

GRZEGORZ PRZYBYŁEK

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska
ul. Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn
e-mail: grzegorz.przybylek@uwm.edu.pl

Wykorzystanie odpadowej frakcji glicerynowej pochodzącej z produkcji biodiesla do biosyntezy polihydroksyalkanianów

Streszczenie — Scharakteryzowano stan badań w dziedzinie wytwarzania polimerów biodegradowalnych ze szczególnym uwzględnieniem syntezy polihydroksykwasów (PHA). Podkreślono istotne znaczenie możliwości wykorzystania do tego celu mieszanych populacji drobnoustrojów (osadu czynnego) zamiast czystych kultur mikroorganizmów, a to ze względu na spodziewane dzięki temu obniżenie kosztów procesu. W opisaney poniżej pracy do syntezy PHA zastosowano odpadową frakcję glicerynową powstałą podczas produkcji biodiesla. Celem badań było określenie wpływu różnych stężeń początkowych takiej frakcji na efektywność biosyntezy PHA przez mieszane populacje mikroorganizmów. Hodowlę prowadzono w warunkach beztlenowo-tlenowych. Maksymalne uzyskane stężenie biopolimeru wyniosło 45 % w przeliczeniu na suchą masę komórek bakteryjnych. Bakterie syntetyzowały głównie kopolimer kwasu 3-hydroksymasłowego (3HB) i 3-hydroksywalerianowego (3HV) z udziałem 3HV wynoszącym ok. 15 %. Porównano właściwości użytkowe tego kopolimeru i syntetycznych poliolefin.

Słowa kluczowe: biodiesel, biopolimery, mieszane kultury bakterii.

SYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANATES FROM WASTE GLYCEROL OBTAINED IN THE PRODUCTION OF BIODIESEL

Summary — The recent developments in the synthesis of biodegradable polymers especially polyhydroxyacids (PHA) have been reviewed. The advantages of the application, in this type of processes, of mixed microbial cultures (activated sludge) instead of pure cultures of bacteria in order to reduce production costs has also been emphasized. Studies on the synthesis of PHA from waste fractions of glycerol obtained in the production of biodiesel in the presence of mixed microbial cultures have been presented in this paper. The influence of the initial concentrations of such fractions on the efficiency of PHA biosynthesis by the mixed microbial cultures cultivated under anaerobic-aerobic conditions (Table 1, 2, Figs. 1, 2) was evaluated. The highest biopolymer concentration obtained in relation to the dry weight of the cell was 45 %. Copolymers of 3-hydroxybutyric (3HB) and 3-hydroxyvalerian (3HV) acid containing a 15 % of 3HV were the main products synthesized by the cultivated bacteria. The properties of the obtained copolymer were compared to those of synthetic polyolefins (Table 3).

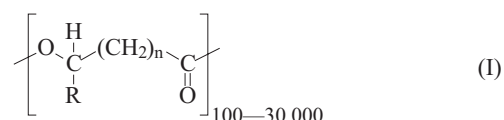
Keywords: biodiesel, biopolymers, mixed microbial cultures.

Wytwarzanie polimerów biodegradowalnych stanowi w ostatnich latach intensywnie rozwijany kierunek badawczy [1]. Wśród polimerów syntetyzowanych przez mikroorganizmy istotne znaczenie mają poliamidy, polisacharydy, a zwłaszcza polihydroksykwasy (PHA). Te ostatnie są to substancje zapasowe gromadzone wewnątrzkomórkowo w mikroorganizmach, gdy w hodowli występuje nadmiar związków organicznych w stosunku do azotu, fosforu bądź tlenu [2–4].

Pod względem chemicznym, polihydroksykwasy mają budowę poliesterów opartych na hydroksykwasach organicznych [wzór (I)]. Syntetyzowane przez mikroor-

ganizmy PHA mogą zawierać — w różnych rodzajach hodowli — od 100 do 30 000 merów w cząsteczce [5].

Dotychczas wykazano, że mikroorganizmy są zdolne do gromadzenia ponad 100 rodzajów polihydroksykwasów różniących się budową chemiczną. W zależności od



gdzie: R — atom H lub grupa alkilowa.

rodzaju składowych merów dzieli się je na trzy grupy, mianowicie złożone z merów krótkołańcuchowych C_3-C_5 (scl-PHA) (np. polihydroksymaślan), średniołańcuchowych C_6-C_{14} (mcl-PHA) (np. polihydroksyoktan) albo długołańcuchowych $>C_{14}$ (lcl-PHA) [6].

