

ALICJA KOŚMIDER, AGNIESZKA DROŻDŻYŃSKA, KATARZYNA CZACZYK

## MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA SUROWCÓW ODPADOWYCH W PROCESIE FERMENTACJI PROPIONOWEJ

### Streszczenie

Stały wzrost zdolności produkcyjnych biodiesla w Polsce, szacowany na ok. 1 mln ton w roku 2010, spowoduje nagromadzenie ok. 300 tys. ton glicerolu odpadowego (odpadu poprodukcyjnego) rocznie, którego zbyt będzie miał wpływ na cenę tego biopaliwa. Rozwiązaniem tej sytuacji może być wykorzystanie surowego bądź częściowo oczyszczonego glicerolu jako składnika podłoża do hodowli drobnoustrojów, których metabolity są użyteczne przemysłowo.

W niniejszej pracy zbadano możliwości wykorzystania czystego glicerolu, glicerolu odpadowego i serwatki (odpadu z przemysłu mleczarskiego), jako źródła węgla w procesie biosyntezy kwasu propionowego przez bakterie *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* i porównanie efektywności procesu z hodowlą prowadzoną na standardowym podłożu do hodowli bakterii propionowych.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że najwięcej kwasu propionowego (13,7 g/l) uzyskano na podłożu, w którym jako źródło węgla zastosowano czysty glicerol. W przypadku zastosowania pozostałych źródeł węgla: glicerolu odpadowego, serwatki oraz glicerolu w połączeniu z serwatką produkcja kwasu propionowego była zbliżona do wyników uzyskanych z wykorzystaniem tradycyjnego źródła węgla – glukozy i wynosiła średnio 10,5 g/l. Stwierdzono, że przy wykorzystaniu surowców odpadowych nastąpiło wydłużenie czasu trwania procesu fermentacji. W tych warunkach zaobserwowano również zmianę profilu syntetyzowanych kwasów organicznych.

**Słowa kluczowe:** glicerol, glicerol odpadowy, serwatka, fermentacja propionowa

### Wprowadzenie

Drobnoustroje z rodzaju *Propionibacterium* odznaczają się dużą heterogennością pod względem właściwości biologicznych. Są to drobnoustroje rosnące w ściśle beztlenowych lub względnie beztlenowych warunkach [2]. Znamiennej cechą tych bakterii jest zdolność do syntezy dużych ilości kwasu propionowego [7]. Kwas propionowy

stosuje się jako naturalny konserwant żywności i pasz lub do produkcji tworzyw sztucznych, herbicydów, a nawet perfum [5, 9, 11].

Mimo, że dotychczasowa produkcja kwasu propionowego odbywa się w procesach petrochemicznych, wzrasta zainteresowanie jego wytwarzaniem sposobem mikrobiologicznym ze względu na możliwości zagospodarowania tanich surowców odpadowych, takich jak serwatka czy melasa [7]. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się wykorzystaniu glicerolu odpadowego nagromadzonego podczas produkcji biodiesla, jako składnika podłoża do hodowli drobnoustrojów, których metabolity są użyteczne przemysłowo. Szacuje się, że przy planowanym na rok 2010 w Polsce wzroście produkcji biodiesla do 1,5 mln ton, pojawi się problem z zagospodarowaniem ok. 300 tys. ton glicerolu, którego zbyt będzie miał wpływ na cenę tego biopaliwa [4, 6]. Odpadowy glicerol z powodzeniem stosowany jest do produkcji 1,3-propanodiolu, kwasu cytrynowego, kwasu bursztynowego lub dihydroksyacetonu [10]. W dostępnej literaturze wykazano również możliwość wykorzystania glicerolu w procesie fermentacji propionowej [1, 5].

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania czystego glicerolu, glicerolu odpadowego i serwatki, jako źródeł węgla w procesie biosyntezy kwasu propionowego przez bakterie *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* i porównanie efektywności procesu z hodowlą prowadzoną na glukozie.

## Material i metody badań

### *Drobnoustroje*

W badaniach użyto bakterii propionowych *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 1 pochodzących z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Drobnoustroje przechowywano w temp. 4 °C na płynnej pożywce kazeinowej, której skład podano w tab. 1. Do celów doświadczalnych bakterie przeszczepiano na płynną pożywkę kazeinową i hodowano w temp. 30 °C przez 72 h. Następnie prowadzono propagację, przeszczepiając szcep na większe objętości testowanych pożywek, dodając 10 % inokulum.

