



Gromadzenie polihydroksykwasów (PHA) w osadzie czynnym w warunkach limitowanego stężenia azotu.

Cz. I. Wpływ parametrów technologicznych na gromadzenie kwasu poli-3-hydroksymasłowego (P(3HB))

Tomasz Pokój, Ewa Klimiuk, Małgorzata Kuczajowska-Zadrożna
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Accumulation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in activated sludge under nitrogen limitation conditions. Part I. Effect of operational condition on effectiveness of poly(3-hydroxybutyric acid) (P(3HB)) accumulation

S u m m a r y

The accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) in activated sludge was investigated. Fed-batch culture was carried out using sodium acetate as the source of carbon. A lack of nitrogen was a stimulating factor of accumulation P(3HB). Two experimental series were run. In series 1, nitrogen was fed into a bacterial culture once for the first 24 hours, in series 2 – for 6 hours each day of the experiment. The effect of operational conditions was evaluated based on the accumulation of P(3HB) in biomass, specific growth rate of microorganisms (μ) yield coefficients ($Y_{P(3HB)/C}$, $Y_{P(3HB)/X}$), and productivity P(3HB). It was proved that the degree of accumulation of P(3HB) in activated sludge was comparable in both series. The highest P(3HB) yield of 0.59 g P(3HB)/g COD was attained in series 1 at the 12th hour after ceasing the nitrogen feeding. In series 1, between the 36th and 48th hour, the productivity reached the level of about 34 mg P(3HB)/l□h. In series 2, $Y_{P(3HB)/C}$ and the productivity accounted for 0.21 g P(3HB)/g ChZT and 21.58 mg P(3HB)/l□h, respectively. The limiting factor of

Adres do korespondencji

Tomasz Pokój,
Katedra Biotechnologii
w Ochronie Środowiska,
Wydział Ochrony
Środowiska i Rybactwa,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. Oczapowskiego 5,
10-719 Olsztyn-Kortowo.

P(3HB) productivity was low specific growth rate of microorganisms of activated sludge. The maximum specific growth (μ_{\max}) reached 0.03 h⁻¹ in series 1 and 0.022h⁻¹ in series 2.

Key words:

activated sludge, poly(3-hydroxybutyric acid), polyhydroxyalkanoates, sodium acetate, productivity of P(3HB), yield P(3HB) coefficients.

1. Wstęp

Zdolność mikroorganizmów do syntezy biopolimerów stanowi obecnie podstawę rozwoju wielu procesów biotechnologicznych. W ochronie środowiska szczególnie obiecująca jest, jak się wydaje, możliwość mikrobiologicznego pozyskiwania poli-hydroksykwasów, zwłaszcza kwasu poli-3-hydroksymasłowego lub jego kopolimeru z kwasem walerianowym. Właściwości fizyczne tych związków wykazują znaczne podobieństwo do polietylenu i polipropylenu, co oznacza, że mogą one stanowić substytut polimerów chemicznych. W odróżnieniu od polimerów syntetycznych poli-hydroksykwasy charakteryzują się podatnością na biochemiczny rozkład, co w przypadku unieszkodliwiania odpadów ma istotne znaczenie (1,2).

Podstawowym czynnikiem ograniczającym powszechność przemysłowej syntezy biopolimerów jest wysoki koszt ich pozyskiwania (około 15-krotnie wyższy niż polimerów syntetycznych) (3). Wynika to zarówno ze znacznej ceny surowców oraz nakładów ponoszonych na utrzymanie czystych kultur, jak i niższej wydajności procesu. Obecnie zarysowują się dwa kierunki działań mających na celu rozwiązywanie tych problemów. Pierwszy, zmierzający do zwiększenia wydajności biosyntezy poprzez właściwy dobór kultur bakterii zdolnych do wysokiej kumulacji PHA oraz charakteryzujących się dużą szybkością wzrostu – w tym zmodyfikowanych genetycznie i drugi polegający na wykorzystywaniu do tego celu osadu czynnego. Zaletą ostatniego rozwiązania jest możliwość stosowania ścieków jako substratów oraz odzysku P(3HB) z osadu nadmiernego, który w oczyszczalniach ścieków jest produktem odpadowym.

Do tej pory najlepiej rozpoznana jest akumulacja P(3HB) w osadzie czynnym z wydzieloną strefą beztlenową. W oczyszczalniach ścieków komunalnych, strefę beztlenową wprowadza się w układach ze zintegrowanym usuwaniem związków węgla, azotu oraz fosforu. Jej obecność stymuluje u mikroorganizmów mechanizm kumulacji polifosforanów komórkowych, który jest sprzężony z metabolizmem poli-hydroksykwasów. Z danych literaturowych wynika, że w warunkach limitowanego stężenia tlenu zawartość kwasu poli-3-hydroksymasłowego w osadzie czynnym może osiągać poziom od 20 do 30% (4). Kumulację P(3HB) w osadzie można zwiększyć do 40% wprowadzając do ścieków kwas octowy (5), bądź wykorzystując sam octan, który obok metanolu jest stosunkowo tanim i dostępnym źródłem węgla (6-8).

Na skalę przemysłową octan można pozyskiwać podczas fermentacji osadów ściekowych. Ścieki z przemysłu rolno-spożywczego zawierają również duże stężenie łatwo fermentujących związków organicznych, ale stężenie azotu jest w nich za-

zwyczaj małe. Wykorzystanie tego rodzaju ścieków do biosyntezy PHA wymagałoby prowadzenia hodowli limitowanych raczej stężeniem azotu, a nie tlenem. Podczas gdy zdolność kumulowania polihydroksykwasów w warunkach beztlenowo-tlenowych jest dość dobrze rozpoznana, dane na temat kumulacji poli-3-hydroksymaślanu przez osad czynny w warunkach limitowanego stężenia azotu są nieliczne. Również stan wiedzy na temat sposobu prowadzenia hodowli z osadem czynnym, przy niedoborze azotu jest niewielki. Skłoniło to do podjęcia badań nad oceną zdolności gromadzenia P(3HB) przez osad czynny przy okresowym braku azotu w pożywce.

Zakres badań obejmował ocenę szybkości wzrostu mikroorganizmów w osadzie czynnym, w hodowlach różniących się sposobem doprowadzania azotu do reaktora. W badaniach zastosowano standardowe źródło węgla w postaci octanu sodu. Efektywność gromadzenia P(3HB) określano na podstawie specyficznej szybkości wzrostu mikroorganizmów μ , współczynników wydajności kwasu poli-3-hydroksymaślanowego ($Y_{P(3HB)/C}$, $Y_{P(3HB)/X}$) oraz produktywności procesu.

