

# Utjecaj inhibitora na rast bakterije *Paenibacillus polymyxa*

---

Železnjak, Martina

Undergraduate thesis / Završni 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:159:933965>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-30**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Martina Železnjak**  
0058217573

**UTJECAJ INHIBITORA NA RAST BAKTERIJE**  
*Paenibacillus polymyxa* DSM 742

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina (šifra projekta: IP-2018-01-9717)

**Mentor:** dr. sc. Blanka Ljubas

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za BI, IM i TSP

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

**Utjecaj inhibitora na rast bakterije *Paenibacillus polymyxa***

**Martina Železnjak, 0058217573**

**Sažetak:** Butan-2,3-diol je važna sirovina u mnogim industrijama, a trenutno se najvećim dijelom proizvodi iz nafte. U ovom je radu ispitan utjecaj potencijalnih inhibitora prisutnih u lignoceluloznim sirovinama predobrađenim pomoću slabe kiseline za proizvodnju butan-2,3-diola pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Uzgoj s acetatom u podlozi pokazuje produktivnost jednaku kontroli ( $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) kad je dodan u koncentraciji od  $5 \text{ g L}^{-1}$ , dok u većim koncentracijama pokazuje inhibitorska svojstva. Dodatak acetoina na početku uzgoja ne podržava rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 ni u najmanjoj dodanoj koncentraciji od  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Vanilin se pokazao kao jak inhibitor već pri koncentraciji od  $2 \text{ g L}^{-1}$ , dok je uz  $1 \text{ g L}^{-1}$  produljena eksponencijalna faza, uz produktivnost proizvodnje butan-2,3-diola od  $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , slično kontrolnom uzgoju. Uzgoj s dodatkom furfurala u koncentraciji od  $1 \text{ g L}^{-1}$  pokazuje jednoličniju potrošnju glukoze, i 4 % veći prinos butan-2,3-diola u odnosu na kontrolu, dok veće koncentracije furfurala inhibiraju proizvodnju metabolita od interesa.

**Ključne riječi:** *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, butan-2,3-diol, inhibitori, lignoceluloza

**Rad sadrži:** 26 stranica, 12 slika, 10 tablica, 23 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** dr. sc. Blanka Ljubas

**Datum obrane:** 7. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

**Effect of inhibitors on the growth of bacterium *Paenibacillus polymyxa***

**Martina Železnjak, 0058217573**

**Abstract:** Butane-2,3-diol is important chemical substance in different industries which is mostly produced from crude oil. The impact of sodium acetate, acetoin, vanillin and furfural is inspected in this work as these chemicals are possibly inhibitors produced during the pre-treatment of lignocellulosic waste. Cultivation with acetate added in the media shows productivity equal to the control ( $0.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) when added in a concentration of  $5 \text{ g L}^{-1}$ , while higher concentrations show inhibitory properties. Acetoin addition does not support the growth of *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 at all, not even in the lowest added concentration of  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Vanillin is shown to be a strong inhibitor already at a concentration of  $2 \text{ g L}^{-1}$ , while  $1 \text{ g L}^{-1}$  prolonged the exponential phase, with the productivity of butane-2,3-diol production of  $0.17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , similar to the control. Cultivation with furfural concentration of  $1 \text{ g L}^{-1}$  shows a uniform consumption of glucose, and a 4 % higher yield of butane-2,3-diol compared to the control, while higher concentrations of furfural inhibit the production of metabolites of interest.

**Keywords:** *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, 2,3-butanediol, inhibitors, lignocellulose

**Thesis contains:** 26 pages, 12 figures, 10 tables, 23 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Blanka Ljubas, Ph.D.

**Thesis defended:** September 7th, 2022

## SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1 Butan-2,3-diol .....  | 2         |
| 2.2 Bakterija Paenibacillus polymyxa .....  | 4         |
| 2.3 Inhibitori rasta bakterije Paenibacillus polymyxa .....                                       | 5         |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....   | <b>7</b>  |
| 3.1 Materijali .....  | 7         |
| 3.1.1 Radni mikroorganizam.....   | 7         |
| 3.1.2 Kemikalije .....  | 7         |
| 3.1.3 Hranjive podloge.....   | 9         |
| 3.3 Analitičke metode .....   | 12        |
| 3.4 Određivanje parametara uspješnosti procesa.....   | 13        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>14</b> |
| 4.2 Rezultati uzgoja bakterije Paenibacillus polymyxa DSM 742 uz dodatak natrijevog acetata ..... | 16        |
| 4.3 Rezultati uzgoja bakterije Paenibacillus polymyxa DSM 742 uz dodatak acetoina.                | 19        |
| 4.4 Rezultati uzgoja bakterije Paenibacillus polymyxa DSM 742 uz dodatak vanilina                 | 20        |
| 4.5 Rezultati uzgoja bakterije Paenibacillus polymyxa DSM 742 uz dodatak furfurala                | 22        |

## 1. UVOD

U doba kad je naglasak na održivom razvoju, ponovnoj uporabi i zaštiti okoliša sve veći, te uz novonastalu lošu geopolitičku situaciju kod glavnih svjetskih producenata nafte i zemnog plina, uporaba fosilnih goriva se pokušava svesti na minimum. U zadnjih nekoliko godina, istraživači razvijaju procese koji će zamijeniti stare i prljave, a da uz to implementiraju čim više saznanja o novim tehnologijama. Biotehnologija, kao grana budućnosti pruža tim znanstvenicima alate da naprave upravo to, s minimalnim utjecajem na okoliš.

Jedan od proizvoda koji se do danas proizvodi velikom većinom iz nafte je i butan-2,3-diol, proizvod koji je sastavni dio mnogih proizvoda na današnjem tržištu zbog čega je potražnja za istim velika. Jedna od najvećih primjena ovog spoja je proizvodnja metil-etil-ketona koji se koristi kao aditiv tekućem gorivu (Syu, 2001). Intenzivno se istražuje mogućnost njegove industrijske proizvodnje pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* koja je njegov poznati producent.

Bakterija *Paenibacillus polymyxa* je štapičasta bakterija s GRAS statusom koja proizvodi širok spektar sekundarnih metabolita koji varira od tvari iskoristivih za regulaciju rasta biljaka, hidrolitičkih enzima, antibiotika i drugih spojeva od iznimne iskoristivosti u industriji (Lal i Tabacchioni, 2009).

Mnogi se znanstvenici bave tom tematikom, a naglasak je posljednjih godina na uporabi otpadnih lignoceluloznih materijala kao sirovinama za uzgoj bakterije s ciljem povećanja održivosti i smanjenja troškova biotehnološkog procesa.

U lignocelulozne materijale ubrajamo razni otpad iz poljoprivrede te šumske industrije, a sastoji se većinom od polisaharida i lignina, kao što su npr. pivski trop, otpadne tave, kora različitog drveća itd. (Lorenzo i sur., 2002).

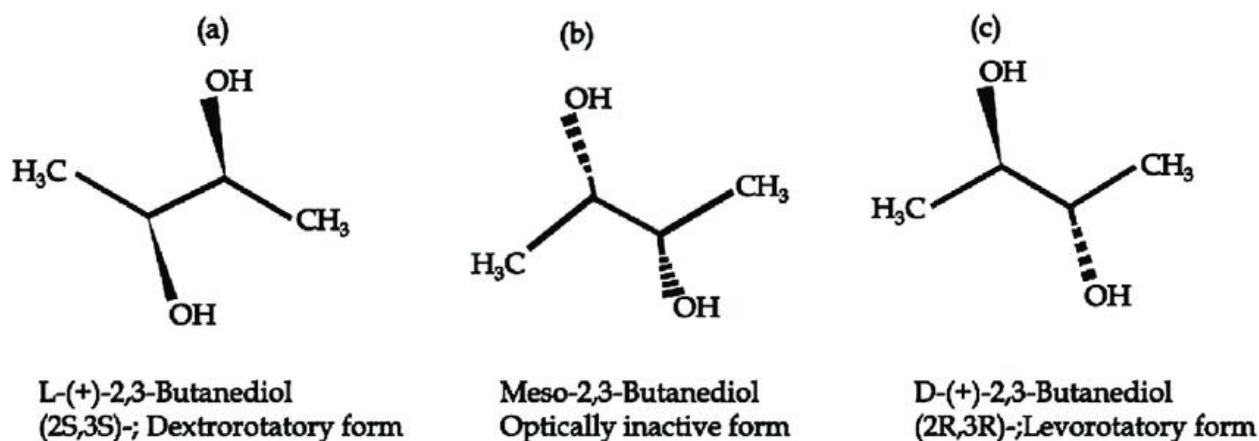
U ovom će radu biti prikazani rezultati eksperimenata provedenih s ciljem ispitivanja utjecaja raznih inhibitora koji se pojavljuju u kiselinskom hidrolizatu lignoceluloznih sirovina na rast soja i proizvodnju butan-2,3-diola.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Butan-2,3-diol

Butan-2,3-diol (u daljnjem tekstu 2,3-BD) je organski spoj koji spada u sekundarne alkohole, točnije glikole. Sadrži 4 ugljikova atoma, pri čemu se na drugom i trećem ugljiku nalazi hidroksilna skupina. Zbog dvaju kiralnih centara u svojoj strukturi, pojavljuje se u 3 izomerna oblika: meso-R,S-izomer, dextro-2,3-butandiol i levo-2,3-butandiol, prikazana na slici 1.



