

# ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

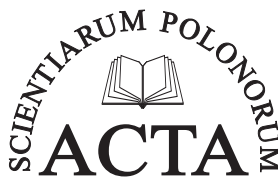
Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

**Biotechnologia**

Biotechnologia

Biotechnology

10 (2) 2011



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn  
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

### **Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum***

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

Wiesław Nagórko (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn), Florian Gambuś (Kraków),  
Franciszek Kluza (Lublin), Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Stanisław Socha (Siedlce),  
Waldemar Uchman (Poznań), Bogdan Lasota (Szczecin)

### **Scientific Board of *Biotechnology***

Danuta Witkowska – (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland) – chairman  
e-mail: danuta.witkowska@up.wroc.pl

Włodzimierz Bednarski (University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland),  
Włodzimierz Grajek (Poznań University of Life Sciences, Poland), Anna Maraz (Corvinus  
University Budapest, Hungary), Zdzisław Targoński (Lublin University of Life Science, Poland)  
Vesna Zechner-Krpan (University of Zagreb, Croatia)

**Covered by: Agro, Ulrich's Database, Copernicus Index, EBSCOhost**

ISSN 1644–065X (print) ISSN 2083–8654 (on-line)

Print edition is an original (reference) edition

Cover design  
Daniel Morzyński

Text editor  
Ewa Jaworska, e-mail: ewa.jaworska@up.wroc.pl

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Sopocka 23, 50-344 Wrocław, Poland  
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,37 Printing sheets: 2,00

*Szanowni Państwo,*

*Przekazujemy Państwu kolejny zeszyt ACTA SCIENTARUM POLONORUM serii Biotechnologia, czasopisma naukowego wydawanego przez wszystkie polskie uczelnie rolnicze i przyrodnicze w 14 seriach. Seria Biotechnologia ukazuje się nakładem Wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu od 2002 roku.*

*Czasopismo nasze publikuje oryginalne prace z zakresu biotechnologii drobnoustrojów, roślin i zwierząt, z naciskiem na aspekty praktyczne. Publikowane są oryginalne prace badawcze a także artykuły o charakterze monograficznym, w języku polskim lub angielskim ze streszczeniami w obu językach. Wszystkie opisy rysunków i tabel są dwujęzyczne. Prace są recenzowane przez najlepszych specjalistów z danej dziedziny.*

*Od 2007 roku czasopismo wydawane jest jako kwartalnik. Wymogi redakcyjne oraz szczegóły dotyczące przygotowania artykułu można znaleźć na stronie [www.acta.media.pl](http://www.acta.media.pl)*

*Zespół Redakcyjny*

*Dear Readers,*

*It is great pleasure to introduce you the next issue of ACTA SCIENTARUM POLONORUM Biotechnologia, a scientific journal published by all polish universities of environmental sciences. The series of Biotechnologia is released by publishing house of Wroclaw University of Environmental and Life Sciences since 2002.*

*The journal publishes original papers in the field of biotechnology of microorganisms, plants and animals with emphasis on practical aspects. There are published both original research articles and monographs, in Polish or English, with abstracts in both languages. The all figures' and tables' captions are bilingual. The papers are reviewed by the best specialists in the field. This issue is also dominated by the application problems.*

*Since 2007 the journal has been published as quarterly. The editorial requirements and details concerning the instruction for authors can be found et: [www.media.pl](http://www.media.pl).*

*Editorial Team*

## WPLYW WARUNKÓW DEGRADACJI POLISACHARYDÓW SŁOMY RZEPAKOWEJ NA EFEKTYWNOŚĆ POZYSKIWANIA CUKRÓW FERMENTUJĄCYCH

Magdalena Świątek, Małgorzata Lewandowska, Karolina Świątek,  
Włodzimierz Bednarski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**Streszczenie.** Przeprowadzono badania, których celem było określenie wpływu alkalicznej obróbki wstępnej słomy rzepakowej na skuteczność hydrolizy enzymatycznej polisacharydów. Doświadczenia zaplanowano przy wykorzystaniu programu Statistica – plan Box-Behnkena. Wielkości wejściowe stanowiły następujące zmienne: temperatura obróbki 60–80°C, czas 2–8 h, dodatek alkaliów (NaOH lub Ca(OH)<sub>2</sub>) w proporcji: 0,05–0,2 g · g<sup>-1</sup> s.s. substratu. Wielkość wyjściową, na podstawie której określano efektywność obróbki badanego substratu, stanowiło stężenie cukrów redukujących uwalnianych podczas sekwencyjnie prowadzonej 48-godzinnej hydrolizy enzymatycznej. Optymalizacja przeprowadzona na podstawie wartości wyjściowych wskazała następujące parametry obróbki wstępnej: stężenie NaOH – 0,15 g · g<sup>-1</sup> s.s. materiału, temperatura – 72°C, czas – 6,6 h oraz: stężenie Ca(OH)<sub>2</sub> – 0,141 g · g<sup>-1</sup> s.s. materiału, temperatura – 74°C, czas – 3,2 h, których zastosowanie pozwoliło na uzyskanie stężenia cukrów w hydrolizatach odpowiednio: 30,4 oraz 27,7 g · dm<sup>-3</sup>.

**Słowa kluczowe:** lignoceluloza, słoma rzepakowa, obróbka wstępna, hydroliza enzymatyczna, bioetanol

### WSTĘP

Zwiększenie produkcji rolniczej oraz stopnia przetworzenia surowców rolno-spożywczych wiąże się ze wzrostem masy odpadów i produktów ubocznych. Większość z nich zawiera wszystkie związki niezbędne do rozwoju mikroorganizmów, tj. węglowodany, białka, tłuszcze, witaminy i mikroelementy. Biorąc to pod uwagę, atrakcyjnymi metodami ich zagospodarowania są metody biotechnologiczne, pozwalające przekształcić je

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Magdalena Świątek, Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Heweliusza 1, 10-718 Olsztyn, e-mail: magdalena.swiatek@uwm.edu.pl

w płynne nośniki energii, a także składniki pasz lub nawozów [Ledakowicz i Krzystek 2005, Taherzadeh i Karimi 2008].

Potencjał masowy słomy rzepakowej szacuje się na 18 mln t/rok, co uzasadnia poszukiwanie możliwości jej zagospodarowania. Słoma rzepakowa jest jednak nisko energetycznym materiałem w porównaniu z węglem kamiennym i innymi surowcami lignocelulozowymi. Jednym z kryteriów jej atrakcyjności jako substratu lignocelulozowego do produkcji bioetanolu jest fakt, że odpady w postaci rzepaczanki są w bardzo małym stopniu zagospodarowane, relatywnie tanie i nisko „energodajne” w procesie bezpośredniego spalania [Podkówka 2004, <http://www.ekoenergia.pl>].

Zainteresowanie problematyką wykorzystania odpadów z przetwórstwa surowców roślinnych w kierunku pozyskiwania alternatywnych nośników energii wynika ponadto z powszechnej obawy o wzrost cen żywności, ponieważ produkowane obecnie biopaliwa I generacji wytwarzane są głównie z surowców takich jak: ziemniaki, zboża, buraki cukrowe. Jednocześnie wymagania Unii Europejskiej dotyczące ich promocji wskazują na konieczność powiększania produkcji bioetanolu w Polsce. Perspektywy jej rozwoju zarówno w Polsce, jak i na świecie wiążą się z pojęciem „paliw II generacji”, do produkcji których wykorzystywane będą między innymi materiały lignocelulozowe, głównie pochodzenia odpadowego. Wykorzystanie biomasy lignocelulozowej jako alternatywnego odnawialnego źródła energii może być sposobem na zwiększenie bezpieczeństwa energetycznego oraz sprzyjać będzie zmniejszeniu emisji gazów cieplarnianych i poprawie stabilności cen paliw.

Obfitość odpadowych surowców lignocelulozowych czyni je potencjalnie niewyczerpalnym źródłem energii, jednakże proces ich przetwarzania charakteryzuje się wysoką kosztownością i niską wydajnością w porównaniu z technologiami tradycyjnymi. Biomasa roślinna, np. słoma, jest surowcem wymagającym szczególnego traktowania w procesie przygotowania do fermentacji etanolowej. Wynika to z jej specyficznej budowy, w której najistotniejszą rolę spełnia ochronna funkcja ligniny, ściśle powiązanej z pozostałymi polimerami: celulozą i hemicelulozą. Celuloza – polimer glukozy oraz hemiceluloza składająca się głównie z cząsteczek galaktozy, mannozy, ksylozy i arabinozy stanowią potencjalny substrat do efektywnego wykorzystania w procesach fermentacyjnych. Lignina – składająca się z pochodnych aromatycznych alkoholi fenolowych, takich jak alkohol koniferylowy, synapinowy, kumarylowy, strukturalnie usieciowana wiązaniami estrowymi i węglowymi, jest wysoce skuteczną przeszkodą utrudniającą wspomniane przeznaczenie. Wymusza to konieczność stosowania wstępnej obróbki substratu, która w istotny sposób wpływa na przebieg kolejno prowadzonych etapów i decyduje o końcowej wydajności procesu produkcji bioetanolu [Sims i in. 2010, Hendriks i Zeeman 2009, Zhang 2008].

W celu przeprowadzenia obróbki wstępnej surowców lignocelulozowych wykorzystuje się metody fizyczne, fizykochemiczne, chemiczne oraz biologiczne. Dobór sposobu postępowania decyduje o zakresie i intensywności przemian w obrębie kompleksu lignocelulozowego. Różnice we właściwościach fizycznych i chemicznych różnorodnej gamy dostępnych substratów determinują konieczność opracowania technologii gwarantujących uzyskanie pożądaných efektów przy minimalnych nakładach finansowych [Sánchez i Cardona 2008].

Zastosowanie w procesie obróbki wstępnej tlenku wapnia, wodorotlenku wapnia, amoniaku, wodorotlenku sodu, oddziaływających na wiązania estrowe pomiędzy ligniną

i pozostałymi polimerami oraz na acetylowe grupy hemiceluloz, powoduje częściowe upłynnienie kompleksu oraz usunięcie znacznej części ligniny. Konsekwencją tych zmian jest zwiększenie dostępności celulozy w przypadku enzymów hydrolitycznych. Do głównych zalet metod opartych na zastosowaniu alkaliów należą: możliwość prowadzenia procesów w temperaturze 20–25°C, mniejsza strata sacharydów w porównaniu ze sposobami wykorzystującymi kwas siarkowy, a także brak powstawania furfuralu i hydroksymetylofurfuralu (inhibitory procesu hydrolizy i fermentacji). Metody te są przydatne głównie do obróbki pozostałości rolniczych (np. słomy) [da Costa Sousa i in. 2009, Alvira i in. 2010].

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było ustalenie optymalnych warunków wstępnego przygotowania słomy rzepakowej, pozwalających na skuteczną degradację enzymatyczną polisacharydów do cukrów fermentujących, możliwych do wykorzystania przez drożdże w procesie fermentacji alkoholowej.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał doświadczalny stanowiła słoma rzepakowa (*Brassica napus* L. var. *napus*), pochodząca z Gospodarstwa Rolnego w Pacóltowie AUREPIO AGRA sp. z o.o., w postaci wysuszonej, o zawartości 92,6% suchej masy. Słomę poddano procesowi kilkustopniowego mielenia, kolejno w urządzeniach: Tefal DPA 130 La Moulinette, Zelmer Symbio Diana, młynek żarnowy Krups typ GVX2, do poziomu rozdrobnienia 1–5 mm. Określono udział poszczególnych frakcji włókna w słomie rzepakowej, wykorzystując urządzenie Fibertec™ 2010: oznaczenie zawartości włókna neutralno-detergentowego NDF według Van Soest'a [AOAC 2002.04], oznaczenie zawartości włókna kwaśno-detergentowego ADF oraz ligniny kwaśno-detergentowej ADL [PN-EN ISO 13906]. Zawartość celulozy wyznaczono z różnicy pomiędzy udziałem frakcji ADF i ADL, natomiast zawartość hemicelulozy – z różnicy pomiędzy udziałem frakcji NDF i ADF.

