

Radosław ŚLĘZAK, Liliana KRZYSZEK, Stanisław LEDAKOWICZ, Justyna GRZELAK

e-mail: radoslaw.slezak@p.lodz.pl

Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Produkcja polihydroksymaślanu przez *Cupriavidus necator***Wstęp**

Polihydroksyalkanolany (PHA), są produkowane w wyniku bakteryjnego przekształcania prostych związków organicznych jako materiał zapasowy. Znajdują zastosowanie do produkcji implantów i biomateriałów oraz tworzyw sztucznych, głównie ze względu na ich biodegradowalność.

Wytwarzanie PHA jest droższe niż tradycyjnych tworzyw sztucznych, dlatego też poszukuje się tanich źródeł materii organicznej. Jednym z nich są odpady organiczne, głównie pochodzenia spożywczego, które w wyniku fermentacji kwaśnej są rozkładane do lotnych kwasów tłuszczowych. Powstałe lotne kwasy tłuszczowe są następnie wykorzystywane przez niektóre bakterie (np. *Cupriavidus necator*) do produkcji PHA. Najczęściej występującą odmianą PHA jest polihydroksymaślan (PHB), który był przedmiotem badań w tej pracy.

Bardzo często stosowaną metodą oznaczania PHB jest ekstrakcja chloroformem. Jest ona związana z przeprowadzeniem dużej liczby operacji związanych z przygotowaniem próby [Braunegg i in., 1978, Huijberts i in., 1994]. Natomiast analiza termogravimetryczna obecnie jest wykorzystywana do analizy wyekstrahowanego polimeru [Bhuwal i in., 2014]. Może być również wykorzystywana do określenia zawartości PHB w komórce bakterii ponieważ PHB rozkłada się w temperaturze 210÷220°C, a pozostałe składniki komórki powyżej temperatury 250÷260°C.

Celem pracy było zbadanie produkcji PHB przez bakterie *Cupriavidus necator* w podłożu syntetycznym, zawierającym różne lotne kwasy tłuszczowe (LKT) oraz w podłożu naturalnym, pochodzącym z fermentacji kwaśnej przeterminowanych artykułów spożywczych, o różnej zawartości LKT. Przeprowadzono także porównanie chromatograficznej i termogravimetrycznej metody oznaczania PHB.

Materiały i metody**Mikroorganizm i podłoże**

Organizm produkujący polihydroksymaślan stanowiły bakterie Gram(-) *Cupriavidus necator* z kolekcji DSM 428. Szczep bakterii przechowywano w temperaturze 4°C na skosie z podłożem kazeinowo-sojowym (TSB). Przed rozpoczęciem hodowli produkcyjnych szczep rozmnażano w podłożu TSB o objętości 10 cm³, a następnie szczepiono nim kolbę z podłożem TSB o objętości 100 cm³. Hodowle inokulacyjne szczepu prowadzono w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

Podłoże syntetyczne. Wpływ składu podłoża na produkcję PHB badano stosując 9 różnych podłoży syntetycznych (A1-A9), które zawierały tylko sole kwasu octowego, propionowego i masłowego. Pierwsze trzy podłoża zawierały octan sodu o stężeniu 1, 5 oraz 10 g/dm³, oznaczone odpowiednio symbolami A1, A2 i A3. Kolejne podłoża zawierały propionian sodu o stężeniu 1, 5 oraz 10 g/dm³ (A4, A5 i A6), oraz maślan sodu o stężeniu 1, 5 i 10 g/dm³ (A7, A8 i A9).

Podłoże naturalne, będące cieczą uzyskaną po fermentacji kwaśnej frakcji organicznej odpadów komunalnych, zostało również przebadane pod kątem produkcji PHB przez bakterie. Doświadczenia przeprowadzono dla trzech różnych stężeń lotnych kwasów tłuszczowych (LKT): B1 – 3160, B2 – 3898 i B3 – 9812 mg/dm³. W kolbie B1 stężenie kwasu octowego wynosiło 2124 mg/dm³, kwasu propionowego 235 mg/dm³, a masłowego 516 mg/dm³. W kolbie B2 stężenie kwasu octowego, propionowego i masłowego wynosiło odpowiednio 2515, 209 i 926 mg/dm³. Natomiast stężenie kwasu octowego, propionowego i masłowego w kolbie B3 wynosiło 4271, 445 i 4886 mg/dm³. Stężenie pozostałych LKT (kwasu izomasłowego, izowalerianowego, walerianowego i kapronowego) w kolbach B1, B2 i B3 było poniżej 10% sumy wszystkich lotnych kwasów

tłuszczowych. Stosunek C/N w kolbach B1, B2 i B3 wynosił odpowiednio 3,2; 4,6 oraz 12,7. Odczyn podłoża regulowano do wartości 7,0.

