

Dorota Orczyk, Daria Szymanowska-Powałowska

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

e-mail: orczyk.dorota@gmail.com

IZOLACJA BAKTERII Z RODZAJU *CLOSTRIDIUM* ZDOLNYCH DO KONWERSJI GLICEROLU DO 1,3-PROPANODIOLU I WYBÓR POŻYWKI PRODUKCYJNEJ DO ICH HODOWLI*

Streszczenie: Rozwijająca się produkcja biodiesla generuje duże ilości produktu odpadowego, jakim jest odpadowy glicerol. Mikrobiologiczna synteza 1,3-propanodiolu z odpadowego glicerolu jest korzystna z ekonomicznego i ekologicznego punktu widzenia. Celem niniejszej pracy był screening bakterii z rodzaju *Clostridium* zdolnych do wydajnej konwersji glicerolu do 1,3-propanodiolu. Wyizolowano 45 szczepów, z których większość okazała się bardzo dobrymi producentami 1,3-propanodiolu. Szczepy testowano na różnych pożywkach produkcyjnych, co pozwoliło na wytypowanie pożywki zapewniającej wysoką wydajność syntezy 1,3-propanodiolu. Szczególną uwagę zwrócono na rodzaj użytego surowca (glicerol czysty i odpadowy). Najlepszy zidentyfikowany szczep (*Clostridium butyricum* 1.1.) namnażano w hodowli bioreaktorowej.

Słowa kluczowe: *Clostridium* spp., izolacja bakterii, 1,3-propanodiol, konwersja glicerolu.

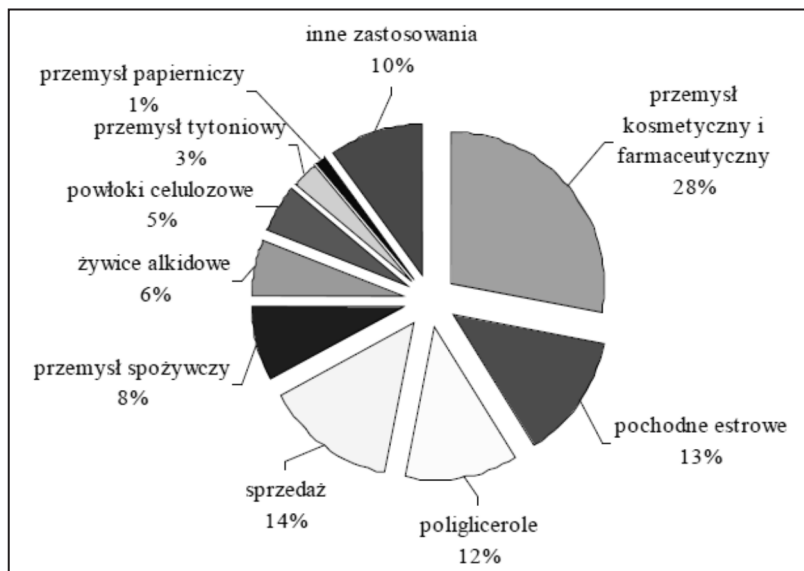
1. Wstęp

1.1. Glicerol – uciążliwy odpad czy cenny surowiec?

Glicerol (gliceryna, propanotriol) jest oleistą, bezbarwną, gęstą cieczą o słodkim smaku, w pełni mieszającą się z wodą. Zapotrzebowanie na ten surowiec jest obecne w różnych gałęziach przemysłu, choć często ograniczone ze względu na niedostateczną jego czystość. Glicerol jest wykorzystywany głównie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym (rys. 1) [Sulewski i in. 2005].

Na rysunku 1 przedstawiono zapotrzebowanie i zużycie glicerolu głównie w przemyśle kosmetycznym (środek zmiękczący, łagodzący, zapobiegający wysuszeniu, składnik past do zębów) i farmaceutycznym (lek nasercowy – nitroglicery-

* Praca została zrealizowana w ramach projektu badawczego PO IG 01.01.02-00-074/09 „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylovych” o akronimie „ZIELONA CHEMIA” realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.



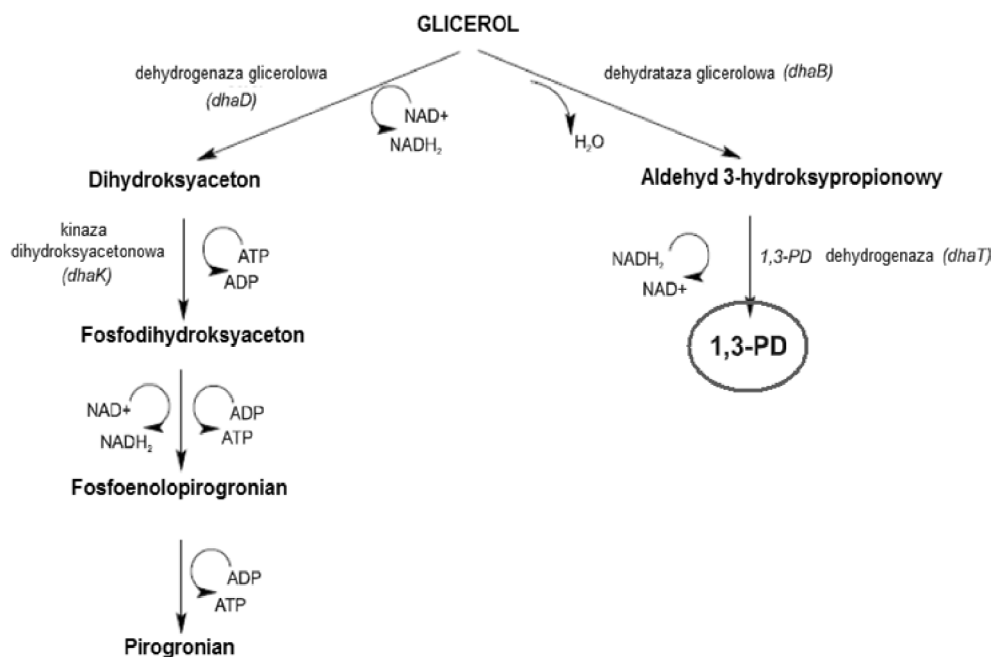
Rys. 1. Zapotrzebowanie na glicerol przez różne dziedziny gospodarki

Źródło: [Sulewski i in. 2005].

na, składnik syropów przeciwkaszlowych, maści i innych). Glicerol jest także szeroko stosowany w przemyśle spożywczym jako środek słodzący, nawilżający w wyrobach piekarniczych oraz rozpuszczalnik barwników [Sulewski i in. 2005]. Wymienione kierunki zastosowania są dowodem na przemysłową wartość tego surowca. Warto jednak zaznaczyć, że często wykorzystywany jest czysty glicerol, a nie glicerol odpadowy (produkt uboczny przy produkcji biodiesla). Natomiast obserwowany wzrost produkcji biodiesla niesie ze sobą poważny problem zagospodarowania tego odpadu poprodukcyjnego. W krajach Unii Europejskiej w roku 2010 wyprodukowano 12 mln ton biodiesla. W Polsce produkcja wynosiła 1,5 mln ton, z czego odpadowy glicerol stanowił 200-300 tys. ton [Gaca 2006; Markowska 2007]. Należy zaznaczyć, że trudność wykorzystania odpadowego glicerolu wynika z faktu, że poza glicerolem zawiera także inne substancje: wodę, wolne kwasy tłuszczowe, metanol, katalizatory, fosfolipidy, substancje barwne, białka, polisacharydy. Procentowy udział poszczególnych składników zależy od użytego surowca i stosowanej technologii [Sulewski i in. 2005]. Właśnie ze względu na złożony skład odpadowego glicerolu pojawia się konieczność jego oczyszczania (co generuje koszty) bądź też znalezienia atrakcyjnej alternatywy na jego zagospodarowanie. Jedną z możliwości jest wykorzystanie odpadowego glicerolu jako pożywki hodowlanej dla drobnoustrojów o potencjale przemysłowym. Jednym z przykładów jest wykorzystanie tego odpadu jako źródła węgla dla bakterii z rodzaju *Clostridium* i synteza 1,3-propanodiolu (1,3-PD).

1.2. Metabolizm glicerolu przez *Clostridium* spp.

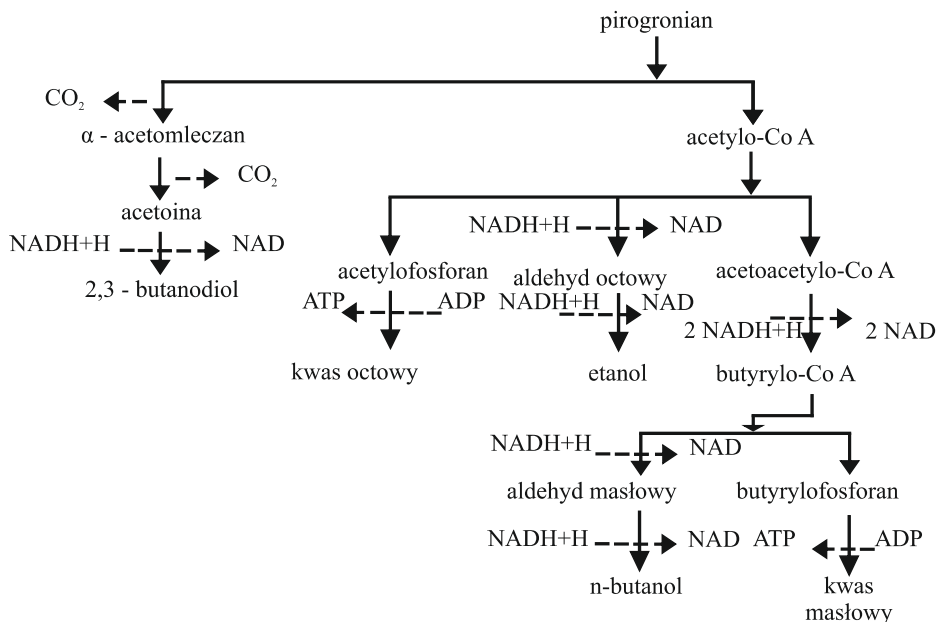
Znane są dwa główne szlaki przemian metabolicznych glicerolu przez Procaryota (rys. 2) [Kośmider, Czaczyk 2009].



Rys. 2. Schemat biochemicznej przemiany glicerolu w procesie fermentacji

Źródło: [Biebl i in. 1999].

Prawa strona szlaku na rys. 2 to tzw. ramię redukcyjne. Konwersja glicerolu do 1,3-PD przebiega tutaj dwuetapowo. W pierwszym następuje dehydratacja glicerolu. W efekcie uzyskuje się produkt pośredni – aldehyd 3-hydroksypropionowy. Etap ten jest katalizowany przez koenzym, witaminę B_{12} . Następnie dehydrogenaza 1,3-propanodiolowa, jako nośnik protonów (NAD^+), redukuje aldehyd 3-hydroksypropionowy do 1,3-propanodiolu [Drożdżyńska i in. 2011]. Geny kodujące wspomniane enzymy należą do operonu *dha* [Saxena i in. 2009]. Po lewej stronie rys. 2 znajduje się ramię oksydacyjne szlaku, przedstawiające konwersję glicerolu do pirogonianu, który następnie w procesie glikolizy jest metabolizowany do różnych produktów ubocznych. Proces dalszych przemian pirogonianu w sposób uproszczony został przedstawiony na rys. 3. Wśród produktów tego szlaku wyróżniamy: 2,3-butanodiol, kwas octowy, etanol, kwas masłowy, wodór i inne [Kośmider, Czaczyk 2009]. Produkcja końcowych metabolitów szlaku oksydacyjnego zależna jest nie tylko od rodzaju mikroorganizmu, który został wykorzystany w fermentacji, ale także od warunków jego hodowli i składu pożywki hodowlanej [Drożdżyńska i in. 2011].



Rys. 3. Końcowe produkty biochemicznej przemiany glicerolu w procesie mikrobiologicznej konwersji
 Źródło: [Kośmider, Czaczyk 2009].

1.3. 1,3-propanodiol – charakterystyka i zastosowanie

1,3-propanodiol znany także jako glikol trimetylenu, 1,3-dihydroksypropan, glikol propylenu lub propano-1,3-diol. Jest to związek organiczny, alkohol zawierający dwie grupy hydroksylowe, o wzorze cząsteczkowym: $C_3H_8O_2$.

Pozyskiwanie 1,3-PD jest uzasadnione dla wielu gałęzi przemysłu [Menzel i in. 1997; Biebl i in. 1999; Katrlík i in. 2007]. W przemyśle chemicznym wykorzystywany jest głównie jako monomer w produkcji poliestrów, smarów i rozpuszczalników organicznych. W przemyśle kosmetycznym – jako środek nawilżający i neutralizujący, a w przemyśle farmaceutycznym jako środek stabilizujący [Kośmider, Czaczyk 2009]. Ponadto zwiększające się zapotrzebowanie na poliestry i polipropyleny (PTT) przyczyniło się do konieczności zwiększenia produkcji 1,3-propanodiolu wykorzystywanego w syntezie poliuretanów. PTT jest biodegradowalnym polimerem stosowanym w produkcji tekstyliów, a także dywanów i tapicerek [Saxena i in. 2009]. Polimery otrzymywane w oparciu o 1,3-PD charakteryzują się odpornością na odkształcenia i dobrą rozciągliwością [Biebl i in. 1999].

1.4. Synteza mikrobiologiczna 1,3-propanodiolu

Obecnie 1,3-propanodiol jest produkowany kosztownymi metodami chemicznymi, przez hydratację akroleiny (Degussa, DuPont) oraz przez hydroreformylowanie tlenku etylenu (Shell). Atrakcyjną alternatywą dla metod chemicznych może być otrzymywanie 1,3-PD metodami biotechnologicznymi. Proces mikrobiologicznej syntezy 1,3-propanodiolu jako produktu biokonwersji glicerolu, z wykorzystaniem bakterii – *Clostridium pasteurianum*, został odkryty już w roku 1881 przez Augusta Freunda [Biebl i in. 1999]. Od tej pory przeprowadzono liczne badania nad biokonwersją glicerolu z udziałem bakterii z rodzaju *Clostridium*. Grupa mikroorganizmów, które zdolne są do wzrostu na czystym i odpadowym glicerolu jako jedynym źródle węgla i energii, jest bardzo liczna. Zalicza się do niej bakterie z gatunku: *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium diols*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus collinoides*, *Pelobacter carbinolicus*, *Rautella planticola* i *Bacillus welchii* [Drożdżyńska i in. 2011]. Warto zaznaczyć, że większość z tych szczepów zdolna jest także do syntezy 1,3-PD [Kośmider, Czaczyk 2009].

Na efektywność syntezy mikrobiologicznej ma wpływ wiele czynników, do których należą: wybór miejsca izolacji szczepu o potencjale przemysłowym, jego niepatogenność, dobór odpowiedniej pożywki produkcyjnej i atrakcyjnego substratu (źródła węgla), typ i warunki hodowli czy oddziaływanie stresów środowiskowych w trakcie procesu syntezy [Himmi i in. 1999; Solomon i in. 1995; Kusharyoto i in. 2011; Colin i in. 2001; Yazdani, Gonzeles 2007].

Z ekonomicznego punktu widzenia przetwarzanie odpadowego glicerolu z wykorzystaniem mikroorganizmów beztlenowych z jednej strony jest alternatywą dla przemysłowej produkcji 1,3-propanodiolu, z drugiej sposobem na zagospodarowanie uciążliwego odpadu. Stosowanie w tym procesie bakterii beztlenowych pozwala na zachowanie niskich kosztów procesu. Hodowla bakterii w warunkach beztlenowych nie wymaga natleniania i intensywnego mieszania, co ogranicza zużycie energii [Kośmider, Czaczyk 2009]. 50% całkowitych kosztów uzyskiwania 1,3-PD stanowi surowiec.

Celem niniejszej pracy był screening i charakterystyka wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Clostridium* zdolnych do wydajnej konwersji glicerolu do 1,3-propanodiolu.

2. Materiały i metody

2.1. Źródła izolacji

Materiałem badań były próbki pochodzące z osadu wody oczyszczonej z Zakładu Gospodarki Komunalnej – Oczyszczalni Ścieków w Mogilnie (nazwy izolatów: 1.1., 1.2., 1.3., 1.4., 1.5., 1.6., 1.7., 2.1., 2.2., 2.3., 2.4.), osadu z Oczyszczalni Ścieków w Zielonej Górze (nazwy izolatów: ZG1, ZG2, ZG3, ZG4, ZG5, ZG6, ZG7, ZG8, ZG9, ZG10, ZG11, ZG12, ZG13, ZG14, ZG15, ZG16, ZG17, ZG18, ZG19, ZG20) oraz ze środowiska fermentacji metanowej – gnojowica bydłęca suplementowana 5% i 10% glicerolem z Laboratorium Ekotechnologii Instytutu Inżynierii Rolniczej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (nazwy izolatów: FM₅1, FM₅2, FM₅3, FM₅4, FM₅5, FM₅6, FM₅7, FM₁₀1, FM₁₀2, FM₁₀3, FM₁₀4, FM₁₀5, FM₁₀6, FM₁₀7).

2.2. Pożywki mikrobiologiczne

Na etapie izolacji szczepów stosowano pożywkę TSC LAB-AGAR™ (BIOCORP Polska Sp. z o.o.), natomiast w hodowli wybranych bakterii stosowano Reincorfed Clostridial Medium – RCM (BIOCORP Polska Sp. z o.o.). Pożywkę sterylizowano w temperaturze 121°C przez 20 minut. Pożywkę produkcyjną (RM – *rich medium*¹, LNM – *low-nutrient medium*², LNM-YE – *low-nutrient medium with yeast extract*³) przygotowano według Himmi’ego i innych [1999]. Suplementowano je czystym glicerolem, odpadowym glicerolem I (Biopaliwa S.A., Malbork) lub odpadowym glicerolem II (LUBOCONS CHEMICALS s.r.o., Słowacja) w stężeniu 70 g/l. Skład odpadowego glicerolu I stanowił: glicerol (83,5%), metanol (0,3%). Skład odpadowego glicerolu II stanowił: glicerol (18,01%), metanol (14%).

2.3. Izolacja bakterii z rodzaju *Clostridium*

Selekcję pożądaných szczepów wykonano przy użyciu metody zalewowej. Po 48 h inkubacji w 30°C na płytkach Petriego obserwowano wzrost czarnych, okrągłych kolonii bakterii, które za pomocą plastikowej, jednorazowej ezy przenoszono do jałowych probówek typu eppendorf, z przygotowaną pożywką RCM. W celu wstępnej identyfikacji izolatów zastosowano metodę Grama. Obraz oglądano z wykorzystaniem mikroskopu optycznego Primo Star (Zeiss), przy powiększeniu 1500x. Izolaty inkubowano 48 h w temperaturze 32°C. Po inkubacji namnożoną zawiesinę bakterii wirowano (10000 x g, 10 minut). Osad zawieszono w pożywce RCM i roztworze 20% glicerolu (w stosunku 1:1). Odpowiednio opisane szczepy przechowywano w temperaturze –20°C.

¹ *Rich medium* – bogata pożywka.

² *Low-nutrient medium* – uboga pożywka.

³ *Low-nutrient medium with yeast extract* – uboga pożywka z ekstraktem drożdżowym.

2.4. Warunki hodowli bakterii z rodzaju *Clostridium* na pożywkach produkcyjnych

2.4.1. Hodowla w probówkach Hungate'a

Namnożone w probówce Hungate'a inokulum bakterii z rodzaju *Clostridium* hodowano na pożywkach produkcyjnych wzbogaconych czystym glicerolem bądź odpadowym glicerolem (I lub II) w stężeniu 70 g/l. Kwasowość środowiska (pH) regulowano z wykorzystaniem 20% roztworu wodorotlenku sodu oraz indykatora pH – purpury bromokrezolowej.

2.4.2. Hodowla w bioreaktorze

Pierwszy etap hodowli polegał na namnożeniu bakterii w probówce Hungate'a, w komorze do hodowli beztlenowców (Whitley MG500 firmy Scientific). Po upływie czasu inkubacji (24h) preinokulum przeniesiono za pomocą sterylnej strzykawki do butli (Duran®) zintegrowanej z 5 l bioreaktorem (Sartorius Stedim Poland Sp. z o.o.). Butlę umieszczono w łaźni wodnej (32°C) i inkubowano przez 24 h celem namnożenia biomasy bakterii. Po inkubacji przepompowano zawartość butli do bioreaktora za pomocą pompy perystaltycznej. Fermentacje prowadzono 72 godziny w temperaturze 32°C, przy stałych obrotach mieszadła 60 rpm i ciągłej regulacji pH (rozwozem 20% NaOH) na poziomie 7,0.

2.5. Metody analityczne

1,3-propanodiol oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografie Agilent Technologies 1200 series (zestaw składał się z takich elementów, jak: automatyczny podajnik próbek G1329B, podwójna pompa G1312B z detektorem refraktometrycznym G1362A). Do oznaczeń użyto kolumnę Rezex ROA, stosując fazę ruchomą w postaci 0,005N H₂SO₄, szybkość przepływu wynosiła 0,6 ml/min w temperaturze 40°C. Próby nanoszono na kolumnę w ilości 10 µl. Identyfikacji ilościowej i jakościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem ChemStation for LC 3D systems, Agilent).

2.6. Identyfikacja bakterii

Całkowity DNA bakterii, wyekstrahowano za pomocą Genomie Mini AX Bakterie Kit (A & A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Na matrycy genomowego DNA amplifikowano 16S rRNA techniką PCR. Profil termiczny był następujący: denaturacja wstępna – 95°C (5 min), hybrydyzacja – 48°C (1 min), elongacja – 72°C (1,5 min), liczba cykli – 30. W reakcji zastosowano następujące startery oligonukleotydowe: SD-B 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAGT3' i SD-U 5'ACGGCTACCTTGTTAC-

GACTT3'. PCR oczyszczano, stosując Clean-up Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Amplikony powstałe na matrycy DNA pochodzącego z kultur hodowlanych analizowano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym w buforze 1 x TBE z bromkiem etydyny (0,5 µg/ml). Oczyszczone produkty PCR oddano do sekwencjonowania do firmy Genomed (Warszawa, Polska). Wyniki sekwencjonowania analizowano z wykorzystaniem programu CAP33 oraz baz danych BLASTN i Ribosomal Database Project.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Izolacja mikroorganizmów

Wyizolowano 45 szczepów o potencjalnym znaczeniu produkcyjnym. Większość z nich stanowiły bakterie z rodzaju *Clostridium*, głównie *Clostridium butyricum*. W grupie izolatów 80% było zdolnych do syntezy 1,3-PD z czystego glicerolu z dobrą lub bardzo dobrą wydajnością (tab. 1). Najlepsze wyniki uzyskano po hodowli dla szczepu *Clostridium butyricum* 1.1. – 0,67 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu} (100% wykorzystania glicerolu).

Tabela 1. Zestawienie wyników izolacji bakterii z rodzaju *Clostridium*

Źródło izolacji	Całkowita liczba izolatów	Liczba izolatów zdolnych do syntezy 1,3-PD	Maksymalne uzyskane stężenie 1,3-PD [g/l]
1. Oczyszczalnia Ścieków w Mogilnie	11	10	36,64
2. Oczyszczalnia Ścieków w Zielonej Górze	20	19	35,33
3. Środowisko fermentacji metanowej	14	7	34,09

Źródło: opracowanie własne.

Podobne wyniki uzyskał w hodowli okresowej Himmi i inni [1999] dla szczepu *Clostridium butyricum* CNCM 1211, uzyskując maksymalną wydajność – 0,69 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu}. Metsoviti i inni [2012] wyizolowali szczep *Clostridium butyricum* NRRL B-23495 z artykułów spożywczych. Prowadząc hodowlę okresową w pH 6,5, bez regulacji pH, otrzymali maksymalne stężenie 1,3-PD – 9,1 g/l. Szymanowska-Powałowska i inni [2012] uzyskali wydajność 0,68 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu} dla szczepu *Clostridium butyricum* wyizolowanego ze żwacza krowy żywionej paszą z dodatkiem glicerolu. Tak wysokie wydajności syntezy 1,3-PD wydają się charakterystyczne dla gatunku *Clostridium butyricum*. Inni autorzy, prowadząc proces syntezy 1,3-PD z glicerolu z zastosowaniem szczepu *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 (NCIB 9486), uzyskali wydajność równą 0,4 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu} [Heyendrix i in. 1991]. Taconi i inni [2008], stosując szczep *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, uzyskali w hodowli okresowej maksymalną wydajność 0,5 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu}. Inni

badacze prowadząc proces z zastosowaniem szczepu *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643 w fermentacji okresowej uzyskali wydajność konwersji glicerolu do 1,3-PD 0,36 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu} [Gungormusler i in. 2010]. Na podstawie przeprowadzonych badań i danych literaturowych można wnioskować, że wśród bakterii z rodzaju *Clostridium* najlepszym, a zarazem niepatogennym producentem 1,3-PD jest szczep z gatunku *Clostridium butyricum*.

3.2. Wybór pożywki produkcyjnej

Wymagania pokarmowe mikroorganizmów odnośnie do prowadzenia procesu mikrobiologicznej konwersji glicerolu do 1,3-PD są zróżnicowane. Przy doborze najlepszej pożywki produkcyjnej istotne znaczenie ma miejsce izolacji bakterii, a także warunki środowiskowe (stresy) w pierwotnym miejscu bytowania mikroorganizmów.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono dobór pożywki produkcyjnej dla hodowli bakterii z rodzaju *Clostridium*. Wybrane (najlepiej rokujące po wstępnej weryfikacji) izolaty hodowano w probówkach Hungate'a na trzech pożywkach produkcyjnych: RM, LNM, LNM-YE, i porównano uzyskane wydajności syntezy 1,3-PD (tab. 2).

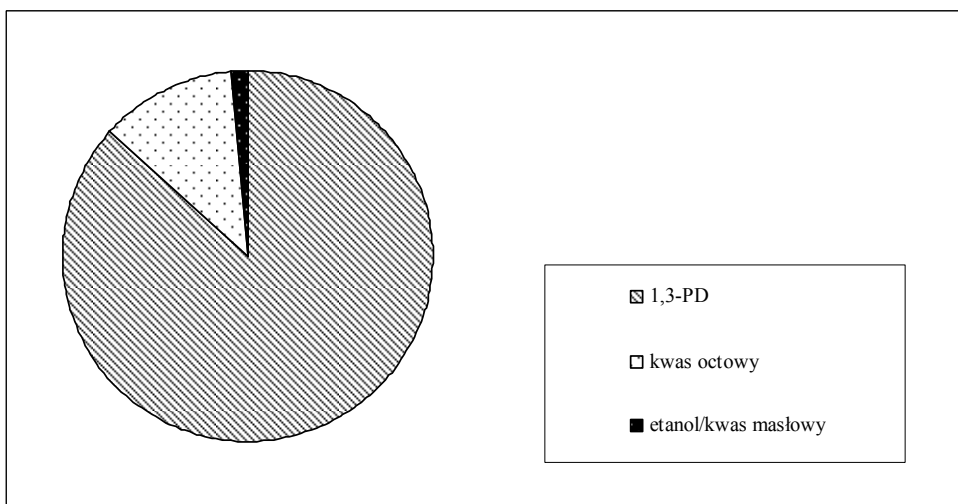
Tabela 2. Porównanie wydajności i konwersji glicerolu do 1,3-PD przez wybrane szczepy bakterii z rodzaju *Clostridium* na różnych pożywkach produkcyjnych

Symbol izolatu	Maksymalne uzyskane stężenie 1,3-PD [g/l]			Maksymalna wydajność [mol _{1,3-PD} /mol _{glicerolu}]			Stopień wykorzystania glicerolu [%]		
	RM	LNM	LNM-YE	RM	LNM	LNM-YE	RM	LNM	LNM-YE
1.1.	<u>36,6</u>	14,5	17,6	0,67	0,66	0,64	100	38	49
1.3.	6,4	9,2	<u>11,9</u>	0,51	0,70	0,57	22	23	37
1.4.	<u>34,6</u>	11,3	10,4	0,63	0,69	0,56	100	29	32
1.5.	7,9	5,1	<u>15,8</u>	0,46	0,68	0,64	30	13	44
1.6.	<u>35,3</u>	14,4	21,4	0,64	0,67	0,60	100	38	64
1.7.	7,2	<u>17,7</u>	12,5	0,53	0,69	0,58	24	46	38

Źródło: opracowanie własne.

Uzyskane wyniki nie pozwoliły na jednoznaczny wybór podłoża. Ze wszystkich badanych wariantów najlepsza okazała się pożywka RM. Większość izolatów na pożywkę RM była zdolna do konwersji glicerolu do 1,3-PD z bardzo dobrą wydajnością, a stopień wykorzystania glicerolu wynosił 100%. Warto zaznaczyć, że hodowla niektórych izolatów bakterii (*Cl. butyricum* 1.6. i 1.7.) na pożywkach uboższych także pozwoliła na otrzymanie wysokich stężeń 1,3-PD. Wykazano, że niezbędny wydaje się dodatek ekstraktu drożdżowego (pożywki RM i LNM-YE).

Podczas mikrobiologicznej konwersji glicerolu do 1,3-PD, oprócz głównego metabolitu, powstaje szereg metabolitów ubocznych m.in. kwas octowy i masłowy, a także etanol (rys. 4). Poziom syntezy metabolitów ubocznych zależy od składu pożywki produkcyjnej i warunków procesu fermentacji (zwłaszcza pH środowiska) [Colin i in. 2001]. Stosunek metabolitów ubocznych do produktu głównego jest bardzo istotny w aspekcie ekonomiki procesu, ponieważ wiąże się bezpośrednio z koniecznością jego oczyszczania.



Rys. 4. Jakościowy skład metabolitów uzyskanych po konwersji glicerolu do 1,3-PD przez bakterie *Clostridium butyricum* (izolat 1.1.) na pożywce RM

Źródło: opracowanie własne.

Literatura przedmiotu upatruje w prostych pożywkach, niezasobnych w składniki odżywcze istotnych korzyści ekonomicznych (niższy koszt procesu). Fakt ten dotyczy także technologii mikrobiologicznej syntezy 1,3-PD, zwłaszcza w skali przemysłowej. Himmi i inni [1999] w swojej pracy analizowali zależność pomiędzy składem pożywki a wydajnością procesu mikrobiologicznej konwersji glicerolu do 1,3-PD. Uzyskane przez nich wyniki dla szczepu *Clostridium butyricum* udowodniły brak istotnego wpływu składu pożywki na wydajność syntezy 1,3-PD. Po zoptymalizowaniu stężenia poszczególnych składników pożywki wydajność syntezy 1,3-PD przez bakterie na pożywce RM i LNM wynosiła $0,66 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}}/\text{mol}_{\text{glicerolu}}$. Uzyskane maksymalne stężenie 1,3-PD było większe po hodowli na pożywce LNM i wynosiło 65,4 g/l. Ponadto zastosowanie pożywki produkcyjnej LNM pozwoliło na bardziej efektywne wykorzystanie glicerolu niż w hodowli na pożywce RM. Inni autorzy, stosując pożywkę RM [Barbirato i in. 1998; Szymanowska-Powałowska i in. 2012], podobnie jak w tej pracy, uzyskali bardzo wysokie wydajności procesu syntezy 1,3-PD, zbliżone do teoretycznej. Dla porównania: Kusharyoto i inni [2011]

w swoich badaniach wykorzystali bogatszą niż RM pożywkę – M9 (50 g/l glicerolu; 9,09 g/l KH_2PO_4 ; 0,535 g/l NH_4Cl ; 0,123 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,017 g/l $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,0 g/l ekstraktu drożdżowego; 0,25 g/l L-cysteiny*HCl; 1,0 ml/l roztworu soli DSMZ 144). Uzyskane przez nich stężenie 1,3-PD wynosiło 33,9 g/l (wydajność 0,60 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu}). Przedstawione przez badaczy [Kusharyoto i in. 2011] wyniki pokazują, że zwiększona zawartość składników pożywki nie przełożyła się na wydajność procesu syntezy 1,3-PD. Zastosowana w niniejszej pracy pożywka RM dla szczepu *Clostridium butyricum* 1.1. pozwoliła na uzyskanie wyższych stężeń 1,3-PD. Warto zaznaczyć, że bardzo ważny jest optymalny stosunek C:N, zwłaszcza w aspekcie dążenia do wysokiej wydajności syntezy 1,3-PD. Fakt ten wydaje się jednym z najważniejszych warunków koniecznych do uzyskania maksymalnych stężeń 1,3-PD. Stosunek C:N na poziomie powyżej lub poniżej 81:1 może stanowić czynnik ograniczający efektywność hodowli prowadzonej przez bakterie *Clostridium butyricum* [Himmi i in. 1999]. Ze względów ekonomicznych uzasadnione jest zastępowanie bogatych podłoży tymi o zminimalizowanym składzie.

Ciekawym zagadnieniem wydaje się stosowanie surowców odpadowych jako składnika pożywek produkcyjnych. W Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu przeprowadzono wstępne eksperymenty mające na celu wykorzystanie jako pożywki produkcyjnej namoku kukurydzianego i gnojowicy suplementowanej glicerolem. Podczas doboru surowców kierowano się zawartością azotu i białka w danym surowcu. Uzyskane wyniki (nieopublikowane) pozwalają wnioskować, że wymienione surowce mogą w przyszłości stanowić z jednej strony ciekawą alternatywę dla znanych podłoży literaturowych [Himmi in. 1999; Biel i in. 1992; Papanikolaou i in. 2000], z drugiej efektywny sposób na zagospodarowanie surowców odpadowych.

3.3. Synteza 1,3-propanodiolu z czystego i odpadowego glicerolu

W literaturze jest wiele przykładów potwierdzających możliwość zastosowania odpadowego glicerolu w syntezie mikrobiologicznej nie tylko 1,3-propanodiolu, ale także kwasu bursztynowego, kwasu propionowego, witaminy B₁₂ czy erytrytolu [Kośmider, Czaczyk 2009; Kośmider i in. 2009; Rywińska i in. 2009]. Warto jednak zaznaczyć, że odpadowy glicerol może zawierać takie substancje, jak: metanol, sól sodową, jony metali ciężkich, wolne kwasy tłuszczowe, które mogą inhibować wzrost i metabolizm mikroorganizmów [González-Pajuelo i in. 2004; Wadhwani i in. 2009; Moon i in. 2010; Ringel i in. 2011]. Dlatego w kolejnym etapie przeprowadzono eksperymenty mające na celu hodowlę wybranych izolatów, stosując pożywkę, w której substrat stanowił odpadowy glicerol (I i II). Fermentację okresową prowadzono w probówkach Hungate'a i w bioreaktorach 5 l (tab. 3, 4).

Poszczególne substraty znacząco różniły się pod względem czystości, co przełożyło się na uzyskane wyniki. Odpadowy glicerol I nie zawierał dużych stężeń zanieczyszczeń, dlatego uzyskane wydajności syntezy 1,3-PD były zbliżone do tych

Tabela 3. Porównanie wydajności syntezy 1,3-PD przez wybrane izolaty bakterii *Cl. butyricum* namażane na pożywkach z czystym i odpadowym glicerolem w probówkach Hungate'a

Symbol izolatu	Surowiec	Maksymalne uzyskane stężenie 1,3-PD [g/l]	Maksymalna wydajność [mol _{1,3-PD} /mol _{glicerolu}]	Stopień wykorzystania glicerolu [%]
1.1.	czysty glicerol	36,6	0,67	100
	odpadowy glicerol I	31,2	0,57	100
	odpadowy glicerol I	0,3	0,00	100
2.1.	czysty glicerol	31,9	0,58	100
	odpadowy glicerol I	28,0	0,51	100
	odpadowy glicerol I	0,2	0,00	100
2.2.	czysty glicerol	31,4	0,57	100
	odpadowy glicerol I	27,4	0,50	100
	odpadowy glicerol I	0,3	0,00	100
FM ₅ 5	czysty glicerol	34,1	0,62	100
	odpadowy glicerol I	28,1	0,49	100
	odpadowy glicerol I	0,3	0,00	100
FM ₁₀ 1	czysty glicerol	30,5	0,58	95,62
	odpadowy glicerol I	28,1	0,51	100
	odpadowy glicerol I	0,2	0,00	100
FM ₁₀ 2	czysty glicerol	31,7	0,58	100
	odpadowy glicerol I	27,7	0,50	100
	odpadowy glicerol I	0,3	0,00	100
FM ₁₀ 3	czysty glicerol	27,8	0,50	100
	odpadowy glicerol I	26,3	0,48	100
	odpadowy glicerol I	0,2	0,00	100

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 4. Porównanie wydajności syntezy 1,3-PD przez wybrany izolat na pożywce z czystym i odpadowym glicerolem w bioreaktorach – izolat *Cl. butyricum* 1.1.

Symbol izolatu	Surowiec	Maksymalne uzyskane stężenie 1,3-PD [g/l]	Maksymalna wydajność [mol _{1,3-PD} /mol _{glicerolu}]	Stopień wykorzystania glicerolu [%]
1.1.	czysty glicerol	37,2	0,68	100
	odpadowy glicerol I	35,1	0,64	100

Źródło: opracowanie własne.

z wykorzystaniem czystego glicerolu. Niewielkie różnice w wydajności procesu wynikają z zawartości glicerolu w stosowanym surowcu. W hodowli bakterii w probówkach Hungate'a maksymalne uzyskane stężenie 1,3-PD wynosiło 31,2 g/l (wydajność 0,57 mol_{1,3-PD}/mol_{odpadowego glicerolu}), natomiast w bioreaktorach – 35,1 g/l (wydajność 0,64 mol_{1,3-PD}/mol_{odpadowego glicerolu}). Przyczyną wyższych stężeń 1,3-PD po hodowli bakterii w bioreaktorach jest automatyzacja procesu i ciągła kontrola pH. W niniejszej pracy znacznie niższe stężenia 1,3-PD uzyskano po hodowli bakterii w pożywce z udziałem odpadowego glicerolu II, w którym stężenie glicerolu wynosiło 18,01%. Dodatkowo surowiec zawierał około 14% metanolu, co z pewnością niekorzystnie wpłynęło na proces fermentacji. Szczep *Clostridium butyricum* 1.1., który na czystym glicerolu i odpadowym glicerolu I osiągnął wydajność syntezy 1,3-PD zbliżoną do teoretycznej, przy użyciu odpadowego glicerolu II nie był zdolny do produkcji 1,3-PD powyżej 0,5 g/l. Wiadomo, że stężenie metanolu już na poziomie 6% powoduje inhibicje wzrostu drobnoustrojów nawet do 90% [Wadhvani i in. 2009]. Fakt ten potwierdzają wyniki uzyskane w niniejszej pracy. O wpływie odpadowego glicerolu na efektywność syntezy 1,3-PD donosi wielu autorów [Colin i in. 2000; Papanikolaou i in. 2000; Szymanowska-Powałowska i in. 2012; Ringel i in. 2011]. Warto jednak zaznaczyć, że stosowany przez autorów odpadowy glicerol najczęściej nie zawierał znaczących ilości zanieczyszczeń. Jednym z przykładów jest opisany szczep *Clostridium butyricum* CNCM 1211 zdolny do produkcji 63,4 g/l 1,3-PD z wydajnością 0,69 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu} [Colin i in 2000]. Inny, *Clostridium butyricum* F2b, który z wydajnością 0,66 mol_{1,3-PD}/mol_{glicerolu} wyprodukował 48 g/l 1,3-PD [Papanikolaou i in. 2000]. Warto zaznaczyć, że autorzy uzyskali bardzo wysokie stężenia 1,3-PD w innych (niż zastosowany w tej pracy) typach fermentacji (okresowo-dolewowa lub ciągła). Szymanowska-Powałowska i inni [2012], prowadząc konwersję odpadowego glicerolu do 1,3-PD metodą okresową, uzyskali w hodowli dla szczepu *Clostridium butyricum* DS5 stężenie 1,3-PD – 31,7 g/l (100% wykorzystanie glicerolu). Bardzo dobre wyniki zostały uzyskane także przez Ringel'a i innych [2011]. Autorzy wyizolowali niepatogenne szczepy *Clostridium butyricum* AKR102a i AKR91b odporne na wysokie stężenia 1,3-PD, a także zdolne do efektywnej konwersji odpadowego glicerolu, uzyskując stężenie 1,3-PD na poziomie około 100 g/l. Zdolność szczepu *Clostridium butyricum* P50B1 do wydajnego wykorzystania odpadowego glicerolu jako jedyne źródła węgla i energii przedstawili w swoich badaniach Kusharyoto i inni [2011]. Badali oni zarówno stopień wykorzystania glicerolu, jak i końcowe stężenie 1,3-PD, stosując czysty (handlowy) i odpadowy (uzyskany po produkcji biodiesla) glicerol. W każdym z analizowanych wariantów stopień wykorzystania glicerolu był na poziomie około 81%. Stężenie 1,3-PD w pożywce po procesie prowadzonym z udziałem komercyjnego glicerolu wynosiło 33,9 g/l, natomiast na pożywce z odpadowym glicerolem – 31,7 g/l. Warto zaznaczyć, że skład ilościowy i jakościowy stosowanych substratów (odpadowego glicerolu) może być zróżnicowany, co może stwarzać problemy związane z powtarzalnością wydajności procesu syntezy 1,3-PD [Yazdani, Gonzeles 2007].

Doniesienia literaturowe, a także wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy pokazują możliwy potencjał wykorzystania odpadowego glicerolu w przemysłowej produkcji 1,3-PD. Zastąpienie rafinowanych surowców surowcami odnawialnymi (odpadowym glicerolem) pozwoliłoby na obniżenie kosztów procesu nawet do 40% [Hirschmann i in. 2005]. Ponadto technologia oparta na wykorzystaniu odpadowego glicerolu pozwala na zintegrowanie procesu polegające na produkcji biodiesla i wykorzystaniu w mikrobiologicznej konwersji odpadowego glicerolu do 1,3-PD.

4. Wnioski

1. Wybór miejsca izolacji bakterii z rodzaju *Clostridium* ma istotny wpływ na ich zdolności do efektywnej konwersji określonych substratów, w tym glicerolu.

2. Zastosowanie naturalnych producentów z rodzaju *Clostridium* pozwala na uzyskanie wydajności syntezy 1,3-PD bardzo zbliżonej do teoretycznej.

3. Dobranie składu pożywki produkcyjnej jest warunkiem otrzymania wysokich wydajności procesu konwersji glicerolu do 1,3-PD, a także ma wpływ na całkowity koszt technologii.

4. Odpadowy glicerol, jako produkt uboczny pochodzący z produkcji biodiesla, może być surowcem w mikrobiologicznej syntezie 1,3-PD.

Literatura

- Barbirato F., Himmi E.H., Conte T., Bories A., *1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries*, "Industrial Crops and Products" 1998, 7, s. 281-289.
- Biebl H., Marten S., Hippe H., Deckwer W.D., *Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia*, "Applied Microbiology and Biotechnology" 1992, 36, s. 592-597.
- Biebl H., Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D., *Microbial production of 1,3-propanediol*, "Applied Microbiology and Biotechnology" 1999, 52, s. 289-297.
- Colin T., Bories A., Moulin G., *Inhibition of Clostridium butyricum by 1,3 -propanediol and diols during glycerol fermentation*, "Applied Microbiology and Biotechnology" 2000, 54, s. 201-205.
- Colin T., Bories A., Lavigne C., Moulin G., *Effect of acetate and butyrate during glycerol fermentation by Clostridium butyricum*, "Current Microbiology" 2001, 43, s. 238-243.
- Drożdżyńska A., Leja K., Czaczyk K., *Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol*, "Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology" 2011, 1, s. 92-100.
- Gaca J., *Faza glicerynowa po produkcji biodiesla – odpad czy cenny surowiec?*, „Czysta Energia” 2006, 11,34-35.
- González-Pajuelo M., Andrade J.C., Vasconcelos I., *Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol*, "Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology" 2004, 31, s. 442-446.
- Gungormusler M., Gonen C., Ozdemir G., Azbar N., *1,3-Propanediol production potential of Clostridium saccharobutylicum NRRL B-643*, "New Biotechnology" 2010, 27, s. 782-788.
- Heyendrix M., Devos P., Vancanneyt M., De Ley J., *The fermentation of glycerol by Clostridium butyricum LMG. 1212 t₂ and 1213 t₁ and Clostridium pasteurianum LMG 3285*, "Applied Microbiology and Biotechnology" 1991, 34, s. 637-642.

- Himmi E.L., Bories A., Barbirato F., *Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by Clostridium butyricum*, "Bioresource Technology" 1999, 67, s. 123-128.
- Hirschmann S., Baganz K., Koschik I., Vorlop K.D., *Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters*, "Landbauforsch Völkenrode" 2005, 55, s. 261-267.
- Katrlík J., Vostiar I., Sefcovicová J., Tkáč J., Mastihuba V., Valach M., Stefuca V., Gemeiner P., *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*, "Analytical and Bioanalytical Chemistry" 2007, 388, s. 287-295.
- Kośmider A., Czaczyk K., *Perspektywy wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych*, "Postępy Mikrobiologii" 2009, 48(4), s. 277-287.
- Kośmider A., Drożdżyńska A., Czaczyk K., *Możliwości wykorzystania surowców odpadowych w procesie fermentacji propionowej*, "Żywność. Nauka. Technologia. Jakość" 2009, 6(67), s. 47-58.
- Kusharyoto W., Andriani D., Sari M., Sulistinah N., Sunarko B., *Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum p50b1 using commercial and raw glycerol from biodiesel production*, "International Seminar Biotechnology" 2011, s. 1-11.
- Markowska J., *Rynek biomasy i biopaliw w Polsce*. „Przemysł Spożywczy” 2007, 7, s. 19-21.
- Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D., *High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by Klebsiella pneumonia*, "Enzyme and Microbial Technology" 1997, 20, s. 82-86.
- Metsoviti M., Paramithiotis S., Drosinos E.H., Galiotou-Panayotou M., Nychas G-J. E., Zeng A-P., Papanikolaou S., *Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and etanol*, "Engineering in Life Science" 2012, 1, s. 57-68.
- Moon Ch., Ahn J-H., Kim S.W., Sang B-I., Um Y., *Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms*, "Applied Biochemistry and Biotechnology" 2010, 161, s. 502-510.
- Papanikolaou S., Ruiz-Sanchez P., Pariset B., Blanchard F., Fick M., *High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated Clostridium butyricum strain*, "Journal of Biotechnology" 2000, 77, s. 191-208.
- Ringel A.K., Wilkens E., Hortig D., Willke T., Vorlop K.D., *An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations*, "Applied Microbiology and Biotechnology" 2011, 3, s. 1049-1056.
- Rywińska A., Juszczuk P., Grysztyn A., Rymowicz W., *Charakterystyka pół ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże*. "Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia" 2009, 8(3), s. 3-14.
- Saxena R.K., Anand P., Saran S., Isar J., *Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities*, "Biotechnology Advances" 2009, 27, s. 895-913.
- Solomon H.M., Rhodehamel E.J., Kautter D.A., *Clostridium botulinum*. (In) *Bacteriological analytical manual 8th ed. FDA*, Washington State Deferred Compensation Program 1995, s. 1701-1710.
- Sulewski M., Gaca J., Szmyt M., Wamka E., *Problemy zagospodarowania gliceryny otrzymanej przy produkcji biodiesla*, II Eco-Euro-Energia, materiały konferencyjne 2005, s. 351-356.
- Szymanowska-Powałowska D., Drożdżyńska A., Powalowski Sz., Grajek W., *Isolation of new strains of bacteria able to synthesize 1,3-propanediol from glycerol*, "Journal of Cleaner Production" 2012, w druku.
- Taconi K.A., Venkataramanan K.P., Johnson D.T., *Growth and solvent production by Clostridium pasteurianum ATCC[®] 6013[™] utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source*, "Environmental Progress & Sustainable Energy" 2008, 28, s. 100-110.

Wadhvani T., Desai K., Patel D., Lawani D., Bahaley P., Joshi P., Kothari V., *Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials*, "The Internet Journal of Microbiology" 2009, 7(1).

Yazdani S.S., Gonzales R., *Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry*, "Current Opinion in Biotechnology" 2007, 18, s. 213-218.

ISOLATION OF BACTERIA OF THE GENUS *CLOSTRIDIUM* AND THE CHOICE OF THE MEDIA CONVERSION GLYCEROL TO 1,3-PROPANEDIOL

Summary: The production of biodiesel generates large quantities of a waste product, namely a raw glycerol. The microbial production of 1,3-propanediol from raw glycerol is beneficial from both an economic and environmental perspective. The aim of this study was to screen and test cultures of bacteria of the genus *Clostridium* which can convert glycerol to 1,3-propanediol. A total of 45 strains were isolated and a vast majority of them turned out to be good producers of 1,3-propanediol. The strains were tested on different media which allowed to determine the optimal medium that ensures high efficiency of synthesis of 1,3-propanediol. Particular attention was paid to the type of glycerol used (pure and crude glycerol). In addition, the best identified strain (*Clostridium butyricum* 1.1.) was analyzed in submerged culture on the bioreactor scale.

Keywords: *Clostridium* spp., bacteria isolation, 1,3-propanediol, glycerol conversion.