**Slika 1.** Stereoizomeri butan-2,3-diola (Hakizimana i sur., 2019)

Pojavljuje se u tekućem ili kristaličnom obliku, bez boje je i mirisa, slatkastog okusa. Higroskopan je, miješa se s vodom, a topljiv je u organskim otapalima kao što su alkoholi i eteri. Temperatura taljenja varira od 16,3 do 25 °C, dok je temperatura vrelišta na 182 °C (NCBI, 2022b). Levo izomer ima nisko ledište na -60°C što ga čini odličnom komponentnom antifrizom. Kemijski se 2,3-BD sintetizira iz nafte, zbog čega se naglasak u današnje doba stavlja na razvijanje biotehnološke proizvodnje koja će pružiti industriji zeleniju proizvodnju.

Istraživanja pokazuju da se mnogi mikroorganizmi poput *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Paenibacillus polymyxa* koriste za proizvodnju 2,3-BD (Hakizimana i sur., 2019). Ti se mikroorganizmi redovito podvrgavaju postupcima genetičkog inženjerstva kako bi se poboljšao prinos 2,3-BD, ali i proširila paleta supstrata koje oni mogu asimilirati za rast i proizvodnju metabolita. Tako se kao supstrati osim čistih izvora glukoze, dušika i ostalog koriste i kompleksni, jeftiniji izvori poput biljne biomase i poljoprivrednog i industrijskog otpada.

U svim spomenutim mikroorganizmima se 2,3-BD sintetizira pomoću takozvanog „mixed-acid“ fermentacijskog puta, u kojem osim tog spoja nastaju i druge organske kiseline i etanol. Malo je poznato o metaboličkoj ulozi proizvodnje 2,3-BD-a, no pretpostavlja se da njegova proizvodnja ima ulogu u regulaciji NADH/NAD<sup>+</sup> u stanici te pohrani ugljika za rast mikrobne stanice (Hakizimana i sur., 2019).

Najveća koncentracija 2,3-BD je postignuta pomoću *Klebsiella pneumonia*, kad je iznosila 150 g L<sup>-1</sup>, no industrijska primjena je omogućena samo koristeći bakterije koje imaju GRAS status. (Ma i sur., 2009). Tu dolazimo do bakterije *Paenibacillus polymyxa* s kojom je najveći ostvareni prinos 111 g L<sup>-1</sup> u kompleksnom mediju koji sadrži kvasčev ekstrakt (Häbler i sur., 2012).

Za proizvodnju 2,3-BD-a pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* potrebna su 3 enzima:  $\alpha$ -acetolaktat sintaza,  $\alpha$ -acetolaktat dekarboksilaza i 2,3-BD dehidrogenaza (Ji i sur., 2011).

2,3-BD se proizvodi većinom u anaerobnim uvjetima, dok je pri visokim koncentracijama preferirana proizvodnja octene kiseline i acetoina.

Meso-2,3-BD ima primjenu u kozmetičkoj industriji jer produžuje rok trajanja proizvoda zbog svojih antibakterijskih svojstava, pa se koristi u dezinficijensima, kremama, losionima. 1,3-butandien koji se proizvodi dehidracijom 2,3-BD je prekursor za sintetičku gumu. (Ji i sur., 2011). 2,3-BD se koristi kao dodatak gorivu jer je njegova toplina izgaranja slična onima od tekućih goriva i iznosi 27,2 kJ/g. Zbog visokog oktanskog broja može poboljšati otpornost goriva kompresiji bez ulaženja u samo-zapaljenje što poboljšava performanse i očuvanje motora. (Harvey i sur., 2016) Također, 2,3-BD se može dehidrirati u acetoin i diacetil koji se koriste kao pojačivači okusa u mliječnim proizvodima, margarinima i kozmetici.

Koncentracija 2,3-BD varira od 8 do 10% u fermentacijskom mediju što znači da je znatan utrošak energije na downstream proces. Izvori nalažu kako trošak za pročišćavanje premašuje 50% ukupnih proizvodnih troškova, zbog čega je potrebno uložiti velike napore u optimizaciju procesa kako bi se povećala isplativost biotehnoške proizvodnje tog važnog spoja (Xie i sur., 2022).

## 2.2 Bakterija *Paenibacillus polymyxa*

*Paenibacillus polymyxa* je gram-pozitivna, neutrofilna, fakultativno anaerobna, sporulirajuća štapičasta bakterija s bičevima. Prema njemačkoj legislativi, spada pod rizičnu skupinu 1, što je karakterizira kao nepatogenu vrstu.

Taksonomski se svrstava u: *bacterium*, *tetrabakterium*, *firmicute*, *bacili*, *bacillali*, *Paenibacillaceae*, *Paenibacillus polymyxa*. Osim 2,3-BD, proizvodi acetoin, etanol i organske kiseline. Veličina genoma je 5 777 351 bp, dok je udio GC 45,5 % (Tinôco i sur., 2021).

Optimalni uvjeti za rast su 28 do 40 °C i pH 7, a samo neke vrste preferiraju alkalne uvjete.

Stanište ove bakterije je u rizosferi raznih poljoprivrednih kultura, u morskim sedimentima, šumskom drveću, utrobi insekata i ličinki (Daud i sur., 2019).

Sojevi iz roda *Paenibacillus* mogu asimilirati širok spektar pentoza i heksoza, ali i lignoceluloznih hidrolizata. Katabolizam heksoza se javlja preko glikolize, koristeći Embden-Meyerhof-Parnas metabolički put te uz „Bifid shunt“ (bifidna skretnica) kao alternativni put koji omogućuje fleksibilnu regulaciju zahtjeva energije i redoksa, ovisno u metaboličkom stanju mikroorganizma. Katabolizam pentoza pak se odvija kombinacijom pentoza-fosfatnog puta i glikolize (Tinôco i sur., 2021).

Sojevi iz roda *Paenibacillus* imaju potencijal povećati produktivnost poljoprivredne proizvodnje, uključujući povećanje težine usjeva i rast korijena (Liu i sur., 2019). *P. polymyxa* se smatra bakterijom koja promovira rast biljke na način da potpomaže fiksiranje dušika iz atmosfere, povećava topivost fosfora i dostupnost željeza u tlu te poboljšava stvaranje fitohormona. Zbog tih značajki može se koristiti kao zamjena za kemijski sintetizirana gnojiva (Daud i sur., 2019.). Unatoč tome, uporaba ove bakterije kao dio bio-gnojiva trenutno je limitirana jer se performanse ove bakterije mogu srozati zbog utjecaja okolišnih uvjeta poput pH tla, saliniteta, udjela vlage i temperature (Grady i sur., 2016).

Promoviranje rasta biljke nije dosad primarno povezano s mogućnosti fiksiranja dušika, već sa sintezom spojeva koji promoviraju rast. Tako se za spoj koji ima aktivnost sličnu indol-3-octennoj kiselini pretpostavlja da stimulira rast pšenice, dok spojevi iso-pentenyl adenin i nepoznati citokinin koje otpušta u stacionarnoj fazi rasta doprinose germinaciji sjemenja, de novo formaciji pupoljaka itd. (Lal i Tabacchioni, 2009).

Nekoliko sojeva ove bakterije proizvodi enzime koji razaraju stanične stijenke (glukanaze, celulaze, hitinaze, proteaze...), zbog čega svoju primjenu pronalazi u proizvodnji spojeva

vezanih uz prehrambenu industriju, obradu kože, kemijsku sintezu, gospodarenje otpadom. Također, neki proizvodi njenog metabolizma koriste se u medicini, kao način liječenja tromboze, za povećanje imuniteta i s potencijalnim tumor-suprimirajućim svojstvima (Langendries i Goormachtig, 2021).

Osim što se *P. polymyxa* koristi kao promotor rasta i proizvođač industriji korisnih spojeva, ima svoju ulogu i kao antimikrobni agens, zbog svoje antagonističke aktivnosti prema gljivicama i drugim bakterijama. Primjerice, soj P13 proizvodi i izlučuje polyxin koji inhibira rast *Lactobacillus* sojeva te ima bakteriocinska svojstva kao što su osjetljivost na proteaze, otpornost na organska otapala i kelatore i drugo (Lal i Tabacchioni, 2009).

Bakterije roda *Paenibacillus* znani su proizvođači i EPS-a (egzopolisaharida) raznih struktura poput levana i kurdiana (Liyaskina i sur., 2021).

U ovom istraživanju je fokus na svojstvo bakterije *P. polymyxa* da proizvodi industrijski važan butan-2,3-diol. *Paenibacillus* proizvodi levo izomer butan-2,3-diola visoke čistoće, s malim udjelom meso izomera. Glavni je predstavnik upravo *P. polymyxa*, čiji divlji tip proizvodi levo izomer s 98% čistoće, dok genetski promijenjeni sojevi dosežu čistoću od 99,99% (Tinôco i sur., 2021). Jedan mol glukoze pretvara se u 2 mola piruvata koji se pretvara u 1 mol, 1 mol butan-2,3-diola i 2 mola NADH (Lal i Tabacchioni, 2009).

### **2.3 Inhibitori rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa***

Na rast bakterijske biomase utječu mnogi faktori, zbog čega je od izrazite važnosti da se konstruira medij te postave uvjeti uzgoja koji pružaju bakteriji povoljne uvjete za rast i proizvodnju metabolita.

