentnim i eterskim vezama (Agbor i sur., 2011). Odgovoran je za hidrofobnost i povećava čvrstoću stanične stijenke. Lignin fizički ograničava dostupnost polisaharida hidrolitičkim enzimima, a također može ireverzibilno adsorbirati celulaze i druge enzime tijekom procesa enzimske hidrolize zbog svojih hidrofobnih strukturnih značajki (Zeng i sur., 2014; Kumar i Wyman, 2009).

#### 2.5.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Otpornost lignoceluloznih sirovina na enzimsku hidrolizu posljedica je kompleksnosti i heterogenosti strukturnih polimera lignoceluloze. Faktori koji utječu na otpornost lignocelulozne biomase dijele se na strukturne (kristaličnost i specifična površina celuloze, stupanj polimerizacije, veličina i volumen pora) te kemijske (sastav i udio acetilnih skupina, lignina, hemiceluloze) (Zoghلامي i Paës, 2019). Predobrada je ključan korak kojim se mijenja lignocelulozna struktura i povećava pristup hidrolitičkim enzimima koji konvertiraju polisaharide u fermentabilne šećere (Mosier i sur., 2005). Do poboljšanja enzimske hidrolize lignoceluloznog materijala dolazi povećanjem specifične površine i poroznosti, uklanjanjem ili modifikacijom strukture lignina, smanjenjem kristaličnosti celuloze, djelomičnom depolimerizacijom ili uklanjanjem hemiceluloze (Harmsen i sur., 2010).

Metode predobrade dijele se na fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke. Fizikalne metode predobrade općenito se koriste za smanjenje veličine čestica biomase čime se povećava specifična površina materijala. Fizikalne metode uključuju mehaničko usitnjavanje, ekstruziju, pirolizu, ultraljubičasto ili mikrovalno zračenje te ultrazvuk (Mankar i sur., 2021; Marđetko i sur., 2018). Mehaničko usitnjavanje primjerice, kugličnim mlinovima,

smanjuje kristaličnost i stupanj polimerizacije celuloze, poboljšava prijenos mase tijekom procesa zbog smanjenja veličine čestica te olakšava pristup hidrolitičkim enzimima. Glavni nedostaci ove tehnike su visoka potrošnja energije i nemogućnost uklanjanja lignina (Mankar i sur., 2021). Obično se mehaničko usitnjavanje primjenjuje zajedno s drugim metodama radi smanjenja veličine čestica prije daljnje kemijske ili biološke predobrade (Sun i sur., 2016).

Kemijske metode predobrade uključuju primjenu kiselina, lužina, ionskih tekućina, organskih otapala, ozona i dr. Predtretman kiselinom koristi se uglavnom za uklanjanje hemiceluloze čime se povećava slobodna površina celuloze, a time i uspješnost enzimske hidrolize (Veluchamy i sur., 2018). Najčešće korištene kiseline su sumporna, octena, fosforna kiselina, a mogu se primijeniti i dušična, klorovodična, mravlja i druge (Rezania i sur., 2020; Sun i sur., 2016). Predobrada se može provesti razrijeđenom kiselinom (0,5 - 2,5 % w/w) pri povišenim temperaturama (100 - 220 °C) ili koncentriranom kiselinom (30 - 70 % w/w) pri relativno niskim temperaturama (< 50 °C) (Mankar i sur., 2021; Den i sur., 2018; Sun i sur., 2016; Harmsen i sur., 2010). Predtretman razrijeđenom kiselinom troši manje količine kiseline, ali veću količinu energije zbog visokih temperatura procesa. S druge strane, primjenom koncentriranih kiselina ostvaruje se visok prinos monomernih šećera, fleksibilnost glede izbora sirovina te manji utrošak energije zbog blažih uvjeta odvijanja procesa. Međutim, nedostaci primjene koncentrirane kiseline su štetnost za okoliš, potreba za reciklacijom kiseline radi smanjenja troškova te visok rizik od korozije opreme (Harmsen i sur., 2010). Općenito su prednosti primjene kiselinske hidrolize jednostavnost izvođenja i niska cijena (Sun i sur., 2016). Glavni nedostatak kiselinske hidrolize je stvaranje mikrobnih inhibitora, budući da se fermentabilni šećeri mogu razgraditi do furfurala i 5-hidroksimetilfurfurala (Marđetko i sur., 2018; Harmsen i sur., 2010). Također, primjena ove metode zahtijeva neutralizaciju prije procesa fermentacije, obzirom da je pH vrijednost dobivenog kiselinskog hidrolizata vrlo niska. Neutralizacija se provodi lužinama pri čemu nastaje kruti otpad (Harmsen i sur., 2010).

Biološka predobrada uključuje primjenu mikroorganizama ili enzima za razgradnju lignoceluloze. Najčešće se primjenjuju bakterije te plijesni smeđeg, bijelog i mekog truljenja koje proizvode enzime za razgradnju lignina, hemiceluloze i celuloze (Sindhu i sur., 2016). Enzimi koji razgrađuju lignin uključuju lakaze i peroksidaze (lignin peroksidaza i mangan peroksidaza). Celulaze kataliziraju hidrolizu  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza celuloze. Konverzija celuloze u glukozu zahtijeva djelovanje triju enzima – endoglukanaze, celobiohidrolaze i  $\beta$ -glukozidaze. Endoglukanaze hidroliziraju  $\beta$ -1,4-glikozidne veze u lancu celuloze, celobiohidrolaze odcjepljuju celobiozu s kraja lanca, dok  $\beta$ -glukozidaze konvertiraju celobiozu

u glukozu (Himmel i sur., 1996). Nadalje, ksilanaze kataliziraju hidrolizu ksilana koji se sastoji od pentoza kao što je ksiloza. Potpuna hidroliza ksilana zahtijeva djelovanje više ksilanaza s različitim djelovanjem (Binod i sur., 2011). Mikrobní izvori za komercijalnu proizvodnju ksilanaza uključuju *Aspergillus niger*, *Bacillus*, *Trichoderma reesei* i *Humicola insolens* (Sindhu i sur., 2016). Biološka predobrada je ekološki prihvatljiva metoda, odvija se u blagim uvjetima, ne zahtijeva puno energije i tijekom procesa ne dolazi do stvaranja mikrobnih inhibitora. Međutim, to je relativno dugotrajan proces (Sindhu i sur., 2016; Sun i sur., 2016). Odabirom najučinkovitijeg soja i optimizacijom uvjeta uzgoja može se povećati učinkovitost procesa smanjenjem vremena predobrade i gubitka ugljikohidrata (Kuijk i sur., 2015). Važni procesni parametri koji utječu na biološku metodu predobrade su sastav lignocelulozne biomase, korišteni mikroorganizam, koncentracija inokuluma, temperatura, pH, vrijeme inkubacije, sadržaj vlage te brzina aeracije (Sindhu i sur., 2016).

#### 2.5.1.1. Mikrobní inhibitori nastali kiselinskom predobradom

Mikrobní inhibitori, nastali kiselinskom predobradom lignoceluloznih sirovina, zapravo su produkti razgradnje oslobođenih fermentabilnih šećera i lignina. Najčešći inhibitori pronađeni u kiselinskim hidrolizatima su alifatske kiseline (octena, mravlja, levulinska kiselina), aromatski spojevi (fenoli) nastali razgradnjom lignina, furfural i 5-hidroksimetilfurfural (HMF) (Lee i sur., 2013). Octena kiselina prvenstveno nastaje hidrolizom acetilnih skupina hemiceluloze, mravlja kiselina nastaje razgradnjom furfurala i HMF, dok levulinska kiselina nastaje kao produkt razgradnje HMF. Sadržaj alifatskih kiselina u hidrolizatima jako varira te ovisi o korištenoj sirovini i procesu predobrade. Sirovine s visokim udjelom acetiliranog ksilana (poljoprivredni ostaci i tvrdo drvo) daju veće koncentracije alifatskih kiselina u odnosu na sirovine kao što je meko drvo (Jönsson i sur., 2013). Nedisocirane kiseline difuzijom ulaze u stanicu gdje zbog neutralnog citosolnog pH disociraju. Disocijacija kiselina dovodi do smanjenja unutarstaničnog pH što može dovesti do smrti stanice (Pampulha i Loureiro-Dias, 1989). Nadalje, furfural nastaje razgradnjom pentoza (ksiloze, arabinoze), a HMF razgradnjom heksoza (manoze, glukoze, galaktoze). Inhibitori imaju jak učinak na mikroorganizme koji se koriste u procesu fermentacije zbog razgradnje DNA, redukcije sinteze RNA što rezultira otežanom enzimskom aktivnošću (Lorenci Woiciechowski i sur., 2020).

Obzirom da je stvaranje inhibitora tijekom kiselinske hidrolize neizbježno, razvijen je niz različitih fizikalnih, kemijskih i bioloških tehnika za njihovo uklanjanje iz dobivenih lignoceluloznih hidrolizata. Fizikalne metode uključuju ionsku izmjenu, ekstrakciju organskim otapalima, membranske procese, adsorpciju aktivnim ugljenom ili zeolitima. Kemijske metode

temelje se na konverziji inhibitora u spojeve koji su manje toksični (Lee i sur., 2013; Liu i sur., 2004). Biološka metoda podrazumijeva primjenu mikroorganizama za uklanjanje inhibitora iz kiselinskog hidrolizata (Okuda i sur., 2008; López i sur., 2004).

### 2.5.2. Otpadni pivski trop

Tijekom procesa proizvodnje piva nastaje značajna količina različitih nusproizvoda, od kojih su najzastupljeniji pivski trop i otpadni pivski kvasac. Pivski trop je netopljivi kruti ostatak dobiven nakon proizvodnje sladovine i čini 85 % ukupnih nusproizvoda pivarske industrije (Tang i sur., 2009). Na 100 L proizvedenog piva može se dobiti oko 20 kg pivskog tropa (Mussatto i sur., 2006). Zbog dostupnosti, niske cijene i nutritivnih vrijednosti predstavlja dobru sirovinu za različite biotehnološke procese. Međutim, tradicionalno se koristi samo kao krmivo, a razlog nedovoljne iskorištenosti otpadnog pivskog tropa njegov je kompleksan sastav i visok sadržaj vlage, što otežava skladištenje i transport. Zbog brze mikrobne razgradnje (kvarenja) obično se odlaže kao otpadni materijal prije nego što se iskoristi kao sirovina (Robertson i sur., 2010). Pivski trop sadrži neekstrahirane tvari mljevenog zrna slada (pljevica, ugljikohidrati) i ubraja se u lignocelulozne sirovine (sadrži oko 20 % proteina i 70 % vlakana). Kemijski sastav varira ovisno o sorti ječma te postupcima slađenja i ukomljavanja (Mussatto i sur., 2006). Zbog visokog udjela polisaharida pivski trop ima velik potencijal primjene u industrijskim procesima proizvodnje etanola, mliječne kiseline, butanola, ksilitola, enzima, oligosaharida i drugih proizvoda (Ferraz i sur., 2013). Njegovom razgradnjom oslobađaju se fermentabilni šećeri koje mikroorganizmi mogu koristiti za rast i proizvodnju biokemikalija. Posljednjih godina pivski trop privukao je pažnju kao dodatak proizvodima namijenjenim za ljudsku prehranu zbog bioaktivnih komponenti koje uključuju sekundarne metabolite kao što su alkaloidi, antibiotici, fenolne kiseline, pigmenti i dr. (Martins i sur., 2011). Fenolne kiseline smatraju se prirodnim antioksidansima koje se povezuju s prevencijom kardiovaskularnih, neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa i određenih oblika karcinoma (Connolly i sur., 2014; Barbosa-Pereira i sur., 2013). Nadalje, dodatak pivskog tropa stočnoj hrani dovodi do povećanja prinosa mlijeka, većeg sadržaja masti u mlijeku, a također je dobar izvor esencijalnih aminokiselina (Ikram i sur., 2017).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

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

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

U tablici 1 navedene su kemikalije i komercijalni enzimi korišteni u istraživanju.

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

<b>Kemikalija</b>	<b>Stupanj čistoće</b>	<b>Proizvođač</b>
amonijev acetat	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
amonijev sulfat	≥ 99 %	Honeywell, SAD
mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka
kalijev dihidrogenfosfat	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogenfosfat	≥ 98 %	Kemika, Hrvatska
mravlja kiselina	≈ 98 %	Honeywell, SAD
octena kiselina	99,5 %	Avantor, SAD
sumporna kiselina	96 %	Merck KgaA, Njemačka
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kobaltov klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	99 %	Honeywell, SAD
borna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 1.** Kemikalije i komercijalni enzimi korišteni prilikom izrade ovog rada – *nastavak*

<b>Kemikalija</b>	<b>Stupanj čistoće</b>	<b>Proizvođač</b>
natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev natrijev tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
mikrokristalična celuloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
karboksimetilceluloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksilan	> 95 %	Biosynth Carbosynth, Švicarska
dinitrosalicilna kiselina	96 %	Kemika, Hrvatska
natrijev sulfit	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
fenol	99 %	Kemika, Hrvatska
etanol	96 %	GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
aktivni ugljen	p.a.	Kemika, Hrvatska
agar	tehnički	Biolife, Italija
CSL	za upotrebu u biotehnologiji	Dynamite Baits, UK
protupjenič	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
činkov sulfat heptahidrat	99 %	Merck KgaA, Njemačka
Cellulase enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
Viscozyme L, enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Novozyme, Danska
Hemicellulase from <i>Aspergillus niger</i>	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD

Kao lignocelulozna sirovina, u ovom istraživanju, korišten je otpadni pivski trop dobiven tijekom proizvodnje piva u mikropivovari Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Kemijski sastav otpadnog pivskog tropa i čvrste faze dobivene nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize pivskog tropa prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Kemijski sastav suhe tvari otpadnog pivskog tropa i čvrste faze nakon dvostupanjske 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

#### 3.1.3.1. Kemijski definirane hranjive podloge

Za uzgoj inokuluma bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 korištena je kemijski definirana hranjiva podloga koja sadrži mesni ekstrakt (3 g/L), pepton (5 g/L) i glukozu (1 g/L). Radna kultura čuvana je na čvrstim hranjivim podlogama istog sastava, uz dodatak agara koncentracije 15 g/L.

U tablici 3 naveden je sastav kemijski definiranih hranjivih podloga korištenih za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u Erlenmeyerovim tikvicama, na različitim izvorima dušika.

U tablici 4 prikazan je kemijski sastav hranjivih podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima u Erlenmeyerovim tikvicama.

Pojedini uzgoji bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom, provedeni su u kemijski definiranoj hranjivoj podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa čiji je sastav prikazan u tablici 5.

Pri svakom uzgoju, u svaku podlogu, dodano je 3 ml/L otopine elemenata u tragovima sastava navedenog u tablici 6. Otopina se čuva u hladnjaku pri 4 °C.

**Tablica 3.** Sadržaj soli, izvora ugljika i dušika te faktora rasta u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u Erlenmeyerovim tikvicama na različitim izvorima dušika

	Uzgoj na različitim izvorima dušika				
	Podloga 1	Podloga 2	Podloga 3	Podloga 4	Podloga 5
<b>Tvar</b>	<b><math>\gamma</math> (g/L)</b>				
glukoza	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
kvašćev ekstrakt	5,0	10,0	-	-	-
pepton	5,0	-	10,0	-	-
CSL	-	-	-	10,0	-
mesni ekstrakt	-	-	-	-	10,0
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
kalijev dihidrogenfosfat	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
kalijev hidrogenfosfat	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
amonijev acetat	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
amonijev sulfat	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

**Tablica 4.** Sastav kemijski definiranih hranjivih podloga za uzgoj i proizvodnju enzima bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u Erlenmeyerovim tikvicama

	Podloga A	Podloga B	Podloga C
<b>Tvar</b>	<b><math>\gamma</math> (g/L)</b>		
ksilan	5,0	-	-
celuloza	-	5,0	-
karboksimetilceluloza	-	-	5,0
kvašćev ekstrakt	5,0	5,0	5,0
pepton	5,0	5,0	5,0
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2	0,2	0,2
kalijev dihidrogenfosfat	3,5	3,5	3,5
kalijev hidrogenfosfat	2,5	2,5	2,5
amonijev acetat	5,0	5,0	5,0
amonijev sulfat	4,0	4,0	4,0

**Tablica 5.** Sastav kemijski definirane podloge koja simulira kiselinski hidrolizat pivskog tropa za uzgoje bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom

<b>Kemikalija</b>	<b><math>\gamma</math> (g/L)</b>
glukoza	24,0
ksiloza	11,0
kvašćev ekstrakt	5,0
pepton	5,0
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2
kalijev dihidrogenfosfat	3,5
kalijev hidrogenfosfat	2,5
amonijev acetat	5,0
amonijev sulfat	4,0
mravlja kiselina	0,5
octena kiselina	0,8

**Tablica 6.** Kemijski sastav otopine elemenata u tragovima za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

<b>Kemikalija</b>	<b><math>\gamma</math> (g/L)</b>
željezov sulfat heptahidrat	2,500
kobaltov klorid heksahidrat	0,075
bakrov sulfat pentahidrat	0,031
borna kiselina	0,258
natrijev molibdat dihidrat	0,023
kalijev natrijev tartarat	2,100

### 3.1.3.2. Kompleksne hranjive podloge za uzgoj u bioreaktoru s miješalom

Tijekom šaržnih uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, korištene su tri kompleksne hranjive podloge. Kao prva podloga za uzgoj korištena je mješavina tekućih faza dobivenih dvjema šaržama kiselinske hidrolize (predobrade) otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru (poglavlje 3.2.2.). Određeni volumen mješavine dobivenih kiselinskih hidrolizata podvrgnut je detoksikaciji aktivnim ugljenom (poglavlje 3.2.3.5.) te korišten kao prihrana tijekom uzgoja u bioreaktoru s miješalom na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa. Čvrsta faza zaostala nakon kiselinske predobrade otpadnog pivskog tropa enzimski je hidrolizirana (poglavlje 3.2.2.) čime je dobivena tekuća faza korištena kao treća podloga za uzgoj. Sastav kompleksnih podloga korištenih za uzgoj u bioreaktoru s miješalom prikazan je u tablici 7.