### *Podłoża*

W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano sześć podłoży hodowlanych różniących się rodzajem zastosowanego źródła węgla. Skład pożywek przedstawiono w tab. 1. Źródła węgla stanowiły: glukoza bezwodna, czysty glicerol, glicerol odpadowy (częściowo oczyszczony) zawierający 860 g/l glicerolu pochodzący z produkcji biodiesla (SG BODDINGS GmbH, Niemcy), laktoza zawarta w serwatce (suszona serwatka o zawartości laktozy 60 % pochodziła z zakładu P.P.H.U. LAKTOPOL, Suwałki), laktoza zawarta w serwatce i czysty glicerol zmieszane w stosunku 1:1 oraz laktoza zawarta w serwatce zmieszana z glicerolem odpadowym w stosunku 1:1.

Podłoża doprowadzono do pH 6,8 za pomocą 25 % wodnego roztworu amoniaku, następnie wyjaławiano w aparacie Kocha metodą tyndalizacji przez 25 min [8].

Tabela 1

Skład podłoży hodowlanych.  
Composition of culture media

Składniki Components	Pożywka kazeinowa (z glukozą) Casein medium (with glucose)	Pożywka z czystym glicerolem / Medium with pure glycerol	Pożywka z glicerolem odpadowym / Medium with crude glycerol	Pożywka z serwatką Medium with whey	Pożywka z czystym glicerolem i serwatką Medium with pure glycerol and whey	Pożywka z glicerolem odpadowym i serwatką Medium with crude glycerol and whey
Glukoza / Glucose [g]	20	-	-	-	-	-
Czysty glicerol Pure glycerol [g]	-	20	-	-	10	-
Glicerol odpadowy Crude glycerol [g]	-	-	20	-	-	10
Laktoza z serwatki Lactose from whey [g]	-	-	-	20	10	10
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> [g]	1,76			-		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O [g]	2,29			-		
Hydrolizat kwasowy (kazeina) / Casamino acid (casein) [g]	5			-		
Hydrolizat enzymatyczny Tryptone [g]	10			-		
Biotyna / Biotin [mg]	0,3					
Pantotenian Ca Ca-pantothenate [mg]	4					
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O [mg]	5					
CoSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O [mg]	2					
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O [mg]	10					
ZnCl <sub>2</sub> [mg]	2					
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O [g]	0,2					
Woda destylowana Distilled water [ml]	do 1000					

### *Warunki prowadzenia hodowli*

Hodowle inokulacyjne prowadzono w warunkach statycznych, przez 72 h, w temp. 30 °C, w atmosferze CO<sub>2</sub>, w kolbach Erlenmayera o objętości 250 ml, zawierających 200 ml pożywki kazeinowej. Do zaszczepienia odpowiedniego podłoża produkcyjnego używano 10 % obj. zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej.

Proces biosyntezy kwasu propionowego prowadzono w kolbach Erlenmayera o objętości 250 ml, zawierających 200 ml odpowiedniego podłoża hodowlanego zaszczepionego hodowlą inokulacyjną. Doświadczenia prowadzono w warunkach statycznych, w atmosferze CO<sub>2</sub> przez 240 h, w temp. 30 °C, z codzienną regulacją pH do wartości 6,8 za pomocą 25 % wodnego roztworu amoniaku. Próby do analiz pobierano w 24., 48., 72., 120., 168. i 240. godzinie trwania procesu.

### **Metody badań**

#### *Oznaczanie źródeł węgla i kwasów organicznych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)*

Cukry proste (laktozę oraz glukozę), glicerol oraz kwasy organiczne (kwas propionowy, kwas octowy, kwas bursztynowy) oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w chromatografii cieczowym MERCK – HITACHI (zestaw: automatyczny podajnik prób MERCK – HITACHI L-7250, pompa MERCK – HITACHI L-7100 z detektorem RI (MERCK – HITACHI L-7490). Do oznaczeń używano kolumny Aminex HPX – 87H 300x7,8 mm (BIO-RAD). Jako eluent stosowano 0,001 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przy przepływie 0,6 ml/min, izokratycznie. Oznaczenia prowadzono w temp. 60 °C. Próby po przesączeniu przez sącziki mikrobiologiczne o średnicy porów 0,45 μm (Millipore) наносzono na szczyt kolumny w ilości 30 μl. Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonywano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem Chromatography Data Station Software, MERCK – HITACHI).