S obzirom da je *Paenibacillus polymyxa* fakultativni anaerob, može rasti i u uvjetima intenzivne aeracije kao i u anaerobnim uvjetima. Intenzivna aeracija pospješuje rast bakterije, no proizvodnja butan-2,3-diola je inhibirana, također, selektivnost R,R-butan-2,3-diola se smanjuje s povećanjem dostupnog kisika prema Häbler i sur., 2012.

*Paenibacillus polymyxa* neutrofilna je bakterija, pa je tako njen optimum za rast između 6 i 8 pH jedinica, što ovisi o soju producentu i korištenom supstratu. Izvan tog područja, rast bakterije i proizvodnja metabolita su inhibirani.

Osim prije navedenih parametara uzgoja, valja istaknuti i inhibiciju produktom. Utvrđeno je da je 50 g L<sup>-1</sup> prag iznad kojeg je butan-2,3-diol toksičan za bakteriju. Taj se prag optimiziranjem medija povisuje na 68,5 g L<sup>-1</sup> (Okonkwo i sur., 2017).

### **2.3.1 Inhibitori dobiveni predobradom lignoceluloznih sirovina**

Lignocelulozne sirovine su materijali zaostali iz raznih industrija, ponajprije iz drvne i prehrambene. Smatraju se ogromnim potencijalom za proizvodnju biogoriva i proizvodnju kemikalija. Kao druga generacija supstrata čine ekološki prihvatljiviji izvor energije koji ne zahtjeva dodatno korištenje poljoprivrednih zemljišta. Lignocelulozne sirovine sastoje se od celuloze, hemiceluloza i lignina, koji zajedno tvore polimerni kompleks koji je prirodno otporan na enzimsku razgradnju, zbog čega je neophodna predobrada kako bi ih mikroorganizmi mogli koristiti kao izvor fermentabilnih šećera (Zoghلامي i Paës, 2019).

Tijekom predobrade nastaju spojevi koji su potencijalni inhibitori, kako za rast, tako i za proizvodnju metabolita od interesa. Nusprodukti predobrade variraju od slabih kiselina nastalih iz acetilnih skupina hemiceluloze do furana dobivenih degradacijom šećera. Tu je važno spomenuti spojeve koji spadaju u skupinu LDMICs- spojevi koji inhibiraju rast mikroorganizama nastali iz lignoceluloze. U njih ubrajamo fufuraldehide, vanilin i siringičnu kiselinu (Okonkwo i sur., 2021).

Furfural je heterociklički aldehid, derivat furana. U predtretmanu lignoceluloznih sirovina nastaje degradacijom pentoza i heksoza, uz 5-hidroksimetilfuran. Oba spoja, kao derivati furana inhibiraju glikolitičke i fermentativne enzime i oštećuju DNA zbog čega su toksični za stanicu (van der Maas i sur., 2021).

Jedan od inhibirajućih spojeva nastalih kao nusprodukt degradacije lignina tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina je i vanilin. Točan mehanizam inhibicijskog djelovanja derivata lignina još je nepoznat, no zabilježen je pad prinosa etanola od čak od 70 % kad je u fermentacijski medij za proizvodnju etanola dodano 1-2 g L<sup>-1</sup> vanilina (Kordala i sur., 2021).

Zbog neutralnog pH unutar stanice, slabe kiseline disociraju i spuštaju pH stanice. Jedno od mogućih objašnjenja za inhibitorni efekt slabih kiselina leži u tome da su i aktivni transport i ATPaze, dva mehanizma koja uklanjaju disocirane kiseline i protone, ovisni o ATP-u. Kad stanica počne slabije pumpati protone pri višim koncentracijama kiselina, smanjuje se količina ATP-a i proton motorna sila i počinje intracelularno zakiseljavanje što dovodi do snižene vijabilnosti stanica (van der Maas et al, 2021).

### **2.3.2 Ostali inhibitori rasta**

Acetoin je blijedo žuta ili bezbojna tekućina s karakterističnom aromom po maslacu. Osim što se upotrebljava u prehrambenom industriji kao aditiv, njegovi derivati mogu se upotrijebiti u

farmaceutskoj, kemijskoj i drugim industrijama. U prirodi on služi mikroorganizmima kao dio metabolizma ugljika gdje regulira omjer NADH/NAD<sup>+</sup> u stanici te se pohranjuje kao izvor ugljika. Metabolički put proizvodnje acetoina uključuje sintezu piruvata, transformaciju dva piruvata u  $\alpha$ -acetolaktat i ugljikov dioksid. Iz  $\alpha$ -acetolaktata zatim nastaje acetoin pomoću enzima acetolaktat dekarboksilaze. Jedan je od nus-produkata u proizvodnji butan-2,3-diola biotehnološkom proizvodnjom, jer se pomoću enzima 2,3-butandiol dehidrogenaze reducira u butan-2,3-diol (Tian i sur., 2016). Može biti toksičan i štetan za rast i razvoj jer oštećuje DNA i proteine svojom keto skupinom (Cesselin et al., 2021).

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### ***3.1 Materijali***

##### **3.1.1 Radni mikroorganizam**

Za uzgoj je korišten soj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pribavljen iz Leibniz instituta Njemačka zbirka mikroorganizama i staničnih kultura (DSMZ, Braunschweig, Njemačka). Kultura je održavana na čvrstoj hranjivoj podlozi.

##### **3.1.2 Kemikalije**

Kemikalije korištene u ovom radu navedene su u tablici 1.

**Tablica 1.** Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga

| Naziv kemikalije              | Čistoća                     | Proizvođač             |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Amonijev acetat               | ≥99 %                       | Merck KgaA, Njemačka   |
| Amonijev sulfat               | ≥99 %                       | Honeywell, SAD         |
| Bakrov sulfat pentahidrat     | ≥98 %                       | Merck KgaA, Njemačka   |
| Borna kiselina                | p.a.                        | Kemika, Hrvatska       |
| Dikalijev hidrogen fosfat     | ≥98 %                       | Kemika, Hrvatska       |
| Dinatrijev tartarat dihidrat  | p.a.                        | Kemika, Hrvatska       |
| Glukoza                       | ≥99 %                       | Sigma-Aldrich, SAD     |
| Kalijev dihidrogen fosfat     | ≥99 %                       | Kemika, Hrvatska       |
| Kobaltov klorid heksahidrat   | p.a.                        | Kemika, Hrvatska       |
| Kvaščevo ekstrakt             | Za uporabu u biotehnologiji | Liofilchem, Italija    |
| Magnezijev sulfat heptahidrat | ≥99 %                       | LACHNER d.o.o., Češka  |
| Manganov klorid dihidrat      | p.a.                        | Kemika, Hrvatska       |
| Mesni ekstrakt                | Za uporabu u biotehnologiji | Liofilchem, Italija    |
| Natrijev molbidat dihidrat    | p.a.                        | Kemika, Hrvatska       |
| Pepton                        | Za uporabu u biotehnologiji | Fischer Scientific, UK |
| Željezov sulfat heptahidrat   | p.a.                        | Kemika, Hrvatska       |

### 3.1.3 Hranjive podloge

Za pripremu inokuluma pripremljena je hranjiva podloga čiji je sastav naveden u tablici 2., dok je za kultivaciju bakterije pripremljena hranjiva podloga sastava navedenog u tablici 3. Glukoza je kao izvor ugljika pripremljena zasebno, sterilizirana i dodana u podlogu u koncentraciji od  $30 \text{ g L}^{-1}$ . Elementi u tragovima su pripremljeni prema popisu kemikalija u tablici 4. i dodani nakon sterilizacije filtriranjem u koncentraciji od  $3 \text{ ml L}^{-1}$ . Ovisno o uzgoju, u podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama dodane su određene koncentracije različitih inhibitora čiji pregled vidimo u tablici 5.

**Tablica 2.** Sastav podloge za propagaciju NA1

| NA1          |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| Kemikalija   | Koncentracija [ $\text{g L}^{-1}$ ] |
| Pepton       | 5                                   |
| Meat extract | 3                                   |
| Glukoza      | 1                                   |

**Tablica 3.** Sastav podloge za kultivaciju NA2

| NA2                           |                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Kemikalija                    | Koncentracija [ $\text{g L}^{-1}$ ] |
| Amonijev acetat               | 5                                   |
| Amonijev sulfat               | 3                                   |
| Dikalijev hidrogen fosfat     | 2,5                                 |
| Kalijev dihidrogen fosfat     | 3,5                                 |
| Kvašćev ekstrakt              | 5                                   |
| Magnezijev sulfat heptahidrat | 0,2                                 |



**Tablica 4.** Elementi u tragovima

| Elementi u tragovima         |                                    |
|------------------------------|------------------------------------|
| Kemikalija                   | Koncentracija [g L <sup>-1</sup> ] |
| Željezov sulfat heptahidrat  | 2,5                                |
| Dinatrijev tartarat dihidrat | 2,1                                |
| Manganov klorid dihidrat     | 1,8                                |
| Kobaltov klorid heksahidrat  | 0,075                              |
| Bakrov sulfat pentahidrat    | 0,031                              |
| Borna kiselina               | 0,258                              |
| Natrijev molbidat dihidrat   | 0,023                              |

**Tablica 5.** Koncentracije ispitivanih inhibitora u podlogama za uzgoj

| Inhibitor       | Koncentracija [g L <sup>-1</sup> ] |    |    |    |
|-----------------|------------------------------------|----|----|----|
|                 | 5                                  | 10 | 15 | 20 |
| Natrijev acetat | 5                                  | 10 | 15 | 20 |
| Acetoin         | 5                                  | 10 | 15 | 20 |
| Vanilin         | 1                                  | 2  | 3  | 4  |
| Furfural        | 1                                  | 2  | 3  | 4  |

### 3.1.4 Aparatura i pribor

#### 3.1.4.1 Spektrofotometar

Optička gustoća izuzetih uzoraka je određena pomoću spektrofotometra „Cary 100, UV-VIS” (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka), te su analizirani pomoću računalnog programa „SimpleReads”.

