

ОПОЛЗОТВОРЯВАНЕ НА ОТПАДЪЧЕН ГЛИЦЕРОЛ ОТ ПРОИЗВОДСТВОТО НА БИОДИЗЕЛ ОТ *BACILLUS SUBTILIS* TS 01

Севдалина Тодорова

Русенски университет „Ангел Кънчев“, Филиал – Разград, 7200 Разград, България,

E-mail: stodorova@uni-rise.bg

UTILIZATION OF WASTE GLYCEROL FROM BIODIESEL PRODUCTION BY *BACILLUS SUBTILIS* TS 01

Sevdalina Todorova

Department of Biotechnologies and Food technologies, Ruse Angel Kanchev University – Razgrad Branch, 7200 Razgrad, Bulgaria, E-mail: stodorova@uni-rise.bg

ABSTRACT

Glycerol is a co-product of the biodiesel industry. It may be a suitable raw material for the production of biologically active compounds by the microorganisms. This study aimed to use the glycerol obtained from the biodiesel production process as the main carbon source for biopreparat production with antimicrobial action by *Bacillus subtilis* TS 01. The antifungal activity of the preparation of culture medium has been highest in optimized 1st medium with 30 g l⁻¹ crude glycerol while the antibacterial activity has been highest in optimized 2nd medium with 50 g l⁻¹ crude glycerol.

Key words: *Bacillus subtilis* TS 01, crude glycerol, biopreparat, antimicrobial activity

Биодизелът е едно от най-обещаващите алтернативни и възобновяеми горива. При производството му от растителни и животински масла се генерира около 10 % глицерол като основен отпаднак продукт. Той (за разлика от фармацевтичния) има примеси, като вода (8-10 %), метанол (15-20 %), мастни киселини (10-15 %), сапуни (4-7 %), натриева или калиева основа (1-3 %) и др. съставки (до 2 %) и се описва като „суров глицерол“ (crude glycerol). Приема се, че при производство на един US галон (3,785 L) отпадат 0,35 kg суров глицерол. До 2016 г. ще бъдат получени около 4 милиарда галона суров глицерол (Fangxia et al., 2012). Годишното производство на суров глицерол само в САЩ е около 50 хиляди тона (BG 110823 (A)).

Този твърде голям излишък от суров глицерол, при това с много ниска цена - до \$ 0.05 /kg, налага търсенето на нови подходи и развитието на устойчиви методи за използване на тази органична суровина. Част от този отпаднак продукт се преработва в пречистен глицерол, по-голяма част от който се преработва в дестилиран, за фармацевтиката, козметиката, производство на сапуни, антифризи и др.

Голяма част от отпадъчния глицерол остава неоползотворена. Редица нови начини за неговото използване са били обект на много изследвания. Известни са течни препарати за размразяване на пътища и магистрали (BG 110823 (A)), в чийто състав се влага суров глицерол, отпаднак от производството на биодизел. В посочените препарати суровият глицерол съставлява 24.3 – 59.8 %.

Отпадъчният глицерол от получаването на биодизел може да бъде подходяща суровина за производството на високо ефективни съединения от микроорганизмите. В литературата по-голямо внимание е отделено на биотрансформацията на суровия глицерол в химични продукти с придобита стойност (Fangxia et al., 2012; Li et al., 2013) или за генериране на енергия (Santibáñez et al., 2011). Друга възможност за оползотворяването на глицерола е използването му като хранителен субстрат от микроорганизмите във ферментационните производства за биосинтез на микробни метаболити. Суровият глицерол е използван като

въглероден източник в хранителната среда за получаване на биополимери от видове *Bacillus* и *Pseudomonas* (Sathianachiyar and Devaraj, 2013).

Като основен източник на въглерод и енергия, суровият глицерол е включен в състава на ферментационна хранителна среда за производство на биоповърхностно активно вещество от *B. subtilis* ATCC 6633 (Sousa et al., 2014) и за продуцирането на биосърфактант от *B. subtilis* TD4 и *Pseudomonas aeruginosa* SU7 (Saimmai et al., 2012).