**Tablica 7.** Kemijski sastav kompleksnih hranjivih podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom

	<b>Podloga KH</b> (kiselinski hidrolizat)	<b>Podloga DKH</b> (detoksicirani kiselinski hidrolizat)	<b>Podloga EH</b> (enzimski hidrolizat)
<b>Tvar</b>	<b><math>\gamma</math> (g/L)</b>		
glukoza	15,91	11,40	26,55
ksiloza	10,97	7,89	10,95
arabinoza	4,54	4,50	0,0
mravlja kiselina	1,68	1,49	2,2
octena kiselina	0,78	0,68	7,26

### 3.1.4. Oprema i uređaji

#### 3.1.4.1. Centrifuge

Za izdvajanje bakterijske biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD) pri 8000 rpm. Za izdvajanje tekuće faze nakon detoksikacije kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa i tekuće faze nakon enzimske hidrolize čvrste faze zaostale nakon provedene kiselinske hidrolize, korištena je centrifuga Beckman, Model J-21B, Njemačka, pri 5000 rpm. Tijekom pripreme uzoraka za UPLC analizu korištena je centrifuga CF-10 High-Performance (Witeg, Njemačka) pri 10 000 rpm.

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

Uređaj UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD) korišten je za određivanje koncentracija supstrata i produkata u uzorcima izuzetim tijekom provedenih uzgoja (slika 3). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), injektora (G7129B 1290 Vialsampler), pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex) dimenzija 150 x 7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) te računalnog softvera za obradu podataka (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline protoka 0,6 ml/min, a volumen analiziranog uzroka iznosio je 10  $\mu$ L.



**Slika 3.** Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II) (*vlastita fotografija*)

#### 3.1.4.3. Spektrofotometar

Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) korišten je za određivanje optičke gustoće hranjive podloge kao indirektnog pokazatelja rasta biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri valnoj duljini od 600 nm, koristeći staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Nadalje, za mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 575 nm (određivanje koncentracije glukoze i ksiloze) i 595 nm (određivanje koncentracije proteina po Bradfordu) korištene su plastične kivete. Za spektrofotometrijsko određivanje udjela lignina topivog u kiselini (mjerenjem apsorbancije pri 205 nm) te određivanje furana (mjerenjem apsorbancije pri 284 i 320 nm), korištene su kvarcne kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

#### 3.1.4.4. Vage

Za vaganje kemikalija i suhe tvari otpadnog pivskog tropa korištena je analitička vaga Acculab ALC210.4 (SAD), a za ostale potrebe vaganja korištena je tehnička vaga Tehnica ET-1211 (Slovenija).

#### 3.1.4.5. Sušionik

Za sušenje otpadnog pivskog tropa (prije i nakon predobrade) korišten je sušionik Instrumentaria ST-50 (Hrvatska).



#### 3.1.4.6. Tresilica za mikrobiološke uzgoje

Uzgoji bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u Erlenmeyerovim tikvicama provedeni su na tresilici Certomat RM (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka) pri 30 °C i 130 rpm.

#### 3.1.4.7. Visokotlačni reaktor za predobradu lignoceluloznih sirovina

Za kiselinsku predobradu lignocelulozne sirovine (otpadnog pivskog tropa) korišten je visokotlačni reaktor tvrtke Marus-ATM (Zagreb, Hrvatska) ukupnog volumena 20 L (slika 4). Uređaj se sastoji od reaktorske posude za predobradu sirovine, perforirane košare u koju se stavlja sirovina, a zatim prelijeva razrijeđenom sumpornom kiselinom, plašta za zagrijavanje reaktora koji sadrži termičko ulje (grije se u vanjskoj posudi električnim grijačima), pumpe koja omogućava strujanje zagrijanog ulja unutar plašta, ventila za ispuštanje tekuće faze, zaštitne jedinice i kontrolne jedinice za regulaciju procesnih parametara. Na kraju procesa, tlak u reaktoru izjednačava se s atmosferskim tlakom pomoću ventila na gornjoj strani reaktora. Nakon hlađenja, tekući dio hidrolizata ispušta se otvaranjem ventila na dnu reaktora, a čvrsti dio zaostaje u perforiranoj košari koja se vadi s gornje strane.



**Slika 4.** Visokotlačni reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina (*vlastita fotografija*)

#### 3.1.4.8. Bioreaktor s miješalom

Šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 te šaržni uzgoji spomenute bakterije s pritokom supstrata, provedeni su u bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) izrađenom od nehrđajućeg čelika, ukupnog volumena 42 L (slika 5). Opremljen je miješalom s tri podesive turbine koje imaju po 6 ravnih lopatica. Elektromotor snage 2,09 kW pokreće miješalo. Maksimalna brzina rotacije miješala iznosi 3000 rpm. Bioreaktor je opremljen kontrolnom jedinicom sa sustavom za mjerenje i regulaciju temperature, pH vrijednosti podloge, protoka zraka, brzine rotacije miješala, razine pjene, parcijalnog tlaka kisika u podlozi, izlaznih plinova ( $O_2$  i  $CO_2$ ) i turbidimetrom. Na poklopcu bioreaktora nalaze se ulazni i izlazni membranski filteri za zrak te ulazi za inokulaciju i dodavanje različitih otopina (npr. za korekciju pH) pomoću ugrađenih peristaltičkih pumpi. Sterilizacija bioreaktora provodi se vodenom parom preko plašta.



**Slika 5.** Bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka)  
(vlastita fotografija)

#### 3.1.4.9. Ostala oprema

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

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprema inokuluma

Kemijski definirana hranjiva podloga korištena za uzgoj inokuluma bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pripremljena je na način da se u odgovarajući volumen demineralizirane vode dodaju i otope prethodno izračunate i odvagane mase potrebnih sastojaka (pepton 5 g/L, mesni ekstrakt 3 g/L, glukoza 1 g/L). U Erlenmeyerove tikvice dodano je po 100 ml tako pripremljene podloge za inokulum, a zatim su tikvice stavljene na sterilizaciju u autoklav pri 121 °C / 20 min. Nakon sterilizacije i hlađenja podloge, sterilno je dodano po 3 ml/L otopine elemenata u tragovima preko sterilnog filtera veličine pora 0,2 µm. Iz jedne Erlenmeyerove tikvice pipetmanom je dodano po 20 ml tako pripremljene hranjive podloge u sterilne tikvice volumena 50 ml (za prvu fazu uzgoja inokuluma).

Uzgoj inokuluma započinje precjepljivanjem prethodno porasle kulture bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, pomoću sterilne ušice, s čvrste podloge u Petrijevim zdjelicama (jednagog sastava kao i tekuća podloga, uz dodatak 15 g/L agara) u 20 ml tekuće hranjive podloge za inokulum. Uzgoj se provodi preko noći, na tresilici, pri 130 rpm i temperaturi od 30 °C. Zatim se 10 ml tako uzgojene prekonoćne kulture precijepi u 100 ml pripremljene hranjive podloge za inokulum te preko noći uzgaja u istim uvjetima.

#### 3.2.2. Predobrada otpadnog pivskog tropa

Kao sirovina za pripremu hranjivih podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioraktoru s miješalom, korišten je otpadni pivski trop. Provedene su dvije šarže kiselinske hidrolize u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C tijekom 10 minuta (Mardetko i sur., 2018). Za jednu šaržu predobrade 1 kg suhe tvari otpadnog pivskog tropa korišteno je 10 L 0,5 % otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nakon prve šarže predobrade izdvojeno je 6,8 L tekuće faze (kiselinski hidrolizat pivskog tropa), a nakon druge šarže izdvojeno je 5,5 L tekuće faze te ukupno 370 g

čvrste faze (nehidrolizirani ostatak pivskog tropa). Mješavina dobivenih tekućih faza korištena je kao podloga za šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom (poglavlje 3.2.3.4.).

Čvrsta faza zaostala nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa podvrgnuta je enzimskoj hidrolizi. 350 g suhe tvari čvrste faze pomiješano je s 5 L acetatnog pufera pH 5, a zatim su dodani enzimi Viscozyme L 2,5 % vol/vol (Novozyme, Danska), Cellulase enzyme blend 2 % vol/vol (Sigma-Aldrich, SAD) te Hemicellulase from *Aspergillus niger* 1 % vol/vol (Sigma-Aldrich, SAD). Enzimska hidroliza trajala je 72 sata uz kontinuirano miješanje na zatvorenoj tresilici pri 130 rpm i temperaturi od 50 °C. Nakon hidrolize, dobiveni sadržaj centrifugiran je pri 5000 rpm tijekom 30 minuta, a zatim profiltriran preko Büchnerovog lijevka, čime je izdvojeno 3,8 L tekuće faze (enzimskog hidrolizata). Dobiveni enzimski hidrolizat steriliziran je u autoklavu (121 °C / 15 min) te korišten kao podloga za šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom (poglavlje 3.2.3.6.).

### 3.2.3. Priprema hranjivih podloga

#### 3.2.3.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na različitim izvorima dušika

Pripremljene su kemijski definirane hranjive podloge za ispitivanje utjecaja različitih izvora dušika na rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. U odgovarajući volumen demineralizirane vode dodane su prethodno izračunate i odvagane mase potrebnih tvari prema tablici 3 (dodane su sve tvari osim glukoze koja se dodaje naknadno). U Erlenmeyerove tikvice dodano je po 150 ml pripremljenih podloga s različitim izvorima dušika (podloga 1 sadržavala je pepton i kvašćev ekstrakt, podloga 2 sadržavala je samo kvašćev ekstrakt, podloga 3 samo pepton, podloga 4 CSL, a podloga 5 mesni ekstrakt). pH vrijednost hranjivih podloga podešena je na 6,5 dodatkom krutog natrijeva hidroksida uz eventualnu korekciju dodatkom sumporne kiseline. Pripremljena je koncentrirana otopina glukoze (500 g/L) te otopina elemenata u tragovima sastava prikazanog u tablici 6. Nakon sterilizacije (121 °C / 20 min) i hlađenja, u svaku tikvicu sterilno je profiltrirano 3 ml/L otopine elemenata u tragovima preko sterilnog filtera veličine pora 0,2 µm te odgovarajući volumen sterilne koncentrirane otopine glukoze tako da početna koncentracija bude 15 g/L.

### 3.2.3.2. Priprema hranjive podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i proizvodnju enzima

Pripremljene su hranjive podloge za ispitivanje rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i sposobnosti proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima na ksilanu, celulozi ili karboksimetilcelulozi (CMC) kao izvorima ugljika. U odgovarajući volumen demineralizirane vode dodane su prethodno izračunate i odvagane mase tvari prema tablici 4. Volumen hranjivih podloga iznosio je 150 ml, a pH vrijednost podloga podešena je na 6,5 dodatkom krutog natrijeva hidroksida. Nakon sterilizacije (121 °C / 15 min) i hlađenja, u svaku tikvicu dodano je 3 ml/L sterilno profiltrirane otopine minerala u tragovima.

### 3.2.3.3. Priprema hranjive podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa

Pripremljeno je 5,5 L kemijski definirane hranjive podloge za šaržni i šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, sastava prikazanog u tablici 5. U odgovarajućem volumenu demineralizirane vode otopljene su prethodno izračunate i odvagane mase potrebnih tvari (osim glukoze i ksiloze koje se dodaju naknadno u obliku koncentriranih otopina). Pripremljena podloga je pomoću lijevka ulivena u bioreaktor s miješalom nakon čega je slijedila sterilizacija *in situ* pri 121 °C tijekom 20 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja bioreaktora na temperaturu uzgoja (30 °C), pomoću pumpe, dodana je sterilno profiltrirana otopina minerala u tragovima (3 ml/L) i odgovarajući volumeni sterilnih koncentriranih otopina glukoze i ksiloze. Zatim je pH vrijednost podešena na 6,5 dodatkom 3 M otopine natrijevog hidroksida.

### 3.2.3.4. Priprema hranjive podloge za šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa

Dobivena mješavina tekućih faza (kiselinski hidrolizat) nakon kiselinske predobrade otpadnog pivskog tropa (poglavlje 3.2.2.) preko lijevka je ulivena u bioreaktor s miješalom. Dodane su 2-3 kapi protupjeniča, a zatim je podloga sterilizirana *in situ* (121 °C / 15 min). Volumen podloge iznosio je 5,5 L. Nakon sterilizacije i hlađenja na temperaturu uzgoja (30 °C), pumpom je dodana sterilno profiltrirana otopina minerala u tragovima (3 ml/L). pH vrijednost podešena je na 6,5 dodatkom 3 M NaOH.

### 3.2.3.5. Priprema podloge za prihranu tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa

Kao prihrana tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa, korištena je detoksicirana tekuća faza dobivena kiselinskom hidrolizom pivskog tropa. Tekuća faza nakon kiselinske predobrade najprije je centrifugirana pri 5000 rpm tijekom 30 minuta, nakon čega je izdvojen supernatant. U 3 L izdvojenog supernatanta dodano je 65 g aktivnog ugljena, a zatim je sadržaj miješan na magnetnoj miješalici sat vremena. pH je namješten na 5,8 dodatkom krutog natrijeva hidroksida. Nakon miješanja, sadržaj je ponovno centrifugiran pri 5000 rpm tijekom 30 minuta. Izdvojeni supernatant profiltriran je preko Büchnerovog lijevka kako bi se uklonio zaostali aktivni ugljen na koji su adsorbirani inhibitori. Dobiveni filtrat (detoksicirani kiselinski hidrolizat) steriliziran je u autoklavu (121 °C / 15 minuta) i korišten kao prihrana tijekom uzgoja.

### 3.2.3.6. Priprema hranjive podloge za šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa

Dobivena tekuća faza, nakon provedene enzimske hidrolize čvrste faze nastale kiselinskom hidrolizom otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru (poglavlje 3.2.2.), ulivena je preko lijevka u bioreaktor s miješalom. Volumen podloge iznosio je 5,5 L. Dodane su 2-3 kapi protupjeniča, a zatim je podloga sterilizirana *in situ* (121 °C / 15 min). Nakon sterilizacije i hlađenja bioreaktora na temperaturu uzgoja (30 °C), pumpom je dodano 3 ml/L sterilno profiltrirane otopine minerala u tragovima, a pH podešen na 6,5 dodatkom 3 M NaOH.

## 3.2.4. Provedba i nadzor uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

### 3.2.4.1. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na različitim izvorima dušika

Uzgoj je proveden na kemijski definiranim hranjivim podlogama s različitim izvorima dušika čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.3.1. Pripremljene podloge (volumena 150 ml) naciepljene su s 10 ml inokuluma (poglavlje 3.2.1.) te zatim stavljene na tresilicu, uz konstantno miješanje pri 130 rpm, na temperaturi od 30 °C. U određenim vremenskim intervalima sterilno je izuzimano po 5 ml uzorka iz svake tikvice. Najprije je očitana optička gustoća pomoću spektrofotometra, a zatim su uzorci centrifugirani pri 8000 rpm, 8 minuta. Dobiveni supernatant analiziran je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC) radi praćenja koncentracija supstrata i produkata.

#### *3.2.4.2. Uzgoj bakterije Paenibacillus polymyxa DSM 742 za proizvodnju enzima*

Uzgoj je proveden na podlogama opisanim u poglavlju 3.2.3.2. Hranjive podloge u tikvicama (volumena 150 ml) naciepljene su s 20 ml inokuluma pripremljenog prema poglavlju 3.2.1. Uzgoj je vođen na tresilici pri 130 rpm i 30 °C. Svaka 24 sata izuzimano je po 5 ml uzorka iz svake tikvice. Nakon određivanja optičke gustoće uzorka i centrifugiranja, dobiveni supernatant korišten je za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu (poglavljje 3.2.5.3.) i enzimske aktivnosti DNSA metodom (poglavljje 3.2.5.4.).

#### *3.2.4.3. Uzgoji bakterije Paenibacillus polymyxa DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa*

Šaržni uzgoj u bioreaktoru s miješalom proveden je na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata pivskog tropa čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.3.3. Podloga je inokulirana s 0,5 L inokuluma pripremljenog prema poglavlju 3.2.1. Uzgoj je vođen u mikroaerofilnim uvjetima, pri temperaturi od 30 °C, pH 6,45 i uz konstantno miješanje pri 250 rpm. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima tijekom 50 h. Nakon očitavanja optičke gustoće i centrifugiranja uzoraka, provedena je UPLC analiza supernatanata.

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, također je proveden na spomenutoj podlozi (poglavljje 3.2.3.3.). Nakon inokulacije s 0,6 L inokuluma, uzgoj je vođen u mikroaerofilnim uvjetima (30 °C / pH 6,5 / 74 h) uz konstantno miješanje pri 250 rpm. Početni volumen podloge u bioreaktoru nakon inokulacije iznosio je 6,1 L. Nakon 31 h uzgoja dodano je 0,2 L sterilne koncentrirane otopine glukoze (500 g/L), a nakon 52 h dodano je 0,5 L sterilne koncentrirane otopine glukoze (500 g/L). Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima te prije i nakon svake prihrane koncentriranom otopinom glukoze. Nakon očitavanja optičke gustoće i centrifugiranja uzoraka, provedena je UPLC analiza supernatanata.