#### 3.1.4.2 Centrifuga

Za odvajanje supernatanta iz izuzetih uzoraka korištena je centrifuga tipa „SL 8R Thermoscientific“ (Waltham, Massachusetts, SAD), dok je za pripremu uzoraka za UPLC analizu korištena centrifuga tipa „Witeg CF-10“ (Njemačka).

#### 3.1.4.3 *Tresilica*

Za uzgoj u tikvicama pri uvjetima od 30 °C i 130 rpm korištena je termostatska „Instrumentaria ST-50“ (Zagreb, Hrvatska) i laboratorijska tresilica otvorenog tipa „Certomat RM 71“ B. Braun Biotech International (Njemačka).

#### 3.1.4.4 *Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)*

Za određivanje promjene koncentracije supstrata i proizvoda metabolizma nakon provedenog uzgoja korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD). On se sastoji od analitičke kolone (Rezex ROA- Organic Acid H+, Phenomenex, dimenzija 150×7,8 mm), detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID), pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), pećnice, predkolone i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS) i injektora (G7129B 1290 Vialsampler).

#### 3.1.4.5 *Ostali pribor*

Uz prije navedenu opremu, za provedbu eksperimentalnog dijela ovog rada korišteno je i:

- Stakleno i plastično laboratorijsko posuđe
- Autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija)
- Magnetna miješalica
- Analitička vaga „Shimadzu“, AX-200 W/O AC ECTA
- Tehnička vaga „Tehtnica“ ET-1211
- Zamrzivač za čuvanje uzoraka Gorenje

### **3.2 Metode rada**

#### 3.2.1 Priprema hranjivih podloga

Sve tekuće hranjive podloge pripremljene su otapanjem određene količine kemikalije, izračunate prema koncentraciji na volumen od 150 ml u demineraliziranoj vodi s kojom smo dopunili do tog volumena. Pripremljene su podloge i otopina glukoze sterilizirane u autoklavu na 121°C tijekom 20 minuta, nakon čega je u tikvice s podlogom dodana glukoza, elementi u tragovima te ispitivani inhibitori u odgovarajućim koncentracijama. Sastav podloga je opisan u Poglavlju 3.1.3.

### 3.2.2 Uzgoj bakterije

Bakterija je nacijejpljena s čvrstog agara najprije u 20 ml NA1 podloge te je inkubirana 24 h na tresilici pri brzini od 130 rpm i temperaturi od 30°C. 10 ml kulture prebačeno je u 100 ml NA1 podloge i ostavljeno još 24 h pri istim uvjetima. Erlenmeyerove tikvice sa 150 ml NA2 koje su sadržavale različite koncentracije ispitivanih inhibitora su nacijejpljene sa 7,5 ml inokuluma. Kultivacija se odvijala 40-60 sati (ovisno o uzgoju) uz izuzimanje uzoraka svakog sata, počevši s 24. satom. Svakom je uzorku određena optička gustoća pri 600 nm. Također, svaki je uzorak bio centrifugiran na 8000 rpm, 5 minuta pri 4 °C, nakon čega je a supernatant pripremljen za daljnju UPLC analizu.

## 3.3 *Analitičke metode*

### 3.3.1 Određivanje optičke gustoće na spektrofotometru

Uzorci su nakon izuzimanja vorteksirani te im je određena optička gustoća na 600 nm na spektrofotometru „Cary 100, UV/VIS“. Mjerenje je provedeno s nultim ili prvim razrjeđenjem, ovisno o potrebi uzorka.

### 3.3.2 Analiza uzoraka na UPLC-u

Uzorak supernatanta je razrijeđen sa ZnSO<sub>4</sub> u omjeru 1:1, dok su uzorci s koncentracijom od 15 g L<sup>-1</sup> inhibitora ili više bili dodatno razrijeđeni sa vodom, također u omjeru 1:1. Razrijeđeni su uzorci potom centrifugirani na 13000 rpm 5 minuta na centrifugi tipa „Witeg CF-10“ (Njemačka). Dobiveni supernatant je zatim profiltriran kroz 0.2 µm filter u vijalicu za UPLC. Korištena je kolona Rezex ROA- Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex dimenzija 150x7,8 mm. Korištena je mobilna faza 0,0025 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> uz protok od 9,6 ml min<sup>-1</sup> i temperaturu kolone 60 °C. UPLC analizom određene su koncentracije glukoze, mliječne kiseline, octene kiseline, acetoina, butan-2,3-diola te etanola.

### 3.4 Određivanje parametara uspješnosti procesa

Uspješnost procesa uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* opisujemo sljedećim parametrima:

- Postotak utroška izvora ugljika – glukoze ( $\Delta S[\%]$ )

$$\Delta S[\%] = \left(1 - \frac{S}{S_0}\right) * 100\%$$

$S_0$  – Koncentracija supstrata na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$S$  – Koncentracija supstrata u trenutku mjerenja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

- Prinos 2,3-butandiola ( $Y_{2,3-butandiol}$ , [ $\text{g L}^{-1}$ ])

$$Y_{2,3-butandiol} = P_{2,3-BD} - P_{0,2,3-BD}$$

$P_{0,2,3-BD}$  – Koncentracija 2,3-butandiola na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$P_{2,3-BD}$  – Koncentracija 2,3-butandiola na kraju uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

- Prinos etanola ( $Y_{ETOH}$ , [ $\text{g L}^{-1}$ ])

$$Y_{ETOH} = P_{ETOH} - P_{0, ETOH}$$

$P_{0,ETOH}$  – Koncentracija etanola na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$P_{ETOH}$  – Koncentracija etanola na kraju uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

- Prinos mliječne kiseline ( $Y_{MK}$ , [ $\text{g L}^{-1}$ ])

$$Y_{MK} = P_{MK} - P_{0, MK}$$

$P_{0,MK}$  – Koncentracija mliječne kiseline na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$P_{MK}$  – Koncentracija mliječne kiseline na kraju uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

- Produktivnost proizvodnje 2,3-butandiola ( $Pr_{2,3-butandiol}$ , [ $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ])

$$Pr_{2,3-butandiol} = \frac{Y_{2,3-butandiol}}{t_u}$$

$t_u$  – Ukupno vrijeme trajanja uzgoja [h]

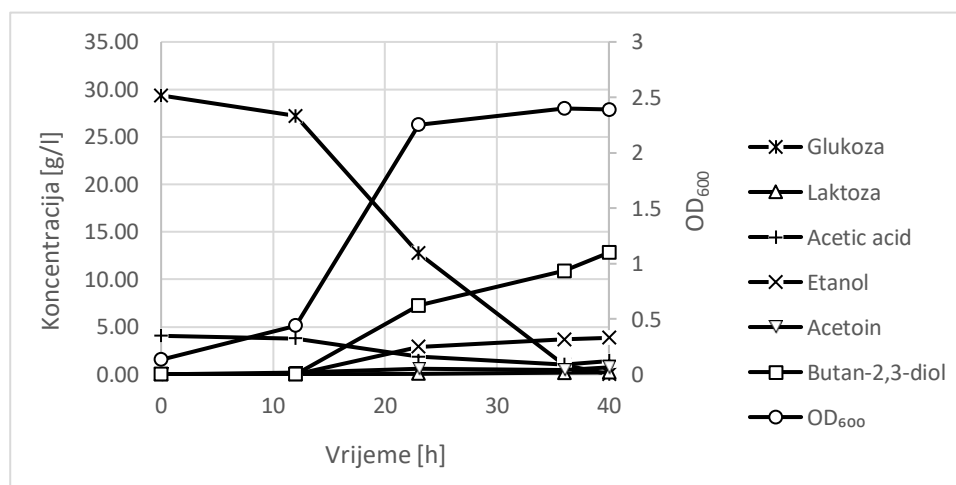
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U skladu s ciljem rada, određivanjem utjecaja inhibitora na rast bakterije *Paenibacillus polymyxa*, provedena su 4 uzgoja. U prvom je uzgoju ispitivan utjecaj acetata te je on dodan kao natrijev acetat u koncentraciji od 5, 10, 15 i 20 g L<sup>-1</sup>, a rezultati su prikazani u poglavlju 4.2. Drugi je uzgoj bio proveden s dodatkom acetoina, također u koncentracijama od 5, 10, 15 i 20 g L<sup>-1</sup> podloge, a rezultati su navedeni u poglavlju 4.3. Treći je uzgoj proveden s koncentracijama od 1, 2, 3 i 4 g L<sup>-1</sup> vanilina, a četvrti s istim koncentracijama furfurala. Rezultati trećeg uzgoja su u poglavlju 4.4, četvrtog u poglavlju 4.5.

Svi su uzgoji provedeni u Erlenmeyerovim tikvicama u tekućim podlogama prethodno navedenog sastava pri 30 °C i 130 rpm.