2. Metodyka badań

2.1. Skład chemiczny pożywki

W badaniach użyto pożywki mineralnej wg Choi, Yoon (9). Pożywkę przygotowano w następujący sposób: 2,3 g KH_2PO_4 ; 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,3 g NaHCO_3 ; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w 1 litrze wody destylowanej oraz wprowadzono 1 ml roztworu mikroelementów (0,58 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 3,96 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,6 g H_3BO_3 ; 5,56 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 5,62 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,34 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,04 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,06 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ rozpuszczonych w 1 litrze 0,5 n roztworu HCl). Jako źródło węgla zastosowano octan sodu w stężeniu od 5 do 20 gO_2/l (ChZT) zwiększanym w kolejnych dniach proporcjonalnie do zawartości suchej masy osadu czynnego. Azot wprowadzano do pożywki w formie roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utrzymując stałą proporcję $\text{C/N} = 10$.

Czynnikiem stymulującym biosyntezę polihydroksykwasów przez mikroorganizmy osadu czynnego był brak azotu w pożywce. W fazie niedoboru azotu do reaktora dozowano pożywkę mineralną o podanym składzie, z wyjątkiem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. W fazie regeneracji dozowano pożywkę zawierającą $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w stężeniu 20 mg N/l oraz mikroelementy.

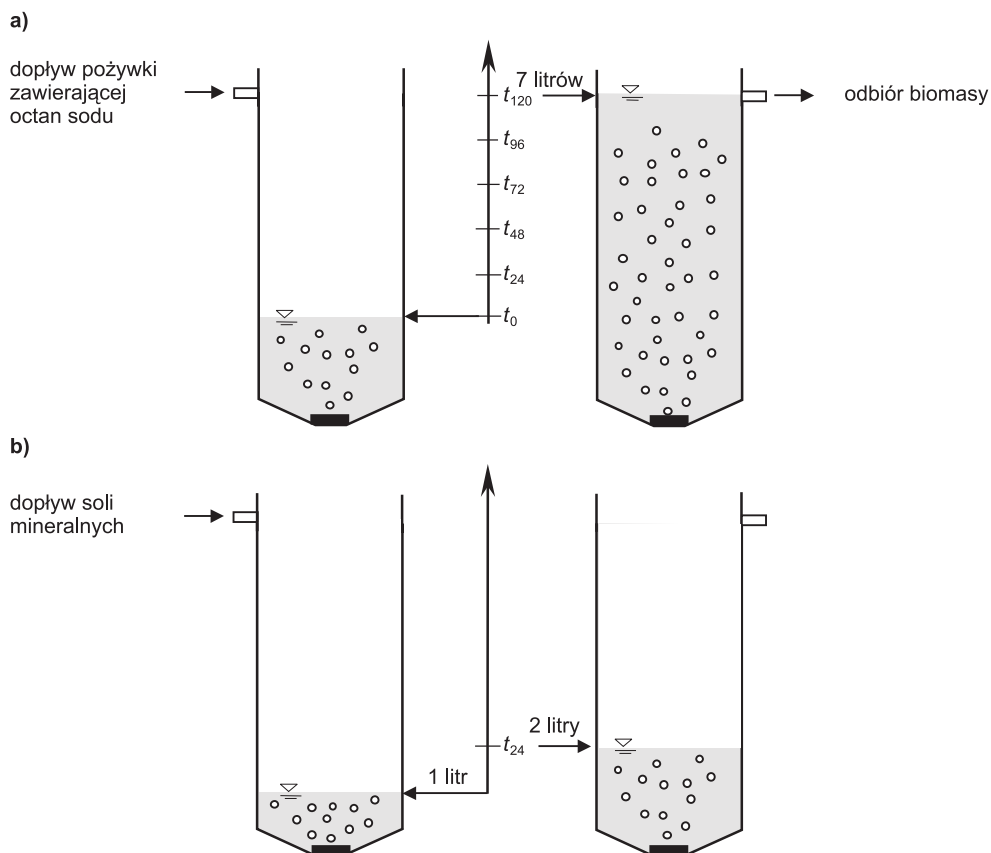
2.2. Stanowisko badawcze i warunki hodowli

Badania technologiczne prowadzono w skali ułamkowo-technicznej w reaktorze o pojemności czynnej 7 litrów. Reaktor składał się z części cylindrycznej oraz dennicy w kształcie stożka. Część cylindryczną stanowiła rura wykonana z pleksiglasu

o średnicy 140 mm i wysokości 490 mm. Reaktor wyposażony był w drobnopęcherzykowy system napowietrzający.

Inoculum stanowił osad czynny pochodzący z miejskiej oczyszczalni ścieków, który poddano adaptacji do warunków stymulujących biosyntezę kwasu poli-3-hydroksymasłowego, prowadząc przez około 3 miesiące hodowlę w opisanych warunkach.

Hodowlę rozpoczynano od wprowadzenia do reaktora 2 litrów inoculum o stężeniu suchej masy około 1 g/l. Następnie przez pięć kolejnych dni hodowli doprowadzano w sposób ciągły pożywkę w objętości litra na dobę. Po uzyskaniu całkowitej objętości wynoszącej 7 litrów, hodowlę przerywano, osad czynny w objętości 6 litrów odprowadzano z reaktora. Pozostały osad czynny w objętości litra poddawano regeneracji. Polegała ona na dozowaniu do reaktora pożywki zawierającej azot i mikroelementy, co miało na celu zużycie przez mikroorganizmy zmagazynowanych uprzednio polimerów komórkowych i regenerację osadu. Sposób prowadzenia hodowli przedstawiono na rysunku 1. Kolejny cykl hodowli rozpoczynano od ustalenia zawartości biomasy w reaktorze na założonym poziomie.



Rys. 1. Sposób prowadzenia hodowli w reaktorze: a) reakcja, b) regeneracja osadu czynnego.