Anastácio et al. (2014) докладват, че суров глицерол може да се използва директно, без етапи на пречистване, като източник на въглерод за производството на микробиален протеин от *Pichia pastoris*.

Основната цел на настоящата работа е изследване влиянието на суровия глицерол като въглероден източник в състава на хранителни среди за получаване на биопрепарати от *Bacillus subtilis* TS 01.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Щам-продуцент.

В изследванията е използван *B. subtilis* TS 01. Съхранява се в Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури под номер НБПМКК 8718. Щамът е изолиран от българска почва и е антагонист на редица гъбни и бактериални фитопатогени (Todorova and Kozhuharova, 2010). Неговите биопрепарати са предназначени за биологичен контрол на фитопатогени, стимулиране растежа на растенията, бактериални добавки при компостиране и за добавяне към течни препарати за размразяване на пътища и магистрали. (Заявка за изобретение № 111510 / 25.06.2013).

2. Тест-микроорганизми. Като тест-микроорганизми са използвани фитопатогените *Botrytis cinerea* и *Xanthomonas campestris* от колекцията на катедра “Биотехнологии и хранителни технологии” на РУ „Ангел Кънчев” – Филиал Разград. Поддържането, съхранението им и приготвянето на суспензии от тях е по методиката на Todorova and Kozhuharova (2010).

3. Хранителни среди. За култивиране на щама са използвани глюкозо-пептонна среда №3 (Phae et al., 1990) и две оптимизирани хранителни среди: среда I^{ba} - за проявяване на максимална антигъбна активност и среда II^{pa} - за проявяване на максимална антибактерийна активност (Todorova et al., 2015).

Във всички хранителни среди като въглероден източник, вместо глюкоза, е използван суров глицерол (отпадъчен продукт от производството на биодизел), чиято концентрация е варирана от 20 до 50 g l⁻¹. 20 g l⁻¹ суров глицерол отговаря на 10 g l⁻¹ глюкоза (по въглерод).

Суровият глицерол беше получен от промишлено предприятие за производство на биодизел и съдържа около 80% глицерол и вода, метанол и калиева основа като остатък.

4. Култивиране на *B. subtilis* TS 01. Развитието на *B. subtilis* TS 01 е осъществено дълбочинно в ерленмайерови колби от 500 cm³, съдържащи 50 ml хранителна среда, при 28 °C, на ротационна клатачка при 220 min⁻¹, за 72 h. Инокулатът е 2 % (v/v) 18 h вегетативен материал, получен на наклонен месо-пептонен агар (NA, Difco) в епруветки.

5. Определяне на рН на културалните среди на *B. subtilis* TS 01. Активната киселинност на културалните среди на *B. subtilis* TS 01 е определена потенциометрично, с рН-метър ТМ6.

6. Определяне на суха биомаса на *B. subtilis* TS 01. Културалните среди са центрофугирани при 4000 min⁻¹ за 30 min за отделяне на биомасата. Сухата биомаса е определена чрез изсушаване при 105 °C до постоянна маса и е изразена в процент сухо вещество (% с.в.).

7. Определяне на антимикуробната активност на *B. subtilis* TS 01. Антимикуробната активност на *B. subtilis* TS 01 е определяна в културалните среди по метода на дифузия в картофено-декстрозен агар (КДА, HiMedia) с ямки. Посяването на *B. cinerea* е повърхностно

с 0.1 ml суспензия, с титър 1.10^5 кое ml^{-1} . Суспензия на *X. Campestris*, с титър 1.10^9 кое ml^{-1} , е дозирана в хранителната среда, след охлаждане до 45 – 48 °С, в съотношение 1:100. В петриевите панички са изрязани по 4 ямки с диаметър 7 mm, като във всяка ямка са накапани по 30 μl от културалните среди на *B. subtilis* TS 01. Петриевите панички са темперирани при стайна температура за 30 min, след което са термостатирани при 28 °С за три денонощия. Антимикробната активност на *B. subtilis* TS 01 е изразена с размера на стерилните зони (диаметър в mm). Всички изследвания са проведени трикратно.