#### *3.2.4.4. Šaržni uzgoj bakterije Paenibacillus polymyxa DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa*

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, proveden je na kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa (poglavljje 3.2.3.4.). Nakon inokulacije s 0,6 L pripremljenog inokuluma (poglavljje 3.2.1.) uzgoj je vođen u mikroaerofilnim uvjetima (30 °C / pH 6,5) uz konstantno miješanje pri 250 rpm, tijekom 75 h. Početni volumen podloge u bioreaktoru, nakon inokulacije, iznosio je 6,1 L. Nakon 27 h i 51 h uzgoja dodana je po 1 L podloge za prihranu

(detoksicirani kiselinski hidrolizat pivskog tropa) čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.3.5. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima te prije i nakon svake prihrane. Nakon očitavanja optičke gustoće i centrifugiranja izuzetih uzoraka, provedena je UPLC analiza supernatanata.

#### 3.2.4.5. Šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, proveden je na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize pivskog tropa (poglavljje 3.2.3.6.). Podloga u bioreaktoru inokulirana je s 0,6 L pripremljenog inokuluma (poglavljje 3.2.1.). Početni volumen podloge u bioreaktoru, nakon inokulacije, iznosio je 6,1 L. Uzgoj je vođen u mikroaerofilnim uvjetima tijekom 73,5 h (30 °C, pH 6,5) uz konstantno miješanje pri 205 rpm. Nakon 9 h i 26 h uzgoja dodana je po 1 L enzimskog hidrolizata (prihrane), a nakon 52 h uzgoja dodano je 0,7 L enzimskog hidrolizata. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima te prije i nakon svake prihrane. Nakon očitavanja optičke gustoće i centrifugiranja izuzetih uzoraka, provedena je UPLC analiza supernatanata.

### 3.2.5. Analitičke metode

#### 3.2.5.1. Određivanje optičke gustoće tijekom uzgoja

Optička gustoća (OD) izuzetih uzoraka tijekom svakog uzgoja određena je pomoću spektrofotometra Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) pri valnoj duljini od 600 nm, u svrhu praćenja rasta biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742.

#### 3.2.5.2. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC) određene su koncentracije supstrata i produkata u izuzetim uzorcima. U 750 µL supernatanta uzorka dodano je 750 µL 10 %-tne otopine ZnSO<sub>4</sub> sa svrhom taloženja proteina i nečistoća nastalih tijekom procesa. Sadržaj je homogeniziran na vortex miješalici te ostavljen 10 minuta u mirovanju. Uzorci su zatim centrifugirani pri 10 000 rpm, 5 minuta. Izdvojeni supernatant profiltriran je kroz mikrobiološki filter promjera pora 0,2 µm u staklenu vialu. Tako pripremljeni uzorak stavlja se na UPLC analizu.

Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a brzina protoka iznosila je 0,6 ml/min. 10 µL uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu temperature 60 °C. Računalnim



programom OpenLAB CDS obrađeni su dobiveni kromatogrami. Nepoznate koncentracije supstrata i produkata u uzorcima izračunate su iz jednadžbi pravaca baždarnih dijagrama prikazanih u prilogu 1.

#### 3.2.5.3. *Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu*

U Eppendorf kivetu dodano je 600  $\mu\text{L}$  Bradfordovog reagensa i 15  $\mu\text{L}$  supernatanta uzorka. Sadržaj je ostavljen u mraku tijekom 15 minuta, a zatim je očitana apsorbancija pri 595 nm. Koncentracija proteina (mg/L) u uzorku računa se iz jednadžbe pravca baždarnog dijagrama:

$$A = 0,0225 \times c + 0,6034 \quad [1]$$

#### 3.2.5.4. *Određivanje enzimске aktivnosti DNSA metodom*

Tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na ksilanu, celulozi ili karboksimetilcelulozi, svaka 24 sata izuzimano je 5 ml uzorka za određivanje aktivnosti celulaza i hemicelulaza. Uzorci su centrifugirani pri 8000 rpm, 10 minuta. Za svaki uzorak pripremljene su 4 prazne Eppendorf kivete volumena 1,5 ml. U pripremljene kivete izvagano je 10 mg supstrata (karboksimetilceluloze, mikrokristalične celuloze i ksilana), a zatim je u svaku kivetu dodan 1 ml supernatanta uzorka (jedna kiveta sadržavala je samo supernatant). Sadržaj epica inkubiran je tijekom 30 minuta na termomikseru pri 50 °C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani pri 10 000 rpm, 5 minuta. Zatim je izuzeto 600  $\mu\text{L}$  supernatanta i pomiješano sa 600  $\mu\text{L}$  DNSA reagensa (dinitrosalicilna kiselina). Sadržaj je inkubiran na termomikseru 15 minuta, pri 95 °C (tijekom inkubacije razvija se obojenje). Nakon inkubacije odmah je dodano 200  $\mu\text{L}$  40 %-tne otopine kalij natrij tartarata za stabilizaciju boje. Uzorci su ohlađeni 5 minuta u ledu, a zatim je u plastičnim kivetama očitana apsorbancija pri 575 nm.

Jedna jedinica enzimске aktivnosti (U/ml) određena je kao količina enzima koja oslobađa 1  $\mu\text{mol}$  odgovarajućeg šećera tijekom 30 minuta u reakcijskoj smjesi volumena 1 ml.

#### 3.2.5.5. *Određivanje sastava otpadnog pivskog tropa*

Suha tvar otpadnog pivskog tropa i čvrsta faza zaostala nakon provedene kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru (poglavlje 3.2.2) podvrgnute su dvostupanjskoj kiselinskoj hidrolizi radi određivanja njihovog sastava. Osušeni uzorci najprije su usitnjeni u tarioniku, a zatim je na analitičkoj vagi izvagano oko 0,4 g suhe tvari uzorka i prebačeno u okruglu tikvicu s ravnim dnom. Dodano je 4 ml 72 %-tne sumporne kiseline, sadržaj je promiješan staklenim štapićem i stavljen u termostat pri 30 °C / 1 sat uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije dodano je 112 ml demineralizirane vode, čime je koncentracija

sumporne kiseline smanjena na 4 % (w/w). Tikvica je pričvršćena na povratno hladilo te je sadržaj kuhan 4 sata uz povremeno miješanje. Nakon provedene hidrolize, uzorci su ohlađeni pod mlazom vode te profiltrirani preko Büchnerovog lijevka kroz prethodno osušeni i izvagani filter papir. Volumen dobivenog filtrata izmjeren je menzutom i korišten za određivanje ukupnih furana, topivog lignina (spektrofotometrijski) te koncentracije šećera i drugih tvari (UPLC analizom). Zaostali talog ispran je vodom radi neutralizacije te korišten za određivanje netopljivog lignina. Rezultati dvostupanjske kiselinske hidrolize prikazani su u tablici 2.

### 3.2.5.6. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini

Čvrsti talog zaostao na filter papiru nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize prebačen je u prethodno osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu te stavljen na sušenje pri 105 °C. Nakon sušenja do konstantne mase, uzorak s filter papirom je izvagan te je izračunat udio lignina netopljivog u kiselini (LNTK) prema jednadžbi:

$$w (LNTK; \%) = \frac{m(\text{osušeni filter papir s talogom}) - m(\text{filter papir})}{m(\text{uzorak uzet za analizu})} \quad [2]$$

### 3.2.5.7. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini

Filtrat hidrolizata nakon provedene dvostupanjske kiselinske hidrolize, uzorak tekuće faze nakon provedene kiselinske hidrolize te uzorci prije i nakon detoksikacije kiselinskog hidrolizata korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje udjela lignina topljivog u kiselini (LTK). Pripremljeno je odgovarajuće razrjeđenje uzroka tako da izmjerena apsorbancija pri 205 nm bude između 0,7 i 1 (u području linearnosti). Kao slijepa proba korišten je zrak, a apsorbancija je mjerena u kvarcnim kivetama. Udio lignina topljivog u kiselini računa se prema jednadžbi:

$$w (LTK; \%) = \frac{A \times V \times D}{\alpha \times b \times m} \quad [3]$$

gdje je  $w (LTK)$  udio lignina topljivog u kiselini (%),  $A$  apsorbancija uzroka izmjerena pri valnoj duljini od 205 nm (-),  $V$  volumen filtrata (L),  $D$  faktor razrjeđenja (-),  $\alpha$  koeficijent ekstrinkcije lignina koji prema metodi TAPPI UM250 iznosi 110 (g/L cm),  $b$  širina kivete koja iznosi 1 (cm),  $m$  masa uzorka uzetog za analizu (g)

### 3.2.5.8. Određivanje ukupnih furana

Uzorci tekuće faze nakon provedene kiselinske i dvostupanjske kiselinske hidrolize te uzorci prije i nakon detoksikacije kiselinskog hidrolizata, korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije furana, mjerenjem apsorbancija pri valnim duljinama od 284 i 320

nm (Martinez i sur., 2000). Uzorci su razrijeđeni demineraliziranom vodom u omjeru 1:1000, a zatim su očitane apsorbancije pri navedenim valnim duljinama, primjenom kvarcnih kiveta. Baždarni dijagram izrađen je mjerenjem apsorbancija otopina poznatih koncentracija furana. Koncentracije furana u uzorcima izračunate su iz jednadžbe izrađenog baždarnog dijagrama:

$$\gamma = \frac{\Delta A - 0,0173}{191,02} \quad [4]$$

gdje je  $\gamma$  masena koncentracija furana (g/L),  $\Delta A = A_{284} - A_{320}$  (-)

### 3.2.6. Proračun parametara uspješnosti provedenih uzgoja

Prinos produkta ( $Y_P$ ) računa se prema izrazu:

$$Y_P = P - P_0 \quad [5]$$

gdje je  $Y_P$  prinos produkta (g/L),  $P$  konačna koncentracija produkta (g/L),  $P_0$  početna koncentracija produkta (g/L)

Ukupna potrošnja supstrata računa se prema izrazu:

$$Y_S = S_0 - S \quad [6]$$

gdje je  $Y_S$  potrošnja supstrata (g/L),  $S_0$  početna koncentracija supstrata (g/L),  $S$  konačna koncentracija supstrata (g/L)

Koeficijent konverzije supstrata u produkt ( $Y_{P/S}$ ) računa se prema izrazu:

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{Y_S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad [7]$$

pri čemu je  $Y_{P/S}$  koeficijent konverzije supstrata u produkt (g/g),  $Y_P$  prinos produkta (g/L),  $Y_S$  ukupna potrošnja supstrata (g/L)

Produktivnost se računa prema izrazu:

$$Pr = \frac{Y_P}{t_{uk}} \quad [8]$$

pri čemu je  $Pr$  produktivnost (g/L h),  $Y_P$  prinos produkta (g/L),  $t_{uk}$  ukupno vrijeme trajanja uzgoja (h)

Specifična brzina potrošnje supstrata  $r_S$  ( $\text{h}^{-1}$ ) i specifična brzina sinteze produkata  $r_P$  ( $\text{h}^{-1}$ ) određene su kao reakcije prvog reda (Marđetko i sur., 2018) iz eksperimentalnih podataka. Dobiveni podaci linearizirani su prema jednadžbama:

$$\ln S = \ln S_0 + r_S \times t \quad [9]$$

$$\ln P = \ln P_0 + r_P \times t \quad [10]$$

pri čemu su  $r_S$  i  $r_P$  određene kao koeficijent smjera pravca linearizirane regresijske funkcije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedeni su uzgoji bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim i kompleksnim hranjivim podlogama s ciljem ispitivanja sposobnosti rasta bakterije te potencijala proizvodnje vrijednih proizvoda (2,3-butandiol, acetoina, mliječne kiseline, etanola i enzima). Najprije je ispitan rast i metabolička aktivnost bakterije tijekom uzgoja u hranjivim podlogama s različitim izvorima dušika, zatim sposobnost rasta i proizvodnje lignocelulolitičkih enzima tijekom uzgoja na ksilanu, celulozi ili karboksimetilcelulozi kao izvorima ugljika. U drugom dijelu istraživanja provedeni su šaržni i šaržni uzgoji s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom na kemijski definiranim i kompleksnim hranjivim podlogama. Kompleksne hranjive podloge za uzgoj spomenute bakterije u bioreaktoru s miješalom dobivene su metodama predobrade otpadnog pivskog tropa kao obnovljivog izvora ugljika i energije. Za provedene uzgoje grafički je prikazana promjena koncentracija izvora ugljika, biomase i produkata, prikazani su izračunati parametri uspješnosti procesa nakon čega slijedi rasprava dobivenih rezultata.

U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u Erlenmeyerovim tikvicama, u hranjivoj podlozi s različitim izvorima dušika.

U poglavlju 4.2. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i proizvodnje enzima u Erlenmeyerovim tikvicama, u hranjivim podlogama s dodatkom ksilana, celuloze ili karboksimetilceluloze kao izvora ugljika.

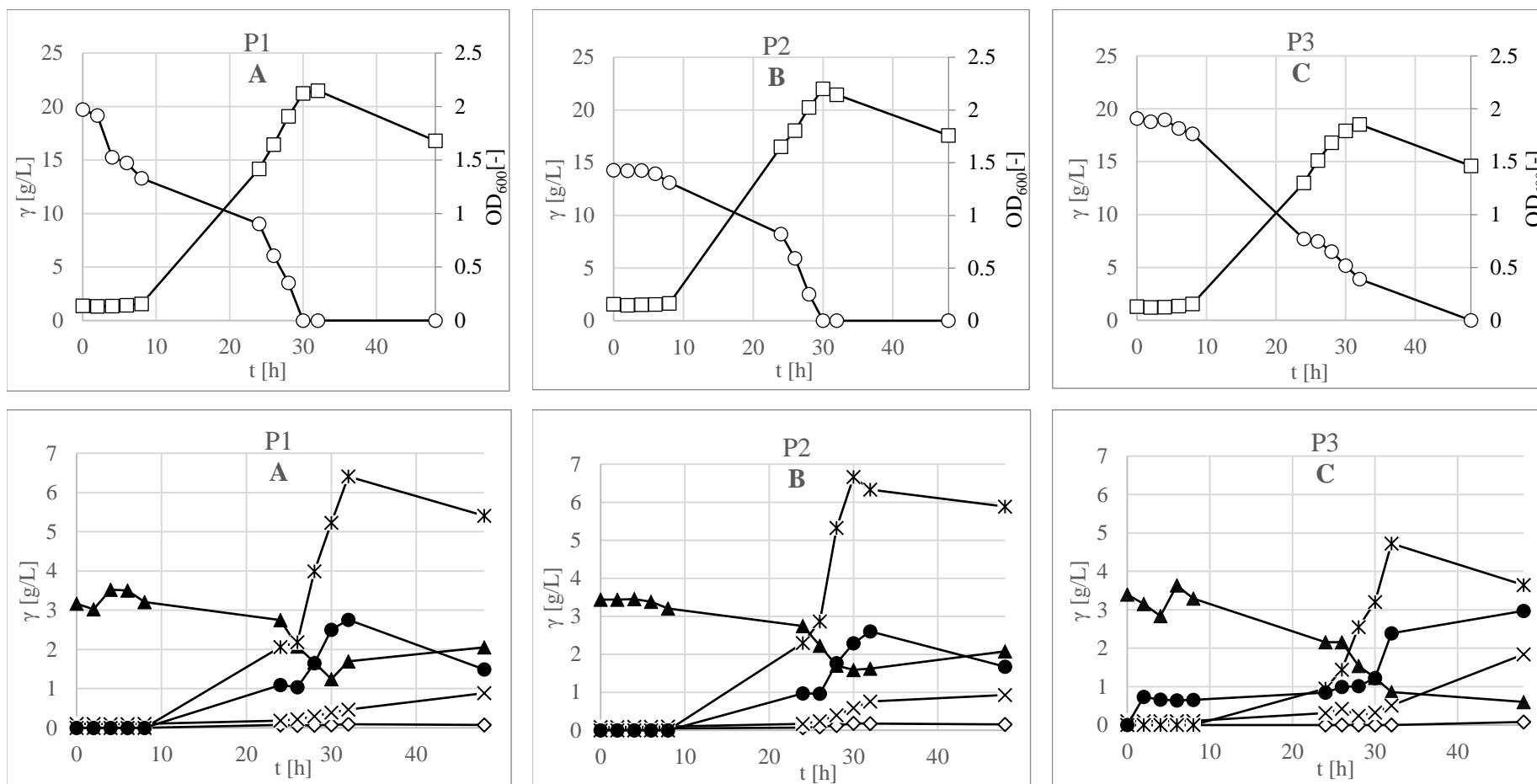
U poglavlju 4.3. prikazani su rezultati šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 te šaržnog uzgoja spomenute bakterije s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi čiji sastav simulira sastav kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa.

U poglavlju 4.4. prikazani su rezultati šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa.

U poglavlju 4.5. prikazani su rezultati šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa.