##### 4.1 Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 743 bez dodatka inhibitora rasta

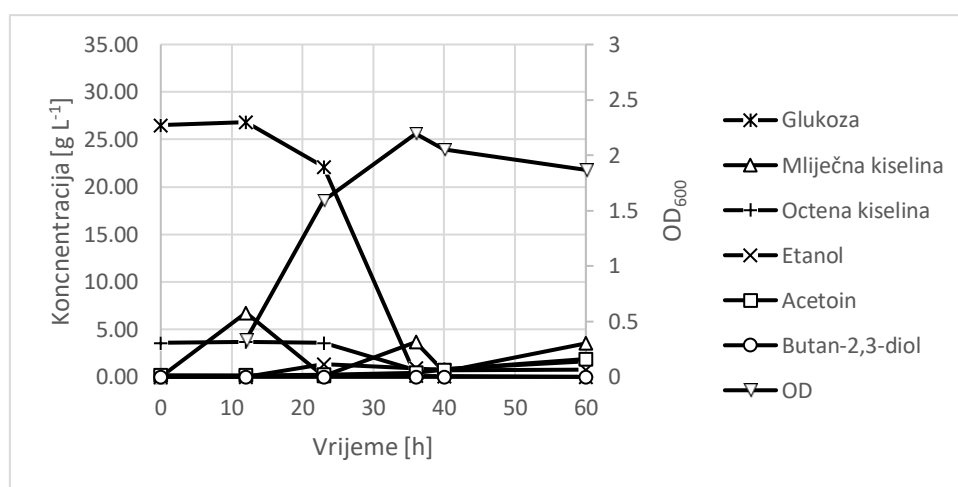
Uz svaki uzgoj s inhibitorom, proveden je i uzgoj bez inhibitora kao kontrola. Kontrolni uzgoj je proveden na podlozi NA2 sastava opisanog u poglavlju Materijali i metode 3.1.3., kako bi se eliminirao utjecaj grešaka u radu, starosti bakterije, proizvodnje inokuluma i sličnih faktora u tumačenju rezultata kultivacije. Na slici 2 prikazan je dijagram rasta kontrole 1 iz kojeg iščitavamo da je lag faza trajala 12h, nakon čega slijedi eksponencijalna u trajanju od 10h (do 22.h), a poslije koje nastupa stacionarna faza. Što se tiče proizvodnje metabolita, koncentracija acetoina je u kontrolnom uzgoju najviše porasla u eksponencijalnoj fazi, kao i koncentracija butan-2,3-diola. Ukupno je na kraju kultivacije proizvedeno 0,7 g L<sup>-1</sup> acetoina i 12,8 g L<sup>-1</sup> butan-2,3-diola. Od drugih metabolita bilježimo na kraju uzgoja prinos mliječne kiseline od 0,2 g L<sup>-1</sup> te prinos etanola od 3,8 g L<sup>-1</sup>, dok koncentracija octene kiseline pada s početnih 4 na 1,4 g L<sup>-1</sup>.



Slika 2. Promjena koncentracije supstrata/produkata i OD<sub>600</sub>-a za kontrolni uzgoj, kontrola 1

Sličan je dijagram rasta i za drugu paralelu u kojoj također bilježimo vrlo slične pokazatelje uspješnosti (tablica 6.)

Iako su svi uzgoji provedeni pod identičnim uvjetima, već su i u kontrolnim uzorcima zamijećena odstupanja zbog čega je potrebna pažljiva obrada dobivenih rezultata. Naime, u paraleli 2, uzorku koji je bio praćen kroz 60h, eksponencijalna faza traje sve do 36. sata uzgoja čime se njezino trajanje produljuje s 10 na 24h, no uz manji prinos biomase. S obzirom da je kontrola 1 rađena paralelno uz uzgoj s natrijevim acetatom i acetoinom, a kontrola 2 usporedno s uzgojima s vanilinom i furfuralom, rezultati će se uspoređivati s kontrolom provedenom u isto vrijeme.



Slika 3. Promjena koncentracije supstrata/produkata i OD<sub>600</sub>-a za kontrolni uzgoj, kontrola 2

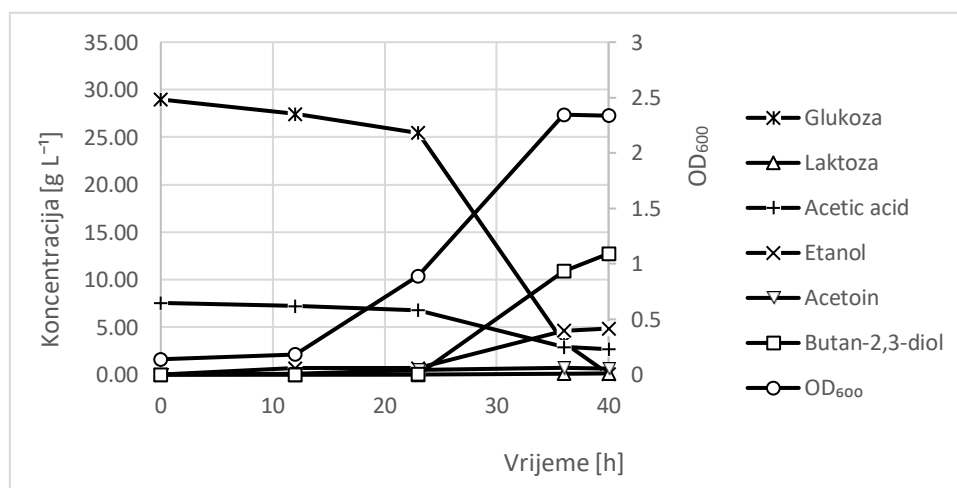
Tablica 6. Pokazatelji uspješnosti procesa za kontrole

| Kontrola broj   | 1    | 2    |
|---|------|------|
| $\Delta S$ [%]  | 100  | 100  |
| $Y_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                  | 12,8 | 8,61 |
| $Y_{EtOH}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                           | 3,8  | 0,73 |
| $Y_{MK}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                             | 0,2  | 3,55 |
| $Pr_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | 0,32 | 0,14 |

#### 4.2 Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz dodatak natrijevog acetata

Natrijev acetat dodan je u podlogu prethodno opisanog sastava u koncentracijama od 5, 10, 15 i 20 g L<sup>-1</sup> s ciljem ispitivanja induktorskog učinka acetata u proizvodnji butan-2,3-diola kao što je opisano u prijašnjim radovima (Maddox, 1996., Rajković, 2021). Kultivacija bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na tresilici pri 130 rpm i 30°C praćena je kroz period od 40 h uz izuzimanje uzoraka i mjerenje optičke gustoće na 600 nm te određivanje koncentracije supstrata i produkata UPLC metodom.

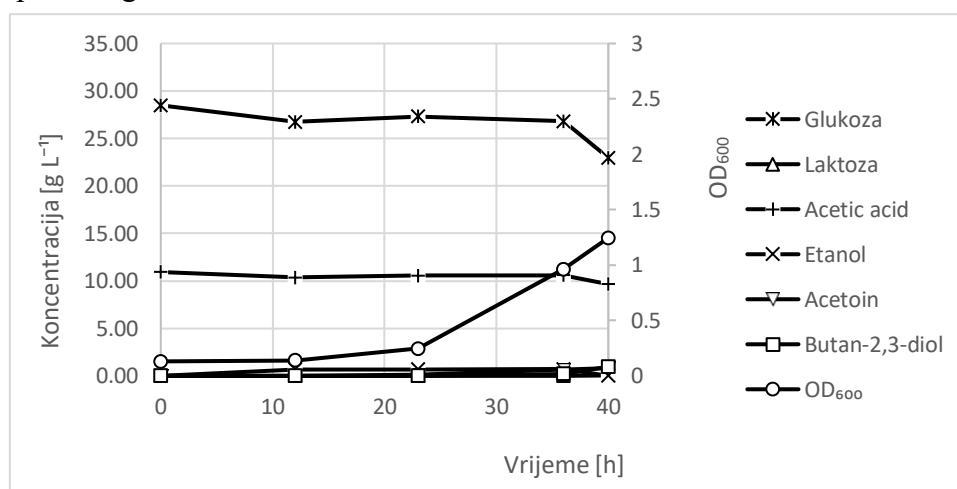
U odnosu na kontrolni uzgoj, kod kultivacije s 5 g L<sup>-1</sup> natrijevog acetata dodanog u hranjivu podlogu (Slika 4.) primjećujemo dužu lag fazu i posljedično, kasniji početak sinteze butan-2,3-diola. Unatoč duljem razdoblju privikavanja, utrošena je gotovo sva glukoza (99,81%), te je produktivnost (što se tiče proizvodnje butan-2,3-diola) gotovo jednaka onoj koja odgovara kontrolnom uzgoju i iznosi 0,32 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Drugi su proizvodi metabolizma bakterije *Paenibacillus polymyxa* također proizvedeni, no u odnosu na kontrolni uzgoj bilježimo 17 % manje acetoina i 21 % više etanola. S obzirom da je nakon 40 h koncentracija proizvedenog butan-2,3-diola vrlo slična onoj u kontrolnom uzorku, dodatak natrijevog acetata u koncentraciji od 5 g L<sup>-1</sup> nije isplativ jer se uz dodatne troškove potrebne za dodavanje natrijevog acetata dobije isti rezultat kao što se mogao postići bez dodatnih troškova.