8. Статистика. Резултатите са статистически обработени, като са представени средните стойности със съответната им средна грешка при ниво на значимост $P=0.05$ (Батунер, 1971).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследвано е влиянието на концентрацията на суровия глицерол върху развитието и антимикробната активност на *B. subtilis* TS 01 в три хранителни среди. Получените резултати са отразени в таблици 1, 2 и 3. От представените данни в таблиците се вижда, че суровият глицерол е добър въглероден източник в състава на хранителните среди.

Степента на интензивност на развитие на бактериалната култура е изразена със сухата биомаса в процент сухо вещество (% с.в.). При производството на биопрепарати трябва да бъде изпълнено условието за натрупване на висок процент спори и биомаса. Както се вижда от данните в таблиците най-нисък % с.в. шамът образува в среда №3, където азотният източник е пептон. В тази среда *B. subtilis* TS 01 натрупва най-голям процент биомаса при концентрация 30 g l^{-1} суров глицерол. С повишаване на концентрацията му, количеството биомаса дори намалява. Културалните среди са с алкална реакция около рН 8, която не се изменя значително при различните концентрации на глицерол (таблица 1). Данните в таблица 1 показват, че при използване на суров глицерол като въглероден източник в среда №3, антимикробната активност на *B. subtilis* TS 01 е ниска. Активността срещу *B. cinerea* е между 12.0 и 12.7 mm стерилни зони, като не се влияе от промяната на концентрациите на суровия глицерол. Антибактерийната активност на щама, обаче е по-ясно изразена и варира от 12.0 до 16.3 mm стерилни зони, като тенденцията е да се увеличава с повишаване на концентрацията на суровия глицерол.

Таблица 1

Интензивност на развитие и антимикробна активност на *Bacillus subtilis* TS 01 в хранителна среда №3

Суров глицерол, g l^{-1}	Биомаса, % с.в.	рН на културалната среда	Антимикробна активност в стерилни зони, mm срещу:	
			<i>B. cinerea</i>	<i>X. campestris</i>
20	0.128	8.10	12.0±0.23	12.0±0.63
30	0.143	8.12	12.6±0.27	15.6±0.16
40	0.110	8.20	12.0±0.13	15.3±0.23
50	0.104	7.90	12.7±0.45	16.3±0.27

Данните в таблици 2 и 3 отразяват получените резултати за развитието и антимикробната активност на *B. subtilis* TS 01 в оптимизираните среда I^{ba} и среда II^{pa} хранителни среди. И в двете среди шамът натрупва голямо количество биомаса при включване на суров глицерол като въглероден източник в състава им – 0.748 % с.в. в среда I^{ba} и 0.935 % с.в. в среда II^{pa}. В среда I^{ba} оптималното количество суров глицерол е 30 g l^{-1} . Тогава *B. subtilis* TS 01 образува най-голям процент биомаса и проявява най-висока антигъбна активност – стерилни зони с размери 26.6 mm. С увеличаване на концентрацията на глицерола активността на щама срещу *B. cinerea* намалява. Антибактерийната активност

на шам-продуцента в среда I^{ва} по принцип е по-ниска от антигъбната, което е установено в предишни изследвания. Тази среда е оптимизирана за проявяване на максимална антигъбна активност (Todorova et al., 2015). Това се наблюдава и при използване на суров глицерол като въглероден източник (таблица 2).