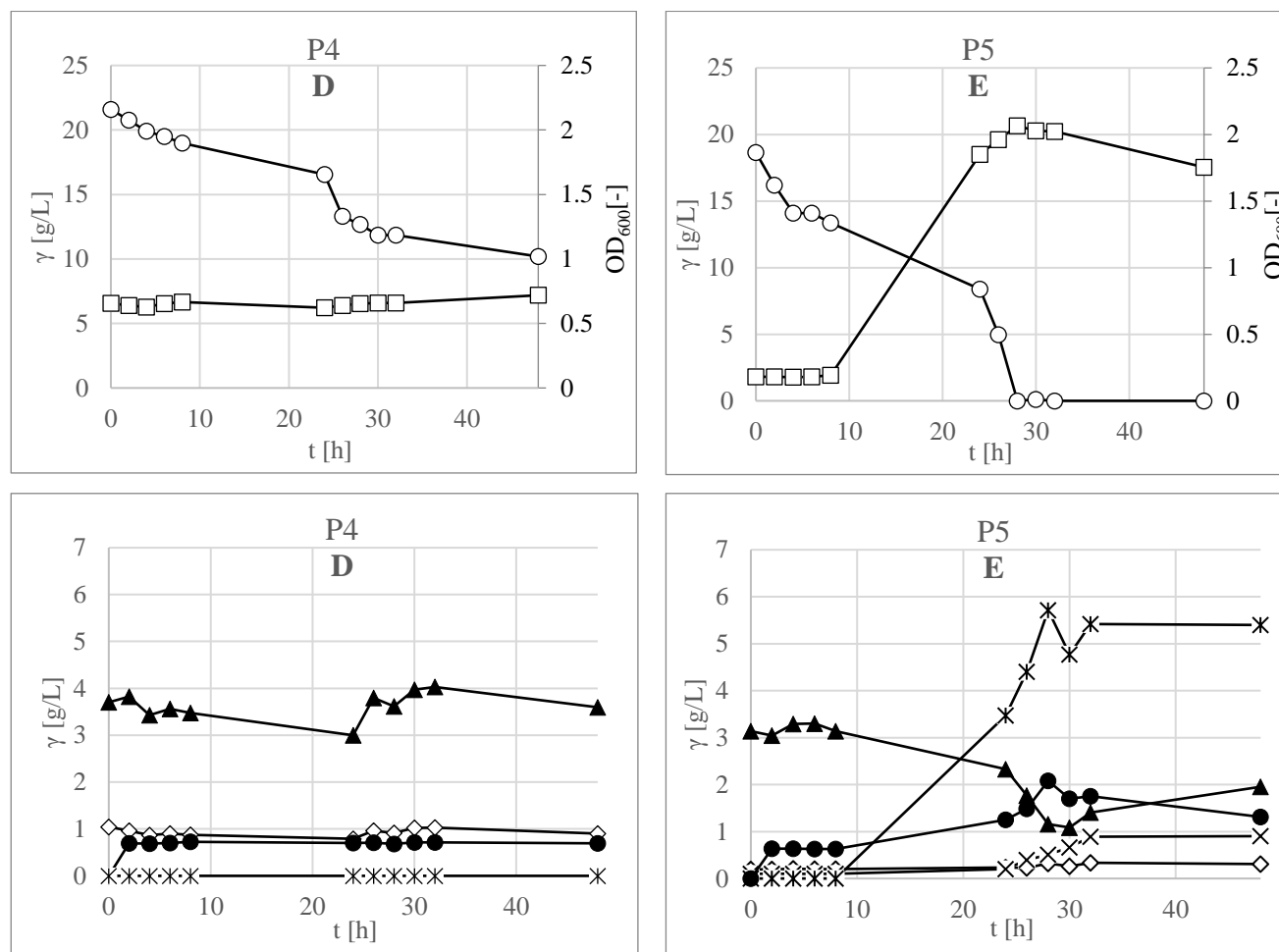
#### **4.1. UZGOJ BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 NA PODLOGAMA S RAZLIČITIM IZVORIMA DUŠIKA**

Istraživanje sposobnosti rasta i proizvodnje vrijednih produkata metabolizma bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na različitim izvorima dušika provedeno je u Erlenmeyerovim tikvicama, na podlogama sastava prikazanog u tablici 3 (poglavlje 3.1.3.1.) te pripremljenim na način opisan u poglavlju 3.2.3.1. Uzgoj je vođen tijekom 48 h, kako je opisano u poglavlju 3.2.4.1. Promjena koncentracije glukoze kao izvora ugljika, optičke gustoće podloge pri 600 nm (direktnog pokazatelja rasta bakterijske biomase) i koncentracije produkata prikazana je na slici 6. Specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata te parametri uspješnosti procesa prikazani su u tablici 8. Koncentracija biomase bakterije *P. polymyxa* DSM 742 nije određivana gravimetrijski zbog bakterijske sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida i proteina uslijed čega se nije mogla s točnošću odrediti samo koncentracija biomase.



**Slika 6.** Promjena koncentracije glukoze [g/L], OD<sub>600</sub> [-] i koncentracije produkata [g/L] tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim izvorima dušika: A (5 g/L kvašćevog ekstrakta i 5 g/L peptona), B (10 g/L kvašćevog ekstrakta, bez peptona), C (10 g/L peptona, bez kvašćevog ekstrakta), D (10 g/L CSL-a), E (10 g/L mesnog ekstrakta)

—○— glukoza    —□— OD600    —◇— mliječna kiselina    —▲— acetat    —×— acetoin    —\*— 2,3-butanediol    —●— etanol



**Slika 6.** Promjena koncentracije glukoze [g/L], OD<sub>600</sub> [-] i koncentracije produkata [g/L] tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim izvorima dušika: A (5 g/L kvašćevog ekstrakta i 5 g/L peptona), B (10 g/L kvašćevog ekstrakta, bez peptona), C (10 g/L peptona, bez kvašćevog ekstrakta), D (10 g/L CSL-a), E (10 g/L mesnog ekstrakta) - nastavak

○—glukoza    □—OD600    ◇—mliječna kiselina    ▲—acetat    ×—acetoin    \*—2,3-butandiol    ●—etanol



Prema dobivenim rezultatima prikazanim na slici 6, može se uočiti da je trajanje *lag* faze (faze prilagodbe bakterije na uvjete uzgoja) jednako za sve provedene uzgoje (izuzev uzgoja u podlozi 4 s dodanim CSL-om tijekom kojeg nije zabilježen porast bakterijske biomase). Eksplozivna faza rasta trajala je otprilike od 10. do 30. sata uzgoja u svim podlogama (osim u podlozi 4) nakon čega je nastupila stacionarna faza rasta te naposljetku faza odumiranja. U podlozi 1 (5 g/L kvašćevog ekstrakta i 5 g/L peptona) najveća izmjerena vrijednost optičke gustoće podloge pri 600 nm ( $OD_{600}$ ) tijekom uzgoja iznosila je 2,1484. Glukoza je utrošena tijekom prvih 30 sati uzgoja, a specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je 0,3576 1/h. Isto je primijećeno i tijekom uzgoja u podlozi 2 (10 g/L kvašćevog ekstrakta, bez dodatka peptona) pri čemu je specifična brzina potrošnje glukoze iznosila 0,3585 1/h, a najveća vrijednost  $OD_{600}$  2,2004. Tijekom uzgoja bakterije u podlozi 3 (10 g/L peptona, bez dodatka kvašćevog ekstrakta) najveća zabilježena vrijednost  $OD_{600}$  bila je nešto niža u usporedbi s uzgojima u podlogama 1, 2 i 5 te je iznosila 1,8523, dok je specifična brzina potrošnje glukoze iznosila 0,1091 1/h. Kao što je spomenuto, prilikom uzgoja bakterije u podlozi 4 s dodatkom 10 g/L CSL-a kao izvora dušika, nije došlo do značajnog porasta bakterijske biomase. Tijekom uzgoja u podlozi 5 (10 g/L mesnog ekstrakta) glukoza je utrošena nakon 28 sati uzgoja pri čemu je specifična brzina potrošnje iznosila 0,5314 1/h, a najveća izmjerena vrijednost  $OD_{600}$  bila je 2,0649.

Nadalje, tijekom svih provedenih uzgoja (osim uzgoja u podlozi 4) uočeno je da do porasta koncentracije produkata (2,3-butandiola, mliječne kiseline, etanola i acetoina) dolazi tijekom eksplozivne faze rasta bakterije, odnosno povećanjem vrijednosti  $OD_{600}$ . Smanjenjem izmjerenih vrijednosti  $OD_{600}$  smanjuje se koncentracija 2,3-butandiola i etanola, dok koncentracija mliječne kiseline i acetoina uglavnom stagnira. Najveće koncentracije 2,3-butandiola zabilježene su na kraju eksplozivne faze rasta bakterije tijekom uzgoja u podlogama 1 i 2 te su iznosile 6,4071 g/L, odnosno 6,6649 g/L. Najviši prinos 2,3-butandiola na kraju procesa i koeficijent konverzije supstrata u 2,3-butandiol dobiveni su uzgojem u podlozi 2, u iznosu od 5,8833 g/L, odnosno 0,4118 g/g. Tijekom uzgoja u podlozi 3 dobiven je manji prinos 2,3-butandiola (3,6437 g/L) u odnosu na uzgoje u podlogama 1, 2 i 5. Međutim, proizvedeno je više etanola i acetoina pri čemu je prinos etanola na kraju procesa iznosio 2,9728 g/L, stupanj konverzije supstrata u etanol 0,1556 g/g, a prinos acetoina iznosio je 1,7423 g/L te koeficijent konverzije supstrata u acetoin 0,0912 g/g. Najviši prinos mliječne kiseline dobiven je tijekom uzgoja u podlozi 5 u iznosu od 0,1108 g/L. Tijekom uzgoja u podlozi 4 (s dodatkom CSL-a) nisu proizvedeni 2,3-butandiol niti acetoin, dobivena je niska koncentracija

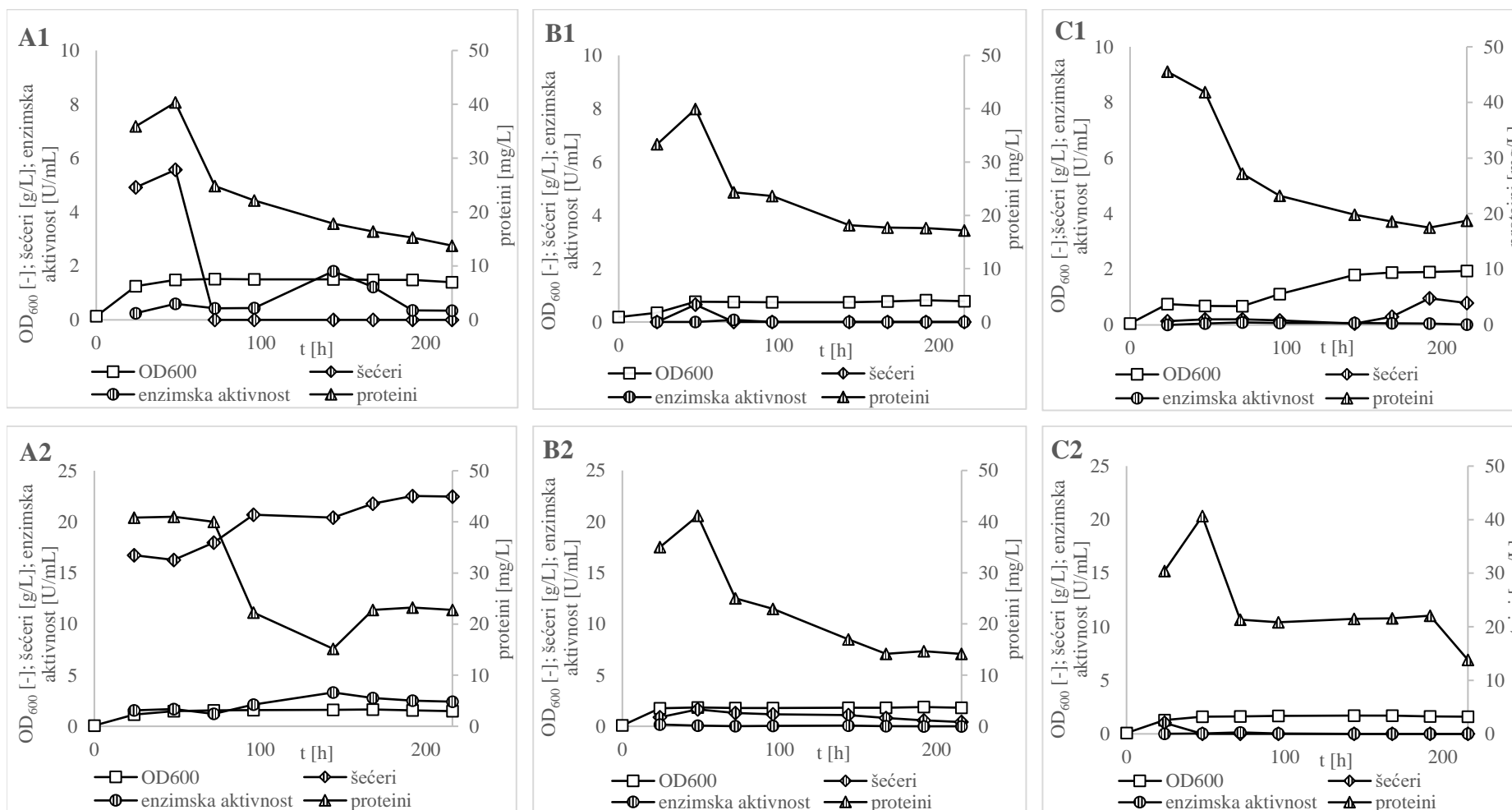
etanola, a niska koncentracija mliječne kiseline bila je prisutna u podlozi na početku uzgoja. Ostali procesni parametri te brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata navedeni su u tablici 8. Nadalje, prema Nakashimada i sur. (2000) *P. polymyxa* može koristiti acetat kao izvor ugljika zajedno s glukozom te njegov dodatak u hranjivu podlogu potiče proizvodnju 2,3-butandiola, stoga je u svaku podlogu na početku uzgoja dodan amonijev acetat u koncentraciji od 5 g/L. Također je poznato da bakterija *P. polymyxa* može tijekom uzgoja, između ostalog, proizvesti acetat. Prema Marwoto i sur. (2004) stanice *P. polymyxa* uzgojene na ksilozi proizvode više acetata nego stanice uzgojene na glukozu te dodatak acetata glukoznom mediju sa stanicama uzgojenim na glukozu povećava prinos 2,3-butandiola. Za razliku od stanica uzgojenih na glukozu, stanice uzgojene na ksilozi slabo troše acetat koji je dodan u glukozni medij. Rezultati njihova istraživanja također su pokazali da stanice *P. polymyxa* ne troše acetat zajedno sa ksilozom. U ovom istraživanju tijekom svih provedenih uzgoja na glukozu uz dodatak amonijeva acetata (osim uzgoja u podlozi 4) došlo je do potrošnje acetata tijekom eksponencijalne faze rasta bakterije *P. polymyxa* DSM 742.

**Tablica 8.** Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim izvorima dušika

<b>Procesni parametri</b>	<b>Podloga 1</b> (kvašćev ekstrakt i pepton)	<b>Podloga 2</b> (kvašćev ekstrakt)	<b>Podloga 3</b> (pepton)	<b>Podloga 4</b> (CSL)	<b>Podloga 5</b> (mesni ekstrakt)
$Y_S$ [g/L]	19,7148	14,2867	19,1018	11,4067	18,6467
$Y_{P(2,3-BD)}$ [g/L]	5,4052	5,8833	3,6437	0,0	5,4004
$Y_{P(MK)}$ [g/L]	0,0765	0,0995	0,0815	/	0,1108
$Y_{P(EtOH)}$ [g/L]	1,4915	1,6753	2,9728	0,6929	1,3093
$Y_{P(acetoin)}$ [g/L]	0,7810	0,8421	1,7423	0,0	0,8019
$Y_{P/S(2,3-BD)}$ [g/g]	0,2742	0,4118	0,1908	0,0	0,2896
$Y_{P/S(MK)}$ [g/g]	0,0039	0,0070	0,0043	/	0,0059
$Y_{P/S(EtOH)}$ [g/g]	0,0757	0,1173	0,1556	0,0607	0,0702
$Y_{P/S(acetoin)}$ [g/g]	0,0396	0,0589	0,0912	0,0	0,0430
$Pr_{2,3-BD}$ (g/(L h))	0,1126	0,1226	0,0759	0,0	0,1125
$Pr_{MK}$ (g/(L h))	0,0016	0,0021	0,0017	/	0,0023
$Pr_{EtOH}$ (g/(L h))	0,0311	0,0349	0,0619	0,0144	0,0273
$Pr_{acetoin}$ (g/(L h))	0,0163	0,0175	0,0363	0,0	0,0167
$r_S$ [1/h]	0,3576	0,3585	0,1091	0,0193	0,5314
$r_{2-3-BD}$ [1/h]	0,2184	0,2109	0,2463	/	0,1245
$r_{MK}$ [1/h]	/	0,1664	/	/	/
$r_{EtOH}$ [1/h]	0,2206	0,217	0,2141	/	0,1272
$r_{acetoin}$ [1/h]	0,1273	0,2152	0,0703	/	0,2314

## **4.2. UZGOJ BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA U SVRHU INDUKCIJE SINTEZE LIGNOCELULOLITIČKIH ENZIMA**

Istraživanje proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 provedeno je u hranjivim podlogama s dodatkom ksilana, celuloze ili karboksimetilceluloze (CMC) kao izvora ugljika. Podloge sastava prikazanog u tablici 4 pripremljene su u Erlenmeyerovim tikvicama prema poglavlju 3.2.3.2. Uzgoj je vođen 216 h, na način opisan u poglavlju 3.2.4.2. Napravljene su po dvije paralele za svaki izvor ugljika. Promjena izmjerenih vrijednosti optičke gustoće podloge ( $OD_{600}$ ) kao direktnog pokazatelja rasta bakterijske biomase, koncentracije proteina određenih metodom po Bradfordu (poglavlje 3.2.5.3), koncentracije oslobođenih šećera i enzimske aktivnosti određene DNSA metodom (poglavlje 3.2.5.4.) prikazane su na slici 7.