**Slika 4.** Promjena koncentracija supstrata/produkata za uzgoj s 5 g L<sup>-1</sup> natrijevog acetata

Dodatak natrijevog acetata u većoj koncentraciji također nije pokazao bolje bioprocene parametre uzgoja.

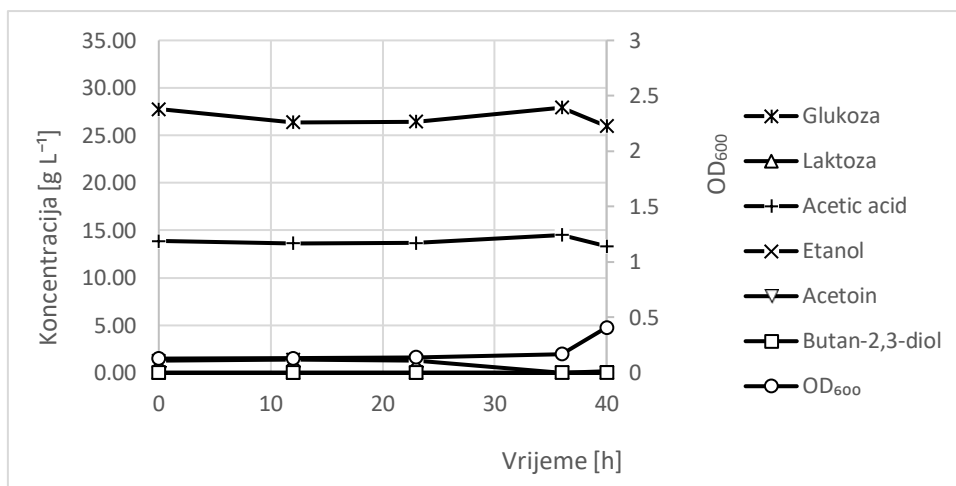
Uzgoj u podlozi s dodanih  $10\text{ g L}^{-1}$  natrijevog acetata pokazuje već značajno promijenjene vrijednosti u odnosu na kontrolu, što vidimo na slici 5. Eksponencijalna faza nastupa tek nakon 20 sati, što je 2 puta duže u odnosu na kontrolni uzgoj. Proizvodnja butan-2,3-diola zanemarivo mala – koncentracija na kraju uzgoja je ispod  $1\text{ g L}^{-1}$ . Neisplativost uzgoja pokazuje i podatak da je nakon 40h uzgoja utrošeno tek 20 % glukoze, a produktivnost procesa iznosi  $0,02\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ . Ukupna koncentracija acetoina na kraju uzgoja je 0,8 što je 25% više u odnosu na uzgoj s  $5\text{ g L}^{-1}$  natrijevog acetata te 9,4% više u odnosu na kontrolni uzgoj, dok su i etanol i mliječna kiselina ispod  $0,1\text{ g L}^{-1}$ .



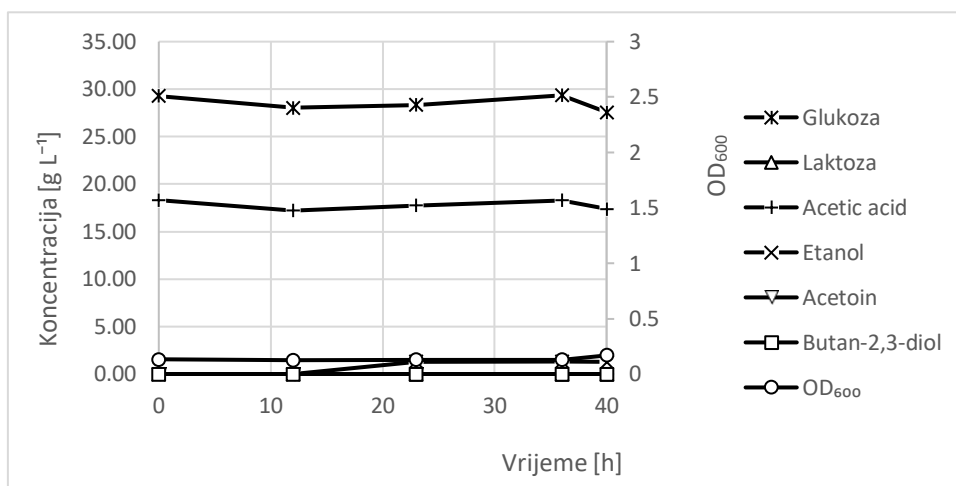
**Slika 5.** Promjena koncentracija supstrata/produkata za uzgoj s  $10\text{ g L}^{-1}$  natrijevog acetata

Dodatak natrijevog acetata u većoj koncentraciji pokazuje izražen inhibitorski utjecaj. Uzgoj s  $15\text{ g L}^{-1}$  natrijevog acetata u podlozi pokazuje potrošnju supstrata i porast biomase tek nakon 36 h, dok se za uzgoj s  $20\text{ g L}^{-1}$  natrijevog acetata porast bilježi tek između 38 i 40h, kao što se vidi na slikama 6 i 7. To je razdoblje predugo da bi imalo primjenu u industrijskim postupcima, stoga daljnji rezultati ovih uzgoja neće biti prikazivani u ovom radu.





**Slika 6.** Promjena koncentracija supstrata/produkata za uzgoj s 15 g L<sup>-1</sup> natrijevog acetata



**Slika 7.** Promjena koncentracija supstrata/produkata za uzgoj s 20 g L<sup>-1</sup> natrijevog acetata

**Tablica 7.** Pokazatelji rezultata za uzgoj uz dodatak natrijevog acetata

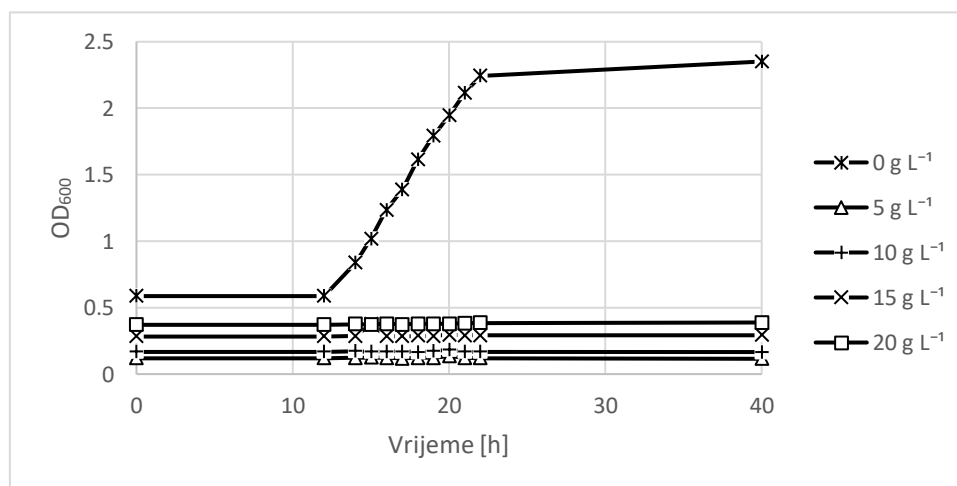
| Koncentracija dodanog NaAc [g L <sup>-1</sup> ]             | 5     | 10   | 15   | 20   |
|---|-------|------|------|------|
| $\Delta S$ [%]  | 99,81 | 19,4 | 6,42 | 5,85 |
| $Y_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                  | 12,73 | 0,97 | 0    | 0    |
| $Y_{EtOH}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                           | 4,84  | 0    | 0    | 1,27 |
| $Y_{MK}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                             | 0,12  | 0,05 | 0    | 0    |
| $Pr_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | 0,32  | 0,02 | 0    | 0    |

### 4.3 Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz dodatak acetoina

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz dodatak 5, 10, 15 i 20 g L<sup>-1</sup> na podlozi sastava opisanog u poglavlju 3.1.3 vodio se u anaerobnim uvjetima pri 30°C i 130 rpm, pri čemu se rast biomase pratio određivanjem OD<sub>600</sub>, a koncentracija supstrata i produkata pomoću UPLC metode. Ispitivanjem rasta bakterije s dodatkom acetoina utvrđeno je da ne dolazi do povećanog rasta bakterije niti proizvodnje produkata značajnih za industriju. Kao što je prikazano u dijagramu na slici 8., nije zabilježen porast biomase u 40 h koliko je praćen uzgoj, što znači da acetoin ni u koncentraciji od 5 g L<sup>-1</sup> ne podržava rast bakterije *Paenibacillus polymyxa*.

Na slici 8. se nalazi prikaz ovisnosti OD<sub>600</sub> uzoraka o vremenu koji pokazuje da nema prinosa bakterijske biomase, dok je na slici 9. prikazana promjena koncentracija supstrata/produkata za uzorak s 5g L<sup>-1</sup> acetoina u podlozi, gdje se vidi da nije došlo do proizvodnje spojeva od interesa.