Tak uzyskiwany polimer 3-hydroksymaślanu i jego kopolimer z kwasem walerianowym wykazują właściwości termoplastyczne zbliżone do odpowiednich właściwości polimerów syntetycznych, np. polietylenu lub polipropylenu, jednakże dość łatwo ulegają biodegradacji i z tego względu mogą stanowić surowiec do produkcji opakowań, środków opatrunkowych bądź innych tego typu materiałów użytkowych. Mogą być również prasowane w różnych kształtach, np. nitek lub folii, co stwarza wielokierunkowe możliwości ich wykorzystania [7].

W rozwoju technologii biosyntezy polihydroksykwasów zarysowują się dwa kierunki badawcze. Pierwszy polega na zwiększeniu szybkości i wydajności uzyskiwanych polimerów z udziałem czystych kultur bakterii oraz szczepów rekombinowanych genetycznie a drugi – na wytwarzaniu polihydroksykwasów przez mieszane kultury mikroorganizmów. Możliwość hodowli z udziałem mieszanych populacji w otwartych reaktorach daje istotną przewagę nad hodowlą z udziałem czystych kultur, które wymagają zachowania wysokiego stopnia sterylności procesu i otoczenia reaktora. Ponadto, po ustaleniu warunków operacyjnych, hodowle cechuje znaczna stabilność i proces nie wymaga tak ścisłej kontroli, jak hodowle z udziałem czystych kultur bakterii [8].

W przypadku kultur mieszanych możliwe jest wykorzystanie tanich źródeł węgla, co prowadzi do obniżenia kosztów produkcji poliestrów hydroksykwasów alkanowych. Dotychczas badania prowadzono z wykorzystaniem serwatki [4, 9, 10], melasy [11–13], oleju palmowego [14, 15], a także odpadów rolno-spożywczych poddanych fermentacji metanowej [16]. Prace z wykorzystaniem odpadów z produkcji biodiesla realizowano głównie z udziałem czystych kultur [17–19] i do chwili obecnej dostępnych jest jedynie niewiele informacji dotyczących stosowania mieszanych populacji do tego celu [20].

Celem niniejszej pracy była ocena możliwości zużycowania odpadowej frakcji glicerynowej pochodzącej z produkcji paliwa biodieslowego jako substratu do wytwarzania polihydroksykwasów z udziałem mieszanych populacji mikroorganizmów, a także określenie wpływu różnych stężeń początkowych takiej frakcji na efektywność biosyntezy PHA.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura i materiał

Stanowisko badawcze stanowił reaktor z poli(metakrylanu metylu) (PMMA) o objętości czynnej 5 dm^3 , wyposażony w system napowietrzający i mieszadło. Jako

zaszczerpienie wykorzystano mieszane populacje mikroorganizmów pochodzące z oczyszczalni ścieków „Łyna” w Olsztynie, adaptowane do określonych warunków hodowli. Adaptację mikroorganizmów prowadzono do uzyskania ustalonych warunków, przyjmując jako kryterium stałe stężenie polihydroksykwasów w suchej masie komórek oraz stałą szybkość zużycia związków organicznych z pożywki. Średni czas adaptacji mikroorganizmów wynosił ok. 1 miesiąca.

Pożywka

Na początku każdego cyklu do reaktora dozowano porcjami o objętości $0,5 \text{ dm}^3$ pożywkę zawierającą (w g/dm^3): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 1,16$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,28$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,14$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} - 1,86$, $\text{CaCl}_2 - 0,33$, $\text{NH}_2\text{CSNH}_2 - 0,06$, $\text{NaHCO}_3 - 0,85$ oraz frakcją glicerynową jako źródło węgla. Frakcja ta składała się z gliceryny (ok. 50 %) oraz wolnych kwasów tłuszczowych, metanolu i niewielkich ilości estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Do pożywki dodawano roztwór mikroelementów ($3 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$) obejmujący (w g/dm^3): $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O} - 3$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,3$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O} - 0,3$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O} - 0,24$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} - 0,24$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O} - 0,06$. Przeprowadzono trzy serie badań różniące się ilością wprowadzanej frakcji glicerynowej, wynoszącą (w g/dm^3) 6,6, 13,2 lub 26,4, co odpowiadało początkowemu stężeniu ChZT (chemiczne zapotrzebowanie tlenu) w reaktorze ok. 600, 1200 bądź $2400 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$.