#### *Oznaczanie suchej masy komórkowej*

Płyn pohodowlany wirowano przy 4000 obr./min przez 10 min. Odwirowaną biomasę przenoszono ilościowo do wcześniej zważonych naczynek wagowych. Naczynka z biomasą suszono w temp. 105 °C do uzyskania stałej masy.

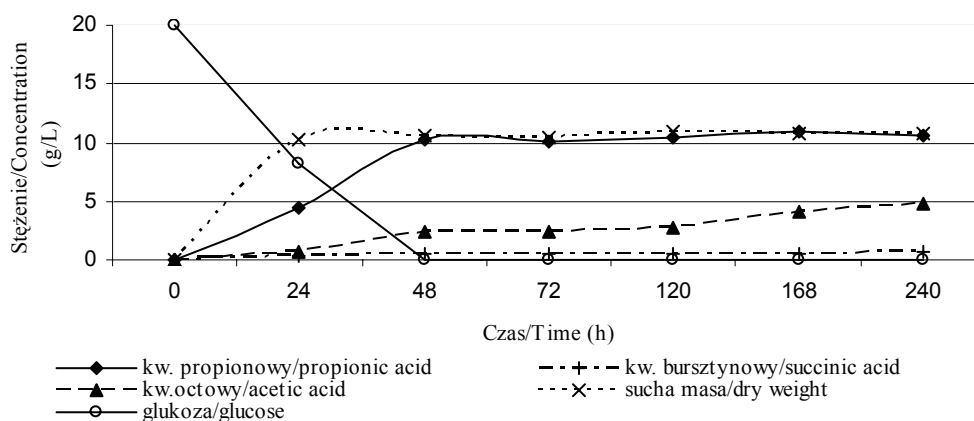
Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Obliczenia matematyczne, jak i statystyczne wykonano, wykorzystując do tego celu programy komputerowe Excel 2003 dla Windows XP oraz STATISTICA 6.0 PL StatSoft, Inc. (2003). Do wyznaczenia istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi posłużono

się jednoczynnikową analizą wariancji przy zastosowaniu testu Tukey'a na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

W przeprowadzonych eksperymentach zbadano przebieg procesu biosyntezy kwasu propionowego przez szczep bakteryjny *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 1.

Na rys. 1. przedstawiono przebieg fermentacji propionowej na podłożu zawierającym glukozę jako źródło węgla. Zastosowany szczep bakterii propionowych charakteryzował się wysokim plonem suchej masy komórkowej, której wartość utrzymywała się od 24 h na poziomie 10 g/l, we wszystkich wariantach doświadczeń (niezależnie od zastosowanego źródła węgla). Już w 48. h procesu nastąpiło całkowite zużycie glukozy. Biosynteza kwasu propionowego osiągnęła wówczas wartość maksymalną (10,2 g/l), a wydajność procesu wyniosła 0,5 g kwasu propionowego/g substratu. W tym czasie ilość wyprodukowanego kwasu octowego osiągnęła poziom 2,4 g/l. Zaobserwowano jednak statystycznie istotny, stały wzrost ilości kwasu octowego przez cały okres analizowania procesu do poziomu 5 g/l w 240. h. W trakcie przeprowadzania eksperymentu stwierdzono także produkcję kwasu bursztynowego, którego biosynteza osiągnęła maksymalną wartość w 120. h fermentacji i wynosiła 0,5 g/l.

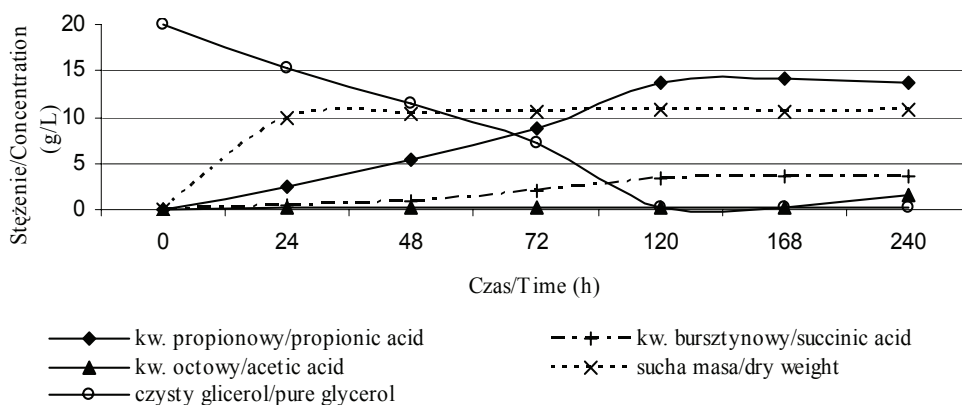


Rys. 1. Przebieg fermentacji propionowej z wykorzystaniem glukozy jako źródła węgla.