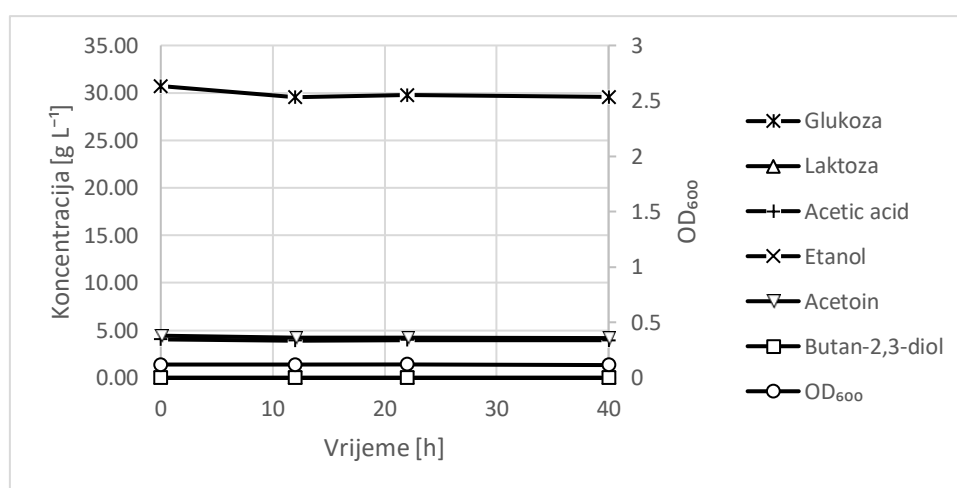
Toksičnost acetoina zabilježena je u prijašnjim radovima za druge bakterijske vrste. Konkretno, za *Lactococcus lactis* se spominje kao proizvod katabolizma s najjačim inhibicijskim efektom, koji se javlja kao posljedica mutacija DNA i inhibicije proteinske stabilnosti i aktivnosti (Cesselin i sur., 2021).



**Slika 8.** Prikaz ovisnosti OD<sub>600</sub> uzoraka o vremenu za uzgoj s 0, 5, 10, 15 i 20 g L<sup>-1</sup> acetoina

**Tablica 8.** Pokazatelji uspješnosti procesa za uzgoj s dodatkom acetoina

| Koncentracija dodanog acetoina [ $\text{g L}^{-1}$ ]              | 5    | 10   | 15   | 20   |
|---|------|------|------|------|
| $\Delta S[\%]$  | 0,04 | 0,07 | 5,39 | 6,62 |
| $Y_{2,3\text{-butandiol}}$ , [ $\text{g L}^{-1}$ ]                | 0    | 0    | 0    | 0    |
| $Y_{EtOH}$ , [ $\text{g L}^{-1}$ ]                                | 0    | 0    | 0    | 0    |
| $Y_{MK}$ , [ $\text{g L}^{-1}$ ]                                  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| $Pr_{2,3\text{-butandiol}}$ , [ $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] | 0    | 0    | 0    | 0    |

**Slika 9.** Promjena koncentracija supstrata/produkata za uzgoj s  $5 \text{ g L}^{-1}$  acetoina

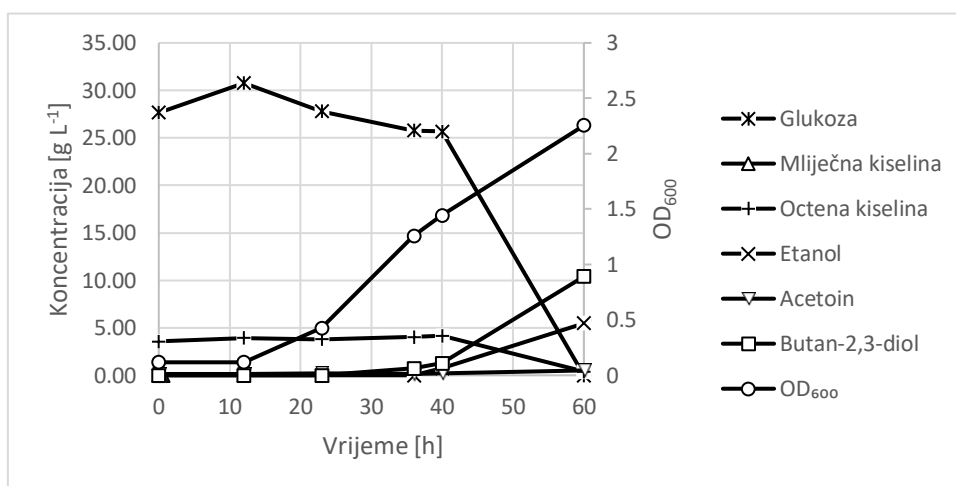
#### 4.4 Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz dodatak vanilina

Utjecaj vanilina na proizvodnju butan-2,3-diola pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* praćen je na način da se u tikvice s hranjivom podlogom dodalo 1, 2, 3 odnosno  $4 \text{ g L}^{-1}$  vanilina, a uzgoj je proveden u tikvicama na tresilici pri  $30^\circ\text{C}$  i 130 rpm. Kultivacija je praćena 60h, uz mjerenje optičke gustoće pri 600 nm s ciljem praćenja rasta biomase te uz UPLC analizu uzoraka, s ciljem praćenja promjene koncentracija supstrata i produkata.

Za uzorak s  $1 \text{ g L}^{-1}$  vanilina zapažena je produljena eksponencijalna faza koja traje od 12. do 60.h (slika 10.) što je duplo dulje trajanje u odnosu na kontrolni uzorak koji je praćen također 60 sati. Unatoč produljenoj eksponencijalnoj fazi,  $\text{OD}_{600}$  u 60. satu doseže istu vrijednost kao u kontroli, što odgovara i potrošnji glukoze koja na kraju uzgoja doseže 100%. Produktivnost proizvodnje butan-2,3-diola neznatno je veća u odnosu na kontrolu i iznosi  $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . U odnosu na kontrolu 2 u ovom uzorku bilježimo gotovo 70% manju koncentraciju mliječne kiseline, i 36% veći prinos etanola.

Pri većim koncentracijama dodanog vanilina inhibiran je rast bakterije, a s time i proizvodnja industriji zanimljivih spojeva, kao što je vidljivo u tablici 7., stoga ti uzgoji nisu detaljno obrađeni u ovom radu.

Dobiveni rezultati odgovaraju toksičnosti vanilina spomenutoj u uzgoju *Bacillus subtilis* za koju je već koncentracija od  $0,6 \text{ g L}^{-1}$  vanilina potpuno inhibirala rast. (van der Maas i sur., 2021). Okonowo i sur., 2021 spominju da vanilin, kao jedini izvor ugljika u koncentraciji od  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  *P. polymyxa* DSM 365 detoksificira, no bez povećanja optičke gustoće kao pokazatelja akumulacije stanične biomase.



**Slika 10.** Promjena koncentracije supstrata/produkata za uzgoj s  $1 \text{ g L}^{-1}$  vanilina

**Tablica 9.** Pokazatelji uspješnosti za uzgoj uz dodatak vanilina

| Koncentracija dodanog vanilina [g L <sup>-1</sup> ]         | 1    | 2    | 3    | 4   |
|---|------|------|------|-----|
| $\Delta S[\%]$  | 100  | 1,19 | 4,57 | 0   |
| $Y_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                  | 10,4 | 0    | 0    | 0,1 |
| $Y_{EtOH}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                           | 5,47 | 0    | 0    | 0   |
| $Y_{MK}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                             | 1,14 | 0    | 0    | 0,1 |
| $Pr_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | 0,17 | 0    | 0    | 0   |

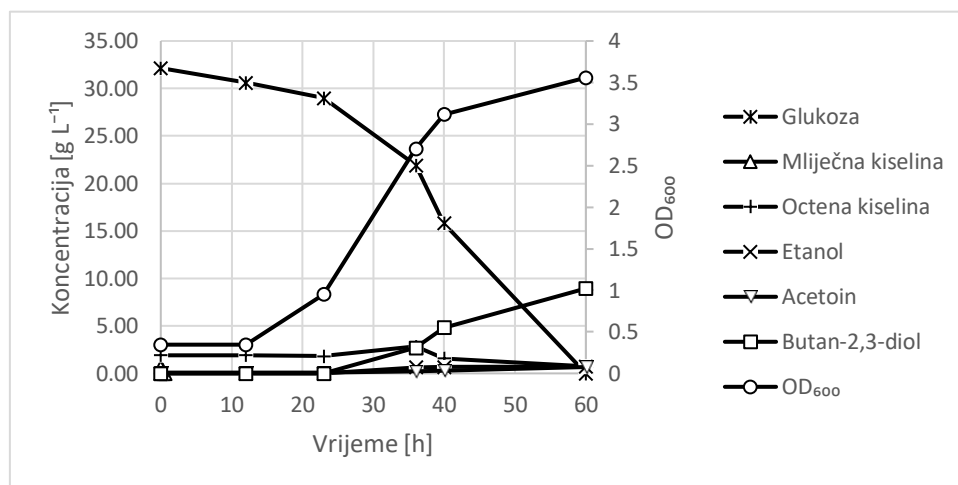
#### 4.5 Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uz dodatak furfurala

Furfural je također u tikvice za uzgoj dodan u koncentraciji od 1, 2, 3 i 4 g L<sup>-1</sup>, Uzgoj je proveden pri anaerobnim uvjetima, temperaturi od 30°C te 130 rpm, a praćen je 60h pri čemu su uzorci izuzeti svakog sata te im je određena optička gustoća pri 600 nm te je UPLC analizom utvrđena koncentracija supstrata i produkata.

U odnosu na kontrolu 2, u uzgoju s 1 g L<sup>-1</sup> furfurala, glukoza je također utrošena 100%, no tu vrijednost dostiže tek u 60.h uzgoja, dok je u kontroli utrošena već u 36.h uzgoja. To odgovara i OD<sub>600</sub> vrijednosti koja pokazuje rast bakterije od 12.h do kraja uzgoja s 1g L<sup>-1</sup> furfurala, dok u kontroli nakon završetka eksponencijalne faze OD<sub>600</sub> pada.