Tak przygotowane i wysterylizowane podłoża o objętości 100 cm³ zaszczepiane były inokulum w stosunku 1:10. Zaszczepione podłoża inkubowano 60 godzin w wstrząsarce utrzymującej temperaturę 30±0,5°C i przy prędkości wstrząsania 180 obrotów na minutę.

Analizę ogólnego węgla organicznego i azotu całkowitego w podłożu hodowlanym wykonano za pomocą aparatu IL 550 TOC-TN firmy HACH-LANGE. Stężenie biomasy mierzono poprzez wysuszenie odwirowanej masy w temperaturze 105°C do stałej masy.

Oznaczanie LKT

Stężenie LKT mierzono za pomocą chromatografu gazowego firmy VARIAN CP4800 wyposażonego w kolumnę kapilarną BP21 (długość 25 m, średnica 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm) oraz detektor FID. Temperatura detektora i dozownika była równa 250°C. Objętość nastrzyku wynosiła 1 μL na dozownik z podziałem 1:100. Temperatura kolumny przez pierwszą minutę analizy wyniosła 110°C, a następnie rosła do temperatury 230°C z szybkością 10°C/min. Temperaturę 230°C utrzymywano przez 2 minuty.

Oznaczanie PHB metodą chromatograficzną

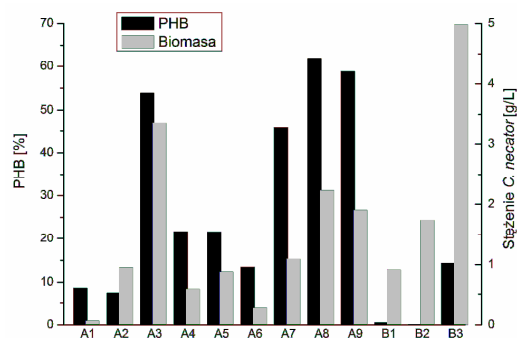
Po zakończeniu procesu hodowli, komórki bakterii *C. necator* oddzielano od medium hodowlanego w procesie wirowania. Następnie wydzieloną biomasa poddano liofilizacji i mieleniu. Rozdrobnioną biomasa w ilości około 20 mg umieszczano w zakręcaną probówkę o objętości 10 cm³, zawierającą 2 cm³ chloroformu i 2 cm³ metanolu z dodatkiem 3% H₂SO₄. Probówkę wygrzewano w temperaturze 100°C przez 3,5 godziny. Po wystudzeniu, do próbówki dodawano 1 cm³ wody, a następnie wytrząsano przez 15 minut, w wyniku czego powstały dwie fazy. Fazę zawierającą chloroform odwadniano poprzez dodanie bezwodnego Na₂CO₃. Tak przygotowaną próbkę analizowano wykorzystując chromatograf gazowy firmy VARIAN CP4800, wyposażony w kolumnę BP20 (długość 30 m, średnica 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm) oraz detektor FID. Temperatura detektora i dozownika wynosiła odpowiednio 210 oraz 250°C. Objętość nastrzyku wynosiła 1 μL na dozownik z podziałem 1:40. Temperatura kolumny przez pierwszą minutę wyniosła 50°C, a następnie rosła do temperatury 230°C z szybkością 10°C/min. Temperaturę 230°C utrzymywano przez 2 minuty.