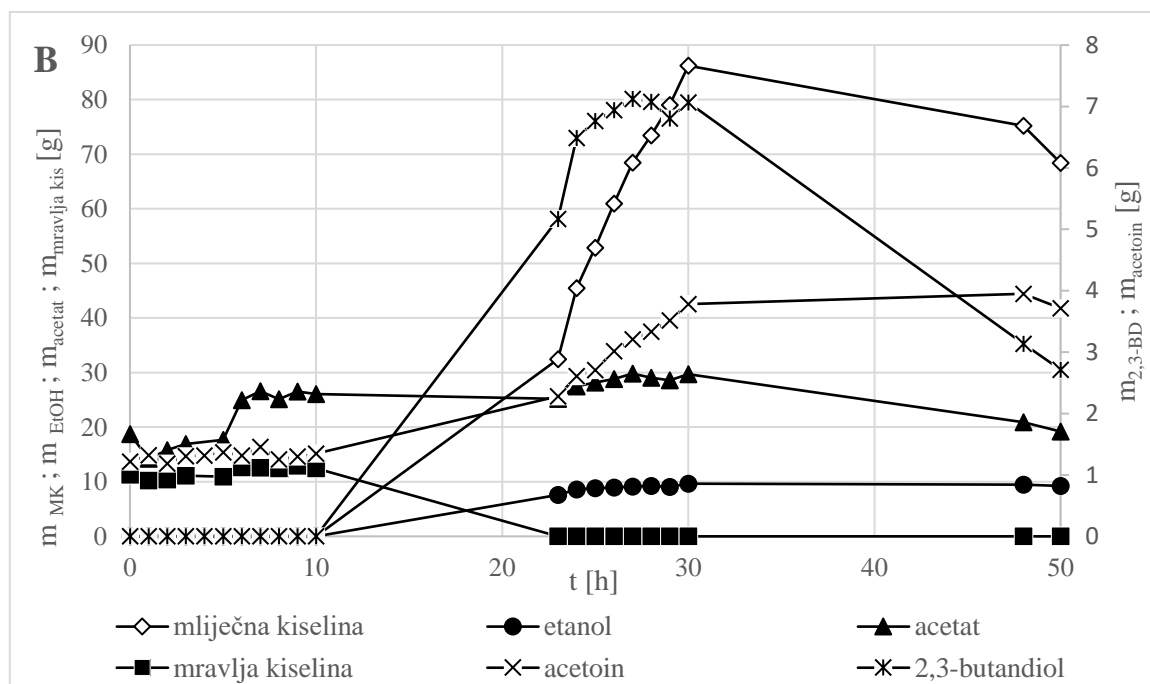
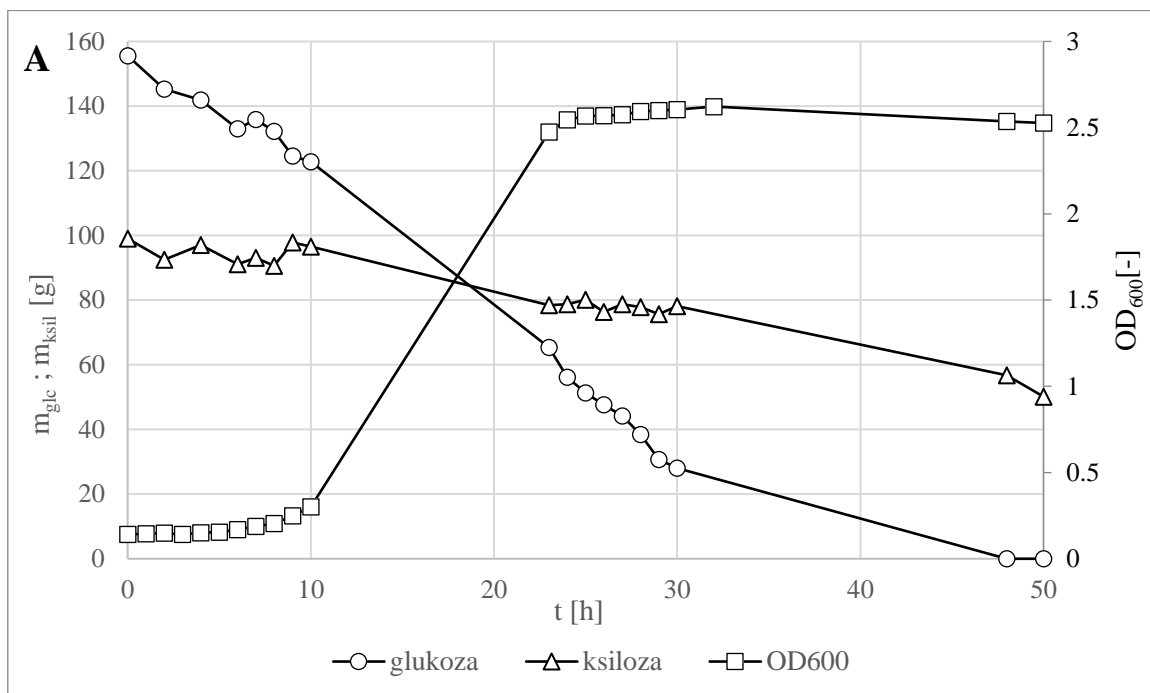
**Slika 7.** Promjena OD<sub>600</sub> [-], koncentracije oslobođenih šćera [g/L], koncentracije proteina [mg/L] i enzimske aktivnosti [U/ml] tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s 5 g/L ksilana (A1, A2), 5 g/L celuloze (B1, B2), 5 g/L karboksimetilceluloze (C1, C2)

Na temelju rezultata prikazanih na slici 7 utvrđeno je da bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 ima sposobnost proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima (celulaza i hemicelulaza), a time i potencijal razgradnje lignoceluloznih sirovina. Najviše koncentracije ukupnih proteina (približno 40 mg/L), određene metodom po Bradfordu (poglavlje 3.2.5.3.), detektirane su tijekom prvih 48 sati uzgoja na svim podlogama, pri čemu je najviša koncentracija postignuta u podlozi s karboksimetilcelulozom (45,5244 mg/L). Daljnjim uzgojem smanjivala se koncentracija ukupnih proteina. Veća koncentracija proteina ne znači nužno da je i enzimska aktivnost određena DNSA metodom (poglavlje 3.2.5.4) veća, obzirom da nisu svi detektirani ekstracelularni proteini nužno lignocelulolitički enzimi. Najveća enzimska aktivnost tijekom svih provedenih uzgoja zapažena je nakon 144. sata uzgoja u podlozi s ksilanom kao izvorom ugljika (3,3105 U/ml). Uzgojima na celulozi i karboksimetilcelulozi (CMC) postignute su znatno manje enzimске aktivnosti. Najveća enzimska aktivnost izmjerena tijekom uzgoja na celulozi bila je nakon 24. sata uzgoja (0,1737 U/ml), a tijekom uzgoja na karboksimetilcelulozi (CMC) najveća aktivnost određena je nakon 72. sata uzgoja u iznosu od 0,1393 U/ml.

Ispitivanje sposobnosti rasta i proizvodnje lignocelulolitičkih enzima bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 provedeno je također na glukozi (10 g/L) te otpadnom pivskom tropu prije i nakon provedenog procesa predobrade (2 % w/w) kao izvorima ugljika. Dobiveni rezultati uzgoja nisu bili reprezentativni stoga nisu prikazani u ovom radu. Potrebno je provesti optimizaciju procesa uzgoja ove bakterije na pivskom tropu.

#### **4.3. UZGOJI BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, U PODLOZI KOJA SIMULIRA SASTAV KISELINSKOG HIDROLIZATA OTPADNOG PIVSKOG TROPA**

U ovom dijelu istraživanja provedeni su šaržni te šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, u kemijski definiranoj hranjivoj podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata otpadnog pivskog tropa kako bi se ispitala sposobnost rasta i sinteze vrijednih produkata metabolizma spomenute bakterije pri zadanim uvjetima. Hranjiva podloga pripremljena je na način opisan u poglavlju 3.2.3.3., a uzgoji su vođeni na način opisan u poglavlju 3.2.4.3. Na slici 8 i u tablici 9 prikazani su rezultati šaržnog uzgoja, a rezultati šaržnog uzgoja s pritokom supstrata prikazani su na slici 9 i u tablici 10.



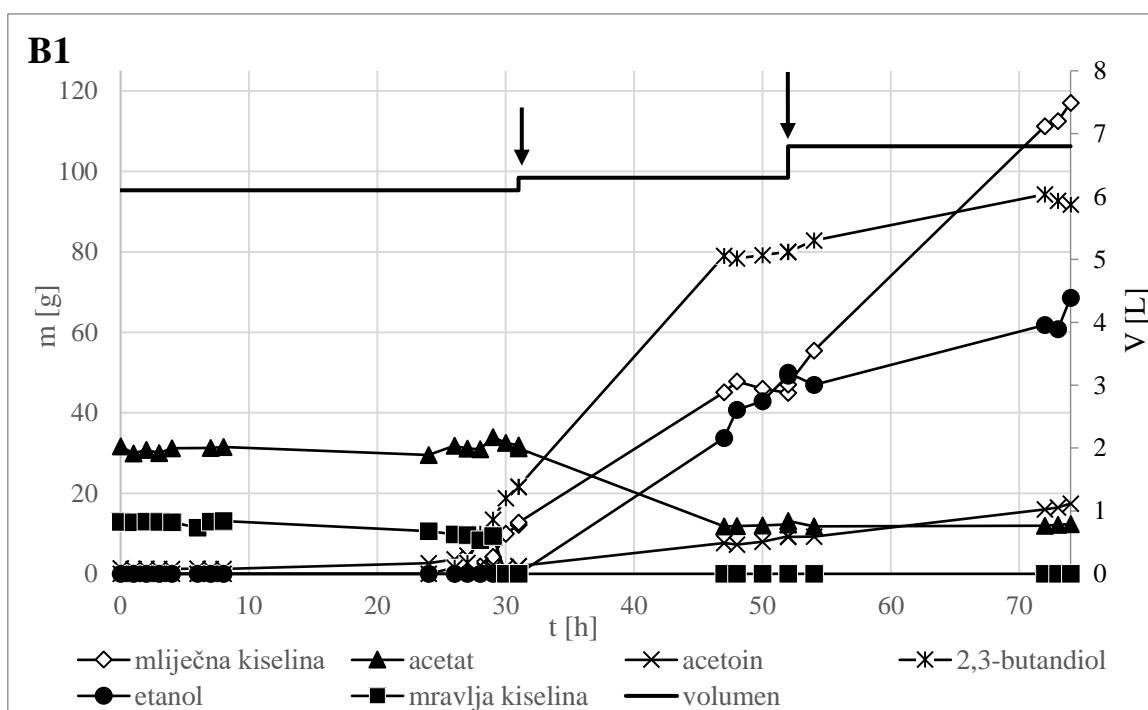
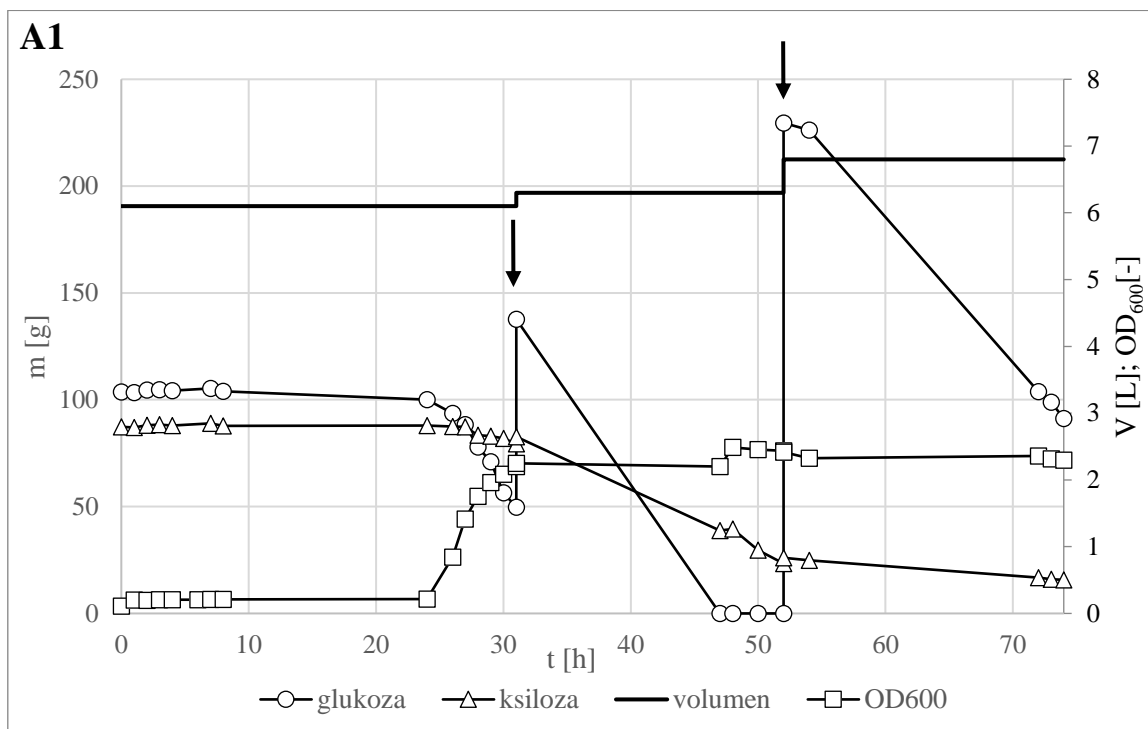
**Slika 8.** Promjena mase glukoze, ksiloze [g] i OD<sub>600</sub> [-] (A) te promjena mase mrvlje kiseline, acetata, mliječne kiseline (MK), etanola (EtOH), acetoina te 2,3-butandiola (2,3-BD) [g] (B) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom, u kemijski definiranoj podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog troja

Šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom, u podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat pivskog tropa, praćen je tijekom 50 h. Obzirom da se fizikalno-kemijskim metodama predobrade lignoceluloznih sirovina primjerice, primjenom kiseline u visokotlačnom reaktoru (Mardetko i sur., 2018), dobivaju tekući hidrolizati koji sadrže pretežito ugljikohidrate kao što su glukoza i ksiloza, kao izvori ugljika korišteni su upravo ovi šećeri, pri čemu je preferirani izvor ugljika glukoza. Glukoza je tijekom uzgoja u potpunosti utrošena, dok je ksiloze utrošeno 49,37 %. Specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je 0,1134 1/h, a brzina potrošnje ksiloze iznosila je 0,0204 1/h. Eksponencijalna faza rasta započela je nakon 8. sata uzgoja, a najveća izmjerena vrijednost OD<sub>600</sub> iznosila je 2,6224. Sinteza produkata (2,3-butandiola, mliječne kiseline, etanola, acetoina) započela je tijekom ekspanencijalne faze rasta, pri čemu je sinteza mliječne kiseline, acetoina i 2,3-butandiola nastavljena i tijekom stacionarne faze. Najveća zabilježena koncentracija 2,3-butandiola iznosila je 1,1875 g/L (7,1249 g), s time da je pri kraju uzgoja došlo do značajnog pada koncentracije 2,3-butandiola pa je prinos na kraju procesa iznosio samo 0,4523 g/L (2,7141 g), a stupanj konverzije supstrata u 2,3-butandiol iznosio je 0,0133 g/g (računato na ukupni supstrat). Tijekom uzgoja najviša koncentracija proizvedene mliječne kiseline iznosila je 14,3696 g/L (86,2173 g), pri čemu je prinos na kraju procesa iznosio 11,3990 g/L (68,3938 g), koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu 0,3345 g/g te produktivnost u iznosu od 0,2280 g/(L h). Prinos etanola iznosio je 1,5406 g/L (9,2437 g), a koeficijent konverzije supstrata u etanol 0,0452 g/g. Na kraju procesa prinos acetoina iznosio je 0,4159 g/L (2,4954 g), a koeficijent konverzije supstrata u acetoin 0,0122 g/g. Nadalje, koncentracija acetata tijekom procesa nije se značajnije mijenjala, dok je mravlja kiselina u potpunosti utrošena. Ostali procesni parametri i specifične brzine sinteze produkata i potrošnje supstrata tijekom šaržnog uzgoja u bioreaktoru s miješalom prikazane su u tablici 9.