Warunki pracy reaktora

Cykl pracy reaktora trwał 24 h i składał się z 5 faz: napełniania (0,08 h), mieszania (warunki beztlenowe, 3 h), napowietrzania (warunki tlenowe, 20 h), sedymentacji (0,84 h) oraz spustu (0,08 h). Pod koniec fazy napowietrzania odbierano osad czynny ($0,25 \text{ dm}^3$), co umożliwiała zachowanie „wieku” osadu na poziomie dwudziestu dni, natomiast po fazie sedymentacji odbierano wodę nadosadową ($2,5 \text{ dm}^3$), w wyniku czego hydrauliczny czas zatrzymania pożywki w układzie wynosił 2 dni. Kolejny cykl rozpoczynano od dodania pożywki i uzupełnienia wodą destylowaną do końcowej objętości reaktora, czyli 5 dm^3 .

Metody analityczne

Podczas trwania doświadczenia w pożywce i cieczy pofermentacyjnej kontrolowano podstawowe parametry fizyczne i chemiczne, tj. stężenie azotu amonowego (wg PN-73/C-04567.02), stężenie związków organicznych (wartość ChZT wg PN-74/C-04578.03), zawartość lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) oraz suchej masy komórek (wg standardowych metod zgodnie z [21]). W każdej serii badań analizy powtarzano trzykrotnie.

Kiedy hodowla osiągała stan stabilny analizowano powyższe 4 parametry a także stężenie i rodzaj kumulo-

wanych przez mikroorganizmy polimerów w toku cyklu. Przyjmowano przy tym, że stan stabilny hodowli został osiągnięty wówczas, gdy co najmniej przez 7 kolejnych dni trwania eksperymentu wartości wymienionych czterech parametrów doświadczalnych na końcu cyklu były stałe.

Rodzaj i stężenie polihydroksykwasów kumulowanych przez mikroorganizmy określano metodą chromatografii gazowej. Próbkę do analizy chromatograficznej były przygotowywane zgodnie z metodyką opisaną w publikacji Braunegg i współpr. [22]. Mianowicie, polihydroksykwas w osadzie czynnym ekstrahowano chloroformem i przeprowadzano w estry metylowe 3-hydroksykwasów. W tym celu do szklanych, zakręcanych probówek o pojemności 10 cm³ pobierano biomasę z reaktora, oddzielano ją od wody osadowej na drodze odwirowywania (20 min, 4000 obr./min, 4 °C), wymrażano w temp. -80 °C oraz liofilizowano. Następnie do biomasy dodawano chloroform (2 cm³) oraz metanol zakwaszony kwasem siarkowym (3 % obj., 2 cm³) i poddawano estryfikacji w suszarce w temp. 100 °C przez 20 h. Po ostygnięciu do temperatury pokojowej, do probówek odmierzano po 1 cm³ wody destylowanej, na skutek czego mieszanina reakcyjna ulegała rozdzieleniu na dwie części: rozpuszczalną w wodzie i rozpuszczalną w rozpuszczalniku organicznym. Frakcję wodną odrzucano, a frakcję organiczną zawierającą produkty estryfikacji (estry metylowe hydroksykwasów) odwadniano dodając niewielką ilość bezwodnego Na₂SO₄, następnie sączono ją przez filtr z włókna szklanego (średnica porów 0,45 μm), a uzyskany przesącz poddawano analizie chromatograficznej.

Analizę chromatograficzną przesącza realizowano wg metodyki przedstawionej w pracy Furrer i współpr. [23]. Stężenie oraz rodzaj estrów metylowych 3-hydroksykwasów określano przy użyciu chromatografu gazowego (GC Varian CP-3800), wyposażonego w dozownik z podziałem strumienia gazu nośnego, kolumnę kapilarną VF-5ms (średnica wewnętrzna – 0,25 mm, długość – 30 m), zawierającą średniopólną fazę stacjonarną w postaci poli[(5 %)-difenilo-(95 %)-dimetylopolisiloksanu] o grubości 0,25 μm (Varian) oraz detektor płomienio-

wo-jonizacyjny (FID). Stosowano przy tym następujące warunki rozdzielania: objętość dozowanej próbki 1 μl, natężenie przepływu gazu nośnego (hel) 1 cm³/min, temperatura dozownika 250 °C, podział strumienia gazu nośnego 1:10, temperatura początkowa pieca kolumn 80 °C (1 min), przyrosty temperatury 10 °C/min do 120 °C i następnie 45 °C/min do 270 °C (3 min), temperatura detektora 300 °C. Jako wzorzec w oznaczaniach ilościowych posłużył kopolimer kwas poli(3-hydroksymasłowy-co-walerianowy) zawierający 12 % kwasu walerianowego (Sigma-Aldrich, USA). Stężenie estrów metylowych 3-hydroksykwasów oznaczano metodą kalibracji bezwzględnej (czyli z wzorcem zewnętrznym). Wzorzec przygotowywano i analizowano w identyczny sposób jak próbkę osadu czynnego, postępując zgodnie z opisaną powyżej metodyką.

Szybkość wytwarzania lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) określano jako stosunek stężenia LKT pod koniec trwania fazy beztlenowej do czasu trwania tejże fazy.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

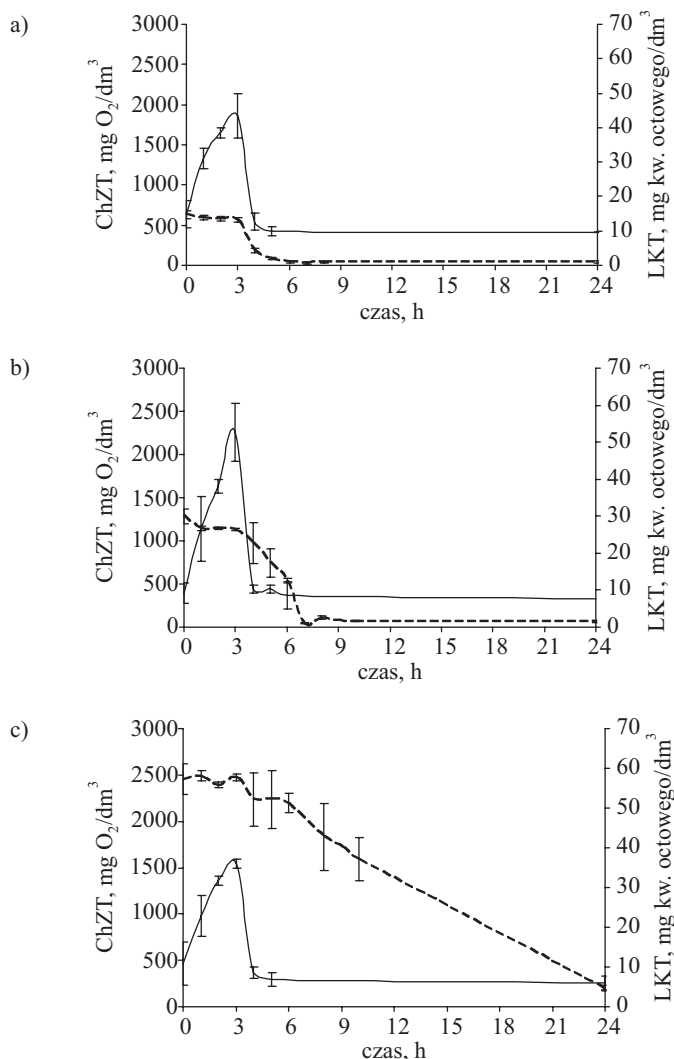
Poszczególne serie badanych próbek różniły się początkowym stężeniem frakcji glicerynowej. Rzeczywiste stężenie tej frakcji (wyrażone wartością ChZT) oraz wartości podstawowych parametrów – tj. stężeń amoniaku i azotu w kolejnych seriach wraz z odpowiednim odchyleniem standardowym – podano w tabeli 1.

Zwiększenie stężenia gliceryny w pożywce spowodowało wzrost obciążenia objętości reaktora ładunkiem organicznym, które w kolejnych seriach doświadczeń zmieniało się w przedziale 0,6–2,21 g ChZT/(dm³ · d). Na podstawie wyników badań stwierdziliśmy, że spadek wartości ChZT następował w fazie napowietrzania (po upływie trzeciej godziny cyklu). Czas, po którym wyczerpywał się substrat przedłużał się wraz ze wzrostem stężenia frakcji gliceryny w pożywce i wynosił 5 h w serii 1, 7 h w serii 2, natomiast w serii 3 wyniósł już 24 h (rys. 1). Rzeczywiste stężenie azotu amonowego na początku cyklu, tj. stężenie amoniaku w pożywce, oraz obciążenie objętości reaktora ładunkiem azotu amonowego było

T a b e l a 1. Stężenia związków organicznych (frakcji glicerynowej) oraz amoniaku i azotu w pożywce w seriach 1–3 (w nawiasach odchylenie standardowe, *n* = 3)

T a b l e 1. Concentration of organic matter (glycerol phase) and ammonium and nitrogen in the medium obtained in series 1 to 3 (standard deviation in brackets, *n*=3)