Prinos butan-2,3-diola je za 4 % veći u odnosu na kontrolu i iznosi 8,94 g L<sup>-1</sup> dok je prinos drugih metabolita zanemariv.

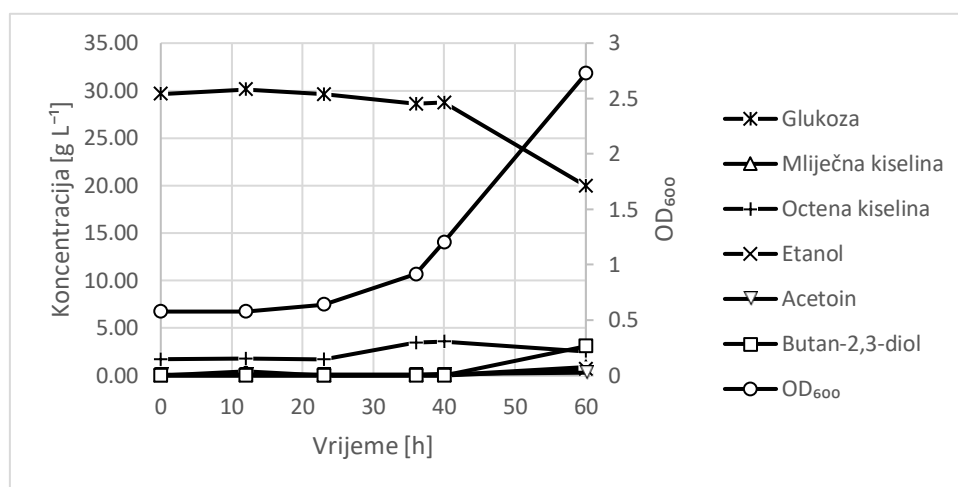
Ovaj rezultat pokazuje da za *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 furfural nije jednako toksičan kao za *Bacillus subtilis*, bakteriju za koju je lag faza pri istoj koncentraciji furfurala bila gotovo trostruko veća prema van der Maas i sur., 2021.



Slika 11. Promjena koncentracije supstrata/produkata za uzgoj s 1g L<sup>-1</sup> furfurala

U tikvici s 2 g L<sup>-1</sup> furfurala eksponencijalna faza počinje kasnije, tek oko 36. sata i traje do kraja praćenog razdoblja, vjerojatno i duže, kao što se može vidjeti na slici 12. Do tog vremena nisu proizvedene znatne količine spojeva od interesa – butan-2,3-diol na kraju uzgoja doseže tek koncentraciju od 3,08 g L<sup>-1</sup>, dok je drugih spojeva ispod 1 g L<sup>-1</sup> što je u odnosu na dugo vrijeme kultivacije zanemarivo malo. Rezultat se slaže s istraživanjem provedenim nad *P. polymyxa* DSM 365, u kojem se navodi da koncentracije furfurala od 0,5, 1 i 2 g L<sup>-1</sup> smanjuju OD<sub>600</sub> 7,6-, 3,9-, odnosno 4,4 puta u odnosu na kontrolu (Okonkwo i sur., 2021).

U tikvicama s 3, odnosno 4 g L<sup>-1</sup> nije utrošeno niti 10% dodane glukoze, pa posljedično nije došlo ni do rasta biomase niti do proizvodnje butan-2,3-diola, kao ni drugih struci zanimljivih spojeva, stoga ti uzorci nisu detaljnije prikazani u ovom radu.



**Slika 12.** Promjena koncentracije supstrata/produkata za uzgoj s 2g L<sup>-1</sup> furfurala

**Tablica 10.** Pokazatelji uspješnosti za uzgoj uz dodatak furfurala

| Koncentracija dodanog furfurala [g L <sup>-1</sup> ]        | 1   | 2    | 3   | 4   |
|---|-----|------|-----|-----|
| $\Delta S$ [%]  | 100 | 32,7 | 6,6 | 4,3 |
| $Y_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                  | 8,9 | 3,1  | 0   | 0   |
| $Y_{EtOH}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                           | 0,7 | 0,6  | 0   | 0   |
| $Y_{MK}$ , [g L <sup>-1</sup> ]                             | 1,3 | 0,9  | 0   | 0   |
| $Pr_{2,3-butandiol}$ , [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | 0,1 | 0,1  | 0   | 0   |

## 5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 može se zaključiti sljedeće:

1. Dodatak natrijevog acetata ne pospješuje rast bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 niti pospješuje proizvodnju 2,3-butandiola.
2. Bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 ne raste niti pokazuje metaboličku aktivnost kad je u podlogu dodan acetoin, što ga karakterizira kao jakog inhibitora.
3. Bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pokazuje neznatno veću produktivnost pri  $1 \text{ g L}^{-1}$  vanilina, dok veće koncentracije ovog spoja inhibiraju rast i proizvodnju metabolita.
4. Bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u kultivaciji s  $1 \text{ g L}^{-1}$  furfurala jednoličnije troši izvor ugljika, dok veće koncentracije furfurala produljuju lag fazu i odgađaju proizvodnju metabolita što rezultira smanjenom produktivnosti.

## 6. LITERATURA

- Cesselin, B., Henry, C., Gruss, A., Gloux, K., & Gaudu, P. (2021). Mechanisms of Acetoin Toxicity and Adaptive Responses in an Acetoin-Producing Species, *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(24). <https://doi.org/10.1128/AEM.01079-21>
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Hakizimana, O., Matabaro, E., & Lee, B. (2019). The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnology Reports*, 25, e00397. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00397>
- Harvey, B. G., Merriman, W. W., & Quintana, R. L. (2016). Renewable Gasoline, Solvents, and Fuel Additives from 2,3-Butanediol. *ChemSusChem*, 9(14), 1814–1819. <https://doi.org/10.1002/cssc.201600225>
- Häßler, T., Schieder, D., Pfaller, R., Faulstich, M., & Sieber, V. (2012). Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresource Technology*, 124, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.047>
- Ji, X.-J., Huang, H., & Ouyang, P.-K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.007>
- Kordala, N., Lewandowska, M., & Bednarski, W. (2021). Effect of the method for the elimination of inhibitors present in *Miscanthus giganteus* hydrolysates on ethanol production effectiveness. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01255-2>
- Lal, S., & Tabacchioni, S. (2009). Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: A minireview. *Indian Journal of Microbiology*, 49(1), 2–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0008-y>
- Langendries, S., & Goormachtig, S. (2021). <sc>*Paenibacillus polymyxa*</sc>, a Jack of all trades. *Environmental Microbiology*, 23(10), 5659–5669. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15450>
- Liu, X., Li, Q., Li, Y., Guan, G., & Chen, S. (2019). *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. *PeerJ*, 7, e7445. <https://doi.org/10.7717/peerj.7445>
- Liyaskina, E. v., Rakova, N. A., Kitykina, A. A., Rusyaeva, V. v., Toukach, P. v., Fomenkov, A., Vainauskas, S., Roberts, R. J., & Revin, V. v. (2021). Production and characterization of the exopolysaccharide from strain *Paenibacillus polymyxa* 2020. *PLOS ONE*, 16(7), e0253482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253482>
- Lorenzo, M., Moldes, D., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, A. (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged



- cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 82(2), 109–113.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00176-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00176-6)
- Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., Tang, H., & Xu, P. (2009). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 49–57.
- National Center for Biotechnology Information (2022a). PubChem Compound Summary for CID 517045, Sodium acetate. <  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-acetate>>Pristupljeno 10. kolovoza 2022
- National Center for Biotechnology Information-NCBI, PubChem (2022b) PubChem CompoundSummary for CID 262, 2,3-Butanediol.  
 <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_3-Butanediol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Butanediol)> Pristupljeno 10. kolovoza 2022
- Okonkwo, C. C., Ujor, V., & Ezeji, T. C. (2021). Production of 2,3-Butanediol from non-detoxified wheat straw hydrolysate: Impact of microbial inhibitors on *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Industrial Crops and Products*, 159.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113047>
- Rajković, A. (2021). Biotehnološka proizvodnja 2,3-butandiola s pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 (Diplomski rad). Preuzeto s  
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:240442>
- Syu, M.-J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s002530000486>
- Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X., & Chen, W. (2016). Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 41–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.11.005>
- Tinôco, D., Pateraki, C., Koutinas, A. A., & Freire, D. M. G. (2021). Bioprocess Development for 2,3-Butanediol Production by *Paenibacillus* Strains. *ChemBioEng Reviews*, 8(1), 44–62. <https://doi.org/10.1002/cben.202000022>
- van der Maas, L., Driessen, J. L. S. P., & Mussatto, S. I. (2021). Effects of inhibitory compounds present in lignocellulosic biomass hydrolysates on the growth of *Bacillus subtilis*. *Energies*, 14(24). <https://doi.org/10.3390/en14248419>
- Xie, S., Li, Z., Zhu, G., Song, W., & Yi, C. (2022). Cleaner production and downstream processing of bio-based 2,3-butanediol: A review. *Journal of Cleaner Production*, 343, 131033. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131033>
- Zoghlami, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7.  
<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

## **Izjava o izvornosti**

Ja   Martina Železnjak   izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis