

Експериментални методи за биоразграждане на глицерол до получаване на ценни органични съединения

Симеон Даракчиев

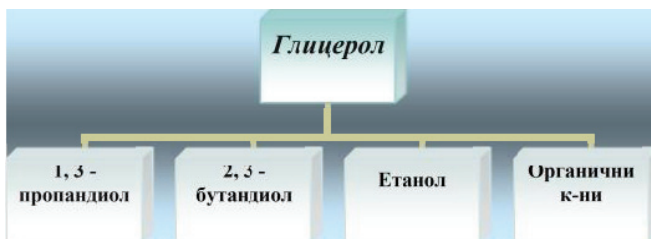
Experimental methods for biodegradation of glycerol to obtain valuable organic compounds: A basic problem in the production of biodiesel is the release of large amounts of waste glycerol. Since it is very low quality and can not be used directly, one way to utilize it is by its biodegradation with appropriate enzymes. As a result some valuable products are obtained such as 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, organic acids, and small amounts of ethanol. In this work was carried out literature review of the publications which consider the obtaining of valuable products from glycerol and especially 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. Main attention is given to the experimental methods, apparatuses and the conditions for carrying out experiments.

Keywords: biodegradation, glycerol, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol

ВЪВЕДЕНИЕ

Биодизелът е едно от най значимите биогорива – алтернатива на традиционното дизелово гориво. Основен проблем при производството на биодизелово гориво е отделянето на големи количества отпадъчен глицерол. За всеки един тон биодизел се произвеждат 100 кг глицерол. Суровият глицерол, получен при производството на биодизел, обаче, е с много ниска стойност. За използването му в храни, козметика и лекарства е необходимо последващо пречистване като обезцветяване, премахване на неприятната миризма и йонообмен за премахване на следи от примеси, което на този етап е скъпо. Един от начините за решаването на този проблем е оползотворяването на глицерола до получаването на ценни продукти като 1,3-пропандиол, 2,3-бутандиол, органични киселини и др.

Микробиологичното разграждане на глицерола до различни съединения е изследвано, като специално внимание е отделено на производството на 1,3-пропандиол, водород и етанол.



Фиг. 1

Анаеробното разграждане на глицерола като директен субстрат е описано в няколко разработки. В резултат на това разграждане се получават и други продукти освен биогаз (например 1,3-пропандиол). За биодеградацията на глицерол са използвани чисти култури микроорганизми [6, 7, 8, 16, 10]. Подобна информация за анаеробното разграждане на глицеролната фаза чрез чиста култура от микроорганизми е описана в литературата. Най-честия продукт на тази деградация е 1,3-пропандиол [12, 14, 15]. Анаеробна биодеградация на суров глицерол от производството на биодизел са описани в работата на Yazdani и Gonzales [19].

Бактериите, метаболизиращи глицерола, са представители на семействата *Clostridium* и *Enterobacteriaceae*. Родовете *Aerobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*,

Moellerella, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pectobacterium* и други, принадлежат към ентеробактериите.

Всички ентеробактерии могат да разграждат глицерола, но ценни биотехнологични продукти (1,3-пропандиол, 2,3-бутандиол) могат да синтезират само *Klebsiella* и *Citrobacter*. С щамовете от род *Pseudomonas* са проведени успешни ферментации за получаване на 1,3-пропандиол от глицерол. Ферментацията е от смесен тип, по времето на която се получава смес от диоли, етанол и органични киселини.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Процесът на получаване на 1,3-пропандиол по биотехнологичен път зависи от много фактори – състав на хранителната среда, аерация и др. Основният проблем при биодegradацията на глицерол е големият брой получавани продукти в резултат на този процес. Освен 1,3-пропандиол, в културалната течност, в зависимост от използвания щам и условията на провеждане на процеса, може да присъстват и 1,2-пропандиол, 2,3-бутандиол, етанол, ацетат, лактат. Невъзможно е процесът на биодegradация да се осъществи така, че да се получи само 1,3-пропандиол. Затова голямо внимание се отделя на методите за изолиране и пречистване на този продукт. За сега най-използваните методи в това отношение са екстракцията, йонообменната хроматография, мембранната филтрация и др.

Papanikolaou et al. [13] провеждат периодична и непрекъсната ферментация със щам *Clostridium Butyricum*. Периодичният и едностъпален непрекъснат процеси са проведени в 2-литров реактор при температура от 33°C. Направен е и двустъпален непрекъснат процес с цел получаване едновременно на висока концентрация на продукта и висока производителност. Първата фаза се характеризира с висока скорост на разреждане, за да се увеличи производителността на 1,3-пропандиол, а втората протича при по-ниска скорост, което увеличава концентрацията. Най-висока концентрация на 1,3-пропандиол при едностъпален процес е 35-48 g/l. За двата типа изследвани процеси е получен около 0,55 g 1,3-пропандиол за 1g изразходен глицерол. Такъв резултат е получен и от други автори със същият щам [20]. Himmi et al. [5] използват *Clostridium Butyricum* в периодичен процес за получаване на 1,3-пропандиол. Експериментите са проведени с три вида хранителни среди в 20 литров реактор с използваем обем от 17 l.

Друг микроорганизъм, който е често използван за ферментация на глицерол до 1,3-пропандиол е *Klebsiella Pneumoniae*. Xiu et al. [18] оптимизират условията на периодична и непрекъсната ферментация на базата на обемната производителност на 1,3-пропандиол. При непрекъснат процес оптималната скорост на разреждане и начална концентрация на глицерол в входната суровина са съответно 0,29/h и 731 mmol/l. Производителността е 114 mmol/l.h, което е над два пъти повече от оптималните стойности за периодичен процес. Те предлагат двустъпален непрекъснат процес, в който в първата фаза се работи при оптимални условия, а втората използва остатъчния глицерол от първата. Скоростта на разреждане е по-висока при втората степен. Двустъпален биопроцес в два биореактора в серия е за предпочитане пред един биореактор по отношение на концентрацията и добива на 1,3-пропандиол.

Chen et al. [3] изследват влиянието на различни източници на въглерод, азот, органични хранителни вещества и соли върху формирането на клъщовият ензим при ферментацията. Според тях оптималните условия са 37°C, pH – 7,0, скорост на разклащане 200 rpm. Резултатите показват поява на максимална активност на ключовият ензим преди получаване на максималната концентрация на 1,3-пропандиол. Chen et al. [4] показват, че аеробното культивиране е по-добро за растежа на клетката, намаляване на времето на культивиране и образуването на етанол и увеличаването на производството на 1,3-пропандиол.

Menzel et al. [11] получават крайна концентрация на глицерол 35,2-48,5 g/l при непрекъснат процес в работен обем от 2l. Реакторът работи при 300 rpm, pH 7,0 се поддържа чрез добавяне на 30% КОН и температурата е 37°C. Разтвор на глицерол от 870 g/l се подава отделно в междинен резервоар, вместо директно в реактора според нужната концентрация на глицерол във входящата среда. За всяка скорост на разреждане се получава устойчиво състояние при различни концентрации на глицерол в средата. Крайната обемна производителност от 4,9-8,8 g/l еполучена при скорост на разреждане между 0,1 и 0,25/h. Най-високата получена концентрация на пропандиол е 50-60 g/l при периодичен и периодичен с подхранване на интервали (fed-batch) процес. При непрекъснат процес производителността е между 2 и 3,5 пъти по-висока.

Wang et al. [17] изследват конверсията на глицерол до 1,3-пропандиол при периодичен и непрекъснат процес и при аеробни и анаеробни условия. Скоростта на биоконверсия при двата процеса е подобна, но производителността на 1,3-пропандиол е по-висока в случай на аеробен процес.

Lin et al. [9] повишават продукцията на 1,3-пропандиол от *Klebsiella pneumoniae* чрез добавяне на фумарат. Проведени са експерименти в колби за 4 часа с начална концентрация на глицерол от 20 g/l и добавяне на фумарат в диапазона от 0 до 25 mM. Установено е, че клетките нарастват по-бързо с добавянето на фумарат.

К. Петров и П. Петрова използват за биодеградиация на глицерол щам *Klebsiella pneumoniae* G31 в условията на fed-batch ферментация (с подхранване през интервали от време). Хранителната среда, използвана в този случай, е модифицирана среда на Zhao. Стартовата концентрация на глицерол в нея е 30 g/l. Най-висок добив на 2,3-бутандиол (49.9 g/l) и 1,3-пропандиол (11.6 g/l) са постигнати при pH-неконтролирана ферментация на хранителна среда в отсъствието на Co^{2+} . Общото количество на разграден глицерол по време на процеса е 138,3 g [14, 15].