Słomę rzepakową poddano chemicznej obróbce, z zastosowaniem NaOH lub  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  w proporcjach: 0,05–0,2 g · g<sup>-1</sup> s.s. substratu, w temperaturze 60–80°C i w czasie 2–8 h. Doświadczenia zaplanowano, wykorzystując program STATISTICA (plan Box-Behnkena). Na podstawie wydajności hydrolizy enzymatycznej mierzonej stężeniem uwalnianych cukrów redukujących przeprowadzono optymalizację procesu, wykorzystując model powierzchni odpowiedzi. Na tej postawie wyznaczono warunki obróbki wstępnej (temperaturę, czas, dodatek wodorotlenku wapnia lub sodu) pozwalające uzyskać najkorzystniejszy efekt, dla podanego zakresu parametrów. Stężenie substratu lignocelulozowego w zawiesinie ustalono na poziomie 10% s.s. (w/w), co gwarantowało możliwość mieszania medium w czasie reakcji. Po odpowiednim czasie obróbki przeprowadzono neutralizację, doprowadzając kwasowość środowiska do wartości pH 5. Tak przygotowany materiał był substratem do sekwencyjnie prowadzonej hydrolizy enzymatycznej. Reakcja przebiegała w temperaturze 50°C, w kolbach Erlenmeyera o pojemności 500 cm<sup>3</sup>, zawierających 200 g medium reakcyjnego, z zastosowaniem wytrząsania (250 obr · min<sup>-1</sup>; inkubator Innova 40, New Brunswick Scientific) przy użyciu ustalonej kompozycji trzech preparatów enzymatycznych firmy Novozymes: celulazy (Celluclast) – 15 FPU · g<sup>-1</sup> s.s. słomy, celobiazy (Novozyme 188) – 30 CBU · g<sup>-1</sup> s.s. słomy, ksylanazy (Pentopan) – 15 FXU · g<sup>-1</sup> s.s. słomy. Aktywność enzymów była wyrażana następująco:

1 FPU – dawka enzymu uwalniająca 1  $\mu\text{mol}$  glukozy z bibuły Whatman no. 1, w czasie 1 minuty, 1 CBU – dawka enzymu przekształcająca 1  $\mu\text{mol}$  celobiozy do 2  $\mu\text{mol}$  glukozy w czasie 1 minuty, 1 FXU – dawka enzymu uwalniająca 1  $\mu\text{mol}$  ksylozy w czasie 1 minuty. Podczas hydrolizy zastosowano dodatek azydru sodu (0,1%) celem wyeliminowania potencjalnych zakażeń mikrobiologicznych. W czasie reakcji okresowo pobierano próbki do analizy. Efekty hydrolizy określano na podstawie stężenia uwolnionych cukrów redukujących, oznaczonych z wykorzystaniem odczynnika DNS (kwas 3,5-dinitrosalicylowy) [Miller 1959]. Kontrolnie przeprowadzono również hydrolizę enzymatyczną substratu nie poddanego obróbce wstępnej.

## WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 1 przedstawiono udział celulozy, hemicelulozy i ligniny w suchej masie słomy rzepakowej. Zawartość celulozy i hemicelulozy łącznie w badanym surowcu kształtowała się na poziomie ok. 52%, stanowiąc potencjalny substrat do hydrolizy enzymatycznej, a następnie fermentacji alkoholowej.

Tabela 1. Udział poszczególnych frakcji słomy rzepakowej w % suchej substancji  
Table 1. Content of different fractions of rape straw in percentage of dry matter

NDF*	ADF**	ADL***	Celuloza Cellulose	Hemiceluloza Hemicellulose
61,86	56,19	9,60	46,59	5,67

\*NDF – włókno neutralno-detergentowe – neutral detergent fiber;

\*\*ADF – włókno kwaśno-detergentowe – acid detergent fiber;

\*\*\*ADL – lignina kwaśno-detergentowa – acid detergent lignin

Przeprowadzenie 48-godzinnej hydrolizy kontrolnej substratu natywnego pozwoliło na uzyskanie stężenia uwolnionych cukrów  $9,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  hydrolizatu, przy czym proces hydrolizy przebiegał najszybciej przez 12 h, po upływie których stężenie glukozy osiągnęło poziom  $8,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , co stanowiło prawie 90% wartości uzyskanej po 48 h. Wydajność hydrolizy sacharydów w odniesieniu do wartości teoretycznej, wyznaczonej na podstawie stężenia celulozy i hemicelulozy w materiale natywnym, osiągnęła poziom zaledwie 16,0%.

Podobne rezultaty uzyskali Perez i in. [2008], którzy prowadzili badania nad optymalizacją parametrów termohydrolizy we wstępnej degradacji słomy pszennej. Wydajność hydrolizy polisacharydów substratu natywnego osiągnęła poziom 13,0% teoretycznej wydajności glukozy.

W badaniach Bak i in. [2009], którzy oceniali przydatność metody napromieniania wiązką elektronów do wstępnego traktowania słomy ryżowej, przeprowadzenie 120-godzinnej hydrolizy enzymatycznej substratu natywnego skutkowało uzyskaniem wydajności uwalnianej glukozy na poziomie 22,6%. Wyższa o niespełna 7% wydajność mogła być spowodowana ponad 2-krotnie dłuższym czasem hydrolizy oraz większą podatnością na hydrolizę polisacharydów słomy ryżowej w porównaniu ze słomą rzepakową.



W wyniku przeprowadzenia serii doświadczeń z wykorzystaniem substratu wstępnie traktowanego z udziałem NaOH zaobserwowano wyraźne zwiększenie podatności polisacharydów na hydrolizę enzymatyczną (tab. 2).

Tabela 2. Efektywność 48-h hydrolizy enzymatycznej słomy rzepakowej w zależności od parametrów obróbki wstępnej wyznaczonych wg planu Box-Behnkena (15 układów)  
Table 2. Effectiveness of 48-hour enzymatic hydrolysis of rape straw depending on pretreatment parameters designated according to Box-Behnken plan (15 combinations)

Nr układu Set number	Temperatura [°C] Temperature	Czas [h] Time	Dodatek wodorotlenku sodu/wapnia [g · g <sup>-1</sup> s.s.] Addition of sodium/calcium hydroxide [g · g <sup>-1</sup> d.m.]	Stężenie uwalnianych cukrów redukujących po obróbce z udziałem NaOH i hydrolizie [g · dm <sup>-3</sup> ] Concentration of released reducing sugars after pretreatment with NaOH and hydrolysis	Stężenie uwalnianych cukrów redukujących po obróbce z udziałem Ca(OH) <sub>2</sub> i hydrolizie [g · dm <sup>-3</sup> ] Concentration of released reducing sugars after pretreatment with Ca(OH) <sub>2</sub> and hydrolysis
1	60	2	0,10	22,9	23,0
2	80	2	0,10	26,5	25,3
3	60	8	0,10	25,4	27,0
4	80	8	0,10	27,7	24,4
5	60	4	0,05	21,3	21,2
6	80	4	0,05	23,2	16,1
7	60	4	0,20	24,8	22,1
8	80	4	0,20	26,8	22,1
9	70	2	0,05	25,6	16,7
10	70	8	0,05	24,3	17,8
11	70	2	0,20	28,5	23,0
12	70	8	0,20	27,9	22,7
13	70	4	0,10	30,2	23,6
14	70	4	0,10	26,8	22,1
15	70	4	0,10	28,2	25,0

Dowodzi tego ok. 3-krotnie wyższa zawartość cukrów redukujących w porównaniu z próbą kontrolną uzyskaną po 48 h procesu hydrolizy. Najwyższe stężenie uwolnionych cukrów redukujących (30,2 g · dm<sup>-3</sup> hydrolizatu) otrzymano przy zastosowaniu następujących parametrów wstępnego traktowania: stężenie NaOH – 0,1 g · g<sup>-1</sup> s.s. materiału, temperatura – 70°C, czas – 4 h. Najmniej korzystne okazało się zastosowanie łagodnej obróbki: stężenie NaOH – 0,05 g · g<sup>-1</sup> s.s. materiału, temperatura – 60°C, czas – 4 h – hydroliza substratu przygotowanego w tych warunkach pozwoliła na uwolnienie zaledwie 21,3 g · dm<sup>-3</sup> cukrów redukujących.

W doświadczeniach przeprowadzonych z wykorzystaniem substratu po wstępnym trawieniu za pomocą Ca(OH)<sub>2</sub> również zaobserwowano zwiększenie podatności na hydrolizę polisacharydów słomy rzepakowej, jednakże w mniejszym stopniu niż z udziałem NaOH. Największe stężenie glukozy uwolnionej podczas hydrolizy (27,0 g · dm<sup>-3</sup> hydro-

lizatu) uzyskano przy zastosowaniu następujących warunków obróbki: stężenie  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  –  $0,1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. materiału, temperatura –  $60^\circ\text{C}$ , czas – 8 h.

Zastosowanie minimalnej dawki wodorotlenku wapnia –  $0,05 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. substratu – spowodowało znaczne obniżenie efektywności hydrolizy enzymatycznej we wszystkich badanych układach. Najniższe stężenie cukrów redukujących w hydrolizacie ( $16,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) odnotowano dla surowca traktowanego w warunkach: stężenie  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  –  $0,05 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. materiału, temperatura –  $80^\circ\text{C}$ , czas – 4 h (tab. 2). We wszystkich eksperymentach zaobserwowano gwałtowny wzrost stężenia glukozy podczas pierwszych 12 godzin procesu, po których następowało zwolnienie tempa hydrolizy.

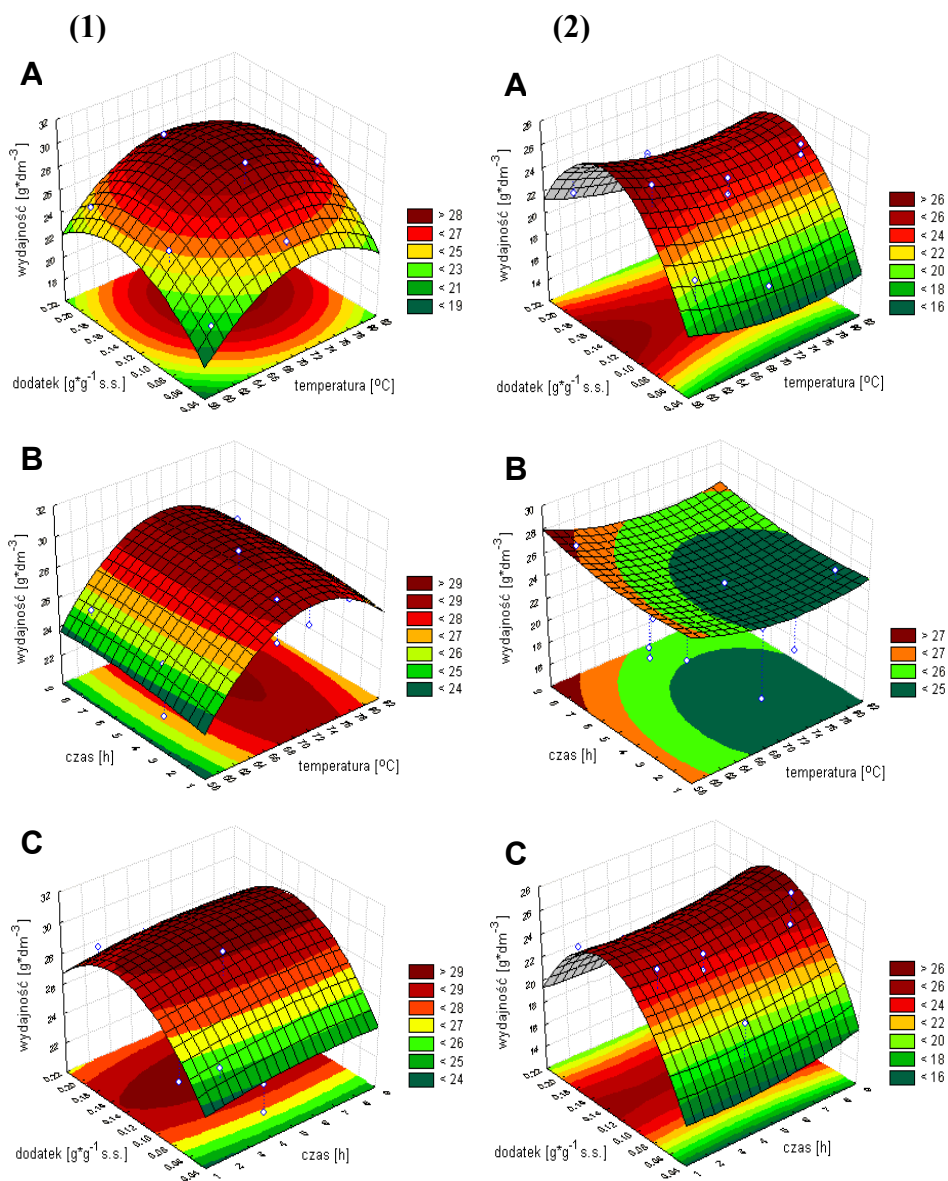
Na podstawie oceny efektów ANOVA przeprowadzonej z wykorzystaniem programu STATISTICA stwierdzono, że skuteczność obróbki wstępnej z udziałem NaOH w największym stopniu uzależniona jest od zastosowanego stężenia wodorotlenku oraz temperatury, natomiast czas procesu odgrywa mniejszą rolę. Świadczy o tym kształt płaszczyzn dopasowania na rysunku 1 (1) – wygięcie płaszczyzny w dwóch kierunkach na rysunku A wskazuje na istotny wpływ obu parametrów: stężenia NaOH i temperatury, natomiast jednokierunkowe załamanie na rysunkach B i C – dowodzi znacznie mniejszej zależności skuteczności obróbki substratu od czasu jej trwania.

Efektywność obróbki wstępnej z udziałem  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  w głównej mierze uzależniona jest od zastosowanego stężenia wodorotlenku, natomiast temperatura i czas procesu odgrywają mniejszą rolę. Potwierdza to kształt płaszczyzn dopasowania na rysunku 1 (2) – jednokierunkowe wygięcie płaszczyzny na rysunkach A i C wskazuje na istotny wpływ stężenia  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , natomiast nieznaczne jednokierunkowe załamanie na rysunku B – dowodzi mało istotnej zależności skuteczności obróbki od temperatury i czasu jej trwania.

Na podstawie uzyskanych rezultatów przeprowadzono optymalizację procesu, wykorzystując model powierzchni odpowiedzi, w wyniku której wyznaczone zostały warunki wstępnego traktowania pozwalające uzyskać najkorzystniejszy efekt przy badanym zakresie parametrów: stężenie NaOH –  $0,15 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. materiału, temperatura –  $72^\circ\text{C}$ , czas – 6,6 h lub stężenie  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  –  $0,141 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. materiału, temperatura –  $74^\circ\text{C}$ , czas – 3,2 h. Stężenie uwalnianej glukozy ze słomy potraktowanej taką obróbką osiągnęło poziom odpowiednio  $30,4$  i  $27,7 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  hydrolizatu i wartości te były wyższe od wyznaczonych aproksymowanych:  $29,8$  i  $25,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (rys. 2).

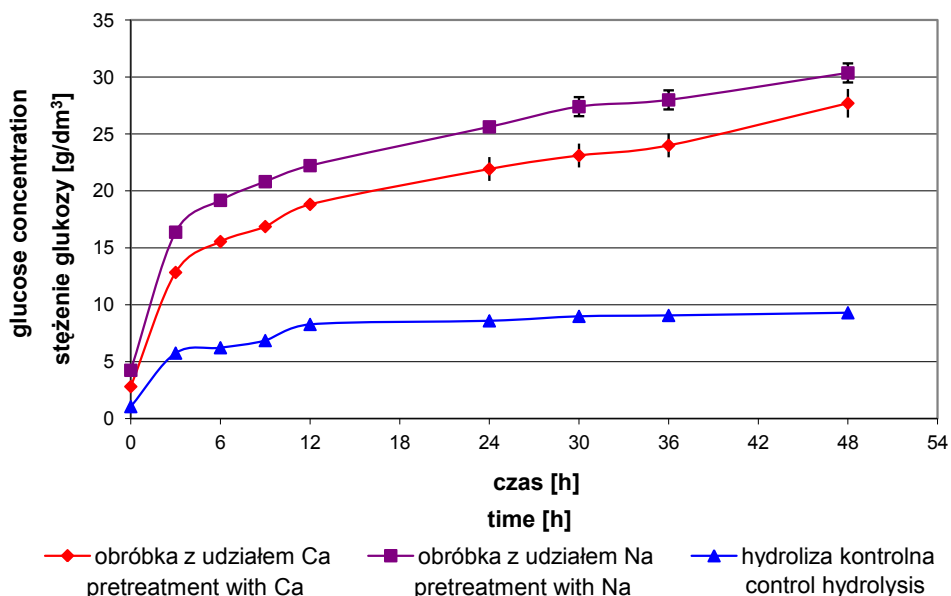
Wydajność hydrolizy w odniesieniu do wartości teoretycznej określonej na podstawie zawartości celulozy i hemiceluloz w materiale natywnym wyniosła  $52,3$  i  $47,7\%$ , odpowiednio dla surowca traktowanego NaOH i  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

W badaniach prowadzonych przez McIntosh i Vancov [2010] hydrolizę enzymatyczną słomy sorgo poprzedzono alkaliczną obróbką wstępną substratu, stosując zmienne warunki procesu w zakresie: stężenia NaOH (od 0 do  $2,0\%$  (w:v), temperatury ( $60$  i  $121^\circ\text{C}$ ) oraz czasu jej trwania (30, 60 i 90 min). Spośród badanych czynników za najistotniejszy uznano wpływ temperatury obróbki, a za optymalne uznano następujące parametry wstępnego traktowania:  $121^\circ\text{C}$ , 60 minut, stężenie wodorotlenku sodu –  $2,0\%$  (w:v), w wyniku zastosowania których po hydrolizie uzyskano  $0,799 \text{ g}$  cukrów  $\cdot \text{g}^{-1}$  substratu. Wydajność uwalniania cukrów osiągnięta w tym doświadczeniu była korzystniejsza niż w omawianej pracy i niewątpliwie była rezultatem zastosowania wyższej temperatury obróbki, która jak wynika z przeprowadzonej optymalizacji, ma istotny wpływ na skuteczność działania NaOH.



Rys. 1. Schematy powierzchni odpowiedzi obrazujące wpływ temperatury, dawki NaOH (1) lub  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (2) i czasu obróbki na wydajność hydrolizy enzymatycznej słomy rzepakowej mierzonej stężeniem cukrów redukujących w hydrolizacie. A – czas 4,5 h, B – dodatek NaOH lub  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  0,11  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. substratu, C – temperatura 70°C

Fig. 1. The response surface plots showing the influence of temperature, proportion of NaOH (1) or  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (2) and time of pretreatment on the efficiency of enzymatic hydrolysis of rape straw, measured by reducing sugars concentration in hydrolysate. A – time 4,5 h, B – proportion of NaOH or  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  0,11  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  d.m. of substrate, C – temperature 70°C



Rys. 2. Postęp hydrolizy słomy rzepakowej natywnej oraz po wstępnej obróbce chemicznej w wyznaczonych warunkach optymalnych (NaOH –  $0,15 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. materiału, temperatura –  $72^\circ\text{C}$ , czas – 6,6 h;  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  –  $0,141 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. materiału, temperatura –  $74^\circ\text{C}$ , czas – 3,2 h), w trakcie 48 h doświadczenia, wyrażony stężeniem cukrów redukujących w hydrolizacie (średnia dla dwóch powtórzeń)

Fig. 2. The course of enzymatic hydrolysis of raw rape straw and rape straw after chemical pretreatment under estimated optimal conditions (NaOH –  $0,15 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  d.m. of material, temperature –  $72^\circ\text{C}$ , time – 6,6 h;  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  –  $0,141 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  d.m. of material, temperature –  $74^\circ\text{C}$ , time – 3,2 h), during 48-hour experiment, expressed as reducing sugars concentration in hydrolysate (an average of two replications)

Chen i in. [2009] uzyskali wydajność hydrolizy polisacharydów słomy kukurydzianej wyższą o około 30% (81,2%), po przeprowadzeniu obróbki w temperaturze  $120^\circ\text{C}$ , w 2% roztworze NaOH i w czasie 30 min. Zastosowanie stosunkowo wysokiej temperatury pozwoliło na osiągnięcie korzystnych rezultatów, w znacznie krótszym czasie.

Zbliżone rezultaty uzyskali natomiast Nlewem i Thrash [2010], którzy w procesie obróbki wstępnej prosa różgowego zastosowali wodorotlenek sodu w stężeniu 0,5% (w:v), temperaturę  $85\text{--}90^\circ\text{C}$  i czas 1 h, otrzymując po procesie 48-godzinnej sekwencyjnej hydrolizy enzymatycznej  $0,31 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  biomasy. Materiał wyjściowy zawierał 65% celulozy i hemicelulozy łącznie, zatem wydajność uwolnionych cukrów w odniesieniu do wartości teoretycznej kształtowała się na poziomie poniżej 45%. Cytowani autorzy w swoich badaniach wykazali, że wzrost stężenia wodorotlenku był odwrotnie proporcjonalny do wydajności hydrolizy enzymatycznej.

Saha i Cotta [2007] zastosowali wodorotlenek wapnia do obróbki wstępnej słomy pszennej. Trawienie substratu prowadzono w temperaturze  $121^\circ\text{C}$ , za pomocą  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  w stężeniach ( $0,025$ ,  $0,05$  i  $0,1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  słomy), w czasie 6, 30 lub 60 min. Zaobserwowano, że zarówno zwiększenie dawki wodorotlenku wapnia, jak i wydłużenie czasu obróbki skutkowało zwiększeniem podatności surowca na hydrolizę enzymatyczną, przy czym

wpływ stężenia wodorotlenku, podobnie jak w naszych badaniach, okazał się istotniejszy. Za optymalne warunki obróbki słomy pszennej cytowani badacze uznali: 0,1 g  $\text{Ca(OH)}_2 \cdot \text{g}^{-1}$  słomy pszennej, 121°C, 60 minut, które pozwoliły na uzyskanie wydajności uwalniania cukrów redukujących 82%, jednakże po 2,5-krotnie dłuższym procesie hydrolizy enzymatycznej (120 h, w porównaniu z prowadzoną przez nas 48-godziną hydrolizę).

Xu i in. [2010] oceniali efektywność obróbki wstępnej prosa różgowego z wykorzystaniem wodorotlenku wapnia w temperaturze otoczenia. Przeprowadzono szereg eksperymentów hydrolizy, które poprzedzone były alkaliczną obróbką wstępną substratu, z zastosowaniem zmiennych warunków procesu w zakresie: stężenia  $\text{Ca(OH)}_2$  (od 0,025 do 0,2 g  $\cdot \text{g}^{-1}$  substratu), temperatury (21, 50 i 121°C) oraz czasu trwania obróbki (od 0,25 do 168 h). Prowadząc proces wstępnego traktowania surowca z dodatkiem wodorotlenku wapnia w dawce 0,1 g  $\cdot \text{g}^{-1}$  substratu, w temperaturze 121°C maksymalne stężenie uwolnionych cukrów redukujących (0,415 g  $\cdot \text{g}^{-1}$  substratu) uzyskano z materiału po 0,5-godzinnej obróbce. Zastosowanie tej samej dawki  $\text{Ca(OH)}_2$ , jednakże w niższej temperaturze – 50 i 21°C oraz w odpowiednio dłuższym czasie – 24 i 96 h, pozwoliło uzyskać podobne rezultaty w prowadzonym sekwencyjnie procesie hydrolizy enzymatycznej – 0,433 oraz 0,412 g cukrów redukujących  $\cdot \text{g}^{-1}$  surowca. Wykazano ponadto, że we wszystkich trzech badanych temperaturach obróbki najkorzystniejsze okazało się zastosowanie wodorotlenku wapnia w dawce 0,1 g  $\cdot \text{g}^{-1}$  substratu. Za optymalne parametry procesu uznano: stężenie  $\text{Ca(OH)}_2$  – 0,1 g  $\cdot \text{g}^{-1}$  biomasy, temperaturę – 50°C, czas – 24 h. Korzystniejsza wydajność uwalniania cukrów mogła być spowodowana większą podatnością na wstępną degradację i hydrolizę polisacharydów prosa różgowego, w porównaniu ze słomą rzepakową, a także zastosowaniem wyższej temperatury obróbki oraz dłuższym jej czasem, gdy była prowadzona w łagodniejszych warunkach temperaturowych.

## PODSUMOWANIE

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na konieczność stosowania obróbki wstępnej w procesie przetwarzania surowców lignocelulozowych oraz potwierdzają przydatność obróbki alkalicznej słomy, w szczególności z udziałem NaOH, do wstępnej degradacji substratu lignocelulozowego, przygotowywanego do fermentacji etanolowej.

Zastosowanie NaOH pozwoliło na uzyskanie korzystniejszych efektów niż z udziałem  $\text{Ca(OH)}_2$ . Hydroliza enzymatyczna substratu po wstępnej obróbce w warunkach optymalnych wyznaczonych na podstawie powierzchni odpowiedzi (0,15 g NaOH  $\cdot \text{g}^{-1}$  s.s. słomy rzepakowej, temperatura 72°C, czas 6,6 h) spowodowała uwolnienie 30,4 g cukrów  $\cdot \text{dm}^{-3}$  hydrolizatu po 48 h reakcji. Po hydrolizie składników słomy po obróbce z udziałem  $\text{Ca(OH)}_2$  w warunkach – 0,14 g  $\text{Ca(OH)}_2 \cdot \text{g}^{-1}$  s.s. substratu, 74°C, 3,2 h (wyznaczonych jak wyżej) osiągnięto 27,7 g cukrów  $\cdot \text{dm}^{-3}$  medium poreakcyjnego. Skuteczność obróbki wstępnej z udziałem NaOH w głównej mierze uzależniona jest od zastosowanego dodatku wodorotlenku oraz temperatury, w mniejszym stopniu od czasu. Z kolei efektywność obróbki wstępnej z udziałem  $\text{Ca(OH)}_2$  zależy głównie od wielkości dawki wodorotlenku, natomiast wpływ temperatury i czasu procesu jest mniej istotny. Wydajność procesu hydrolizy enzymatycznej wyznaczona na podstawie udziału dostępnej celulozy i hemiceluloz w materiale natywnym wyniosła odpowiednio: 52,3 i 47,7% wartości teoretycznej i była większa od wydajności hydrolizy kontrolnej (16%), odpowiednio: 3,3 i 2,9-krotnie.

**PIŚMIENNICTWO**

- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J., 2010, Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, 101, 4851–4861.
- AOAC Official Method 2002.04 – Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber.
- Bak J.S., Ko J.K., Han Y.H., Lee B.C., Choi I.G., Kim K.H., 2009. Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 100, 1285–1290.
- Chen M., Zhao J., Xia L., 2009. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass Bioenergy*, 33, 1381–1385.
- da Costa Sousa L., Chundawat S.P.S., Balan V., Dale B.E., 2009. ‘Cradle-to-grave’ assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Environmental Biotechnology* 20, 339–347.
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 100, 10–18.
- <http://www.ekoenergia.pl>
- Ledakowicz S., Krzystek L., 2005. Wykorzystanie fermentacji metanowej w utylizacji odpadów przemysłu rolno-spożywczego. *Biotechnologia*, 3 (70), 165–183.
- McIntosh S., Vancov T., 2010. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 101, 6718–6727.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31 (3), 426–428.
- Nlewem K.C., Thrash Jr., M.E., 2010. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Bioresour. Technol.*, 101, 5426–5430.
- Pérez J.A., Ballesteros I., Ballesteros M., Sáez F., Negro M.J., Manzanares P., 2008. Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*, 87, 3640–3647.
- PN-EN ISO 13906 – Pasze – Oznaczanie zawartości włókna kwaśnodetergentowego (ADF) i ligniny kwaśnodetergentowej (ADL).
- Podkówka W., 2004. Biopaliwo-Gliceryna-Pasza z rzepaku. Bydgoszcz, 37–41, 194–206.
- Saha B.C., Cotta M.A., 2007. Enzymatic hydrolysis and fermentation of lime pretreated wheat straw to ethanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, 913–919.
- Sánchez Ó.J., Cardona C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.*, 99, 5270–5295.
- Sims R.E.H., Mabee W., Saddler J.N., Taylor M., 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour. Technol.*, 101, 1570–1580.
- Taherzadeh M.J., Karimi K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1621–1651.
- Xu J., Cheng J.J., Sharma-Shivappa R.R., Burns J.C., 2010. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresour. Technol.*, 101, 2900–2903.
- Zhang Y.-H.P., 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 367–375.

## THE INFLUENCE OF DEGRADATION CONDITIONS OF RAPE STRAW POLYSACCHARIDES ON FERMENTABLE SUGARS EFFICIENCY

**Abstract.** Research evaluating the impact of alkali pretreatment of rape straw on the effectiveness of enzymatic hydrolysis of polysaccharides was carried out. The experiments were planned using Statistica program – a Box-Behnken design. The pretreatment conditions tested were: temperature 60–80°C, reaction time 2–8 h and alkali (NaOH or Ca(OH)<sub>2</sub>) proportion 0,05–0,2 g · g<sup>-1</sup> d.m. of substrate. The effectiveness of the used methods was evaluated on the basis of the amount of reducing sugars released during subsequent 48-hour enzymatic hydrolysis. The optimization conducted based on reducing sugars concentration indicated the following pretreatment conditions: NaOH in the proportion 0,15 g · g<sup>-1</sup> d.m. of substrate, temperature 72°C, time 6,6 h and Ca(OH)<sub>2</sub> in the proportion 0,141 g · g<sup>-1</sup> d.m. of substrate, temperature 74°C, time 3,2 h, which allowed to obtain reducing sugars concentration in hydrolysates 30,4 and 27,7 g · dm<sup>-3</sup>, respectively.

**Key words:** lignocellulose, rape straw, pretreatment, enzymatic hydrolysis, bioethanol

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2011

For citation – Do cytowania: Świątek M., Lewandowska M., Świątek K., Bednarski W., 2011. Wpływ warunków degradacji polisacharydów słomy rzepakowej na efektywność pozyskiwania cukrów fermentujących. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (2), 5–16.





## ZWIĘKSZENIE ZDOLNOŚCI BIOSYNTETYZY DIHYDROKSYACETONU PRZEZ BAKTERIE *GLUCONACETOBACTER XYLINUS* ZA POMOCĄ MUTAGENIZACJI PROMIENIOWANIEM UV

Stanisław Błażej, Lidia Stasiak-Różańska, Krzysztof Markowski,  
Edyta Lipińska

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności  
SGGW w Warszawie

**Streszczenie.** Przeprowadzono badania nad wykorzystaniem promieniowania ultrafioletowego do otrzymania mutantów *Gluconacetobacter xylinus*. Celem pracy było uzyskanie szczepu *G. xylinus* o zwiększonej zdolności biotransformacji glicerolu do dihydroksyacetonu (DHA). Zastosowano zróżnicowane czasy ekspozycji szczepu rodzicielskiego na promieniowanie UV, które wynosiły 30, 45, 60 lub 90 sekund. Wyizolowane mutanty wykorzystano do przeprowadzenia biotransformacji glicerolu w DHA. Produkty reakcji oznaczono kolorymetrycznie przy długości fali 550 nm. Najlepszy z mutantów syntetyzował 18,00 mg DHA · cm<sup>-3</sup>, czyli o 32% DHA · cm<sup>-3</sup> więcej niż szczep rodzicielski.

**Słowa kluczowe:** *Gluconacetobacter xylinus*, mutagenizacja, promieniowanie UV, dihydroksy aceton

### WSTĘP

Zdolność drobnoustrojów do przeprowadzania biotransformacji różnych związków i wydzielania produktów tych przemian jest cechą powszechnie wykorzystywaną w wielu gałęziach przemysłu. Znalazła ona również zastosowanie w produkcji dihydroksyacetonu (DHA) [Erni i in. 2006, Gätgens 2007]. Ten nietoksyczny związek, który jest najprostszą znaną ketotriozą, znajduje zastosowanie m.in. w przemyśle kosmetycznym (aktywny składnik preparatów brązujących skórę) [Schmid i in. 2007], spożywczym (suplement diety, substancja słodząca) [Obeid i in. 2006, Omar i in. 2005] oraz medycynie (leczenie choroby vitiligo) [Misterska i in. 2009]. Dihydroksyaceton produkowany jest obecnie

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Stanisław Błażej, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C bud. 32, 02-787 Warszawa, e-mail: stanislaw\_blazejak@sggw.pl

wyłącznie metodą biotechnologiczną, która polega na częściowym utlenianiu propano-1,2,3-triolu (pot. glicerolu) przez wyselekcjonowane szczepy bakterii octowych [Dubin i in. 2007, Erni i in. 2006]. Reakcja katalizowana jest przez dehydrogenazę glicerolową (GlyDH, EC 1.1.99.22) w warunkach optymalnych dla wzrostu bakterii octowych [Xu i in. 2009]. Enzym ten jest związany z błoną cytoplazmatyczną bakterii, a jego centrum aktywne umiejscowione jest w przestrzeni peryplazmatycznej. Taka lokalizacja pozwala na bezpośrednie wydzielanie produktu do środowiska reakcji, bez udziału mechanizmów transportowych obecnych w komórce bakterii [Mishra i in. 2008, Gätgens i in. 2007].

Jednym z najważniejszych zadań badawczych realizowanych przez biotechnologów jest ciągła praca nad zwiększaniem wydajności biotransformacji prowadzonych przez drobnoustroje. Wzrost stężenia otrzymywanych produktów można uzyskać poprzez selekcję szczepów mikroorganizmów, dobór warunków optymalnych dla procesu (temperatury, składu podłoża, pH, stopnia napowietrzania), a także modyfikację genomu szczepów rodzicielskich [Hu i in. 2010, Xu i in. 2009, Gätgens i in. 2007]. Indukcja zmian w kodzie genetycznym bakterii może powodować zwiększenie produkcji pożądaných substancji. Mutacje występują w środowisku naturalnym z bardzo niską częstotliwością [Gniewosz 2003]. Można ją zwiększyć przez zastosowanie czynników mutagennych – chemicznych lub fizycznych [Hu i in. 2010, Gätgens i in. 2007]. Jednym z fizycznych czynników indukujących mutację jest promieniowanie ultrafioletowe [Hu i in. 2010].

## CEL

Celem pracy było zwiększenie zdolności biosyntezy dihydroksyacetonu przez bakterie octowe z gatunku *Gluconacetobacter xylinus* w wyniku mutagenizacji promieniowaniem UV.

## MATERIAŁY I METODY

W badaniach zastosowano szczep bakterii octowych *Gluconacetobacter xylinus* nr 125 pochodzący z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Zakładu Mikrobiologii Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie.

### Podłoża

Podłoże stałe do wzrostu *G. xylinus*: Wort Agat Merck, nr kat.: 1.05448.0500, wzbogaczone kwasem octowym 10 g · dm<sup>-3</sup> oraz alkoholem etylowym 30 g · dm<sup>-3</sup>.

Podłoże płynne do namnażania *G. xylinus*: ekstrakt drożdżowy 30 g · dm<sup>-3</sup>, alkohol etylowy 20 g · dm<sup>-3</sup>.

Podłoże płynne do aktywacji GlyDH: glicerol 20 g · dm<sup>-3</sup>, ekstrakt drożdżowy 5 g · dm<sup>-3</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g · dm<sup>-3</sup>.

Podłoże stałe do selekcji mutantów: agar 20 g · dm<sup>-3</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,5 g · dm<sup>-3</sup>, ekstrakt drożdżowy 5 g · dm<sup>-3</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 g · dm<sup>-3</sup>, glicerol 50 lub 100 g · dm<sup>-3</sup>.

Podłoże do biotransformacji: glicerol 10 g · dm<sup>-3</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,5 g · dm<sup>-3</sup>, ekstrakt drożdżowy 5 g · dm<sup>-3</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 g · dm<sup>-3</sup>.

Kwasowość czynna wszystkich podłoży wynosiła 5,0.

### Warunki hodowli oraz biotransformacji

Hodowlę namnażającą komórek *G. xylinus* (szczepu dzikiego oraz mutantów) prowadzono w objętości 50 cm<sup>3</sup> podłoża w temperaturze 28°C przez 24 godziny na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej (200 rpm). Następnie przenoszono 1% v/v zawiesiny komórek *G. xylinus* do 50 cm<sup>3</sup> podłoża aktywującego GlyDH i inkubowano w temperaturze 28°C przez 48 godzin. Po tym czasie pobierano 2% v/v zawiesiny i prowadzono biotransformację w objętości 50 cm<sup>3</sup> w temperaturze 28°C przez 96 godzin metodą wstrząsaną.

### Mutagenizacja *G. xylinus* promieniowaniem UV

W celu ustalenia liczby żywych komórek bakterii, znajdujących się w 1 cm<sup>3</sup> hodowli namnażającej (jtk · cm<sup>-3</sup>), wykonano posiewy powierzchniowe z rozcieńczeń 10<sup>-4</sup>–10<sup>-6</sup> w trzech równoległych powtórzeniach. Mutagenizacji poddano 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny komórek *G. xylinus*, pochodzących z 24-godzinnej hodowli namnażającej, rozcieńczonej w zakresie 10<sup>-4</sup>–10<sup>-6</sup> razy. Próbkę traktowano promieniowaniem UV o długości fali 254 nm przez czas 30, 45, 60 lub 90 sekund (czas ustalony doświadczalnie, wyniki niepublikowane). Źródłem promieniowania była lampa typu PHILIPS TUV 30 W/G30T8 oddalona od próby o 45 cm. Po tym czasie próby inkubowano w ciemni przez 45 minut w celu uniemożliwienia fotoreaktywacji. Następnie 0,1 cm<sup>3</sup> zmutagenizowanej zawiesiny bakterii posiano na podłoże stałe i inkubowano przez 72 godziny w temperaturze 28°C. Obliczono procentową przeżywalność komórek *G. xylinus* w próbach poddanych mutacji w porównaniu z próbą kontrolną, na którą nie działano promieniami UV. Do dalszych badań wybrano potencjalne mutanty, których przeżywalność mieściła się w przedziale 1–5% [Gniewosz 2003].

### Selekcja mutantów

Kierując się właściwościami redukującymi DHA, do selekcji mutantów zastosowano szybką metodę oceny zdolności wytwarzania dihydroksyacetonu. Zasada metody opierała się na barwnej reakcji DHA z jonami miedzi obecnymi w odczynniku Fehlinga. Wybrane (potencjalne) mutanty wysiano powierzchniowo na podłoże stałe selekcyjne. Posiewy wykonano w dwóch seriach, pierwszą inkubowano przez trzy doby, a drugą dwa razy dłużej. Otrzymane po inkubacji kolonie pokrywano warstwą odczynnika Fehlinga i obserwowano zmianę barwy odczynnika z niebieskiej na żółtą, co świadczyło o obecności DHA w podłożu. Na podstawie wielkości stref zabarwienia oraz intensywności barwy określono potencjalne zdolności produkcji dihydroksyacetonu. Do dalszych badań wybrano szczepy bakterii, które były otoczone największą strefą zabarwienia o intensywnie żółtej barwie.

### Oznaczanie stężenia DHA

Stężenie DHA w podłożu produkcyjnym oznaczono metodą spektrofotometryczną [Tkáč i in. 2001]. Próbkę o objętości 2 cm<sup>3</sup> łączono z taką samą objętością kwasu 3,5-dinitrosalicylowego. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 100°C. W tym czasie DHA redukował grupy nitrowe kwasu 3,5-dinitrosalicylowego do grup aminowych, a sam utleniał się do kwasu 1,3-dihydroksypropionowego. Aminowe pochodne utworzone podczas tej reakcji zabarwiają roztwór na pomarańczowo. Intensywność zabarwienia zależała od stężenia DHA w próbce. Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali 550 nm i przeliczano na stężenie DHA wyrażone w mg · cm<sup>-3</sup>, korzystając z równania regresji

( $y = 0,0005x - 0,0539$ , gdzie  $y$  – absorbancja,  $x$  – stężenie DHA  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), charakteryzującego krzywą standardową sporządzoną na podstawie pomiaru absorbancji standardowych roztworów DHA o stężeniach 100–1100  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Oznaczenia wykonano w 3 seriach, każdy pomiar w 3 równoległych powtórzeniach.

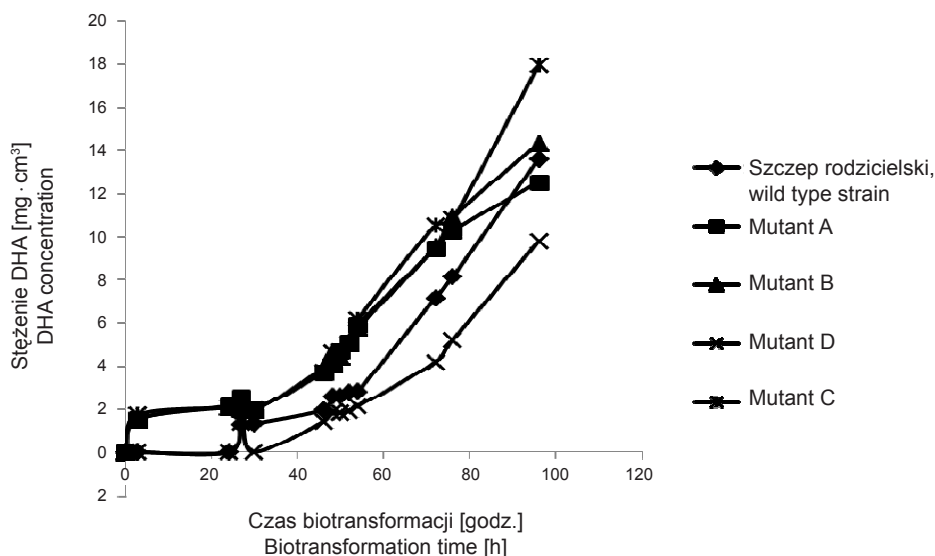
## WYNIKI I DYSKUSJA

Bakterie *G. xylinus* poddane mutagenizacji wykazały wysoką wrażliwość na działanie promieniowania UV. Liczbę przeżywających bakterii po działaniu promieniowania UV przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba jtk  $\cdot \text{cm}^{-3}$  zawiesiny *G. xylinus* po mutagenizacji promieniowaniem UV  
Table 1. Number of colony forming units per  $\text{cm}^{-3}$  (ncf  $\cdot \text{cm}^{-3}$ ) suspension *G. xylinus* after UV mutagenization

Czas mutagen. [sek.] Time of mutagenization [s]	0	30	45	60	90
Rozcieńczenia Dilutions	Liczba jtk $\cdot \text{cm}^{-3}$ (ncf $\cdot \text{cm}^{-3}$ )				
$10^{-4}$	>300	>300	>300	>300	94
	>300	>300	>300	>300	80
	>300	>300	>300	>300	169
$10^{-5}$	>300	0	11	>300	46
	>300	0	8	279	68
	>300	0	13	196	88
$10^{-6}$	81	21	3	0	3
	90	25	0	0	5
	69	15	2	0	2

Do dalszych badań wybrano 15 czystych kultur bakterii *G. xylinus* o najwyższym prawdopodobieństwie wystąpienia mutacji. Bakterie pobrano z płytek, na których nastąpiła największa redukcja liczebności komórek (45 sek. UV;  $R=10^{-6}$ , 90 sek. UV;  $R=10^{-6}$ ). Na podstawie otrzymanych wyników (tab. 1) można stwierdzić, że zastosowany czas mutagenizacji był wystarczający do zredukowania przeżywalności bakterii do założonego poziomu 1–5%. Wybrane (potencjalne) mutanty przesiano na podłoże selekcyjne. Do dalszych badań wybrano cztery szczepy (oznaczone A, B, C, D), wokół których zaobserwowano największą strefę zabarwienia podłoża po reakcji z odczynnikiem Fehlinga. Ostatni etap badań obejmował biotransformację glicerolu do DHA przez szczep rodzicielski oraz mutanty A, B, C i D. Zmiany stężenia dihydroksyacetonu podczas 96-godzinnej procesu biotransformacji glicerolu z udziałem komórek rodzicielskiego szczepu bakterii *G. xylinus* oraz komórek mutantów przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Zmiany stężenia dihydroksyacetonu w podłożach produkcyjnych podczas biotransformacji glicerolu przez rodzicielski szczep *G. xylinus* oraz mutanty A, B, C, D

Fig. 1. Changes in DHA concentration in media during the biotransformation of glycerol by the wild type strain *G. xylinus* and mutants A, B, C, D

Po zakończeniu pierwszej doby procesu stężenie DHA w podłożach ze szczepami zmutowanymi A, B lub C wynosiło blisko  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ . W tym samym czasie szczep dziki oraz mutant D nie wykazywały jeszcze zdolności do produkcji DHA (rys. 1). W kolejnych godzinach biotransformacji zaobserwowano wyraźne oraz istotne statystycznie różnice pomiędzy zawartością dihydroksyacetonu w podłożach z poszczególnymi szczepami. Mutanty A oraz B wykazały podobną zdolność produkcji DHA, która była istotnie większa w porównaniu ze szczepem rodzicielskim. Po 72 godzinach reakcji zawartość DHA wytworzona przez szczep rodzicielski wynosiła  $7,2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ . W tym samym czasie komórki mutantów A i B uwolniły do podłoża odpowiednio  $9,45$  i  $9,5 \text{ mg DHA} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Po 96 godzinach reakcji stężenie DHA w podłożach produkcyjnych było najwyższe dla mutantu C i wynosiło  $18 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ , a dla mutantu B  $14 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ , podczas gdy szczep rodzicielski wytworzył  $13,6 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ , natomiast mutant A  $12,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Najniższe stężenie dihydroksyacetonu ( $10 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) uzyskano w wyniku biotransformacji prowadzonej z użyciem mutantu D, dlatego przypuszcza się, że szczep ten w krótkim czasie utracił cechy pozyskane w wyniku mutacji.

Mutacja innego szczepu bakterii octowych *Gluconobacter oxydans*, wykorzystująca promieniowanie UV, pozwoliła uzyskać szczep, który w podłożu z początkową zawartością glicerolu  $2,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  przekształcił ten substrat w DHA z przeszło 90% wydajnością po 72 godzinach biotransformacji [Hu i in. 2010]. Wysoka wydajność biosyntezy DHA miała związek w warunkami procesu, bowiem miał on charakter półciągły i przebiegał w bioreaktorze, który zapewniał dostarczenie odpowiedniej porcji tlenu, niezbędnej do podtrzymania aktywności metabolicznej bakterii. Inna mutacja [Li i in. 2010], polegała na wprowadzeniu do komórek *Gluconobacter oxydans* plazmidu, który zawierał gen ko-

dujący hemoglobinę. Taka modyfikacja pozwoliła na obniżenie zapotrzebowania na tlen podczas hodowli zmutowanych bakterii. Stężenie DHA uzyskane w wyniku biotransformacji glicerolu prowadzonej z udziałem szczepu zmutowanego wynosiło ok.  $7 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Szczep rodzicielski wytworzył w tym czasie ok.  $5 \text{ mg DHA} \cdot \text{cm}^{-3}$  podłoża, w którym początkowe stężenie glicerolu wynosiło  $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , temperatura procesu  $30^\circ\text{C}$ , a pH 6,0 [Li i in. 2010].

Z przeprowadzonych w minionych latach doświadczeń [Ma i in. 2010] wynika, że początkowe stężenie glicerolu w podłożu produkcyjnym, które jest optymalne do wzrostu bakterii octowych i produkcji DHA, powinno wynosić  $20\text{--}50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Stosowanie wyższych dawek substratu powoduje osłabienie wzrostu bakterii na skutek stresu hiperosmotycznego. Dodatkowo stwierdzono, że zawartość glicerolu rzędu  $90\text{--}120 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  uniemożliwia syntezę DHA [Ma i in. 2010]. Jednak prezentowane w niniejszej pracy wyniki badań sugerują, że aktywność metaboliczna uzyskanych mutantów (A, B, C), a także szczepu dzikiego, nie była hamowana przez wysokie początkowe stężenie substratu w podłożu. Uzyskane wyniki doświadczeń pozwalają przypuszczać, że zastosowana dawka promieniowania UV wywołała zmiany w genomie bakterii *G. xylinus*. W wyniku mutacji uzyskano stężenie DHA większe o 32% w porównaniu ze szczepem rodzicielskim. Zmiany te mogły być efektem mutacji punktowych, powodujących przesunięcie ramki odczytu [Schlegel 2004] lub innych.

## PODSUMOWANIE

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają wnioskować, że mutacja z wykorzystaniem promieniowania UV może być skutecznym sposobem zwiększenia zdolności utleniania glicerolu do dihydroxyacetonu o 32% przez bakterie octowe z gatunku *G. xylinus*. Czas działania czynnika mutagennego (45, 90 sek.) na komórki bakterii był wystarczający, aby wywołać zmiany w genomie tych mikroorganizmów. Dodatkowo można stwierdzić, że zaproponowana w pracy szybka metoda weryfikacji zdolności produkcji DHA, przebiegająca z użyciem odczynnika Fehlinga, może być stosowana do wstępnej selekcji mutantów pod kątem ich zdolności do wytwarzania DHA.

## LITERATURA

- Dubin A., Anioł A., Bielecki S., Borowicz P., Czarnik M., Kur J. W., Kuźmierkiewicz W., Pietrucha T., Sławeta R., Świtoński M., Torbicz W., Wieczorek M., 2007. Stan i kierunki rozwoju biogospodarki. MNiSW, Warszawa, 100–108.
- Erni B., Siebold C., Christen S., Srinivas A., Oberholzer A., Baumann U., 2006. Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 63, 890–900.
- Gätgens C., Degner U., Bringer-Meyer S., Herrmann U., 2007. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 553–559.
- Gniewosz M., 2003. Studia nad doskonaleniem *Aureobasidium pullulans* w produkcji pullulanu. Wyd. SGGW, Warszawa, 26–35.
- Hu Z. C., Liu Z. Q., Zheng Y. G., Shen Y. C., 2010. Production of 1, 3-Dihydroxyacetone from Glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 340–345.

- Li M. H., Wu J., Liu X., Lin J. P., Wei D. Z., Chen H., 2010. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.*, 101, 8294–8299.
- Ma L., Lu W., Xia Z., Wen J., 2010. Enhancement of dihydroxyacetone production by a mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Biochem. Eng. J.*, 49, 61–67.
- Mishra R., Jain S. R., Kumar A., 2008. Microbial production of dihydroxyacetone. *Biotechnol. Adv.*, 26, 293–303.
- Misterska M., Szulczyńska-Gabor J., Żaba R., 2009. Etiopatogeneza, obraz kliniczny i leczenie bielactwa. *Post. Dermatol. Alergol.*, 4, 212–223.
- Obeid O.A., Jamal Z.M., Hwalla N., Emery P.W., 2006. The effect of glutamine and dihydroxyacetone supplementation on food intake, weight gain, and postprandial glycogen synthesis in female Zucker rats. *Nutr.*, 22, 794–801.
- Omar A., Bittar S., Hwalla N., 2005. Effect of diet supplementation with glutamine, dihydroxyacetone, and leucine on food intake, weight gain, and postprandial glycogen metabolism of rats. *Nutr.*, 21, 224–229.
- Schlegel H. G., 2004. *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa, 406–409, 545–546.
- Schmid D., Belser E., Zulli F., 2007. Self-tanning based on stimulation of melanin biosynthesis. *Cosm. Toilet.*, 6, 55–60.
- Tkáč J., Navrátil M., Šturdík E., Gemeiner P., 2001. Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor. *Enz. Microbiol. Technol.*, 28, 383–388.
- Xu X., Chen X., Jin M., Wu X., Wang X., 2009. Advance in dihydroxyacetone production by microbial fermentation. *Chin. J. Biotechnol.*, 25, 903–908.

## INCREASE THE ABILITY OF BIOSYNTHESIS OF DIHYDROXYACETONE BY *GLUCONACETOBACTER XYLINUS* BY UV MUTAGENESIS

**Abstract.** UV mutagenesis was used to obtain *Gluconacetobacter xylinus* mutants. The aim of this study was to attain a mutant able to produce high concentration of dihydroxyacetone. Exposure times were set to: 30, 45, 60 and 90 seconds. Mutants were isolated. The biotransformation of glycerol to DHA with use of these mutants was detected spectrophotometrically at 550 nm. The most active mutants was synthesizing 18,00 mg DHA · cm<sup>-3</sup>, what was 32% DHA · cm<sup>-3</sup> more than the wild type strain.

**Key words:** *Gluconacetobacter xylinus*, mutagenesis, UV radiation, dihydroxyacetone

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2011

For citation – Do cytowania: Błażej S., Stasiak-Różańska L., Markowski K., Lipińska E., 2011. Zwiększenie zdolności biosyntezy dihydroksyacetonu przez bakterie *Gluconacetobacter xylinus* za pomocą mutagenizacji promieniowaniem UV. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (2), 17–24.





## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *CLOSTRIDIUM* SPP. FROM NATURAL SAMPLES THAT PERFORMS EFFECTIVE CONVERSION OF GLYCEROL TO 1,3-PROPANEDIOL

Katarzyna Leja, Kamila Myszka, Piotr Kubiak,  
Joanna Wojciechowska, Agnieszka K. Olejnik-Schmidt,  
Katarzyna Czaczyk, Włodzimierz Grajek

Poznań University of Life Sciences

**Abstract.** Indigenous bacteria in the natural environment can product a wide range of metabolites more efficiently. The aim of this work was to isolate from the natural environment non-pathogenic *Clostridium* strains that are able to convert glycerol to 1,3-propanediol and other metabolites of potential uses in industry. The effective methods of selection and maintenance of anaerobic cultures in the laboratory conditions were also investigated. Samples were pre-cultured on modified PY medium consisted 50 g/l of glycerol. Isolated colonies growth on TSC medium were screened on the basis of morphological characters typical for *Clostridium* sp. Isolated bacterial strains were allowed to growth in selective media such as RCM and modified PY. The metabolites of bacteria were investigated by the HPLC technique. The bacteria strains were identified by 16S rRNA technique. The highest percentage of isolates of the genus *Clostridium* were obtained from excrements of animals, compost, and silages. Nearly 60% were able to convert glycerol to 1,3-propanediol. The highest capacity for utilization of glycerol to 1,3-propanediol was observed in case of the species of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordelli*. The most of examined microflora were also able to short-chain organic acids and ethanol synthesis.

**Key words:** *Clostridium* spp., isolation, 1,3-propanediol, microflora of natural environment, short-chain organic acids

### INTRODUCTION

The natural environment offers microorganisms which may be used in many branches of industry. Isolation of such microflora and investigation the possibility of its industrial application is an important step to replace the chemical synthesis by the biotechnological

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Corresponding author – Adres do korespondencji: Katarzyna Leja, Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, e-mail: katleja@up.poznan.pl

processes. The chemical syntheses generate a lot of by-products which pollute natural environment. Moreover, it is lack of specificity. These problems can be overcome by using the biotechnological methods [Kaeberlein et al. 2002].

Strains isolated from the natural environment (bottom sediments, composts, soils, and excrements of domestic and wild animals) possess metabolites production capability. Many microbial strains, capable of industry useful metabolites production, are available commercially, among other from the ATTC collection. However, indigenous bacteria in the soil can produce a wide range of metabolites more efficiently [Lopez et al. 2004]. An example of the end-products for different microorganisms during glycerol degradation are presented in the Figure 1.

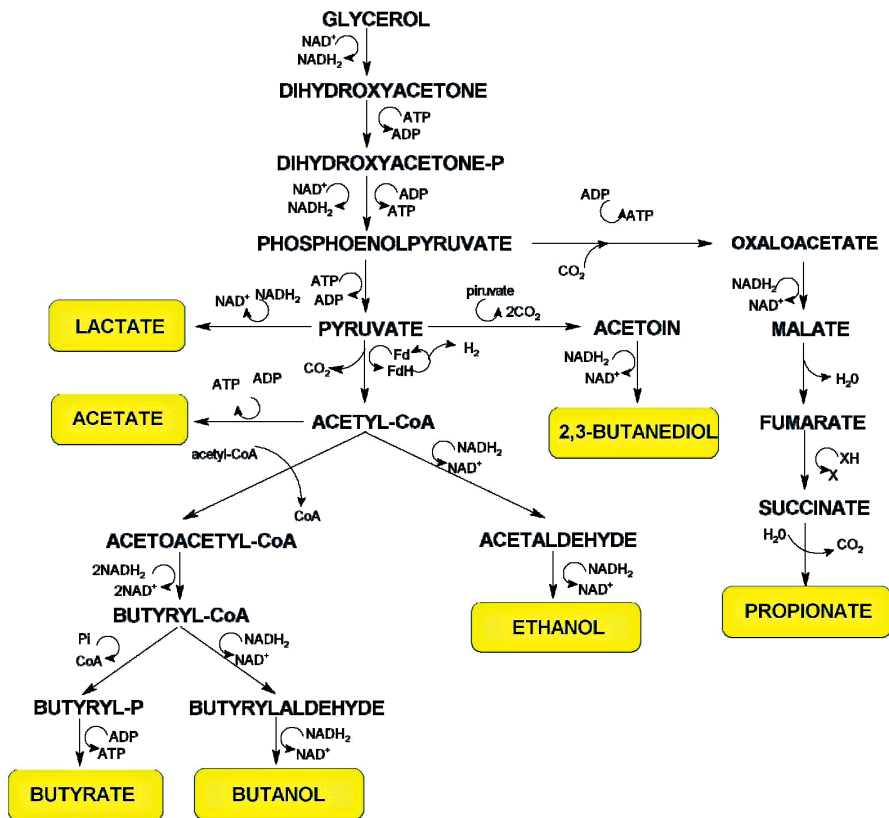
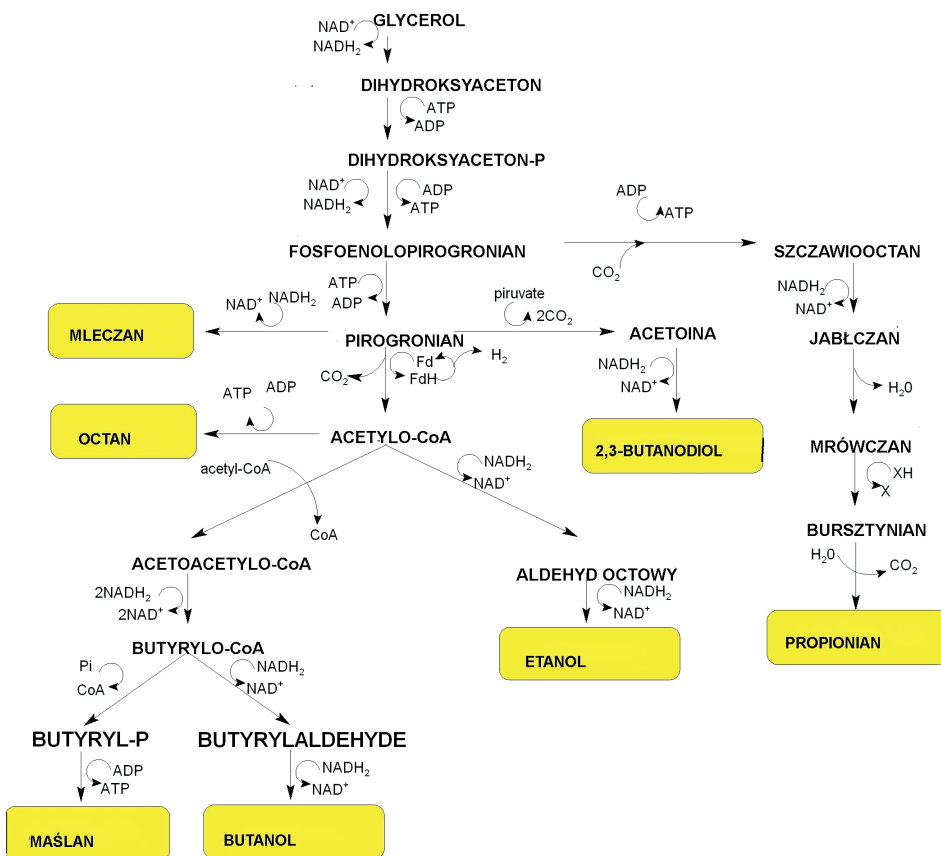


Fig. 1. The end-products from the conversion of glycerol by microbiological way [da Silva et al. 2009]



Rys. 1. Produkty końcowe mikrobiologicznej konwersji glicerolu [da Silva et al. 2009]

An important group of environmental microorganisms is *Clostridium* spp. The clostridia are a heterogeneous group of bacteria which share a small number of common features: they are anaerobic, Gram-positive, endospore-forming rods, without the capacity for dissimilatory sulfate reduction. The species have wide biotechnological potential, among other in the conversion of renewable biomass to commodity chemicals, and in produce potent toxins which are causative agents of disease. Clostridia are able to metabolize an extremely wide range of organic molecules, among others sugars and other carbohydrates, organic acids, alcohols, aromatic compound, amino acids, amines, purines, and pyrimidine. They can be used to solvent (butane, acetone, and ethanol) and acids (succinic, acetic, butyric, and lactic) produce [Mitchell 2001]. The *Clostridium* sp. are also able to 1,3-propanediol (1,3-PD) biosynthesis. 1,3-PD, a typical product of glycerol fermentation. It is one of the most interesting raw materials for chemical industries due to its wide use in different fields, e.g. it is a valuable chemical intermediate applied in organic synthesis. It is also used as a monomer for the production of biodegradable polymers (polyesters, polyether, polyurethanes, etc.), cosmetics, lubricants, medicines, and as an intermediate for the synthesis of heterocyclic compounds [Menzel et al. 1997, Biebl et

al. 1999, Katrlík et al. 2007]. Recently, 1,3-PD is also used as a monomer to synthesize a new type of a polyester – polytrimethylene terephthalate [Biebl et al. 1999, Zeng and Biebl 2002, Liu et al. 2007, Zhang et al. 2007].

The aim of this work was to isolate from the natural environment non-pathogenic *Clostridium* strains that are able to convert glycerol to 1,3-PD and other metabolites of potential uses in industry. The effective methods of selection and maintenance of anaerobic cultures in the laboratory conditions were also investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of samples

Samples from excrements of animals and composts, composts and silages, samples from biogas works, soils, active sludge, rivers' sludge and wastes from food industry were collected from the Wielkopolska District during January – December 2010. Samples were collected in sterile plastic jars and stored in refrigerator until experimentations.

### Isolation of microorganisms and maintenance of cultures

Samples were pre-cultured on modified PY medium according to Biebl and Spöer [2002]. The modified PY medium consisted of (g/l): BactoPeptone 10; yeast extract 10; glycerol 50; CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0.96; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2; NaHCO<sub>3</sub> 20; NaCl 4. The pre-cultivation step was conducted under anaerobic condition using Anaerobic Jar with Gas Generating Kit (Oxoid, UK) at 30°C for 7 days. After incubation period, samples were pretreated at 80°C for 12 min., diluted with sterile solution of sodium chloride and then spread onto TSC agar plates (Biocorp, Poland). The plates were incubated for 24 h under anaerobic condition using Anaerobic Jar with Gas Generating Kit (Oxoid, UK) at the temperature of 30°C. Isolated colonies were screened on the basis of morphological characters (black colonies or black with a 2-4mm opaque white zone surrounding the colonies as a result of lecthinase activity). To make pure culture and maintain culture conditions for the bacteria, screened colonies were transferred on both TSC agar plates (BIOCORP, Poland) and RCM broth (BIOCORP, Poland).

### Screening of bacterial isolates for producing 1,3-PD

Isolated bacterial strains were allowed to growth in modified PY medium for 7 days at 30°C. After incubation period the broths were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The cell free supernatants was collected and used for estimation of 1,3-PD production via high liquid performance chromatography (HPLC) technique. In the experiments Hewlett Packard system consisted of autosampler, pump and refractive index detector was carried out. Analysis were performed isocratically at flow rate 0.6ml/min. at 65°C, on column Aminex HPX-87H 300x7.8 (BIO-RAD). 0.5mN H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as a mobile phase was used. Standards were applied to identify peaks in chromatograms, and peak areas were used to determine the samples concentration. It was conducted by computer integration (ChemStation, Agilent) operated in the mode of external standards.

### Sequencing and phylogenetic analysis

Total DNA from bacteria was extracted using Genomie Mini AX Bacteria Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) after initial incubation in 50 mg/mL lysozyme (Sigma)

for 1 h at 37°C. Sequences encoding small subunit of rRNA were amplified in PCR reaction using primers SDBact0008aS20 and SUniv1492bA21 [Suau et al.1999]. PCR products were purified using Clean-up Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) and sequenced at Genomed, Warszawa, Poland with primers used for PCR and additionally for inner sequence with GTGCCAGCMGCCGCCCTAA primer. Obtained sequences were arranged into contigs and identified in BLAST service of the GenBank database [Altschul et al. 1990].

## RESULTS AND DISCUSSION

Despite a wide range available selective media for isolating specific groups of bacteria from food and clinical samples, there are relatively few media available for isolation anaerobic microflora colonizing natural samples. George et al. [1979], Karasawa et al. [1995], Barbirato et al. [1998], and Biebl and Spöer [2002] made an effort to developing media for *Clostridium* sp. However to date no medium has been extensively examined and accepted for routine isolation and maintenance of environmental isolates in laboratory. In this study, different plating media and different enrichment selective broths were tested according to their ability for isolation and enumeration of anaerobic bacteria of the genus of *Clostridium* from natural samples (our unpublished data). However, the procedure that gave the highest yield of isolates of *Clostridium* spp. from each tested samples consisted of selective enrichment PY and RCM broths followed by plating out onto TSC agar.

In the work all tested natural samples yielded *Clostridium* spp. isolates (Tab. 1). The highest percentage of isolates of the genus of *Clostridium* came from excrements of animals (726 isolates) and composts and silages (774 isolates). In addition in our study all bacterial strains were tested for their ability to grow with glycerol in the medium and to converse this substract to 1,3-PD. Of 2278 isolates tested nearly 60% fermented glycerol to 1,3-PD. Excrements of animals as well as compost and silages contained the highest number of isolates able to produce 1,3-PD (Tab. 1). Amplification and sequence analysis showed that all 1,3-PD-positive strains have a molecular profile consistent with *Clostridium* spp. (approximately 98% confidence). Isolates of the highest capacity for utilization of glycerol to 1,3-PD belonged to the species of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordelli*. Interestingly, the glycerol fermentation by these species has not been investigated.

In the study we also aimed to characterize the products of glycerol fermentation by examined *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordelli*. The work of Papanikolaou et al. [2004], González-Pajuelo et al. [2006], and Rehman et al. [2008] concluded that *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, and *Clostridium pasteurianum* obtained from the culture collection are able to convert glycerol to 1,3-PD and other metabolites, such as ethanol, acetic and butyric acids on the high level. In the literature there are any information concerns 1,3-PD production by microflora existed in natural environment. It is high probability that wild strains can product above mentioned metabolites in highest level.

Table 1. Samples processed and obtained isolates

Tabela 1. Źródła pozyskania izolatów

Materials Źródło izolacji	No of isolates of <i>Clostridium</i> spp Liczba izolatów <i>Clostridium</i> spp.	No of 1,3-PD-positive isolates of <i>Clostridium</i> spp. Liczba izolatów <i>Clostridium</i> spp. zdolnych do syntezy 1,3-PD
<b>excrements of animals</b> <b>odchody zwierzęce</b>	726	480
composts and silages komposty i oborniki	774	473
samples from biogas works próby z biogazowni	256	122
soils gleby	243	141
active sludge osady czynne	225	97
rivers' sludge osady rzeczne	31	9
wastes from food industry odpady z przem. spożywczego	23	22
<b>Total</b> <b>Całkowicie</b>	2278	1344

Table 2 performs the amounts of products formed per gram of glycerol fermented by selected microflora. 1,3-PD was the main product, but acetic acid, lactic acid, formic acid and ethanol were also formed. Isolates of *Clostridium bifermentans* obtained from silages showed 1,3-PD production at the level of approximately 9.8 g/l. These two isolates possess also ability to produce the lactic acid. The production of the lactic acid metabolite exceeded the value of 8,0 g/l. In most cases the production of 1,3-PD by isolates of *Clostridium bifermentans* obtained from soil crossed the value of 11.0 g/l, whereas the lactic acid was synthesized at lesser amount (Tab. 2). During glycerol fermentation these strains produced also acetic and formic acids. Similar trend was observed for *Clostridium sordelli*. The products of glycerol fermentation composed mainly of 1,3-PD (7.31 g/l) and lactic acid (5.21 g/l). In this experiment the amount of acetic acid, formic acid and ethanol crossed the level of 1.0g/l (Tab. 2). As it was mentioned, some bacteria strains, but only a few of all, are able to 1,3-PD biosynthesis. The conversion of glycerol to 1,3-PD is necessary for them because it provides energy for cell growth [Biebl et al. 1999]. Production of organic acids by microorganisms plays a key role in the process of controlling of appearance of other genus of bacteria in particular environment [Ishii et al. 2000]. Siragusa and Dickson [1992] stated that a small amount of short-chain organic acids reduced growth of coexisting non sporegenes microflora.

Table 2. Profile of metabolites of glycerol fermentation by selected *Clostridium* spp.  
Tabela 2. Profil metaboliczny fermentacji glicerolu przez wybrane szczepy *Clostridium*

Strain Szczep	Source of isolation Źródło izolacji	1,3-PD	Lactic acid Kwas mlekowy	Formic acid Kwas mrówkowy	Acetic acid Kwas octowy	Ethanol [g/l] Etanol
<i>Clostridium bifermentans</i>	silage obornik	8.71	4.58	1.13	1.48	2.43
<i>Clostridium bifermentans</i>	silage obornik	10.18	8.67	2.34	3.73	0.49
<i>Clostridium bifermentans</i>	silage obornik	9.78	8.19	1.94	3.81	nd
<i>Clostridium bifermentans</i>	soil gleba	16.98	3.23	0.28	1.46	0.46
<i>Clostridium bifermentans</i>	soil gleba	14.89	6.66	1.36	3.04	0.44
<i>Clostridium bifermentans</i>	soil gleba	12.88	1.29	1.77	2.17	nd
<i>Clostridium bifermentans</i>	soil gleba	11.94	1.34	2.33	5.23	1.93
<i>Clostridium bifermentans</i>	soil gleba	11.54	0.96	nd	1.67	nd
<i>Clostridium bifermentans</i>	soil gleba	11.34	7.17	1.76	2.65	1.73
<i>Clostridium sordelli</i>	silage obornik	7.31	5.21	1.08	1.62	1.33

nd – not detected

nd – nie wykryto

## CONCLUSION

Our data support the notion that the natural environment might be colonized by the strains which are industrially useful. Some of them are non-pathogenic and has an ability to converse glycerol to 1,3-PD and other metabolites, such as short-chain organic acids and alcohols. The best 1,3-PD producers were identified by the rRNA technique as *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordelli*. The improving of the effective methods of isolation and maintenance of bacterial cultures in the laboratory might increase the production of industrially useful metabolites. In further investigations we plan to optimize the composition of the culture medium and other cultivations condition to increase 1,3-PD production by selective bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

The paper was prepared within the framework of project no.01.01.02-00-074/09 co-funded by The European Union from The European Regional Development Fund within the framework of the Innovative Economy Operational Programme 2007–2013.

## REFERENCES

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–410.
- Barbirato F., Himmi E. H., Conte T., Bories A., 1998. 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind. Crops Products.*, 7, 281–289.
- Biebl H., Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D., 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 289–297.
- Biebl H., Spröer C., 2002. Taxonomy of the glycerol fermenting *Clostridia* and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 25, 491–497.
- da Silva G.P., Mack M., Contiero J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biot. Adv.*, 27, 30–39.
- George W. L., Sutter V. L., Citron D., Finegold S.M., 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 9(2), 214–219.
- González-Pajuelo M., Meynial-Salles I., Mendes F., Soucaille P., Vasconcelos I., 2006. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Appl. Environ. Microbiol.*, 4, 96–101.
- Ishii K., Fukui M., Takii S., 2000. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 768–777.
- Kaeberlein T., Lewis K., Epstein S.S., 2002. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science*, 296, 1127–1129.
- Karasawa T., Ikoma S., Yamakawa K., Nakamura S., 1995. A defined growth medium for *Clostridium difficile*. *Microbiol.*, 141, 371–375.
- Katrlík J., Vostiar I., Sefcovicová J., Tkáč J., Mastihuba V., Valach M., Stefuca V., Gemeiner P. A., 2007. A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388(1), 287–295.
- Liu H.J., Zhang D.J., Xu Y.H., Mu Y., Sun Y.Q., Xiu Z.L., 2007. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnol. Lett.*, 29, 1281–1285.
- Lopez M.J., Nichols N.N., Dien B.S., Moreno J., Bothast R.J., 2004. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 125–131.
- Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D., 1997. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 82–86.
- Mitchell W.J., General Biology and Physiology, [in:] *Clostridia: biotechnology and medical applications*, red. Bahl, H., Dürre, P., Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 2001, 49–65.
- Papanikolaou S., Fick M., Aggelis G., 2004. The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 79, 1189–1196.
- Rehman A., Matsumur A.M., Nomura N., Sato S., 2008. Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil bio-diesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. *Curr. Res. Bacteriol.*, 1, 7–16.
- Siragusa G.R., Dickson J.S., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *J. Food Science*, 57(2), 293–296.



- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D., Dore J., 1999. Direct analysis of genes encoding 16 S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within human gut. *App. Environ. Microbiol.*, 65(11), 4799–807.
- Zeng A.P., Biebl H., 2002. Bulk-Chemicals from Biotechnology: the case of microbial production of 1,3-propanediol and the new trends (in) Tools and applications of biochemical engineering science, red. Schügerl and A.-P. Zeng, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 74, 237–257.
- Zhang G.L., Maa B.B., Xua X.L., Chun L., Wang L., 2007. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Bioch. Eng. J.*, 37, 256–260.

## **IZOLACJA I IDENTYFIKACJA NOWYCH GATUNKÓW *CLOSTRIDIUM* SP. ZE ŚRODOWISKA NATURALNEGO ZDOLNYCH DO EFEKTYWNEJ KONWERSJI GLICEROLU DO 1,3-PROPANODIOLU I INNYCH METABOLITÓW**

**Streszczenie.** Szereg procesów metabolicznych jest efektywniej przeprowadzanych przez mikroflorę kolonizującą środowisko naturalne. Celem pracy była selekcja niepatogennych kultur bakterii z rodzaju *Clostridium* ze środowiska naturalnego zdolnych do konwersji glicerolu do 1,3-propanodiolu i innych metabolitów o znaczeniu przemysłowym. Badania dotyczyły także opracowania efektywnych procedur izolacji oraz hodowli mikroorganizmów beztlenowych w warunkach laboratoryjnych. Wstępną adaptację mikroflory obecnej w próbach środowiskowych przeprowadzono na podłożu PY zawierającym glicerol w stężeniu 50 g/l. Hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych w anaerostatach. Wyraźnie oddzielone kolonie o morfologii typowej dla *Clostridium* sp. na podłożu TSC posiewano na podłoża wybiórczo-namnażające RCM oraz PY. Zawartość metabolitów w płynie pohodowlanym oceniano za pomocą techniki HPLC. Identyfikacji gatunkowej dokonano metodą amplifikacji sekwencji kodującej 16S rRNA. Najwyższy odsetek kultur bakteryjnych *Clostridium* sp. pozyskano z odchodów zwierzęcych, kompostów i obornika. Blisko 60% uzyskanych izolatów wykazywało zdolność syntezy 1,3-propanodiolu z glicerolu. Najwyższą zdolnością do utylizacji glicerolu do 1,3-propanodiolu charakteryzowały się szczepy *Clostridium bifermentans* oraz *Clostridium sordelli*. Większość przebadanych drobnoustrojów wykazywała także zdolność do syntezy krótkołańcuchowych kwasów organicznych i etanolu.

**Słowa kluczowe:** *Clostridium* sp., izolacja, 1,3-propanodiol, mikroflora środowiska naturalnego, krótkołańcuchowe kwasy organiczne...

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2011

For citation – Do cytowania: LejaK., Myszka K., Kubiak P., Wojciechowska J., Olejnik-Schmidt A.K., CzaczykK., Grajek W., 2011. Isolation and identification of *Clostridium* spp. from natural samples that performs effective conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (2), 25–34.



## SPIS TREŚCI CONTENTS

**Magdalena Świątek, Małgorzata Lewandowska, Karolina Świątek,  
Włodzimierz Bednarski**

Wpływ warunków degradacji polisacharydów słomy rzepakowej  
na efektywność pozyskiwania cukrów fermentujących ..... 5  
The influence of degradation conditions of rape straw polysaccharides on  
fermentable sugars efficiency

**Stanisław Błażej, Lidia Stasiak-Róžańska, Krzysztof Markowski,  
Edyta Lipińska**

Zwiększenie zdolności biosyntezy dihydroksyacetonu  
przez bakterie *Gluconacetobacter xylinus*  
za pomocą mutagenizacji promieniowaniem UV ..... 17  
Increase the ability of biosynthesis of dihydroxyacetone  
by *Gluconacetobacter xylinus* by UV mutagenesis

**Katarzyna Leja, Kamila Myszka, Piotr Kubiak, Joanna Wojciechowska,  
Agnieszka K. Olejnik-Schmidt, Katarzyna Czaczyk, Włodzimierz Grajek**

Isolation and identification of *Clostridium* spp. from natural samples  
that performs effective conversion of glycerol to 1,3-propanediol ..... 25  
Izolacja i identyfikacja nowych gatunków *Clostridium* sp.  
ze środowiska naturalnego zdolnych do efektywnej konwersji  
glicerolu do 1,3-propanodiolu i innych metabolitów