Parametr	Jednostka	Wartość		
		seria 1	seria 2	seria 3
Stężenie frakcji glicerynowej w pożywce	mg ChZT/dm ³	6 106 ± 418	13 224 ± 1694	22 078 ± 2764
Obciążenie objętości reaktora ładunkiem organicznym	g ChZT/(dm ³ · d)	0,61	1,32	2,21
Stężenie amoniaku w pożywce	mg N-NH ₄ /dm ³	221,2 ± 6,3	218,9 ± 7,6	220,4 ± 14,2
Stężenie azotu wg Kjeldahla w pożywce	mg N _{Kj} /dm ³	267,4 ± 6,5	270,9 ± 10,5	293,3 ± 41,4
Obciążenie objętości reaktora ładunkiem azotu amonowego	mg N-NH ₄ /(dm ³ · d)	44,2	43,8	44,1
Stosunek ChZT do ilości azotu w pożywce	mg ChZT/mg N	22,8	48,8	75,3



Rys. 1. Profile stężeń ChZT (---) i lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) (—) w toku cyklu w przypadku początkowej zawartości frakcji glicerynowej równej $600 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ (a), $1200 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ (b) lub $2400 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ (c) (słupki odpowiadają odchyleniu standardowemu, $n = 3$)

Fig. 1. Profiles of ChZT (---) and LKT (—) concentration during cycle, at an initial amount of waste glycerol-rich phase of: (1) — $600 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$, (2) — $1200 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ and (3) — $2400 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ (bars represent standard deviation, $n = 3$)

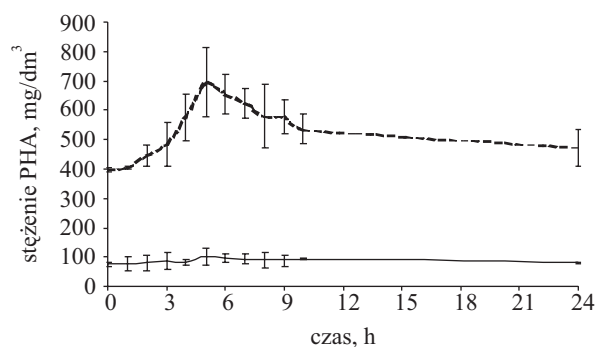
zbliżone we wszystkich seriach. Do spadku stężenia azotu amonowego — tak jak w przypadku ChZT — dochodziło w fazie napowietrzania, po 3 h od chwili rozpoczęcia cyklu. W serii 2 i 3 azot był szybko i całkowicie usuwany z pożywki po rozpoczęciu tej fazy, natomiast w serii 1 jego średnia zawartość w odpływie wyniosła $16,6 \pm 2,1 \text{ mg}/\text{dm}^3$.

We wszystkich seriach podczas fazy mieszania dochodziło do wytwarzania przez mikroorganizmy lotnych kwasów tłuszczowych (LKT). Pod koniec fazy mieszania ich stężenie wahało się od $52,71 \pm 7,88 \text{ mg}/\text{dm}^3$ (seria 2) do $36,00 \pm 1,21 \text{ mg}/\text{dm}^3$ (seria 3) (rys. 1). Największa wartość szybkości wytwarzania LKT wyniosła $17,57 \text{ mg}/\text{dm}^3 \cdot \text{h}$ i została uzyskana w serii 2. We wszystkich

seriach zaobserwowano, że po rozpoczęciu fazy napowietrzania następował szybki spadek stężenia kwasów organicznych o krótkich łańcuchach.

Analizując powyższe dane można stwierdzić, że frakcja glicerynowa w warunkach beztlenowych (faza mieszania) była częściowo przekształcana w lotne kwasy tłuszczowe. Świadczy o tym wzrost ich zawartości w wodzie nadosadowej oraz nieznaczny spadek stężenia ChZT zaobserwowany w poszczególnych seriach podczas fazy mieszania. W fazie napowietrzania (trwającej od 3 h cyklu) odpadowa frakcja glicerynowa (obecna w ilości wyrażonej wartością ChZT) była skutecznie usuwana z cieczy hodowlanej we wszystkich seriach. Wydajność usuwania związków organicznych w toku cyklu w odniesieniu do kolejnych serii wyniosła, odpowiednio, $93,3 \% (\pm 0,9)$, $94,7 \% (\pm 1,2)$ i $91,9 \% (\pm 1,4)$, jednakże szybkość tego procesu była różna. Azot amonowy w serii 1 nie został całkowicie usunięty, natomiast w serii 2 i 3 jego stężenie w odpływie wyniosło 0. W fazie beztlenowej LKT były wytwarzane we wszystkich seriach w ciągu trzech pierwszych godzin cyklu i następnie zużywane w ciągu czwartej jego godziny.

Kumulację polihydroksykwasów zaobserwowano tylko w serii 1, a odpowiednie zmiany stężenia PHA w toku cyklu przedstawia rys. 2. Kumulacja rozpoczęła się po spadku stężenia azotu w cieczy hodowlanej i rozpoczęciu fazy napowietrzania, a trwała do piątej godziny cyklu. Szybkość kumulacji PHA wyniosła $87,3 \text{ mg PHA}/(\text{dm}^3 \cdot \text{h})$. Polihydroksykwasy były kumulowane dopóty, dopóki był dostępny łatwo przyswajalny substrat zewnętrzny. Po jego wyczerpaniu odnotowano jeszcze niewielkie zmiany ChZT w cieczy hodowlanej, ale szybkość usuwania związków organicznych była mała. W tej fazie odnotowano również spadek stężenia polihydroksykwasów — począwszy od piątej godziny trwania cyklu, aż do jego końca. Współczynnik wydajności PHA, liczony jako stosunek szybkości kumulacji poli-



Rys. 2. Zmiany stężenia PHA w serii 1 w toku cyklu: linia przerywana — kwas 3-hydroksymastłowy, linia ciągła — kwas 3-hydroksywalerianowy (słupki odpowiadają odchyleniu standardowemu, $n = 3$)

Fig. 2. Changes in the concentration of PHA in series 1 during the cycle: concentration of 3-hydroxybutyrate (---); concentration of 3-hydroxyvalerate (—) (bars represent standard deviation, $n = 3$)

T a b e l a 2. Porównanie wartości parametrów charakteryzujących przebieg procesu wytwarzania PHA przez różne szczepy mikroorganizmów z zastosowaniem odpadowej frakcji glicerynowej jako źródła węgla (dane literaturowe wg [20] oraz wyniki własne)

T a b l e 2. Parameters of PHA synthesized from waste glycerol as a carbon source by different types of microbial cultures (data from the literature [20] and results obtained from the studied mixed cultures)

Mikroorganizmy	Produktywność objętościowa, g/(dm ³ · h)	Maksymalne stężenie PHA, g/dm ³	Rodzaj wytwarzanego polimeru	Literatura
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	1,1	38,1	P(3HB)	[18]
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	0,31	15,0	P(3HB)	[17]
<i>Pseudomonas corrugata</i> 388	0,01	0,7	mcl-PHA	[16]
Mieszane kultury bakterii	0,072	0,8	P(3HB-co-3HV)	badania własne

hydroksykwasy do szybkości zużycia związków organicznych wyrażonych wartością ChZT ($Y_{PHA/S}$) był równy 0,59 mg PHA/mg ChZT. Maksymalny stopień kumulacji polihydroksykwasy w biomacie wyniósł ok. 44,7 % ($\pm 7,6$). Badania wykazały przy tym, że mikroorganizmy kumulowały głównie kopolimer kwasu 3-hydroksymasłowego (3HB) i kwasu 3-hydroksywalerianowego (3HV); udział kopolimeru 3HB-co-3HV wahał się od 15,8 % ($\pm 3,8$ %) do 12,6 % ($\pm 2,4$ %) podczas cyklu. Nie stwierdzono jednoznacznych tendencji zmian stężenia kwasu 3HV w toku cyklu (linia ciągła na rys. 2). W pozostałych dwóch seriach mimo zmiany stężenia odpadowej frakcji glicerynowej w dopływie do reaktora nie zaobserwowano kumulacji PHA.

Chua i współpr. [24], wykorzystując osad zasilany ściekami bytowo-gospodarczymi uzupełnianymi kwasem octowym, uzyskali stężenie PHA na poziomie 30 % suchej masy (s.m.). Potwierdzili oni, iż osad czynny poddany warunkom beztlenowo-tlenowym może kumulować znaczne ilości biopolimerów. Serafim i współpr. [25] również badali możliwość kumulacji PHA przez mieszane kultury bakterii w warunkach ograniczonej dostępności substratu oraz beztlenowo-tlenowych. Źródłem węgla do biosyntezy był kwas octowy i kwas propionowy w stężeniu odpowiadającym wartości ChZT = 600 mg O₂/dm³. Maksymalne stężenie biopolimerów osiągnięte w warunkach beztlenowo-tlenowych w przypadku obu substratów było podobne i nie przekroczyło 20 % s.m.

Podobnie Bengtsson i współpr. [26] zbadali zdolność kumulacji PHA w warunkach beztlenowo-tlenowych. Jako źródło węgla wykorzystali wstępnie przefermentowane ścieki z produkcji papieru. W wyniku hodowli

uzyskali stężenie polimeru wynoszące 30 % s.m. w okresie beztlenowym i 25 % s.m. w fazie tlenowej.

Także Coats i współpr. [20] ocenili zdolność kumulacji mieszanych kultur bakterii w warunkach beztlenowo-tlenowych. Badania prowadzili przez 4 miesiące, wiek osadu utrzymywano na poziomie 4 dób, a jako źródło węgla także stosowali ścieki pochodzące z produkcji papieru. Średnia zawartość PHA w komórkach mikroorganizmów wyniosła 6,6 %, jednakże w trakcie doświadczeń autorzy niekiedy obserwowali ponad dwukrotnie większe stężenie polimeru w hodowli (16,8 % s.m.). Z przedstawionych w tabeli 2 danych wynika, że wartości uzyskane w trakcie badań własnych były porównywalne jedynie z wynikami uzyskanymi dla szczepu *Pseudomonas corrugata* 388. Opisane w literaturze szczepy *Cupriavidus* okazały się o wiele bardziej wydajne – w hodowli z ich udziałem istnieje możliwość uzyskania znacznie większego stężenia biomasy niż w hodowli z udziałem mieszanych kultur.

W opisywanej tu pracy największy udział PHA w suchej masie uzyskano stosując stężenie odpadowej frakcji glicerynowej wynoszące 600 mg O₂/dm³. Udział ten osiągnął poziom 40 %, co w przypadku mieszanych populacji stanowi wartość dość znaczną. Otrzymanie przy tym kopolimeru P(3HB-co-3HV) ma istotne znaczenie z punktu widzenia korzystnych możliwości jego zastosowania. W porównaniu z P(3HB) wykazuje on zdecydowanie lepszą charakterystykę przetwórczą [27–29]. Wzrost udziału frakcji 3HV wpływa korzystnie na właściwości termiczne i mechaniczne kopolimeru.

W tabeli 3 porównano właściwości kopolimeru 3HB/3HV o zawartości 3HV zbliżonej do uzyskanej w opisanych powyżej badaniach z odpowiednimi właści-

T a b e l a 3. Porównanie użytkowych właściwości polihydroksykwasy oraz syntetycznych poliolefin [30, 31]

T a b l e 3. Comparison of properties of the various polyhydroxyalkanoates and synthetic polymers [30, 31]

Rodzaj polihydroksykwasy	Temperatura mięknięcia, °C	Temperatura zeszklenia, °C	Moduł Younga GPa	Wytrzymałość na zerwanie, MPa
P(3HB)	180	4	3,5	40
P(3HB-co-14 mol %-3HV)	150	4	1,5	35
PP	176	-10	1,7	38
PE-HD	137	—	1,4	30
PE-LD	130	-30	0,2	10

wościami P(3HB) i syntetycznych poliolefin [30, 31]. Dane te świadczą o użytkowej przydatności kopolimeru 3HB/3HV.

Zwiększanie początkowego stężenia frakcji glicerynowej wpływa hamująco na zdolność gromadzenia PHA w biomacie, ponieważ wraz ze wzrostem wartości ChZT w pożywce (serie 2 i 3) odnotowano zanik kumulacji. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że wzrost stosunku C/N w przypadku mieszanych kultur bakterii prowadzi na ogół do spadku stężenia PHA w biomacie. Dionisi i współpr. [32] tłumaczyli też spadek wydajności PHA wraz ze wzrostem obciążenia nadmiernym rozwojem mikroorganizmów niekumulujących polihydroksykwasów. Nawiązując do tych sugestii oraz uwzględniając podane powyżej zmiany efektywności usuwania związków organicznych w poszczególnych seriach (seria 1 — $93,3 \pm 0,9\%$; seria 2 — $94,7 \pm 1,2\%$; seria 3 — $91,9 \pm 1,4\%$), można przypuszczać, że jedynie w serii 1 (najmniejsze obciążenie, por. tabela 1) zaistniały warunki umożliwiające rozwój mikroorganizmów zdolnych do kumulacji PHA. Natomiast w pozostałych seriach prawdopodobnie nie nastąpił rozwój tego typu mikroorganizmów, a dominującą pozycję w populacji zdobyły mikroorganizmy rozkładające glicerynę, o czym świadczy m.in. brak kumulacji PHA w seriach 2. i 3. mimo podobnej efektywności usuwania.

WNIOSKI

— Badania zjawiska kumulacji polihydroksykwasów przez mieszane populacje mikroorganizmów wykazały, że odpadowa frakcja glicerynowa pochodząca z produkcji biodiesla może być wykorzystywana jako źródło węgla do produkcji PHA o krótkich łańcuchach.

— Parametrem decydującym o efektywności procesu jest obciążenie objętości reaktora ładunkiem organicznym, podczas gdy wzrost początkowego stężenia całej frakcji glicerynowej nie powoduje zwiększenia stężenia biopolimeru w komórkach mikroorganizmów.

— Istotnym celem dalszych badań w omawianej dziedzinie wydaje się poznanie składu gatunkowego mikroorganizmów odpowiedzialnych za kumulację polihydroksykwasów w osadzie czynnym, gdyż mogłoby to doprowadzić do uzyskania populacji charakteryzującej się dużą wydajnością produkcji PHA i degradacji frakcji glicerynowej.

Badania były współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

LITERATURA

1. Lenz R. W., Marchessault R. H.: *Biomacromolecules* 2005, **6**, 1.
2. Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K., Woo S. I.: *Biotechnol. Bioeng.* 1994, **43**, 892.
3. Ryu H. W., Hahn S. K., Chang Y. K., Chang H. N.: *Biotechnol. Bioeng.* 1997, **55**, 28.

4. Marangoni C., Furigo Jr. A., de Aragão G. M. F.: *Process Biochem.* 2002, **38**, 137.
5. Lee, S. Y.: *Trends Biotechnol.* 1996, **14**, 431.
6. Anderson A. J., Dawes E. A.: *Microbiol. Rev.* 1990, **54**, 450.
7. Reis M. A. M., Serafim L. S., Lemos P. C., Ramos A. M., Aguiar F. R., Van Loosdrecht M. C. M.: *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2003, **25**, 377.
8. Salehizadeh H., Van Loosdrecht M. C. M.: *Biotechnol. Adv.* 2004, **22** (3), 261.
9. Wong H. H., Lee S. Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, **50**, 30.
10. Pavolo S., Casella S.: *Macromol. Symp.* 2003, **197**, 1.
11. Gouda M. K., Swellam A. E., Omar S. H.: *Microbiol. Res.* 2001, **156**, 201.
12. Mahishi L. H., Tripathi G., Rawal S. K.: *Microbiol. Res.* 2003, **158**, 19.
13. Bonatto D., Matias F., Lisboa M. P., Bogdawa H. M., Henriques J. A. P.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2004, **20**, 395.
14. Alias Z., Tan I. K. P.: *Biores. Technol.* 2005, **96**, 1229.
15. Majid M. I. A., Akmal D. H., Few L. L., Agustien A., Toh M. S., Samian M. R., Najimudin N., Azizan M. N.: *Int. J. Biol. Macromol.* 1999, **25**, 95.
16. Solaiman D. K. Y., Ashby R. D., Foglia T. A., Marmer W. N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, **71** (6), 783.
17. Ashby R. D., Solaiman D. K. Y., Foglia T. A.: *J. Polym. Environ.* 2004, **12**, 105.
18. Mothes G., Schnorpfeil C., Ackermann J.-U.: *Eng. Life Sci.* 2007, **7** (5), 475.
19. Cavaleiro J. M. B. T., de Almeida M. C. M. D., Grandfils C., da Fonseca M. M. R.: *Process Biochem.* 2009, **44**, 509.
20. Coats E. R., Loge F. J., Smith W. A., Thompson D. N., Wolcott M. P.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, **137**, 909.
21. Greenberg A. E., Clesceri L. S., Eaton A. D.: „Standard methods for the examination of water and wastewater”, wyd. American Public Health Association, Waszyngton, USA 1992.
22. BrauneGG G., Sonnleitner B., Lafferty R. M.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1978, **6** (1), 29.
23. Furrer P., Hany R., Rentsch D., Grubelnik A., Ruth K., Panke S., Zinn M.: *J. Chrom.* 2007, **1143**, 199.
24. Chua A. S. M., Takabatake H., Satoh H., Mino T.: *Water Res.* 2003, **37**, 3602.
25. Serafim L. S., Lemos P. C., Reis M. A. M.: *Water Sci. Technol.* 2002, **46** (1), 353.
26. Bengtsson S., Werker A., Welander T.: „Proceedings of 4th IWA Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology (SBR4)”, 7–10 kwietnia 2008 r., Rzym, Włochy.
27. Choi H. J., Kim J., Jhon M. S.: *Polym. Commun.* 1999, **40**, 4135.
28. Sudesh K., Abe H., Doi Y.: *Prog. Polym. Sci.* 2000, **25**, 1503.
29. You J. W., Chiu H. J., Shu W. J., Don T. M.: *J. Polym. Res.* 2003, **10**, 47.
30. Holmes P. A.: „Developments in Crystalline Polymers”, tom 2., Elsevier, Londyn 1987, str. 1–65.
31. Fukui T., Doi Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, **29**, 333.
32. Dionisi D., Majone M., Vallini G., Di Gregorio S., Beccari M.: *Biotechnol. Bioeng.* 2006, **93**, 76.

Otrzymano 17 VI 2010 r.