Възможността 2,3-БД да бъде получен от глицерол е забелязана за първи път от Biebl при изследване на био-конверсията на глицерола от *Klebsiella* и *Citrobacter* [1, 2]. Проблемът на такава ферментация обаче е, че главният продукт е 1,3-пропандиолът, а 2,3-БД е съпътстващ, заедно с етанол, ацетат, лактат и др. Със съвременните методи на генното инженерство се създават мутантни щамове с елиминирани определени биохимични пътища – напр. тези за получаване на лактат и ацетат, което довежда до 7.8% повишена продукция на 2,3-БД и 88 – 92% намаление на синтезираните киселини.

Резултатите от изследвания върху получаването на ценни химикали от глицерол, проведени в Института по инженерна химия на БАН са представени в няколко дипломни работи излезли в последните години. В [23] е изследвана възможността на българския изолат *Pseudomonas denitrificans* 1625, за биодеградиация на глицерол, за получаване на по-висок добив на 1,3-пропандиол. Използвани са два вида хранителни среди, които са стерилизирани в автоклав при температура 121°C и налягане 1 atm. за 20 минути. Процесът на биодеградиация се осъществява в ротационна клатачка при 200 оборота в минута (rpm). Клатачката е модел "New Brunswick Scientific" New Jersey, USA, която работи при температура 30°C и разбъркване 0, 90, 120 и 200 rpm. При всички процеси с началната концентрация на субстрата (глицерол) варира от 10 – 30 g/l. Установено е, че в условията на периодичен процес, проведен в колби на клатачка, оптималната стартова концентрация на субстрата се оказа 20 g/l. При първоначална концентрация на глицерол в хранителната среда 10 и 20 g/l, използваният щам не продуцира 1,2-пропандиол и 2,3-бутандиол, което значително би облекчило процеса на изолиране и пречистване на 1,3-пропандиолът от културалната течност.

В [22] е изследвана биотрансформиращата способност на щамовете *Klebsiella oxytoca* VA 8391 и *Klebsiella pneumoniae* G 31 на различни хранителни среди и при различни условия с цел биоразграждане на най-големи количества на глицерол,

както и на максимални количества получени като резултат на биодegradацията ценни вещества. Хранителните среди са стерилизирани в автоклав при температура 121°C и налягане 1 atm. в продължение на 20 минути. Инокулумът се развива за 24 часа на ротационна клаткача модел "New Brunswick Scientific" New Jersey, USA, при 150 оборота в минута (rpm).

Периодичните процеси за биодegradация на глицерол са провеждани на 500 ml Ерленмайерови колби с работен обем 200 ml и концентрация на глицерол в средата 10 g/l. и в биореактор „Bio flo“ с тотален обем 500 ml и работен обем – 300 ml. Апаратът е производство на фирмата „New Brunswick scientific“.

Установено е, че и двата щама притежават способността да трансформират глицерол, като процесът протича с два пъти по-висока скорост при периодични условия когато се използва щам *Klebsiella pneumoniae* G31. При периодичен процес на биотрансформация на глицерол в биореактор с помощта на *Klebsiella oxytoca* VA 8391 за първи път като продукт се появява ябълчена киселина, и то в концентрация почти 6 g/l.

Възможността за получаване на по-висок добив на 2,3-бутандиол с помощта на *Klebsiella oxytoca* VA 8391 е разгледана в [21]. Изследвана е биодegradацията на глицерол при различни концентрации на субстрата. При всички процеси с подхранване началната концентрация на субстрата (глицерол) варира от 5 – 10 g/l, а при останалите процеси без подхранване – от 10 – 30 g/l. Определена е оптимална концентрация на субстрата 20 g/l. Провеждането на процеса в полупериодични условия води до образуването на по-голямо количество на 2,3 бутандиол в културалната течност. Най-високи концентрации на 2,3 бутандиол са получени в условия на комбинирано разбъркване.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направеният преглед показва наличие на множество изследвания върху получаването на 1,3-пропандиол и значително по-малко на 2,3-бутандиол, вследствие биоразграждане на глицерол, получен като отпадъчен продукт от производството на биодизел. С щамове от род *Klebsiella* са проведени най-успешните ферментации за получаване и на двата продукта. Основен проблем е, че в повечето случаи производството на 1,3-пропандиол е съпътствано от присъствие на 2,3-бутандиол и 1,2-пропандиол, а 2,3-бутандиолът е бил синтезиран като допълнителен, а не целеви продукт на ферментациите. Добре е да се каже още, че лабораторните изследвания трябва да се окрупнят в полупромишлени, с цел по-нататъшно внедряване на процеса в промишлеността.

Благодарности: Това изследване е осъществено с финансова помощ по Договор ДМУ 03/104/13.12.2011 г. от Фонд "Научни изследвания".

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Biebl H., Zeng A.P., Menzel K., Deckwer W.D. Glycerol fermentation to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 1998, 50:24–29.
- [2] Biebl H., Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D. (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:289–297.
- [3] Chen, H.W., W. Wang, B.S. Fang, , Z.D.Hu, Studies on fermentation conditions for key enzymes in 1,3-propanediol production with *Klebsiella Pneumoniae*, Journal of Chemical Engineering of Chinese universities, 2004, 18(5), 621-627.
- [4] Chen, X., Z. Xiu, J. Wang, D. Zhang, P. Xu, Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella Pneumoniae* under microaerobic conditions, Enzyme and microbial Technology, 2003, 33(4), 386-394.

- [5] Himmi, E.H., A. Bories, F. Barbirato, Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium Butyricum*, Bioresource Technology 1999, 67, 123-128.
- [6] Jansen B. Norman, Flickinger C. Michael and Tsao T. George, Production of 2,3 – Butanediol from D-Xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724
- [7] Kenneth Todar , Ph. D. All rights reserved –www. textbookofbacteriology.net, *Pseudomonas aeruginosa*.
- [8] Lago BD, and Demain AL (1969).”Alternate requirement for vitamin B12 or methionine in mutants of *Pseudomonas denitrificans*, a vitamin B12 – producing bacterium”. J.Bacteriol 99 (1): 347- 9. PMID 5802615
- [9] Lin, R.H., H. Liu, J. Hao, K. Cheng, D. Liu, Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella Pneumoniae* with fumarate addition, Biotechnology Letters, 2005, 27(22), 1755-1759.
- [10] Magee 87: Magee, R.J., Kosaric , N.(1987).”The microbial production of 2,3 – butanediol.” Adv. Appl. Microbiol. 32: 89 – 161, MetaCyc Compound: (R,R)-2,3-butanediol
- [11] Menzel, K., A.P. Zeng, W.D. Decker, High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella Pneumoniae*, Enzyme and microbial Technology, 1997, 20(2), 82-86.
- [12] Pachauri Naresh , He Brian, Value – added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production : A Survey of Current Research Activities, Biological and Agricultural Engineering, University of Idaho, Moscow, Idaho 83844-2060, 2006, July 9 – 12
- [13] Papanikolaou, S., P. Ruiz-Sanchez, B. Pariset, F. Blanchard, M. Fick, High production of 1,3-propanediol from industry glycerol by a newly isolated *Clostridium Butyricum* strain. Journal of Biotechnology, 2000, 77(2), 191-208.
- [14] Petrov K., P.Petrova, High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31, Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84:659-665
- [15] Petrov K., P. Petrova, Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations, Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87: 943-949
- [16] Voloch M., N. B. Jansen, M. R. Ladisch, G. T. Tsao, R. Narayan and V. W. Rodwell, 2,3-butandiol, Purdue University, West Lafayette, IN, USA
- [17] Wang, J.F., Z.L. Xiu, H.J. Liu, S.D. Fan, Study of microaerobic conversion of glycerin to 1,3-propanediol by *Klebsiella Pneumoniae*, Modern Chemical Industry, 2001, 21(5), 28-31.
- [18] Xiu, Z.L., B.H. Song, Z.T. Wang, L.H. Sun, E.M. Feng, A.P. Zeng, Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol *Klebsiella Pneumoniae* in one- and two-stage anaerobic cultures, Biochemical Engineering Journal, 2004, 19(3), 189-197.
- [19] Yazdani S. and Gonzalez R., Anaerobic fermentation of glycerol : a path to economic viability for the biofuels industry
- [20] Zeng, A.P., H. Biebl, W.D. Deckwer, Microbial Conversion of glycerol to 1,3-propanediol: Recent progress, ACS Symposium Series 666, 1997, 264-279.
- [21] Бегова, П., Получаване на полезни химикали от глицерол по биотехнологичен път, Дипломна работа, ХТМУ-София, Институт по инженерна химия – БАН, 2010.
- [22] Иванова, К., Биотрансформация на глицерол под действието на *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae*, Дипломна работа, ХТМУ-София, Институт по инженерна химия – БАН, 2011.
- [23] Илиева, Б., Биодegradация на глицерол с помощта на *Pseudomonas denitrificans* 1625, Дипломна работа, ХТМУ-София, Институт по инженерна химия – БАН, 2010.

За контакти:

Гл. асистент, д-р Симеон Руменов Даракчиев, Институт по инженерна химия – БАН, 0878 510344, e-mail: s_darakchiev@abv.bg

Докладът е рецензиран.