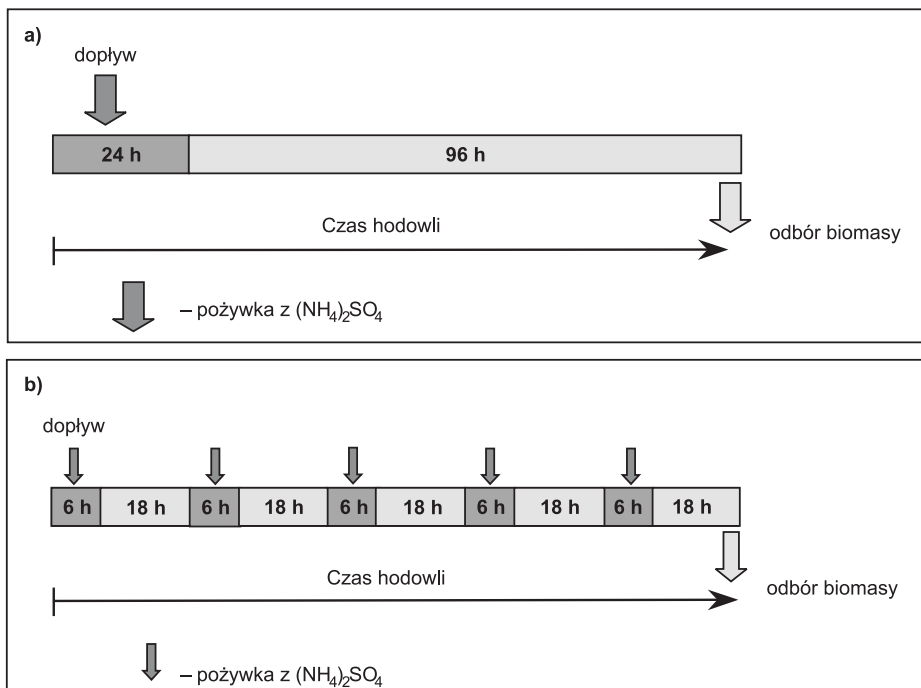
2.3. Założenia eksperymentu

Przeprowadzono 2 serie badawcze różniące się sposobem doprowadzania azotu do reaktora. Sposób dozowania azotu pokazano na rysunku 2. W serii 1 (jednorazowe doprowadzanie azotu) pożywkę zawierającą octan, azot i mikroelementy dozowano przez pierwsze 24 godziny hodowli, po czym w ciągu następnych 96 godzin hodowlę kontynuowano, wprowadzając do reaktora pożywkę pozbawioną azotu, a zawierającą octan sodu i sole mineralne. W serii 2 (pulsowe doprowadzanie azotu) pożywkę z azotem doprowadzano w każdym dniu hodowli. W kolejnych dniach doświadczenia azot w pożywce dozowano przez 6 godzin, a następnie przez 18 godzin pożywkę pozbawioną azotu.

2.4. Metody analityczne

W celu kontroli procesu technologicznego wykonywano następujące analizy chemiczne:

– substancji organicznych oznaczanych jako ChZT zgodnie z Polską Normą PN-74/C-04578.03 (10);



Rys. 2. Sposób dozowania azotu w pożywce: a) w serii 1, b) w serii 2.

- azotu amonowego zgodnie z Polską Normą PN-73/C-04576.02 (11);
- zawiesin ogólnych w reaktorach zgodnie z Polską Normą PN-72/C-04559.02 (12);
- P(3HB) w biomacie wg metodyki podanej przez Law, Slepecky (13).

Analizę stężenia kwasu poli-3-hydroksymasłowego w osadzie czynnym przeprowadzono w następujący sposób: próbkę osadu inkubowano w Cloroxie (The Clorox Company, Oakland, Ca. USA) w temperaturze 37°C przez godzinę. Po inkubacji osad przemywano kolejno wodą destylowaną, acetonem oraz alkoholem etylowym 96%. Z tak przygotowanej próbki ekstrahowano polimer trzema porcjami wrzącego chloroformu. Następnie, chloroform odparowywano, a pozostałość rozpuszczano w stężonym kwasie siarkowym. Zawartość biopolimeru w próbce oznaczano przy użyciu spektrofotometru (Optima SP-3000 UV/VIS) przy długości fali 235 nm.

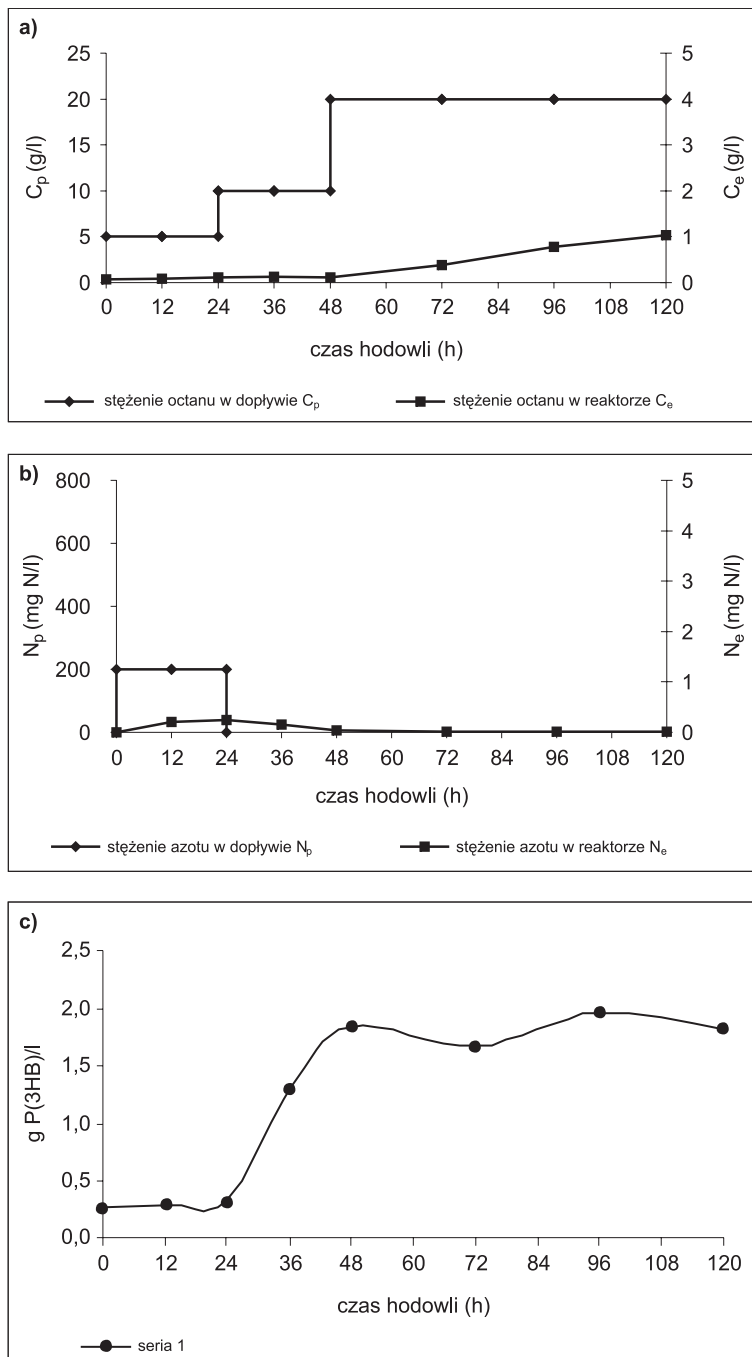
3. Omówienie wyników

3.1. Efektywność kumulacji kwasu poli-3-hydroksymasłowego w zależności od sposobu doprowadzenia azotu

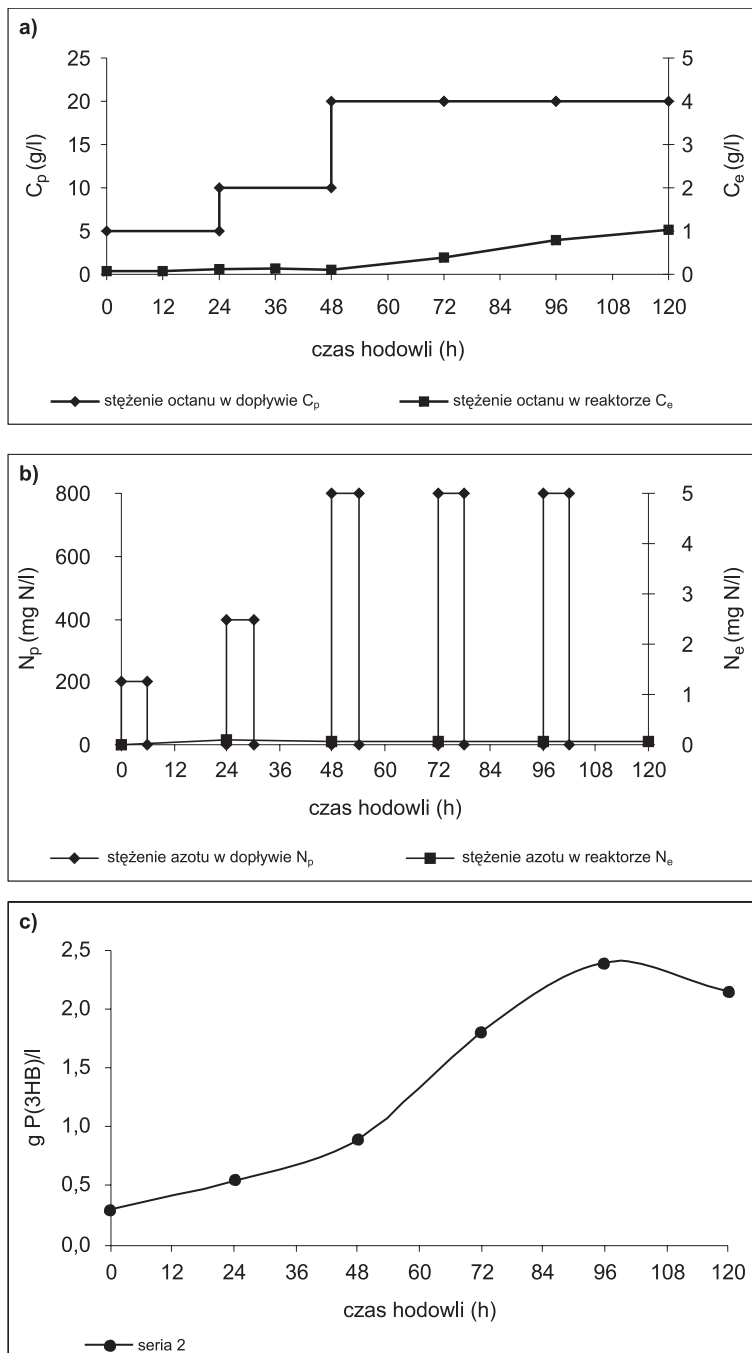
Wyniki badań stężenia octanu (jako ChZT) oraz azotu w doprowadzanej pożywce i w reaktorze, w zależności od czasu, przedstawiono na rysunkach 3 i 4.

W serii 1, azot z pożywką dozowano od rozpoczęcia hodowli przez 24 godziny. W tym czasie stężenie octanu wynosiło 5 g O₂/l (ChZT), a azotu 200 mg N/l, co odpowiadało stosunkowi C/N = 10. Stwierdzono, że w momencie rozpoczęcia hodowli stężenie P(3HB) w biomacie wynosiło 25%, po czym w fazie dozowania azotu zmalało do 21%. Zwiększenie stężenia octanu w dopływie do 10 g O₂/l (ChZT) i równoczesne wstrzymanie podawania azotu spowodowało intensywne gromadzenie poli-3-hydroksymaślanu przez osad czynny i około 2,5-krotny wzrost jego zawartości w osadzie czynnym. Następnie, pomimo dalszego zwiększenia stężenia octanu zawartość P(3HB) w biomacie w kolejnym dniu hodowli, zmniejszyła się do 32% i dalej utrzymała na niezmiennym poziomie do końca doświadczenia (rys. 3).

W serii 2, podczas pulsowego doprowadzania azotu do rektora, utrzymywano identyczną proporcję C/N w pożywce jak w serii 1. W badaniach ujawniono, że zawartość P(3HB) w biomacie zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia octanu w dopływie. Największy stopień kumulacji P(3HB) w biomacie wynoszący 51% odnotowano pomiędzy 72 a 120 godziną hodowli, gdy stężenie octanu w dopływie wynosiło 20 g O₂/l (ChZT) (rys. 4).



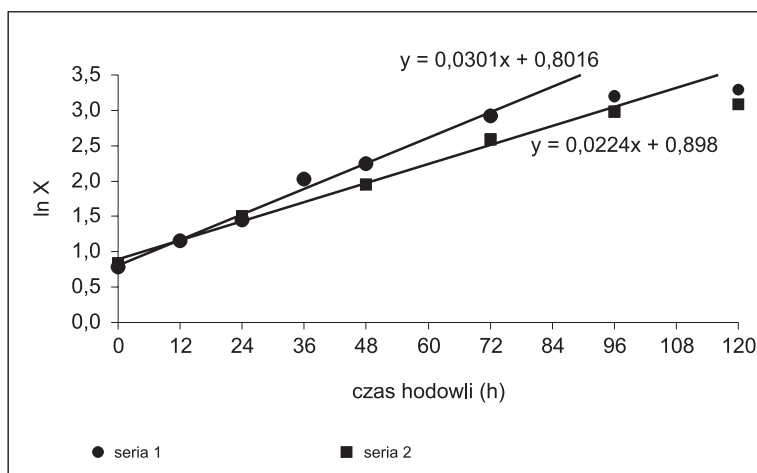
Rys. 3. Profile stężenia pożywek i P(3HB) w serii 1 przy jednorazowym dozowaniu azotu: a) octanu, b) azotu, c) P(3HB).



Rys. 4. Profile stężenia pożywek i P(3HB) w serii 2 przy pulsowym dozowaniu azotu: a) octanu, b) azotu, c) P(3HB).

3.1.1. Specyficzna szybkość wzrostu

Przyrost osadu czynnego w reaktorze pokazano na rysunku 5. Z przebiegu danych eksperymentalnych przedstawiających zależność $\ln X = f(t)$ wynika, że w serii 1 miała ona prawie liniowy przebieg aż do 72 godziny hodowli. W tym czasie komórki rosły ze stałą szybkością, co oznacza wykładniczy charakter wzrostu mikroorganizmów osadu czynnego. W serii 2, z pulsowym dozowaniem azotu, czas trwania fazy wzrostu wykładniczego był dłuższy i trwał do 96 godziny. Współczynnik (a) wyznaczony z równania regresji prostoliniowej odpowiadał liczbowo maksymalnej specyficznej szybkości wzrostu (μ_{\max}). Z przebiegu prostych wynika, że specyficzna szybkość wzrostu mikroorganizmów osadu czynnego w serii 1 wyniosła $0,03 \text{ h}^{-1}$ i była wyższa w porównaniu z serią 2 ($\mu_{\max} = 0,022 \text{ h}^{-1}$).



Rys. 5. Zmiany stężenia biomasy (jako $\ln X$) w czasie.

3.1.2. Wydajność biosyntezy kwasu poli-3-hydroksymasłowego

Wydajność P(3HB) analizowano w odniesieniu do ilości zużytego octanu ($Y_{P(3HB)/C}$) oraz przyrostu biomasy ($Y_{P(3HB)/X}$). Zgodnie z definicją $Y_{P(3HB)/C}$ jest to stosunek szybkości kumulowania P(3HB) do szybkości zużycia substratu, podczas gdy $Y_{P(3HB)/X}$ – stosunek szybkości kumulowania P(3HB) do szybkości przyrostu biomasy.

Dla badanych przedziałów czasowych $Y_{P(3HB)/C}$ liczono jako:

$$Y_{P(3HB)/C} = \frac{C_{P(3HB)} - C_{0, P(3HB)}}{C_0 - C}$$

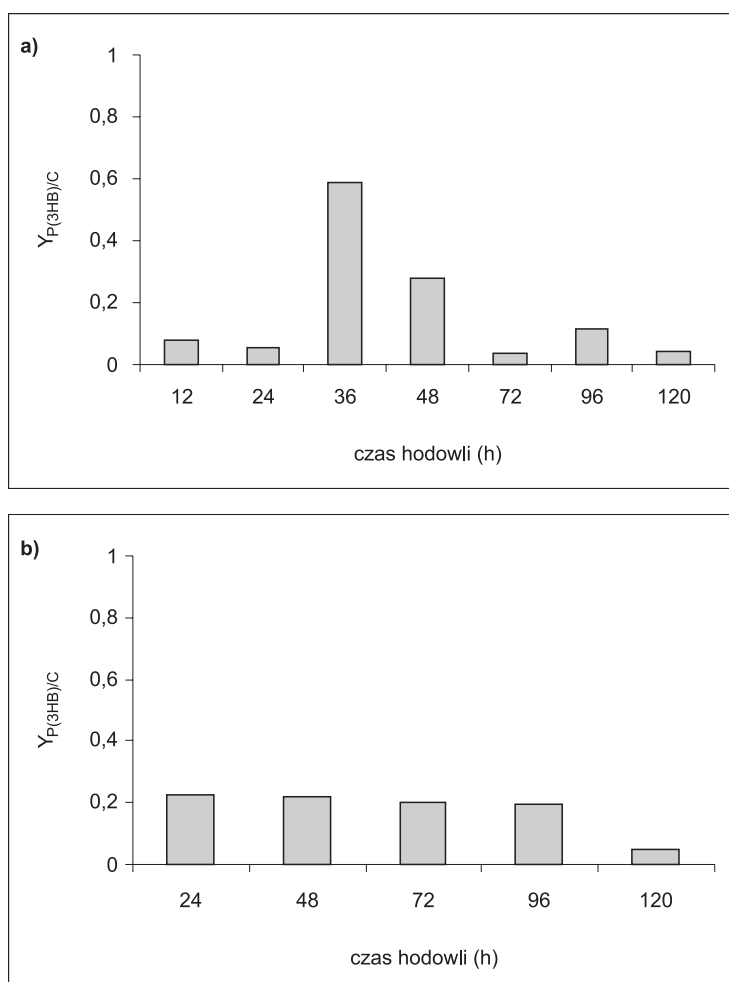
analogicznie $Y_{P(3HB)/X}$:

$$Y_{P(3HB)/X} = \frac{C_{P(3HB)} - C_{0, P(3HB)}}{X - X_0}$$

gdzie:

- C_0 – stężenie octanu w czasie $t = 0$ (g/l),
 C – stężenie octanu w czasie t (g/l),
 $C_{0, P(3HB)}$ – stężenie kwasu poli-3-hydroksymasłowego w czasie $t = 0$ (g P(3HB)/l),
 $C_{P(3HB)}$ – stężenie kwasu poli-3-hydroksymasłowego w czasie t (g P(3HB)/l),
 X_0 – stężenie suchej masy osadu czynnego w czasie $t = 0$ (g smo/l),
 X – stężenie suchej masy osadu czynnego w czasie t (g smo/l).

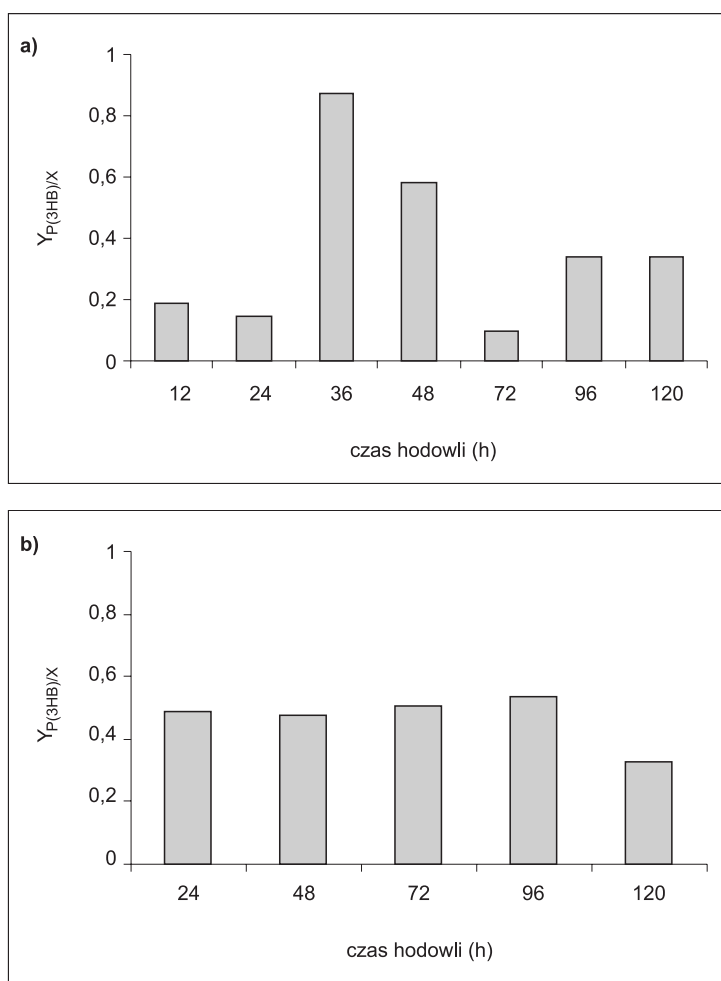
Zmiany wartości współczynników wydajności $Y_{P(3HB)/C}$ w czasie hodowli pokazano na rysunkach 6a i 6b. Z prezentowanych danych wynika, że sposób wprowadzania azotu z pożywką w istotny sposób wpływał na wielkość tego parametru.



Rys. 6. Wydajność P(3HB) w odniesieniu do ilości zużytego substratu $Y_{P(3HB)/C}$: a) seria 1 (jednorazowe dozowanie azotu), b) seria 2 (pulsowe dozowanie azotu).

W serii 1 współczynniki wydajności zmieniały się w szerokim zakresie od 0,05 do 0,59 g P(3HB)/g ChZT. Podczas gdy w pierwszej dobie ilość substratu pobierana na biosyntezę P(3HB) nie przekroczyła 8%, to po zaprzestaniu dozowania azotu wzrosła do 59% (rys. 6a). W kolejnych dniach hodowli kumulacja P(3HB) wahała się w przedziale od 4 do 12% (0,04-0,12 g P(3HB)/g ChZT), pomimo że pożywka doprowadzana do reaktora nie zawierała azotu, a stężenie octanu w dopływie pozostawało wysokie, podobnie jak stopień jego zużycia.

W serii 2, $Y_{P(3HB)/C}$ zmieniał się w niewielkim zakresie od 0,23 g P(3HB)/g ChZT na początku doświadczenia do 0,19 g P(3HB)/g ChZT po upływie 96 godzin, wykazując tendencję spadku w kolejnych dniach hodowli. Po 120 godzinach współczynnik wydajności był najniższy (rys. 6b).



Rys. 7. Wydajność P(3HB) w odniesieniu do przyrostu biomasy $Y_{P(3HB)/X}$: a) seria 1 (jednorazowe dozowanie azotu), b) seria 2 (pulsowe dozowanie azotu).

Zmiany współczynników wydajności P(3HB) w przeliczeniu na suchą masę osadu ($Y_{P(3HB)/X}$) w czasie wykazywały analogiczną tendencję jak $Y_{P(3HB)/C}$. W serii 1 najwyższe wartości $Y_{P(3HB)/X}$ 0,87 g P(3HB)/g smo i 0,58 g P(3HB)/g smo uzyskano odpowiednio po 36 i 48 godzinie doświadczenia. W tym czasie przyrost P(3HB) stanowił odpowiednio 87 i 58% przyrostu suchej masy osadu (rys. 7a). Z wyjątkiem ostatniej doby, w serii 2 współczynnik $Y_{P(3HB)/X}$ utrzymywał się na poziomie 0,47-0,54 g P(3HB)/g smo, co oznacza, że udział P(3HB) był mniejszy i stanowił od 47 do 54% przyrostu suchej masy osadu (rys. 7b).

Można zatem stwierdzić, że przy jednorazowym doprowadzeniu pożywki, po zaprzestaniu dozowania azotu wydajność biosyntezy P(3HB) wzrastała skokowo, ale wysoki poziom stężenia P(3HB) w biomacie utrzymywał się stosunkowo krótko. Pulsowe dozowanie azotu umożliwiało utrzymanie stałej koncentracji P(3HB) przez cały czas trwania fazy wykładniczego wzrostu mikroorganizmów.

3.1.3. Produktywność objętościowa kwasu poli-3-hydroksymasłowego

Produktywność objętościowa P(3HB) jest określana jako ilość P(3HB) wytwarzana na jednostkę czasu i objętości reaktora (22):

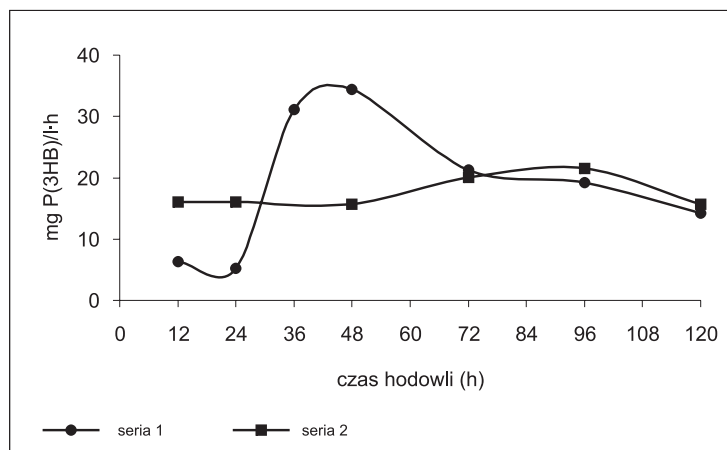
$$\text{Produktywność} = \frac{C_{P(3HB)} - C_{0, (P3HB)}}{V t}$$

gdzie:

V – objętość reaktora (l),

t – czas hodowli (h).

Wyniki badań uzyskane w obu hodowlach pokazano na rysunku 8. Z prezentowanych danych wynika, że w tym przypadku korzystniejszy okazał się jednorazowy



Rys. 8. Zmiany produktywności P(3HB) w czasie.

sposób wprowadzania azotu. Po zaprzestaniu dozowania azotu, szybkim wzrostowi kumulacji P(3HB) w osadzie towarzyszył wzrost produktywności. Najwyższą produktywność objętościową P(3HB), wynoszącą 34,40 mg P(3HB)/l□h, uzyskano pomiędzy 36 a 48 godziną hodowli. W serii 2, przy pulsowym wprowadzaniu azotu, produktywność była stabilna, lecz nie przekroczyła poziomu 21,58 mg P(3HB)/l□h.

4. Dyskusja

W badaniach wykazano, że w hodowlach z limitowanym stężeniem azotu stopień kumulacji P(3HB) w osadzie czynnym był porównywalny bądź niższy z wynikami uzyskiwanymi dla czystych kultur (tab.). Komórki akumulowały P(3HB) w ilości maksymalnej 51% przy pulsowym doprowadzaniu azotu do reaktora i 52% – przy jednorazowym.

W badaniach użyto pożywki, w której proporcja C/N = 10. Zdaniem wielu autorów jest to podstawowy czynnik decydujący o zdolności gromadzenia P(3HB) w biomacie. Sun i wsp. (14) odnotowali wzrost zawartości P(3HB) w komórkach *Azospirillum brasilense* Sp7 na maltozie od 0 do 15% zwiększając proporcję C/N z 6,84 do 27,36. Durner i wsp. (15) wykazali, że *Pseudomonas oleovorans* gromadził znaczące ilości PHA dopiero przy proporcji octanu do azotu (jako C/N) wyższej niż 8,3. Akumulacja polimerów osiągnęła jednak maksymalną wartość (42% wag.), przy stosunku C/N = 17,4. Beun i wsp. (16) badali kumulację P(3HB) w osadzie czynnym hodowanym na ściekach syntetycznych z dodatkiem octanu, w warunkach limitowanego stężenia tlenu. Zdaniem autorów duży stosunek C/N w dopływie konieczny jest, wówczas gdy szybkość syntezy P(3HB) (q_p^{prod}) jest wyższa od specyficznej szybkości wzrostu mikroorganizmów (μ). Gdy q_p^{prod}/μ jest bliski zera, a komórki nie gromadzą P(3HB), wówczas wartość C/N nie musi być wyższa niż 4. Z teoretycznych rozważań autorów wynika, że w przypadku gdy cały dostępny substrat jest wykorzystywany na syntezę P(3HB), wówczas wartość C/N powinna być równa 6,88.

Na podstawie badań własnych wykazano, że w serii z pulsowym wprowadzaniem azotu wartość $Y_{P(3HB)/C}$ kształtowała się na prawie stałym poziomie (0,21 g P(3HB)/g ChZT). W serii z okresowym dozowaniem azotu najwyższą wydajność polihydroksy-maślanu (0,59 g P(3HB)/g ChZT) uzyskano w 12 godzinie od momentu zaprzestania dozowania azotu do reaktora i spadek jej wartości w kolejnych dniach hodowli. Analogiczne tendencje obserwowali Du i Ju (17) w hodowli *Pseudomonas oleovorans*. Największą wydajność polihydroksykwasów wynoszącą 0,35 g PHA/g substratu (kwas nonowy z octowym) uzyskali w 11 godzinie hodowli. Po tym czasie wydajność systematycznie malała osiągając poziom 0,23 g PHA/g substratu na końcu doświadczenia.

Z danych literaturowych wynika, że współczynnik $Y_{P(3HB)/C}$ zależy od rodzaju źródła węgla. Marchessault i Sheppard (18) dla *Alcaligenes eutrophus* uzyskali wydajność na poziomie 0,31 g P(3HB)/g glukozy. Kim i wsp. (19) podają prawie identyczną

Tabela

Warunki syntezy i wydajność procesu gromadzenia P(3HB) przez mikroorganizmy

Mikroorganizmy	Źródło węgla	Substancja limitująca	Typ hodowli	Czas hodowli (h)	Produktywność (g P(3HB)/1□h	Zawartość P(3HB) (%)	Literatura
Czyste kultury mikroorganizmów							
<i>Alcaligenes latus</i>	sacharoza	azot	okresowa ze stopniowym zasilaniem substratem	20	4,94	88	(23)
<i>Alcaligenes latus</i>	sacharoza	–	okresowa ze stopniowym zasilaniem substratem	18	3,97	50	(24)
<i>Ralstonia eutropha</i>	glukoza	fosfor	okresowa ze stopniowym zasilaniem substratem	74	3,14	82	(25)
<i>Ralstonia eutropha</i>	glukoza	azot	okresowa ze stopniowym zasilaniem substratem	50	2,42	76	(19)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	skrobia	tlen	okresowa ze stopniowym zasilaniem substratem	70	0,35	46	(20)
<i>Azotobacter chroococcum</i> H23	skrobia	–	okresowa	72	0,0535	74,2	(26)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	laktoza	–	okresowa	120	0,0167	56	(27)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	skrobia	tlen	okresowa	58	0,0149	73,9	(21)
Osad czynny							
	octan sodu	hodowla tlenowa	SBR z jednorazowym dozowaniem substratu	–	0,26	12	(28)
	octan sodu	hodowla tlenowa	SBR z jednorazowym dozowaniem substratu	–	0,045		(29)
	kwas masłowy	azot	okresowa	48	–	37	(22)
	octan sodu	azot	okresowa ze stopniowym zasilaniem substratem	48	0,034	52	badania własne

wartość współczynnika (0,3 g P(3HB)/g glukozy) z udziałem *Ralstonia eutropha*. W hodowli *Azotobacter chroococcum* na pożywce z dodatkiem skrobi wydajność syntezy P(3HB) była mniejsza i wyniosła 0,174 g P(3HB)/g skrobi (20,21). Najwyższą wydajność syntezy P(3HB) z udziałem mieszanych populacji mikroorganizmów zaobserwowali Hu i wsp. (22). Autorzy wykazali, że na kumulację polihydroksymasłanu mikroorganizmy osadu czynnego wykorzystywały 69% kwasu masłowego, który stanowił substrat.

Parametrem technologicznym w istotny sposób obrazującym zarówno efektywność kumulacji P(3HB), jak i stopień wykorzystania objętości czynnej reaktora jest produktywność objętościowa. W serii 1 najwyższą produktywność wynoszącą 34,40 mg P(3HB)/l□h uzyskano pomiędzy 36 a 48 godziną hodowli, po czym jej wartość spadała do poziomu 14,27 mg P(3HB)/l□h na końcu hodowli. W serii 2, powtarzające się cyklicznie w kolejnych dniach doświadczenia, dozowanie azotu spowodowało wzrost stężenia P(3HB) w czasie. Jednak produktywność objętościowa P(3HB) pozostawała na prawie stałym poziomie i nie przekroczyła wartości 21,58 mg P(3HB)/l□h.

Porównując własne wyniki, z uzyskanymi dla czystych kultur oraz osadu czynnego, można stwierdzić, że w zależności od warunków hodowli i składu gatunkowego mikroorganizmów produktywność była podobna lub wyraźnie niższa (tab.). Podczas hodowli bakterii *Azotobacter chroococcum* oraz *Azotobacter chroococcum* H23 na pożywce z dodatkiem skrobi jako źródła węgla, produktywność P(3HB) wyniosła odpowiednio 0,0149 i 0,0535 g P(3HB)/l□h (21,26). Z podobnie niewielką szybkością (0,0167 g P(3HB)/l□h) poli-3-hydroksymasłan akumulowała *Pseudomonas cepacia* (27). Z danych literaturowych wynika jednak (tab.), że w wielu przypadkach szybkość syntezy P(3HB) przez czyste kultury mikroorganizmów była wysoka i zawierała się w przedziale od 2 do 4 g P(3HB)/l□h.

Produktywność procesu zależy od stopnia kumulacji P(3HB) w osadzie czynnym, specyficznej szybkości wzrostu mikroorganizmów oraz zawartości suchej masy osadu w reaktorze. W badaniach własnych specyficzna szybkość wzrostu mikroorganizmów osadu czynnego była niezbyt wysoka i wyniosła od 0,022 do 0,03 h⁻¹. Przy tak niskiej specyficznej szybkości wzrostu, w hodowlach okresowych nie można uzyskać wysokiej koncentracji osadu czynnego. W tej sytuacji lepszym rozwiązaniem jest, jak się wydaje, przejście na hodowlę półciągłe pozwalające na utrzymywanie stałej, odpowiednio wysokiej koncentracji osadu.

5. Wnioski

1. Sposób dozowania azotu nie wpływał na procentową zawartość kwasu poli-3-hydroksymasłowego w suchej masie osadu czynnego. W obu seriach udział P(3HB) w osadzie czynnym kształtował się na porównywalnym poziomie wynoszącym około 50%.

2. Przy jednorazowym wprowadzaniu azotu, wydajność syntezy P(3HB) wzrastała skokowo po zaprzestaniu dozowania azotu, ale wysoki poziom stężenia biopolimeru w osadzie utrzymywał się stosunkowo krótko. Największą wartość $Y_{P(3HB)/C}$ (0,59 g P(3HB)/g ChZT) uzyskano po upływie 12 godzin od momentu wstrzymania dozowania azotu. Pulsowe dozowanie azotu umożliwiło utrzymanie wydajności P(3HB) na prawie stałym poziomie (0,21 g P(3HB)/g ChZT) przez cały czas trwania fazy wzrostu wykładniczego.

3. Najwyższą produktywność objętościową, wynoszącą 34,4 mg P(3HB)/l□h, uzyskano podczas okresowego dozowania azotu pomiędzy 36 a 48 godziną hodowli. Przy pulsowym dozowaniu produktywność P(3HB) pozostawała na prawie stałym poziomie, a jej wartość nie przekroczyła 21,58 mg P(3HB)/l□h.

4. Z punktu widzenia produktywności procesu, korzystniejsze jest jednorazowe doprowadzanie pożywki z azotem. Pulsowe dozowanie zapewnia natomiast stałą wydajność syntezy i stężenia P(3HB) w osadzie czynnym.

Literatura

1. Steinbüchel A., Fächtenbusch B., (1998), *Trends Biotechnol.*, 16, 419-427.
2. Walle van der G. A. M., de Koning G. J. M., Weusthuis R. A., Eggink G., (2001), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 71, 263-291.
3. Choi J., Lee S. Y., (1997), *Bioprocess Eng.*, 17, 335-342.
4. Chua A. S. M., Takabatake H., Satoh H., Mino T., (2003), *Wat. Res.*, 37, 3602-3611.
5. Beun J. J., Dircks K., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (2002), *Wat. Res.*, 36, 1167-1180.
6. Smolders G. J. F., Vander Neij J., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 461-470.
7. Filipe C. D. M., Daigger G. T., Grady Jr. C. P. L., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 76, 32-43.
8. Liu W., Nakamura K., Matsuo T., Mino T., (1997), *Wat. Res.*, 31, 1430-1438.
9. Choi M. H., Yoon S. C., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3245-3254.
10. Polska Norma 74/C-04578.03 – Oznaczanie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) metodą dwuchromianową.
11. Polska Norma 73/C-04576.02 – Oznaczanie azotu amonowego metodą miareczkową.
12. Polska Norma 72/C-04559.02 – Oznaczenie zawiesin ogólnych, mineralnych i lotnych metodą wagową.
13. Law J. H., Slepceky R. A., (1961), *J. Bacteriol.*, 82, 33-36.
14. Sun J., Peng X., van Impe J., Vanderleyden J., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 113-117.
15. Durner R., Zinn M., Witholt B., Egli T., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 278-287.
16. Beun J. J., Verhoef E. V., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 496-507.
17. Du G., Yu J., (2002), *Process Biochem.*, 38, 325-332.
18. Marchessault P., Sheppard J. D., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 815-820.
19. Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K., Woo S. I., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 892-898.
20. Kim B. S., Chang H. N., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 109-112.
21. Kim B. S., (2000), *Enzyme Microb. Tech.*, 27, 774-777.
22. Hu W. F., Chua H., Yu P. H. F., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 695-698.
23. Wang F., Lee S. Y., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3703-3706.
24. Yamane Y., Fukunaga M., Lee Y. W., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 197-202.

25. Ryu H. W., Hahn S. K., Chang Y. K., Chang H. N., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 28-32.
26. Martínez-Toledo M. V., González-López J., Rodelas B., Pozo C., Salmeron V., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 413-418.
27. Young F. K., Kastner J. R., May S. W., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4195-4198.
28. Beun J. J., Paletta F., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 67, 379-388.
29. Krishna C., van Loosdrecht M. C. M., (1999), *Wat. Res.*, 33, 2374-2382.