**Tablica 9.** Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom, u kemijski definiranoj podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa

$Y_{S(glc)}$ [g]	155,5780
$Y_{S(ksil)}$ [g]	48,8988
$Y_{P(2,3-BD)}$ [g]	2,7141
$Y_{P(MK)}$ [g]	68,3938
$Y_{P(EtOH)}$ [g]	9,2437
$Y_{P(acetoin)}$ [g]	2,4954
$Y_{P/S(2,3-BD)}$ [g/g]	0,0133
$Y_{P/S(MK)}$ [g/g]	0,3345
$Y_{P/S(EtOH)}$ [g/g]	0,0452
$Y_{P/S(acetoin)}$ [g/g]	0,0122
$Pr_{2,3-BD}$ (g/(L h))	0,0090
$Pr_{MK}$ (g/(L h))	0,2280
$Pr_{EtOH}$ (g/(L h))	0,0308
$Pr_{acetoin}$ (g/(L h))	0,0083
$r_S(glc)$ [1/h]	0,1134
$r_S(ksil)$ [1/h]	0,0204
$r_{2-3-BD}$ [1/h]	0,0710
$r_{MK}$ [1/h]	0,1274
$r_{EtOH}$ [1/h]	0,0745
$r_{acetoin}$ [1/h]	0,0679



**Slika 9.** Promjena mase glukoze i ksiloze [g], OD<sub>600</sub> [-] i volumena podloge [L] (A1) te promjena mase mravlje kiseline, acetata, mliječne kiseline (MK), etanola (EtOH), acetoina, 2,3-butandiola (2,3-BD) [g] i volumena podloge [L] (B1) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kemijski definiranoj podlozi koja simulira kiselinški hidrolizat otpadnog pivskog tropa

Šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, u podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat pivskog tropa, praćen je tijekom 74 h. Na slici 9 strelicama su označene prihrane koncentriranom otopinom glukoze (500 g/L). Prva prihrana volumena 0,2 L dodana je nakon 31. sata uzgoja u bioreaktor s miješalom, a druga prihrana volumena 0,5 L dodana je nakon 52. sata uzgoja. Obzirom da se tijekom procesa mijenja volumen podloge, prikazane su promjene masa supstrata i produkata. Kao izvori ugljika korišteni su šećeri glukoza i ksiloza, pri čemu je preferirani izvor ugljika glukoza. Ukupno je utrošeno 329,7657 g glukoze te 77,6846 g ksiloze. U tablici 10 prikazani su izračunati parametri uspješnosti te specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata za pojedine faze procesa (prije i nakon dodataka prihrane) te za cjelokupni proces. Sintaza produkata (2,3-butandiola, mliječne kiseline, etanola i acetoina) započela je tijekom eksponencijalne faze rasta bakterije. Najveći prinos 2,3-butandiola ostvaren je nakon prve prihrane koncentriranom otopinom glukoze, u iznosu od 58,4057 g, a ukupan prinos na kraju procesa iznosio je 91,7023 g. Koeficijent konverzije supstrata u 2,3-butandiol (računat na ukupni supstrat) iznosio je 0,2251 g/g, a produktivnost 0,1822 g/(L h) što je značajno više u odnosu na vrijednosti ovih parametara postignutih tijekom šaržnog uzgoja. Nadalje, najveći prinos mliječne kiseline dobiven je nakon druge prihrane koncentriranom otopinom glukoze u iznosu od 70,0281 g, pri čemu je ukupan prinos na kraju procesa iznosio 114,3984 g. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je 0,2808 g/g (niži u odnosu na koeficijent konverzije šaržnog uzgoja), a produktivnost 0,2273 g/(L h). Nakon prve prihrane koncentriranom otopinom glukoze postignut je najveći prinos etanola (49,2357 g), dok je ukupan prinos na kraju procesa iznosio 67,8454 g, koeficijent konverzije supstrata u etanol iznosio je 0,1665 g/g, a produktivnost 0,1348 g/(L h). Dobivene vrijednosti značajno su više u usporedbi s provedenim šaržnim uzgojem. Tijekom procesa nije proizvedena velika količina acetoina, prinos na kraju procesa iznosio je 16,2237 g, a produktivnost i koeficijent konverzije supstrata u acetoin bili su relativno niski (0,0322 g/(L h) odnosno 0,0398 g/g). Koncentracija acetata stagnirala je tijekom prve faze (prije prve prihrane koncentriranom otopinom glukoze), a tijekom druge faze (nakon prve prihrane) došlo je do smanjenja koncentracije te ponovnog ustaljenja tijekom zadnje faze procesa (nakon druge prihrane). Tijekom procesa mravlja kiselina u potpunosti je utrošena.

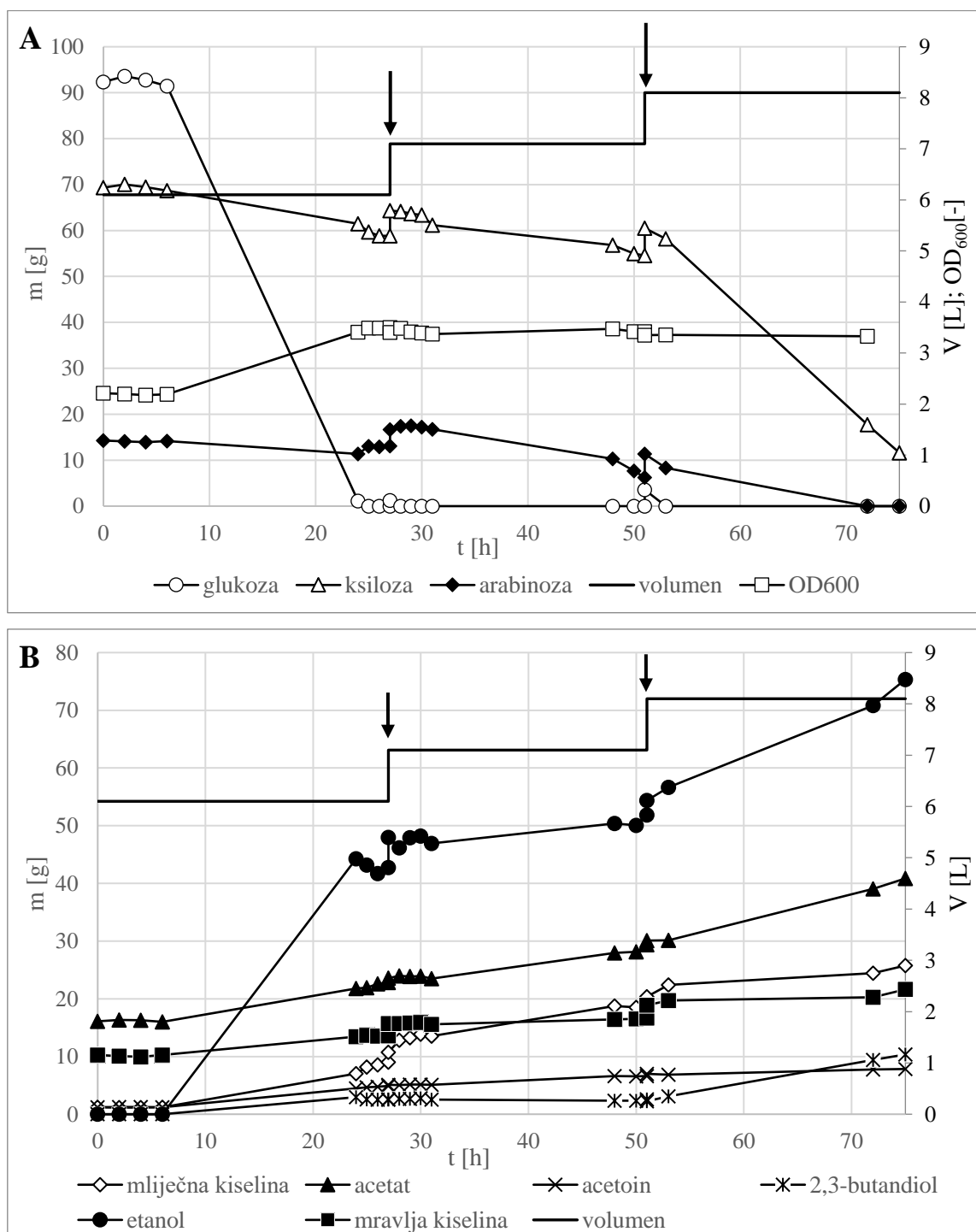
**Tablica 10.** Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kemijski definiranoj podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa

<b>Parametri</b>	<b>Faza 1</b> (prije prve prihrane)	<b>Faza 2</b> (nakon prve prihrane)	<b>Faza 3</b> (nakon druge prihrane)	<b>Ukupno za cijeli proces</b>
$Y_{S(glc)}$ [g]	53,8071	137,6404	138,3182	329,7657
$Y_{S(ksil)}$ [g]	8,0356	59,3781	10,2709	77,6846
$Y_{P(2,3-BD)}$ [g]	21,5935	58,4057	11,7031	91,7023
$Y_{P(MK)}$ [g]	12,1602	32,2101	70,0281	114,3984
$Y_{P(EtOH)}$ [g]	0,0	49,2357	18,6097	67,8454
$Y_{P(acetoin)}$ [g]	0,5066	7,3842	8,3329	16,2237
$Y_{P/S(2,3-BD)}$ [g/g]	0,3492	0,2964	0,0788	0,2251
$Y_{P/S(MK)}$ [g/g]	0,1966	0,1635	0,4713	0,2808
$Y_{P/S(EtOH)}$ [g/g]	0,0	0,2499	0,1252	0,1665
$Y_{P/S(acetoin)}$ [g/g]	0,0082	0,0375	0,0561	0,0398
$Pr_{2,3-BD}$ (g/(L h))	0,1142	0,4415	0,0782	0,1822
$Pr_{MK}$ (g/(L h))	0,0643	0,2435	0,4681	0,2273
$Pr_{EtOH}$ (g/(L h))	0,0	0,3722	0,1244	0,1348
$Pr_{acetoin}$ (g/(L h))	0,0027	0,0558	0,0557	0,0322
$r_{S(glc)}$ [1/h]	0,1569	0,3078	0,0443	/
$r_{S(ksil)}$ [1/h]	0,0211	0,1318	0,0227	/
$r_{2-3-BD}$ [1/h]	0,7857	0,0809	0,0078	/
$r_{MK}$ [1/h]	0,8291	0,0782	0,0376	/
$r_{EtOH}$ [1/h]	0,0	0,2189	0,0175	/
$r_{acetoin}$ [1/h]	0,1773	0,0866	0,0311	/

#### **4.4. ŠARŽNI UZGOJ BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 S PRITOKOM SUPSTRATA, U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, NA KISELINSKOM HIDROLIZATU OTPADNOG PIVSKOG TROPA**

Sposobnost potrošnje supstrata i sinteze vrijednih produkata metabolizma bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa ispitana je u bioreaktoru s miješalom. Najprije je provedena kiselinska hidroliza otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru na način opisan u poglavlju 3.2.2. Dobiveni kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa izrazito je tamne boje te s vremenom dolazi do prelaska topivih kompleksnih spojeva u netopive (Marđetko i sur., 2018) stoga je turbidimetrijsko određivanje koncentracije biomase mjerenjem optičke gustoće bilo otežano i nije bilo primarni cilj ovog istraživanja.

Podloga za šaržni uzgoj s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom (tekuća faza dobivena kiselinskom hidrolizom pivskog tropa) pripremljena je na način opisan u poglavlju 3.2.3.4., a podloga za prihranu (detoksicirana tekuća faza dobivena kiselinskom hidrolizom pivskog tropa) pripremljena je prema poglavlju 3.2.3.5. Uzgoj je vođen na način opisan u poglavlju 3.2.4.4. Na slici 10 prikazana je promjena mase supstrata i produkata, volumena i OD<sub>600</sub> tijekom procesa, a u tablici 11 prikazani su izračunati parametri uspješnosti te specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata u pojedinim fazama procesa (prije i nakon dodataka prihrane) te za cjelokupni proces.



**Slika 10.** Promjena mase glukoze, ksiloze i arabinoze [g], OD<sub>600</sub> [-] i volumena podloge [L] (A) te promjena mase mravlje kiseline, acetata, mliječne kiseline (MK), etanola (EtOH), acetoina, 2,3-butandiola (2,3-BD) [g] i volumena podloge [L] (B) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa

Šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa, praćen je tijekom 75 h. Na

slici 10 strelicama su označene prihrane detoksiciranim kiselinskim hidrolizatom pivskog tropa. Prva prihrana (volumena 1 L) dodana je u bioreaktor s miješalom nakon 27. sata uzgoja, a druga prihrana (također volumena 1 L) dodana je nakon 51. sata uzgoja. Uzorci su uzimani prvih 6 sati uzgoja tijekom kojih je trajala faza prilagodbe bakterije na uvjete uzgoja (*lag* faza). Preferirani izvor ugljika je glukoza, no već nakon 25. sata uzgoja glukoza je u potpunosti utrošena (92,3548 g) pa je započela potrošnja ksiloze (10,5099 g). Prihranama detoksiciranim kiselinskim hidrolizatom dodana je vrlo mala količina glukoze (koja je vrlo brzo utrošena) stoga su se kao izvori ugljika trošili drugi šećeri (ksiloza i arabinoza). Arabinoza je tijekom zadnje faze procesa (nakon dodatka druge prihrane) u potpunosti utrošena, a ksiloze je u podlozi zaostalo 11,6254 g. Ukupno se na kraju procesa utrošilo 97,1416 g glukoze, 69,2001 g ksiloze te 22,9938 g arabinoze. Sinteza produkata započela je tijekom eksponencijalne faze rasta bakterije. Najveći prinos 2,3-butandiola postignut je nakon druge prihrane detoksiciranim kiselinskim hidrolizatom (8,1135 g), a ukupni prinos na kraju procesa iznosio je 10,7312 g. Koeficijent konverzije supstrata u 2,3-butandiol (računato na ukupni supstrat) iznosio je 0,0567 g/g, a produktivnost 0,0177 g/(L h). Mliječna kiselina bila je u malim količinama prisutna u podlozi na početku uzgoja te u podlozi za prihranu. Ukupan prinos mliječne kiseline na kraju procesa iznosio je 21,3599 g, koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je 0,1128 g/g, a produktivnost 0,0352 g/(L h). Najveći prinos etanola ostvaren je prije prve prihrane u iznosu od 42,7351 g, dok je ukupan prinos na kraju procesa iznosio 67,5518 g. Koeficijent konverzije supstrata u etanol iznosio je 0,3568 g/g, a produktivnost 0,1112 g/(L h). Prinos acetoina na kraju procesa bio je nizak te iznosio 6,0678 g, koeficijent konverzije supstrata u acetoin iznosio je 0,0320 g/g, a produktivnost 0,0100 g/(L h). Octena i mravlja kiselina bile su prisutne u podlozi na početku uzgoja te u podlozi za prihranu. Tijekom procesa došlo je do sinteze acetata i formijata, a prinosi na kraju procesa iznosili su 23,2980 g, odnosno 7,0459 g.

Didak Ljubas i sur. (2022) proveli su šaržni uzgoj *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreктору s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa. Najviše koncentracije 2,3-butandiola i etanola postignute su nakon 72 h uzgoja, pri čemu je proizvedena koncentracija 2,3-butandiola iznosila 1,26 g/L, etanola 2,5 g/L te mliječne kiseline 3,6 g/L. Na kraju uzgoja (nakon 96 h) došlo je smanjenja koncentracije 2,3-butandiola (1,22 g/L), dok su koncentracije ostalih produkata metabolizma porasle (15,43 g/L mliječne kiseline i 2,61 g/L etanola). Koeficijent konverzije supstrata u 2,3-butandiol iznosio je 0,254 g/g, a koeficijent konverzije supstrata u etanol 0,102 g/g.

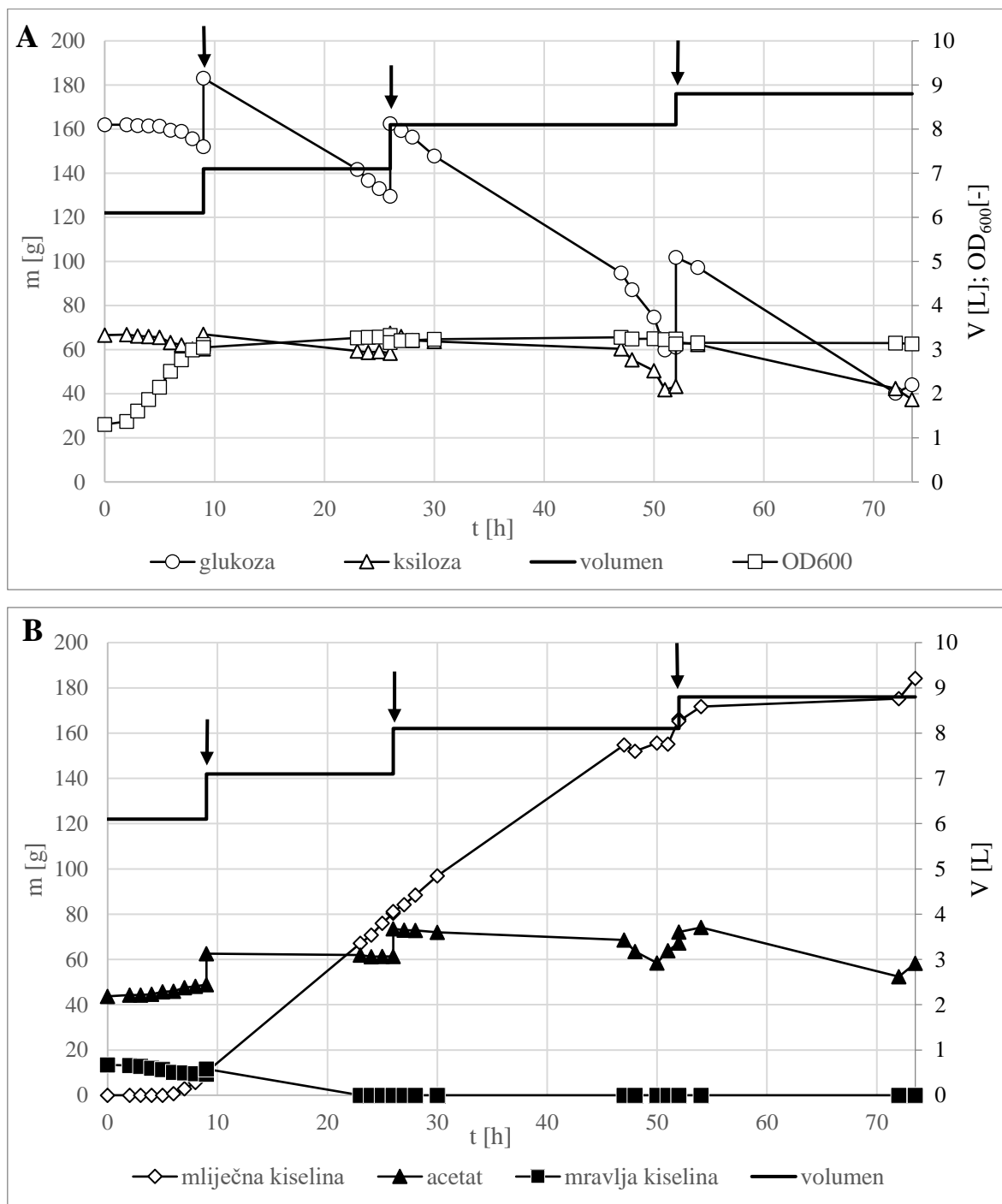
**Tablica 11.** Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkata šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu otpadnog pivskog tropa

<b>Parametri</b>	<b>Faza 1</b> (prije prve prihrane)	<b>Faza 2</b> (nakon prve prihrane)	<b>Faza 3</b> (nakon druge prihrane)	<b>Ukupno za cijeli proces</b>
$Y_{S(glc)}$ [g]	92,3548	1,2077	3,5791	97,1416
$Y_{S(ksil)}$ [g]	10,5099	9,7817	48,9085	69,2001
$Y_{S(arabinoza)}$ [g]	1,2022	10,4112	11,3804	22,9938
$Y_{P(2,3-BD)}$ [g]	2,5688	0,0489	8,1135	10,7312
$Y_{P(MK)}$ [g]	7,8223	8,1338	5,4038	21,3599
$Y_{P(EtOH)}$ [g]	42,7351	3,8639	20,9528	67,5518
$Y_{P(acetoin)}$ [g]	3,7108	1,5328	0,8242	6,0678
$Y_{P/S(2,3-BD)}$ [g/g]	0,0247	0,0023	0,1270	0,0567
$Y_{P/S(MK)}$ [g/g]	0,0752	0,3801	0,0846	0,1128
$Y_{P/S(EtOH)}$ [g/g]	0,4107	0,1806	0,3281	0,3568
$Y_{P/S(acetoin)}$ [g/g]	0,0357	0,0716	0,0129	0,0320
$Pr_{2,3-BD}$ (g/(L h))	0,0156	0,0003	0,0417	0,0177
$Pr_{MK}$ (g/(L h))	0,0475	0,0477	0,0278	0,0352
$Pr_{EtOH}$ (g/(L h))	0,2595	0,0227	0,1078	0,1112
$Pr_{acetoin}$ (g/(L h))	0,0225	0,0090	0,0042	0,0100
$r_S(glc)$ [1/h]	0,2411	0,1887	0,6376	/
$r_S(ksil)$ [1/h]	0,0145	0,0062	0,0694	/
$r_S(arabinoza)$ [1/h]	0,0045	0,1638	0,1141	/
$r_{2-3-BD}$ [1/h]	0,0606	0,0264	0,0616	/
$r_{MK}$ [1/h]	0,0973	0,0797	0,0078	/
$r_{EtOH}$ [1/h]	0,2106	0,0035	0,0129	/
$r_{acetoin}$ [1/h]	0,0709	0,0140	0,0063	/



#### **4.5. ŠARŽNI UZGOJ BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 S PRITOKOM SUPSTRATA, U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, NA ENZIMSKOM HIDROLIZATU ČVRSTE FAZE ZAOSTALE NAKON KISELINSKE HIDROLIZE OTPADNOG PIVSKOG TROPA**

Sposobnost potrošnje supstrata i sinteze vrijednih proizvoda metabolizma bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa ispitana je u bioreaktoru s miješalom. Obično se izdvojena čvrsta faza dobivena fizikalno-kemijskom predobradom lignoceluloznih sirovina odbacuje (Macheiner i sur., 2003) no, obzirom da sadrži kompleksne šećere iz kojih se mogu dobiti fermentabilni šećeri provedena je enzimska hidroliza čvrste faze primjenom komercijalnih enzima na način opisan u poglavlju 3.2.2. Podloga za uzgoj u bioreaktoru s miješalom pripremljena je prema poglavlju 3.2.3.6., a uzgoj je vođen kako je opisano u poglavlju 3.2.4.5. Rezultati šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom na enzimskom hidrolizatu prikazani su na slici 11 i u tablici 12.



**Slika 11.** Promjena mase glukoze, ksiloze [g], OD<sub>600</sub> [-] i volumena podloge [L] (A) te promjena mase mravlje kiseline, acetata, mliječne kiseline (MK) [g] i volumena podloge [L] (B) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog troja

Šaržni uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa, vođen je 73,5 h. Na slici 11 strelicama su označene prihrane enzimskim hidrolizatom otpadnog pivskog tropa. Prva prihrana (volumena 1 L) dodana je u bioreaktor s miješalom nakon 9. sata uzgoja, druga prihrana (volumena 1 L) dodana je nakon 26. sata uzgoja, a treća prihrana (volumena 0,7 L) nakon 52. sata uzgoja. Kao izvori ugljika korišteni su šećeri glukoza i ksiloza (arabinoza nije detektirana u enzimskom hidrolizatu). Tijekom uzgoja utrošeno je ukupno 222,6155 g glukoze te 64,9376 g ksiloze. Od produkata sintetizirana je samo mliječna kiselina (u uzorcima nisu detektirani 2,3-butandiol, etanol niti acetoin). Najveći prinos mliječne kiseline dobiven je nakon druge prihrane enzimskim hidrolizatom otpadnog pivskog tropa, a ukupan prinos na kraju procesa iznosio je 183,7764 g. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu (računato na ukupni supstrat) iznosio je 0,6391 g/g, a produktivnost 0,2841 g/(L h). Octena i mravlja kiselina bile su prisutne u podlozi na početku uzgoja. Mravlja kiselina je tijekom procesa u potpunosti utrošena, a octena kiselina je dodavana tijekom procesa s podlogom za prihranu te se njena koncentracija nije značajnije mijenjala.

Nakon 48 h šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze dobivene nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa, proizvedeno je 9,84 g/L 2,3-butandiola, 3,58 g/L etanola te 7,45 g/L mliječne kiselina. Koeficijent konverzije supstrata u 2,3-butandiol iznosio je 0,033 g/g, a koeficijent konverzije supstrata u etanol 0,070 g/g (Didak Ljubas i sur., 2022).

**Tablica 12.** Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze mliječne kiseline šaržnog uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa

<b>Parametri</b>	<b>Faza 1</b> (prije prve prihrane)	<b>Faza 2</b> (nakon prve prihrane)	<b>Faza 3</b> (nakon druge prihrane)	<b>Faza 4</b> (nakon treće prihrane)	<b>Ukupno za cijeli proces</b>
$Y_{S(glc)}$ [g]	9,9184	53,5661	101,3935	57,7375	222,6155
$Y_{S(ksil)}$ [g]	6,2585	8,4950	24,0718	26,1123	64,9376
$Y_{P(MK)}$ [g]	9,7035	70,2333	84,9627	18,8769	183,7764
$Y_{P/S(MK)}$ [g/g]	0,5998	/	0,6772	0,2251	0,6391
$Pr_{MK}$ (g/(L h))	0,1767	0,5819	0,4034	0,0998	0,2841
$r_{S(glc)}$ [1/h]	0,0226	0,0198	0,1074	0,0475	/
$r_{S(ksil)}$ [1/h]	0,0279	0,0086	0,0821	0,0243	/
$r_{MK}$ [1/h]	0,8291	0,1340	0,0301	0,0025	/

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata tijekom ovog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim izvorima dušika utvrđeno je da bakterija pokazuje sposobnost rasta i sinteze proizvoda u svim podlogama osim u podlozi 4 (s 10 g/L CSL-a) pa se može zaključiti da CSL kao izvor dušika nije pogodan za uzgoj ove bakterije. Uzgojima u podlogama 1 (5 g/L kvašćevog ekstrakta i 5 g/L peptona), 2 (10 g/L kvašćevog ekstrakta) i 5 (10 g/L mesnog ekstrakta) dobiveni su slični prinosi 2,3-butandiola s time da su najveći koeficijent konverzije glukoze u 2,3-butandiol (0,4118 g/g) i produktivnost (0,1226 g/(L h)) postignuti tijekom uzgoja u podlozi 2, a najmanji u podlozi 3 (10 g/L peptona). S druge strane, uzgojem u podlozi 3 dobivene su veće vrijednosti prinosa, produktivnosti i koeficijenata konverzije glukoze u etanol i acetoin nego u ostalim podlogama pa se može zaključiti da je pepton kao izvor dušika pogodniji za sintezu etanola i acetoina nego 2,3-butandiola, u usporedbi s ostalim izvorima dušika.

2. Bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pokazuje sposobnost proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima na ksilanu, celulozi i karboksimetilcelulozi. Najveća enzimaska aktivnost određena je nakon 144. sata uzgoja na ksilanu (3,3105 U/ml).

3. Glavni produkt dobiven šaržnim uzgojem spomenute bakterije u bioreaktoru s miješalom, u podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata pivskog tropa, bila je mliječna kiselina, no proizvedene su i manje količine etanola, 2,3-butandiola te acetoina. Najveći prinosi produkata zabilježeni su nakon 30. sata uzgoja, a obzirom da se koncentracije produkata pri kraju procesa značajno smanjuju, trebalo bi optimirati vrijeme vođenja procesa. Nadalje, šaržnim uzgojem ove bakterije s pritokom supstrata dobivene su veće vrijednosti produktivnosti i koeficijenata konverzije supstrata u 2,3-butandiol, etanol i acetoin (izuzev mliječne kiseline) u odnosu na šaržni način vođenja procesa.

4. Šaržnim uzgojem ove bakterije s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa, kao glavni proizvod dobiven je etanol, a također je proizvedena mliječna kiselina, 2,3-butandiol i acetoin. Za razliku od ostalih provedenih uzgoja u bioreaktoru s miješalom, tijekom ovog uzgoja sintetizirani su acetat i formijat.

5. Šaržnim uzgojem ove bakterije s pritokom supstrata, u bioreaktoru s miješalom, na enzimskom hidrolizatu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize pivskog tropa proizvedena je jedino mliječna kiselina. Ostali produkti metabolizma bakterije nisu detektirani.

## 6. LITERATURA

- Abdallah Y, Yang M, Zhang M, Masum MMI, Ogunyemi SO, Hossain A, i sur. (2019) Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by *Paenibacillus polymyxa* Sx3. *Lett Appl Microbiol* **68**, 423–429. <https://doi.org/10.1111/lam.13117>
- Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, Galvez A (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB (2011) Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol Adv* **29**, 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Akhtar MS, Siddiqui ZA (2007) Biocontrol of a chickpea root-rot disease complex with *Glomus intraradices*, *Pseudomonas putida* and *Paenibacillus polymyxa*. *Australas Plant Pathol* **36**, 175–180. <https://doi.org/10.1071/AP07006>
- Anand R, Grayston S, Chanway C (2013) N<sub>2</sub>-fixation and seedling growth promotion of lodgepole pine by endophytic *Paenibacillus polymyxa*. *Microb Ecol* **66**, 369–374. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0196-1>
- Ash C, Farrow J, Wallbanks S, Collins M (1991) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol* **13**, 202–206. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00608.x>
- Ash C, Priest F, Collins MD (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>
- Bach E, Seger GDDS, Fernandes GDC, Lisboa BB, Passaglia LMP (2016) Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Appl Soil Ecol* **99**, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002>
- Bal A, Chanway CP (2012) Evidence of nitrogen fixation in lodgepole pine inoculated with diazotrophic *Paenibacillus polymyxa*. *Botany* **90**, 891–896. <https://doi.org/10.1139/b2012-044>

- Barbosa-Pereira L, Angulo I, Paseiro-Losada P, Cruz JM (2013) Phenolic profile and antioxidant properties of a crude extract obtained from a brewery waste stream. *Food Res Int* **51**, 663–669. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.042>
- Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can J Microbiol* **47**, 793–800. <https://doi.org/10.1139/w01-080>
- Binod P, Janu KU, Sindhu R, Pandey A (2011) Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. U: Pandey A, Larroche C, Ricke SC (ured.) *Biofuels: Alternative Feedstock's and Conversion Processes*. Elsevier Inc., USA, str. 229–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00010-3>
- Bionda N, Pitteloud JP, Cudic P (2013) Cyclic lipodepsipeptides: a new class of antibacterial agents in the battle against resistant bacteria. *Future Med Chem* **5**, 1311–1330. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.86>
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 343–350. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7)
- Budi SW, van Tuinen D, Arnould C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (2000) Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Appl Soil Ecol* **15**, 191–199. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00095-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00095-0)
- Chandel AK, Garlapati VK, Singh AK, Antunes FAF, da Silva SS (2018) The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresour Technol* **264**, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>
- Chávez-Ramírez B, Kerber-Díaz JC, Acoltzi-Conde MC, Ibarra JA, Vásquez-Murrieta MS, Estrada-de los Santos P (2020) Inhibition of *Rhizoctonia solani* RhCh-14 and *Pythium ultimum* PyFr-14 by *Paenibacillus polymyxa* NMA1017 and *Burkholderia cenocepacia* CACua-24: a proposal for biocontrol of phytopathogenic fungi. *Microbiol Res* **230**, 126347. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126347>

Choi SK, Park SY, Kim R, Lee CH, Kim JF, Park SH (2007) Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.147>

Cochrane SA, Vederas JC (2014) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev* **36**, 4-31. <https://doi.org/10.1002/med.21321>

Connolly A, Piggott CO, FitzGerald RJ (2014) *In vitro* alpha-glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Res Int* **56**, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.021>

Delker C, Raschke A, Quint M (2008) Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* **227**, 929–941. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0710-8>

Den W, Sharma VK, Lee M, Nadadur G, Varma RS (2018) Lignocellulosic biomass transformations via greener oxidative pretreatment processes: Access to energy and value added chemicals. *Front Chem* **6**, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00141>

Didak Ljubas B, Novak M, Trontel A, Rajković A, Kelemen Z, Marđetko N i sur. (2022) Production of different biochemicals by *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 from pretreated brewers' spent grains. *Front Microbiol* **13**, 812457. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.812457>.

Dora S, Bhaskar T, Singh R, Naik DV, Adhikari DK (2012) Effective catalytic conversion of cellulose into high yields of methyl glucosides over sulfonated carbon based catalyst. *Bioresour Technol* **120**, 318–321. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.036>

Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR (2014) Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* **106**, 85–125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

Eastman AW, Heinrichs DE, Yuan ZC (2014) Comparative and genetic analysis of the four sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. *BMC Genomics* **15**, 851. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-851>

Erturk Y, Ercisli S, Haznedar A, Cakmakci R (2010) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biol Res* **43**, 91–98. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602010000100011>



Ferraz E, Coroado J, Gamelas J, Silva J, Rocha F, Velosa A (2013) Spent brewery grains for improvement of thermal insulation of ceramic bricks. *J Mater Civil Eng* **25**, 1638-1646. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0000729](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0000729)

Flickinger MC (1980) Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? *Biotechnol Bioeng* **22**, 27-48.

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

Gastelum-Arellanez A, Paredes-López O, Olalde-Portugal V (2014) Extracellular endoglucanase activity from *Paenibacillus polymyxa* BEb-40: production, optimization and enzymatic characterization. *World J Microbiol Biotechnol* **30**, 2953-2965. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1723-z>

Gouzou L, Burtin G, Philippy R, Bartoli F, Heulin T (1993) Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. *Geoderma* **56**, 479-491. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81490-6.50038-8>

Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb cell fact* **15**, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>

Guemouri-Athmani S, Berge O, Bourrain M, Mavingui P, Thiéry JM, Bhatnagar T, i sur. (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur J Soil Biol* **36**, 149-159. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)01056-6](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)01056-6)

Haggag WM (2007) Colonization of exopolysaccharide-producing *Paenibacillus polymyxa* on peanut roots for enhancing resistance against crown rot disease. *Afri J Biotechnol* **6**, 1568-1577.

Haggag WM, Timmusk S (2008) Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J Appl Microbiol* **104**, 961-969. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03611.x>

Hakizimana, O., Matabaro, E., Lee, B. (2020) The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnol Rep* **25**, e00397. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00397>

HALMED (2021) MAXITROL kapi za oko, suspenzija. HALMED-Agencija za lijekove i medicinske proizvode, <https://halmed.hr/upl/lijekovi/PIL/Maxitrol-kapi-PIL.pdf> Pristupljeno 30. kolovoza 2022.

Harmsen P, Huijgen W, Bermudez L, Bakker R (2010) Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. *Wageningen Food & Biobased Research*, Wageningen.

He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE (2007) Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* **73**,168–178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02023-06>

Heulin T, Berge O, Mavingui P, Gouzou L, Hebbar KP, Balandreau J (1994) *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with wheat rhizosphere in French soils. *Eur J Soil Biol* **30**, 35–42.

Himmel ME, Adney WS, Baker JO, Nieves RA, Thomas SR (1996) Cellulases structure, function and applications. U: Wyman CE (ured.) Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor and Francis, str. 143–161.

Holl FB, Chanway CP (1992) Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can J Microbiol* **38**, 303–308. <https://doi.org/10.1139/m92-050>

Holl FB, Chanway CP, Turkington R, Radley RA (1988) Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* **20**, 19–24. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90121-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90121-6)

Huang E, Yousef AE (2015) Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol Res* **181**, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.001>

Ikram S, Huang L, Zhang H, Wang J, Yin M (2017) Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. *J Food Sci* **82**, 2232–2242. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>

Isikgor FH, Becer CR (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym Chem* **6**, 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>

- Isorna P, Polaina J, Latorre-García L, Cañada FJ, González B, Sanz-Aparicio J (2007) Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa*  $\beta$ -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases. *J Mol Biol* **371**, 1204–1218. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.082>
- Ivančić-Šantek M, Miškulin E, Beluhan S, Šantek B (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem Ind* **65**, 25-38. <https://doi.org/10.15255/KUI.2014.032>
- Jeon YH, Chang SP, Hwang I, Kim YH (2003) Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. *J Microbiol Biotechnol* **13**, 881–891.
- Jeong H, Choi SK, Ryu CM, Park SH (2019) Chronicle of a soil bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a tiny guardian of plant and human health. *Front Microbiol* **10**, 467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00467>
- Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* **6**, 16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- Jung HK, Hong JH, Park SC, Park BK, Nam DH, Kim SD (2007) Production and physicochemical characterization of  $\beta$ -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biotechnol Bioprocess Eng* **12**, 713–719. <https://doi.org/10.1007/BF02931090>
- Kajimura Y, Kaneda M (1996) Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *J Antibiot* **49**, 129–135. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.129>
- Kassaye S, Pant KK, Jain S (2016) Synergistic effect of ionic liquid and dilute sulphuric acid in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Fuel Process Technol* **148**, 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.12.032>
- Khan MS, Gao J, Chen X, Zhang M, Yang F, Du Y, i sur. (2020) Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Paenibacillus polymyxa* SK1 from *Lilium lancifolium*. *Biomed Res Int* **2020**, 8650957. <https://doi.org/10.1155/2020/8650957>
- Khan Z, Kim SG, Jeon YH, Khan HU, Son SH, Kim YH (2008) A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses rootknot nematode. *Bioresour Technol* **99**, 3016–3023. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.031>

Kuijk SJA, Sonnenberg ASM, Baars JJP, Hendriks WH, Cone JW (2015) Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnol Adv* **33**, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014>

Kumar R, Wyman CE (2009) Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnol Bioeng* **103**, 252–267. <https://doi.org/10.1002/bit.22258>

Kwon YS, Lee DY, Rakwal R, Baek SB, Lee JH, Kwak YS, i sur. (2016) Proteomic analyses of the interaction between the plant-growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 and *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **16**, 122–135. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500196>

Lal S, Tabacchioni S (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J Microbiol* **49**, 2–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0008-y>

Lamsal K, Kim SW, Kim YS, Lee YS (2012) Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on pepper. *Mycobiology* **40**, 244–251. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.4.244>

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

Lee B, Farag MA, Park HB, Kloepper JW, Lee SH, Ryu CM (2012) Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One* **7**, e48744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048744>

Lee HJ, Lim WS, Lee JW (2013) Improvement of ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysates by the removal of inhibitors. *J Ind Eng Chem* **19**, 2010–2015. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jiec.2013.03.014>

Liu J, Luo J, Ye H, Zeng X (2012) Preparation, antioxidant and antitumor activities *in vitro* of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food Chem Toxicol* **50**, 767–772. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.016>

Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, Berhow MA, Kurtzman CP, Gorsich SW (2004) Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF

conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**, 345–352. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0148-3>

Lohans CT, Huang Z, Van Belkum MJ, Giroud M, Sit CS, Steels EM, i sur. (2012) Structural characterization of the highly cyclized lantibiotic paenicidin A via a partial desulfurization/reduction strategy. *J Am Chem Soc* **134**, 19540–19543. <https://doi.org/10.1021/ja3089229>

López MJ, Nichols NN, Dien BS, Moreno J, Bothast RJ (2004) Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 125–131. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1401-9>

Lorenci Woiciechowski A, Dalmas Neto CJ, de Souza Vandenberghe LP, de Carvalho Neto DP, Novak Sydney AC, Letti LAJ, i sur. (2020) Lignocellulosic biomass: acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. *Bioresour Technol* **304**, 122848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>

Lu F, Sun L, Lu Z, Bie X, Fang Y, Liu S (2007) Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. *Curr Microbiol* **54**, 435–439. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0591-7>

Macheiner D, Adamitsch BF, Karner F, Hampel WA (2003) Pretreatment and hydrolysis of brewer's spent grains. *Eng Life Sci* **3**, 401–405. <https://doi.org/10.1002/elsc.200301831>

Maes M, Baeyen S (2003) Experiences and perspectives for the use of a *Paenibacillus* strain as a plant protectant. *Commun Agric Appl Biol Sci* **68**, 457–462.

Mankar AR, Pandey A, Modak A, Pant KK (2021) Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresour Technol* **334**, 125235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>

Mardetko N, Novak M, Trontel A, Grubišić M, Galić M, 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>

Martin NI, Hu H, Moake MM, Churey JJ, Whittal R, Worobo RW, i sur. (2003) Isolation, structural characterization, and properties of mactacin (Polymyxin M), a cyclic peptide

antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. *J Biol Chem* **278**, 13124–13132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212364200>

Martinez A, Rodriguez ME, York SW, Preston JF, Ingram LO (2000) Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. *Biotechnol Prog* **16**, 637-641. <https://doi.org/10.1021/bp0000508>

Martins S, Mussatto SI, Martinez-Avila G, Montanez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA (2011) Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation: a review. *Biotechnol Adv* **29**, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>

Marwoto B, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (2002) Enhancement of (R,R)-2,3-butanediol production from xylose by *Paenibacillus polymyxa* at elevated temperatures. *Biotechnol Lett* **24**, 109–114. <https://doi.org/10.1023/A:1013894403987>

Marwoto B, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (2004) Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 112-119. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1435-z>

Matta H, Punj V (1998) Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. *Int J Food Microbiol* **42**, 139-145. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00061-0)

Mavingui P, Heulin T (1994) *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* **26**, 801–803. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90277-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90277-1)

McKendry P (2002) Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol* **83**, 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00118-3)

Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* **96**, 673-686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>

Mota TR, Oliveira DM, Rogério Marchiosi O, Ferrarese-Filho Santos WD (2018) Plant cell wall composition and enzymatic deconstruction. *Bioengineering* **5**, 63–77. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2018.1.63>

Mousa WK, Raizada MN (2015) Biodiversity of genes encoding anti-microbial traits within plant associated microbes. *Front Plant Sci* **6**, 231. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00231>

- Mussatto S, Dragone G, Roberto I (2006) Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J Cereal Sci* **43**, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Nakashimada Y, Kanai K, Nishio N (1998) Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnol Lett* **20**, 1133–1138. <https://doi.org/10.1023/A:1005324403186>
- Nakashimada Y, Mabwoto B, Kashiwamuba T, Kakizono T, Nishio N (2000) Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *J Biosci Bioeng* **90**, 661–664. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)90013-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)90013-6)
- Nielsen P, Sørensen J (1997) Multi-target and mediumindependent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecol* **22**, 183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00370.x>
- Okonkwo CC, Ujor V, Ezeji T (2018) Molecular inactivation of exopolysaccharide biosynthesis in *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 for enhanced 2,3-butanediol production. bioRxiv [Preprint]. <https://doi.org/10.1101/331843>
- Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S (2008) Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *J Biosci Bioeng* **106**, 128–133. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.128>
- Padda KP, Puri A, Chanway CP (2016) Effect of GFP tagging of *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R on its ability to promote growth of canola and tomato seedlings. *Biol Fertil Soils* **52**, 377–387. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1083-3>
- Padda KP, Puri A, Zeng Q, Chanway C P (2017) Effect of GFP-tagging on nitrogen fixation and plant growth promotion of an endophytic diazotrophic strain of *Paenibacillus polymyxa*. *Botany* **95**, 933–942. <https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0056>
- Pampulha ME, Loureiro-Dias MC (1989) Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**, 547–550. <https://doi.org/10.1007/BF00270792>
- Pan X, Gilkes N, Saddler JN (2006) Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforschung* **60**, 398–401. <https://doi.org/10.1515/HF.2006.062>

- Pham PL, Taillandier P, Delmas M, Strehaiano P (1998) Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. *Ind Crop Prod* **7**, 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00048-4](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00048-4)
- Phi QT, Park YM, Seul KJ, Ryu CM, Park SH, Kim JG, i sur. (2010) Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 1605–1613. <https://doi.org/10.4014/jmb.1007.07014>
- Pichard B, Thouvenot D (1999) Effect of *Bacillus polymyxa* seed treatments on control of black-rot and damping-off of cauliflower. *Seed Sci Technol* **27**, 455–465.
- Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM (1998) A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett Appl Microbiol* **27**, 9–13. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00374.x>
- Prado Acosta MP, Valdman E, Leite SGF, Battaglini F, Ruzal SM (2005) Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 1157–1163. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-0381-6>
- Puri A, Padda KP, Chanway CP (2016) Evidence of nitrogen fixation and growth promotion in canola (*Brassica napus* L.) by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R. *Biol Fertil Soils* **52**, 119–125. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1051-y>
- Quereshi S, Ahmad E, Pant KK, Dutta S (2020) Insights into microwave-assisted synthesis of 5-ethoxymethylfurfural and ethyl levulinate using tungsten disulfide as a catalyst. *ACS Sustain Chem Eng* **8**, 1721–1729. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03231>
- Ravi AV, Musthafa KS, Jegathambal G, Kathiresan K, Pandian SK (2007) Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Lett Appl Microbiol* **45**, 219–223. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02180.x>
- Raza W, Shen Q (2010) Growth, Fe<sup>3+</sup> reductase activity, and siderophore production by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 under differential iron conditions. *Curr Microbiol* **61**, 390–395. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9624-3>
- Raza W, Yang W, Shen QR (2008) *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. *J Plant Pathol* **90**, 419–430.



- Raza W, Yuan J, Ling N, Huang Q, Shen Q (2015) Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their anti-fungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol Control* **80**, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.004>
- Rezania S, Oryani B, Cho J, Talaiekhosani A, Sabbagh F, Hashemi B, i sur. (2020) Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: an overview. *Energy* **199**, 117457. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>
- Robertson JA, l'Anson KJA, Treimo J, Faulds CB, Brocklehurst TF, Eijsink VGH, i sur. (2010) Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *Lwt-Food Sci Technol* **43**, 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.019>
- Rosado AS, Seldin L (1993) Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. *World J Microbiol Biotechnol* **9**, 521–528. <https://doi.org/10.1007/BF00386287>
- Saxena N, Pore S, Arora P, Kapse N, Engineer A, Ranade DR, i sur. (2015) Cultivable bacterial flora of Indian oil reservoir: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *Biologia* **70**, 1–10. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0017>
- Seldin L, de Azevedo FS, Alviano DS, Alviano CS, de Freire Bastos MC (1999) Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* **28**, 423–427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00563.x>
- Seul KJ, Park SH, Ryu CM, Lee YH, Ghim SY (2007) Proteome analysis of *Paenibacillus polymyxa* E681 affected by barley. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 934–944.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* **2**, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Shoji J, Kato T, Hino I (1977a) The structure of polymyxin S1. Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXI. *J Antibiot* **30**, 1035–1041. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.1035>
- Shoji J, Kato T, Hino H (1977b) The structure of polymyxin T1. Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXII. *J Antibiot* **30**, 1042–1048. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.1042>

- Sindhu R, Binod P, Pandey A (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—an overview. *Bioresour Technol* **199**, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Son SH, Khan Z, Kim SG, Kim YH (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. *J Appl Microbiol* **107**, 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04238.x>
- Stansly PG, Schlosser M (1947) Studies on polymyxin: isolation and identification of *Bacillus polymyxa* and differentiation of polymyxin from certain known antibiotics. *J Bacteriol* **54**, 549-556.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour Technol* **199**, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Syu MJ (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 10–18. <https://doi.org/10.1007/s002530000486>
- Tambadou F, Caradec T, Gagez A-L, Bonnet A, Sopéna V, Bridiau N, i sur. (2015) Characterization of the colistin (polymyxin E1 and E2) biosynthetic gene cluster. *Arch Microbiol* **197**, 521–532. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1084-5>
- Tang DS, Yin GM, He YZ, Hu SQ, Li B, Li L, i sur. (2009) Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. *Biochem Eng J* **48**, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.019>
- Timmusk S, van West P, Gow NAR, Huffstutler RP (2009) *Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. *J Appl Microbiol* **106**, 1473–1481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04123.x>
- Ui S, Mesoda H, Moraki H (1983) Laboratory-scale production of 2,3-butanediol isomers (D(-), L(+), and meso) by bacterial fermentations. *J Ferment Technol* **61**, 253–259.
- Ullah K, Sharma VK, Dhingra S, Braccio G, Ahmad M, Sofia S (2015) Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. *Renew Sust Energ Rev* **51**, 682-698. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.044>
- van Loon LC (2007) Plant responses to plant growthpromoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* **119**, 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>

- Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Wang J, Thompson PE, Li J (2014) Teaching ‘old’ polymyxins new tricks: new-generation lipopeptides targeting gram-negative ‘superbugs’. *ACS Chem Biol* **9**, 1172–1177. <https://doi.org/10.1021/cb500080r>
- Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J (2010) Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *J Med Chem* **53**, 1898–1916. <https://doi.org/10.1021/jm900999h>
- Veluchamy C, Kalamdhad AS, Gilroyed BH (2018) Advanced pretreatment strategies for bioenergy production from biomass and biowaste. U: Hussain C (ured.) Handbook of Environmental Materials Management. Springer, Cham. str, 1-19. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3\\_45-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_45-1)
- von der Weid IA, Paiva E, Nóbrega A, van Elsas JD, Seldin L (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Res Microbiol* **151**, 369–381. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00160-1)
- Wakelin SA, Walter M, Jaspers M, Stewart A (2002) Biological control of *Aphanomyces euteiches* root-rot of pea with spore-forming bacteria. *Australas Plant Pathol* **31**, 401–407. <https://doi.org/10.1071/AP02051>
- Wang Y, Shi Y, Li B, Shan C, Ibrahim M, Jabeen A, i sur. (2012) Phosphate solubilization of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* from mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber plants. *Afr J Micro Res* **6**, 4567–4573. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.261>
- Wen Y, Wu X, Teng Y, Qian C, Zhan Z, Zhao Y, i sur. (2011) Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69. *Environ Microbiol* **13**, 2726–2737. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02542.x>
- Weselowski B, Nathoo N, Eastman AW, MacDonald J, Yuan ZC (2016) Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC Microbiol* **16**, 244. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0860-y>
- Xie J, Shi H, Du Z, Wang T, Liu X, Chen S (2016) Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Sci Rep* **6**, 21329. <https://doi.org/10.1038/srep21329>

Xie NZ, Chen XR, Wang QY, Chen D, Du QS, Zhou GP, i sur. (2017) Microbial routes to (2R,3R)-2,3-butanediol: recent advances and future prospects. *Curr Top Med Chem* **17**, 2433-2439. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170504101646>

Xiu ZL, Zeng AP (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 917-926. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1387-4>

Xu SJ, Kim BS (2014) Biocontrol of Fusarium crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Mycobiology* **42**, 158–166. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.2.158>

Yang J, Kharbanda PD, Mirza M (2004) Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* PKB1 for biocontrol of *pythium* disease of cucumber in a hydroponic system. *Acta Horti* **635**, 59–66. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.635.7>

Yang W (2019) Components of rhizospheric bacterial communities of barley and their potential for plant growth promotion and biocontrol of *Fusarium* wilt of watermelon. *Braz J Microbiol* **50**, 749–757. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00089-z>

Zeigler DR (2013) The family *Paenibacillaceae*. Strain catalog and reference. Bacillus Genetic Stock Center, Columbus str. 1–32.

Zeng Y, Zhao S, Yang S, Ding SY (2014) Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Curr Opin Biotechnol* **27**, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.008>

Zhou C, Guo J, Zhu L, Xiao X, Xie Y, Zhu J, i sur. (2016) *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 enhances plant iron absorption via improved root systems and activated iron acquisition mechanisms. *Plant Physiol Biochem* **105**, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.025>

Zhou K, Yamagishi M, Osaki M (2008) *Paenibacillus* BRF-1 has biocontrol ability against *Phialophora gregata* disease and promotes soybean growth. *Soil Sci Plant Nutr* **54**, 870–875. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2008.00308.x>

Zhou L, Zhang T, Tang S, Fu X, Yu S (2020) Pangenome analysis of *Paenibacillus polymyxa* strains reveals the mechanism of plant growth promotion and biocontrol. *Antonie Van Leeuwenhoek* **113**, 1539–1558. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01461-y>

Zoghlami A, Paës G (2019) Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. *Front Chem* **7**, 874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

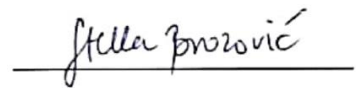
## 7. PRILOZI

**Prilog 1.** Standardi korišteni za UPLC analizu

<b>Tvar</b>	<b>RT (min)</b>	<b>Jednadžba kalibracijskog pravca</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
glukoza	4,766	$y = 143593x - 2189,5$	0,9998
ksiloza	5,134	$y = 126445x - 484,34$	0,9998
arabinoza	5,576	$y = 136417x - 7706,6$	0,9981
mliječna kiselina	6,709	$y = 70479x - 529,71$	0,9998
mravlja kiselina	7,055	$y = 47144x - 14705$	0,9924
octena kiselina	8,035	$y = 68165x - 2182,8$	0,9983
acetoin	9,524	$y = 86982x - 2336,7$	0,9986
2R,3R-butandiol	9,550	$y = 104502x + 6548,2$	0,9982
etanol	11,143	$y = 53836x - 15864$	0,9969

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (STELLA BROZOVIĆ) 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.

A handwritten signature in cursive script, reading "Stella Brozović", is written above a horizontal line.

Vlastoručni potpis