Fig. 1. Propionic acid fermentation process, in which glucose was used as a source of carbon.

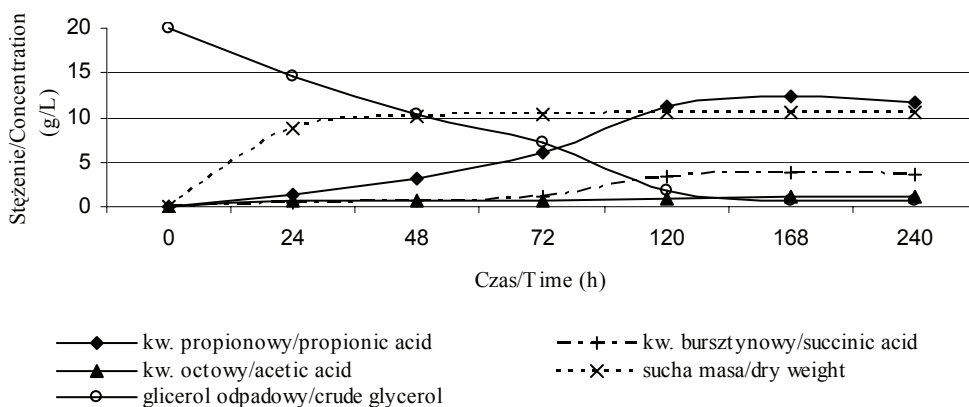
W przypadku hodowli, w której glukozę zastąpiono czystym glicerolem, stwierdzono, że biosynteza kwasu propionowego osiągnęła wartość maksymalną w 120. h prowadzenia hodowli (rys. 2). Był to także czas, w którym doszło do wyczerpania zasobów źródła węgla. W badaniach zanotowano zmianę profilu powstawania kwasów

organicznych. Oprócz wysokiego stężenia kwasu propionowego wynoszącego 13,7 g/l, zaobserwowano produkcję kwasu bursztynowego w ilości ok. 3,5 g/l, którego tworzenie, podobnie jak na podłożu z glukozą, zakończyło się w 120. h fermentacji, a kwas octowy zidentyfikowano w ilościach śladowych (ok. 0,2 g/l). Glicerol okazał się dobrym źródłem węgla do wzrostu i metabolizmu bakterii propionowych. W przedstawionym wariantcie doświadczeń wydajność procesu biosyntezy kwasu propionowego wyniosła 0,68 g /g glicerolu.



Rys. 2. Przebieg fermentacji propionowej z wykorzystaniem czystego glicerolu jako źródła węgla.

Fig. 2. Propionic acid fermentation process, in which pure glycerol was used as a source of carbon.



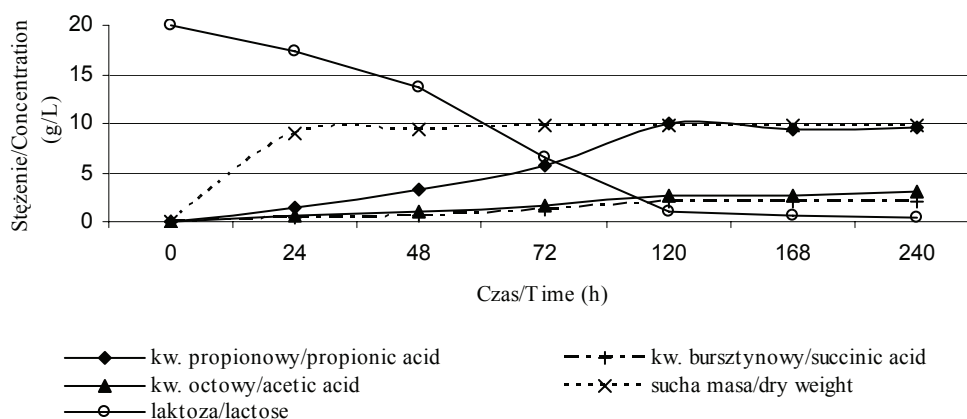
Rys. 3. Przebieg fermentacji propionowej z wykorzystaniem glicerolu odpadowego jako źródła węgla.

Fig. 3. Propionic acid fermentation process, in which pure crude glycerol was used as a source of carbon.

Hodowla bakteryjna prowadzona na pożywce z glicerolem odpadowym (rys. 3) charakteryzowała się zbliżonym przebiegiem, jak w przypadku hodowli z zastosowa-

niem czystego glicerolu. Całkowite odfermentowanie substratu zaobserwowano w 120. h. W tym czasie biosynteza kwasu propionowego ustabilizowała się na poziomie ok. 11,6 g/l hodowli. Ilość kwasu bursztynowego wynosiła wówczas ok. 3,5 g/l, a octowego ok. 0,7 g/l. Wydajność produkcji kwasu propionowego wynosiła 0,56 g/g glicerolu odpadowego.

Całkowite wykorzystanie laktozy w czasie trwania procesu fermentacji propionowej z zastosowaniem serwatki stwierdzono w 120. h prowadzenia eksperymentu (rys. 4). W tym czasie również zakończyła się biosynteza kwasu propionowego na poziomie ok. 10 g/l. W przedstawionym wariantcie doświadczeń zaobserwowano inny profil tworzenia się pozostałych kwasów organicznych. Zaobserwowano wyrównanie proporcji pomiędzy kwasem bursztynowym i octowym, których ilość wynosiła średnio 2,5 g/l. Wydajność procesu tworzenia się kwasu propionowego w przeliczeniu na gram substratu wyniosła wówczas 0,5 g.

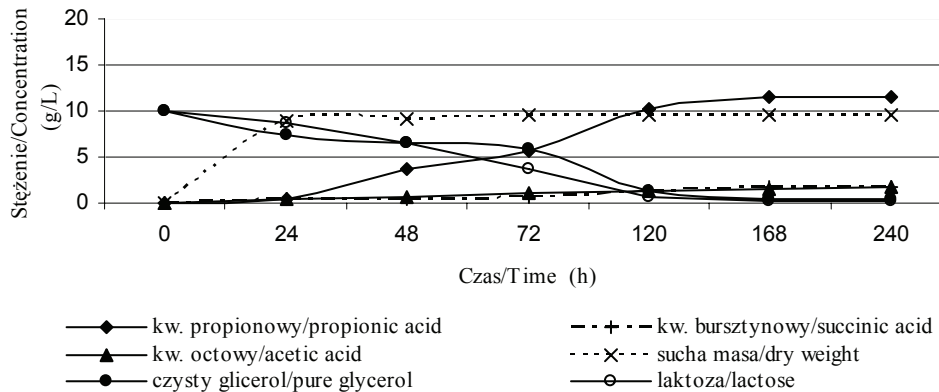


Rys. 4. Przebieg fermentacji propionowej z wykorzystaniem laktozy zawartej w serwatce jako źródła węgla.

Fig. 4. Propionic acid fermentation process, in which lactose contained in whey was used as a source of carbon.

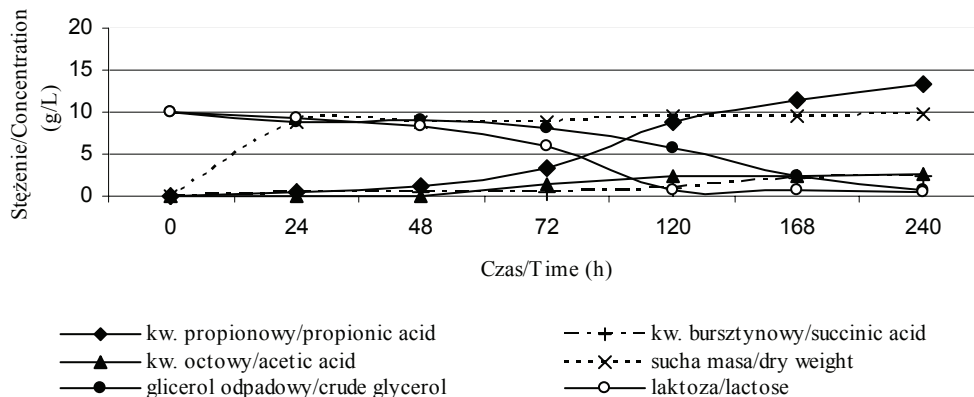
W doświadczeniach prowadzonych z wykorzystaniem serwatki i czystego glicerolu jako źródeł węgla całkowite zużycie substratów zakończyło się w 120. h hodowli (rys. 5). W tym czasie drobnoustroje *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 1 zsyntetyzowały ok. 10 g/l kwasu propionowego. Wydajność produkcji tego kwasu wynosiła wówczas 0,5 g/g substratu. Zachował się również równy stosunek pomiędzy syntezą kwasu bursztynowego i octowego (średnio 1,5 g/l). W prezentowanym eksperymencie zaobserwowano, że do 24. h trwania procesu drobnoustroje preferencyjnie wykorzystywały glicerol jako źródło węgla, przy niewielkim odfermentowaniu laktozy. Od 24. do 72. h trwania eksperymentu ilość glicerolu w medium hodowlanym była

wartością stałą. W tym czasie bakterie pobierały związki odżywcze z laktozy. Całkowite wyczerpanie obu źródeł węgla nastąpiło w 120. h trwania procesu.



Rys. 5. Przebieg fermentacji propionowej z wykorzystaniem czystego glicerolu i laktozy zawartej w serwatce jako źródła węgla.

Fig. 5. Propionic acid fermentation process, in which pure glycerol and lactose contained in whey were used as a source of carbon.



Rys. 6. Przebieg fermentacji propionowej z wykorzystaniem glicerolu odpadowego i laktozy zawartej w serwatce jako źródła węgla.

Fig. 6. Propionic acid fermentation process, in which crude glycerol and lactose contained in whey were used as a source of carbon.

W przypadku zastosowania pożywki, w której serwatkę zmieszano z glicerolem odpadowym, całkowite wyczerpanie źródeł węgla nastąpiło dopiero w 240. h trwania procesu. W tym wariancie doświadczeń zaobserwowano jednak szybsze odfermentowanie laktozy (120 h) niż glicerolu (240 h) (rys. 6). Kwas propionowy był wytwarzany aż do wyczerpania glicerolu i w 240. h jego produkcja wynosiła 13,2 g/l hodowli. Wy-



dajność procesu wynosiła wówczas 0,66 g/g substratu. W tym wariancie eksperymentów, stosunek kwasu bursztynowego do octowego był równy, a ilość tych kwasów kształtowała się na poziomie 2,5 g/l.

Porównanie profili syntetyzowanych kwasów organicznych w momencie całkowitego odfermentowania stosowanych źródeł węgla przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Profil biosyntezy kwasów organicznych przez *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 1 z wykorzystaniem różnych źródeł węgla w momencie całkowitego zużycia substratów.

Profile of organic acids biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 1 using various sources of carbon at a point where substrates were fully consumed.

Substrat Substrate	Czas całkowitego zużycia substratu Time of total consumption of substrate [h]	Stężenie / Concentration [g/l]				
		Kwas propionowy Propionic acid	Kwas octowy Acetic acid	Kwas bursztynowy Succinic acid	Sucha masa Dry weight	Wydajność kwasu propionowego Yield of propionic acid [g/g substr.] [g/g of substrate]
1	48	10,23 <sup>a</sup>	2,44 <sup>c</sup>	0,44 <sup>a</sup>	10,59 <sup>c</sup>	0,51 <sup>a</sup>
2	120	13,75 <sup>b</sup>	0,23 <sup>a</sup>	3,47 <sup>e</sup>	10,73 <sup>d</sup>	0,68 <sup>b</sup>
3	120	11,16 <sup>a</sup>	0,99 <sup>b</sup>	3,47 <sup>e</sup>	10,62 <sup>cd</sup>	0,56 <sup>a</sup>
4	120	10,02 <sup>a</sup>	2,67 <sup>c</sup>	1,96 <sup>c</sup>	9,85 <sup>b</sup>	0,50 <sup>a</sup>
5	120	10,11 <sup>a</sup>	1,33 <sup>b</sup>	1,30 <sup>b</sup>	9,59 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>
6	240	13,22 <sup>b</sup>	2,65 <sup>c</sup>	2,49 <sup>d</sup>	9,64 <sup>a</sup>	0,66 <sup>b</sup>

Objaśnienia: / Explanatory notes:

1- glukoza / glucose; 2- czysty glicerol / pure glycerol; 3- glicerol odpadowy / crude glycerol; 4- laktoza z serwatki / lactose from whey; 5- laktoza z serwatki i czysty glicerol / lactose from whey and pure glycerol; 6- laktoza z serwatki i glicerol odpadowy / lactose from whey and crude glycerol;

a-e – różnice statystycznie istotne na poziomie  $\alpha = 0,05$  / statistically significant differences at  $\alpha = 0.05$ .

Przekształcenie glicerolu w szlaku glikolitycznym do fosfoenolopirogronianu lub pirogronianu powoduje wytworzenie podwójnej ilości redukujących ekwiwalentów w porównaniu z ilością, która powstałaby podczas metabolizmu glukozy lub ksylozy. Glicerol dostarcza więc więcej energii do dalszych przemian [12, 13]. Ze względu na wyższy stopień redukcji glicerolu, w porównaniu z glukozą, przyjęto hipotezę, że bakterie propionowe będą łatwiej fermentować glicerol i syntetyzować większe ilości kwasu propionowego [1]. Podstawą konstrukcji hipotezy przyjętej w niniejszej pracy były badania własne oraz wcześniejsze badania wykonane przez Himmi i wsp. [5],

którzy w roku 2000 opublikowali wyniki podobnych doświadczeń. Himmi i wsp. [5], wykorzystując w procesie fermentacji okresowej drobnoustroje *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ATCC 9614 oraz glicerol jako źródło węgla zaobserwowali 45 % wzrost wydajności procesu w porównaniu z hodowlą prowadzoną na glukozie. W niniejszej pracy wykazano zbliżoną zależność. Produkcja kwasu propionowego na czystym glicerolu była o 34 % wyższa niż w przypadku zastosowania glukozy jako źródła węgla. W pozostałych eksperymentach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic wydajności procesu fermentacji w porównaniu z hodowlą prowadzoną na glukozie, z wyjątkiem wariantu, w którym glicerol odpadowy zmieszano z serwatką. W tym przypadku długi czas fermentacji (240 h) wpływa jednak na niekorzyść tego rozwiązania. Uzyskane wyniki świadczą również o tym, że zastosowane surowce odpadowe zawierają substancje, które powodują spowolnienie przebiegu fermentacji propionowej. Fakt, że substraty te są znacznie tańsze niż glukoza, mogą stanowić alternatywę do produkcji kwasu propionowego na drożdże mikrobiologicznej.

W przedstawionych badaniach stwierdzono zmiany profilu powstawania kwasów organicznych w zależności od zastosowanego źródła węgla. W przypadku hodowli prowadzonej na czystym glicerolu, glicerolu odpadowym lub czystym glicerolu z serwatką, ilość powstałego kwasu octowego była odpowiednio o 90, 60 i 45 % mniejsza niż na glukozie (2,44 g/l). Podobnym profilem powstawania kwasu octowego (2,67 g/l) w stosunku do glukozy cechowała się hodowla, w której zastosowano inny cukier prosty – laktozę. Himmi i wsp. [5], przy wykorzystaniu bakterii *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ATCC 9614 oraz *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 25562, zaobserwowali produkcję kwasu octowego o 50 % mniejszą na glicerolu niż glukozie, co potwierdziło wyniki przedstawione w niniejszej pracy. Zbliżoną zależność otrzymali także inni badacze [1]. Taki profil fermentacji wynika z konieczności utrzymania przez komórki bakteryjne potencjału redox w równowadze [3]. Otrzymane wyniki są istotne z punktu widzenia technologii pozyskiwania kwasu propionowego. Ekstrakcja tego kwasu przez destylację jest silnie hamowana obecnością kwasu octowego. Niskie stężenia tego kwasu, uzyskane przy wykorzystaniu glicerolu jako źródła węgla w pożywce, znacząco zwiększa efektywność procesu destylacji i upraszcza jego procedurę [1].

Perspektywy wykorzystania czystego glicerolu lub glicerolu odpadowego w procesach mikrobiologicznych są atrakcyjne, lecz wymagają dalszych badań dotyczących przede wszystkim doboru szczepów (ewentualnych ich modyfikacji genetycznych), dokładnego poznania szlaków metabolicznych glicerolu oraz optymalizacji warunków hodowli. Substrat ten może w przyszłości stanowić dobrą alternatywę konwencjonalnych źródeł węgla, takich jak węglowodany, które są powszechnie stosowane w procesach fermentacyjnych.

## Wnioski

1. Zastosowanie w procesie biosyntezy kwasu propionowego surowców odpadowych, takich jak glicerol lub serwatka, jako źródeł węgla jest dobrą alternatywą w stosunku do konwencjonalnych odpowiedników np. glukozy.
2. Najwyższą produkcją kwasu propionowego stwierdzono w hodowli prowadzonej na czystym glicerolu i była ona o 34 % większa w porównaniu z hodowlą, w której wykorzystano glukozę jako źródło węgla.
3. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano wydłużenie czasu potrzebnego do utylizacji surowców odpadowych i osiągnięcia maksymalnej produkcji kwasu propionowego w porównaniu z hodowlą prowadzoną na glukozie.
4. Zaobserwowano zmiany profilu powstawania kwasów organicznych w zależności od zastosowanego źródła węgla w pożywce. Przy wykorzystaniu surowców odpadowych produkcja kwasu octowego była średnio o 60 % mniejsza w porównaniu z hodowlą suplementowaną glukozą.

## Podziękowania

*Autorzy składają podziękowania Panu prof. Waldemarowi Rymowiczowi z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, za udostępnienie do badań odpadowego glicerolu.*

## Literatura

- [1] Barbirato F., Chedaille D., Bories A.: Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl. Microbiol., Biotechnol.*, 1997, **47**, 441-446.
- [2] Białecka A.: Chorobotwórczość i diagnostyka bakterii z rodzaju *Propionibacterium*. *Diagnosta Laboratoryjny*, 2005, **1 (6)**, 16-19.
- [3] Erickson L.E., Minkevich I.G., Eroshin V.K.: Utilization of mass-energy balance regularities in the analysis of continuous-culture data. *Biotechnol. Bioeng.*, 1979, **21**, 575-591.
- [4] Gaca J.: Faza glicerynowa po produkcji biodiesla- odpad czy cenny surowiec? *Czysta Energia*, 2006, **11**, 34-35.
- [5] Himmi E.H., Bories A., Boussaid A., Hassani L.: Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **53**, 435-440.
- [6] Markowska J.: Rynek biomasy i biopaliw w Polsce. *Przem. Spoż.* 2007, **7**, 19-21.
- [7] Paściak M., Mordarska H.: Rodzaj *Propionibacterium*- heterogenność taksonomiczna i biologiczna. *Post. Mikrobiol.*, 1999, **38 (3)**, 245-255.
- [8] Pędziwilk F.: A simple plating method for the isolation and enumeration of *Propionibacteria*. *Acta Alim. Pol.*, 1975, **25**, 127-130.
- [9] Razavi-Rohani S.M., Griffiths M.W.: Antifungal effects of sorbic acid and propionic acid at different pH and NaCl conditions. *J. Food Safety*, 1999, **19 (2)**, 109-120.
- [10] Silva G.P., Mack M., Contiero J.: Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotech. Adv.* 2009, **27**, 30-39.

- [11] Vale M.M, Menten J.F.M., Morais S.C.D., Brainer M.M.A.: Mixture of formic and propionic acid as additives in broiler feeds. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 2004, **61** (4), 371-375.
- [12] Willke T., Vorlop K.-D.: Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **66**, 131-142.
- [13] Yazdani S.S., Gonzalez R.: Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**, 213-219.

## POSSIBILITIES OF WASTES UTILIZATION IN THE PROPIONIC ACID FERMENTATION PROCESS

### Summary

The constant growth of the bio-diesel production potential in Poland, estimated to be *ca.* 1 MM tones in 2010, will result in the accumulation of *ca.* 300,000 tonnes of waste glycerol (as waste product) per year; when selling it, the price of bio-diesel will be impacted. A solution to this problem could be to apply a crude or partially refined glycerol as a component of the medium for micro-organisms producing commercially useful metabolites.

In this paper, the potential was studied of utilizing pure glycerol, crude glycerol, and whey (a dairy industry waste) as a source of carbon in the biosynthesis process of propionic acid run by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. Furthermore, the efficiency of the process with a culture on standard medium was compared with the process with a propionic bacteria culture.

Based on the analysis performed, it was found that the highest concentration of propionic acid (13.7 g/l) was obtained when a medium with pure glycerol as a source of carbon was applied. With other carbon sources applied: crude glycerol, whey, and their combination, the propionic acid production level was similar to the results obtained using a conventional source of carbon, i.e. glucose, and amounted to 10.5 g/l on average. It was also found that with the waste sources used, the fermentation time was extended. Under those conditions, a change in the profile of organic acids being synthesised was reported, too.

**Key words:** glycerol, crude glycerol, whey, propionic acid fermentation ☒