Oznaczanie PHB metodą termogravimetryczną

Analizę termogravimetryczną (TGA) wykonano wykorzystując aparat STA 409 PG firmy NETZSCH, przy przepływie argonu z szybkością 50 cm³/min. Początkowa temperatura pieca wyniosła 50°C, a następnie rosła z szybkością 5°C/min do temperatury 110°C. Temperaturę 110°C utrzymywano przez 15 minut. W kolejnym segmencie temperatura rosła z szybkością 5°C/min do temperatury 215°C, którą utrzymywano przez 30 minut. Natomiast w ostatnim segmencie temperatura wzrastała z szybkością 5°C/min do temperatury 550°C. Masa zliofilizowanej próbki do analizy TGA wynosiła 5÷10 mg.

Wyniki i dyskusja

Analizując wpływ składu podłoża syntetycznego na zawartość PHB w komórkach bakterii stwierdzono, że najwięcej PHB (powyżej 45%) zostało wyprodukowane w podłożach (A7, A8 i A9), zawierających maślan sodu, niezależnie od stężenia (w badanym zakresie) oraz w podłożu A3 zawierającym 10 g/dm³ octanu sodu. Najwięcej PHB w komórkach bakterii (62,0%) uzyskano w podłożu A8 o stężeniu maślanu sodu 5,0 g/dm³ (Rys. 1).



Rys. 1. Zawartość PHB oraz stężenie biomasy *C. necator* w przeprowadzonych hodowlach w podłożu syntetycznym i naturalnym.

Największe stężenie biomasy *C. necator* (3,34 g/dm³) uzyskano w podłożu syntetycznym A3 zawierającym octan sodu o stężeniu 10 g/dm³. W podłożu A7 zawierającym maślan sodu o stężeniu 1 g/dm³ stężenie biomasy wyniosło 1,09 g/dm³, natomiast przy stężeniu maślanu sodu 5 i 10 g/dm³ stężenie biomasy wzrosło odpowiednio 2,1 i 1,8 razy.

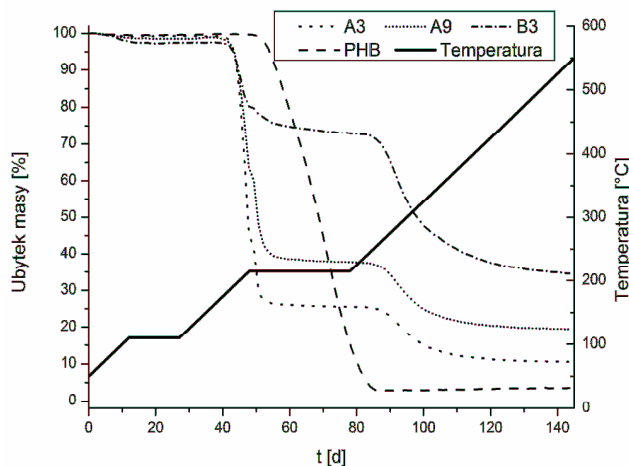
W procesach hodowli biomasy *C. necator* w podłożu zawierającym ciecz po fermentacji kwaśnej stwierdzono, że najwięcej PHB (14,3%) uzyskano stosując podłoże B3, w którym stężenie LKT (9812 mg/dm³) oraz stosunek C/N (12,7) był największy. W podłożach, w których stężenie LKT było poniżej 4000 mg/dm³ oraz stosunek C/N był mniejszy od 5, zawartość PHB w komórkach bakterii była poniżej 1%. Stwierdzono także, że w podłożu z najmniejszą zawartością LKT stężenie biomasy *C. necator* wynosiło 0,91 mg/dm³, a w podłożu z największą zawartością LKT osiągnęło wartość 4,98 mg/dm³.

Uzyskane wyniki wskazują, że najwięcej PHB w komórkach bakterii uzyskuje się wtedy, gdy procesy fermentacji są prowadzone tak, aby stężenie LKT oraz stosunek C/N w pożywce był jak największy.

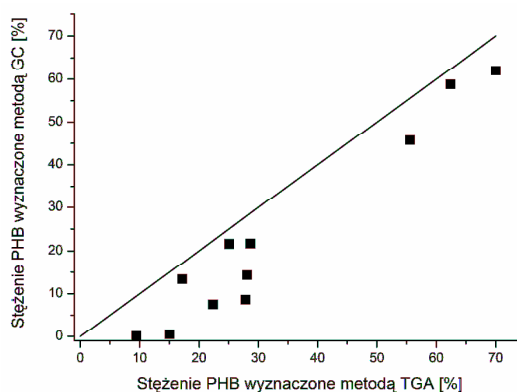
Z badań przeprowadzonych przez *Batcha i in.* [2014] nad produkcją PHB z oleju z jatrofy przy stężeniu 5 g/dm³, a zawartość PHB 55%. Wyniki te są zbliżone dla wartości uzyskanych dla maślanu sodu (podłoże syntetyczne A8) o stężeniu 5g/dm³.

Analizując rozkład termiczny standardu PHB stwierdzono, że w temperaturze 215°C rozkłada się w 96,42%. Przeprowadzona analiza termogravimetryczna komórek bakterii *C. necator* zawierających PHB wykazała, że jest wyraźny podział pomiędzy rozkładem termicznym PHB a pozostałymi składnikami komórek (Rys. 2).

Podczas pierwszych 40 minut rozkładu termicznego komórek bakterii *C. necator* hodowanych w podłożu syntetycznym A3, A9 i B3 stwierdzono niewielki ubytek masy (poniżej 2,5%), który był związany z odparowaniem niezwiązanej wody.



Rys. 2. Rozkład termiczny komórek bakterii z hodowli w podłożu A3, A9 i B3.



Rys. 3. Porównanie metody chromatograficznej i termogravimetrycznej oznaczenia PHB.

Zawartość PHB w komórkach bakterii określono na podstawie ubytku masy w zakresie temperatur od 210 do 220°C. Wzrost temperatury powyżej 250°C powodował rozkład pozostałych związków zawartych w komórkach bakterii.

Z porównania metod oznaczania PHB w komórkach bakterii *C. necator* wynika, że zawartość procentowa PHB oznaczona metodą chromatograficzną jest średnio o 29,3% mniejsza niż określona metodą termogravimetryczną. Mniejsze stężenia PHB w komórkach, oznaczane metodą chromatograficzną, są związane z procesem ekstrakcji, w wyniku którego nie następuje całkowita ekstrakcja PHB z komórki bakteryjnej. W badaniach *Hahn i Chang* [1995] stężenie PHB w komórkach bakterii oznaczone metodą termogravimetryczną było również wyższe niż metodą chromatograficzną.

Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że lotne kwasy tłuszczowe mogą być wykorzystane jako źródło węgla do produkcji polihydroksymaślanu przez bakterie *Cupriavidus necator*.

Ilość wytwarzanego biopolimeru w sposób istotny zależy od składu podłoża hodowlanego. Najwięcej PHB w komórkach bakterii (62,0%) uzyskano w podłożu zawierającym jako główne źródło węgla maślan sodu o stężeniu 5 g/dm³.

Octan sodu jest także dobrym substratem do produkcji PHB, jeżeli jego stężenie wynosi 10 g/dm³. W przeprowadzonych hodowlach największe stężenie biomasy (4,98 g/dm³) stwierdzono w podłożu naturalnym o stężeniu lotnych kwasów tłuszczowych 9812 mg/dm³.

Analiza termogravimetryczna *C. necator* wykazała, że jest wyraźny podział pomiędzy rozkładem termicznym PHB a pozostałymi składnikami komórek bakterii, co potwierdza możliwość jej zastosowania do oznaczania zawartości PHB w komórkach drobnoustrojów.

LITERATURA

- Batcha A. F. M., Prasad D. R., Khan M. R., Abdullah H., 2014. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **37**, 943-951. DOI: 10.1007/s00449-013-1066-4
- Bhuwal A. K., Singh G., Aggarwal N. K., Goyal V., & Yadav A., 2014. Poly-β-hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10. *Bioresources and Bioproc.*, **1**, 1-11. DOI: 10.1186/s40643-014-0009-5
- Braunegg G., Sonnleitner B., Lafferty R.M., 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in bacterial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29-37. DOI: 10.1007/BF00500854.
- Hahn S. K., Chang Y. K., 1995. A thermogravimetric analysis for poly (3-hydroxybutyrate) quantification. *Biotechnol. Tech.*, **9**, 873-878.
- Huijberts G.N.M., van der Wal H., Wilkinson C., Eggink G., 1994. Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. *Bio-technol. Lett.*, **8**, 187-192. DOI: 10.1007/BF00161588