Таблица 2

Интензивност на развитие и антимикробна активност на *Bacillus subtilis* TS 01 в оптимизирана среда I^{ва}

Суров глицерол, g l ⁻¹	Биомаса, % с.в.	pH на културалната среда	Антимикробна активност в стерилни зони, mm срещу:	
			<i>B. cinerea</i>	<i>X. campestris</i>
20	0.362	9.00	17.3±0.16	15.0±0.27
30	0.748	8.52	26.6±0.23	17.6±0.16
40	0.615	8.30	22.0±0.33	18.3±0.23
50	0.448	8.10	20.5±0.65	20.3±0.23

Среда II^{па} е оптимизирана за проявяване на максимална антибактерийна активност (Todorova et al., 2015) при съдържание на глюкоза 25 g l⁻¹. Същата зависимост се запазва и при използването на суров глицерол като въглероден източник. *B. subtilis* TS 01 проявява най-голяма активност срещу *X. campestris* при концентрация 50 g l⁻¹ глицерол – получават се стерилни зони от 27 mm. В тази среда активността на щама срещу *B. cinerea* отново е най-висока при съдържание на глицерол 30 g l⁻¹ (24.7 mm стерилни зони), но е по-ниска в сравнение със среда I^{ва}.

Таблица 3

Интензивност на развитие и антимикробна активност на *Bacillus subtilis* TS 01 в оптимизирана среда II^{па}

Суров глицерол, g l ⁻¹	Биомаса, % с.в.	pH на културалната среда	Антимикробна активност в стерилни зони, mm срещу:	
			<i>B. cinerea</i>	<i>X. campestris</i>
20	0.623	7.40	15.6±0.45	17.5±0.23
30	0.796	8.00	24.7±0.27	21.6±0.27
40	0.876	8.22	21.0±0.16	22.3±0.23
50	0.935	8.16	18.7±0.35	27.0±0.16



А



В

Фиг. 1 Течен препарат на *B. subtilis* TS 01, получен при култивиране на щама в хранителна среда №3 (А) и оптимизирана среда II^{па} (В)

ИЗВОДИ

Щам *B. subtilis* TS 01 може успешно да се култивира на среди със суров глицерол като въглероден източник. Чрез използване на бактериалната култура самостоятелно или в комбинация с други микроорганизми в крупно мащабно производство, се оползотворява обем на отпадък от производството на биодизел и се създава безотпадна и екологично чиста технология за получаването на биопрепарати от *B. subtilis* TS 01, състоящи се от биомаса и биологично активни вещества. Подходящи за целта са оптимизирани среди I^{ва} и II^{ра}.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батунер, П. Математическите методи в химическата техника. Ленинград, Химия, 1971
2. Заявка за изобретение № 111510 / 25.06.2013. Официално месечно издание на Патентното ведомство, София, 2015. Официален бюлетин, бр. 4 / 30. 04. 2015 г.
3. Патент BG 110823 (A) – A liquid compound for defrosting roads and Highways
4. Anastácio, G. S., K. O. Santos, P. A. Suarez, F. A. Torres, J. L. De Marco, N. S. Parachin, 2014. Utilization of Glycerin Byproduct Derived from Soybean Oil Biodiesel as a Carbon Source for Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris*. *Bioresour Technology*, 152, 505-510. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.042.
5. Fangxia, Y., H. A. Milford, S. Runcang, 2012. Value-added Uses for Crude Glycerol-a Byproduct of Biodiesel Production. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 13. doi:10.1186/1754-6834-5-13
6. Li, C., K. L. Lesnik, H. Liu, 2013. Microbial Conversion of Waste Glycerol from Biodiesel Production into Value-Added Products. *Energies*, 2013, 6, 4739-4768; doi:10.3390/en6094739
7. Phae, C.G., M.Sasaki, M.Shoda, H.Kubota, 1990. Characteristics of *Bacillus subtilis* Isolated from Composts Suppressing Phytopathogenic Microorganism. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1990, 36, 4, 575-586
8. Saimmai, A., O. Rukadee, V. Sobhon, S. Maneerat, 2012. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 Grown on Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Production Plant as Sole Carbon Source. *Journal of Scientific and Industrial Research (India)*, 71, 06, 396-406
9. Santibáñez, C., M. T. Varnero, M. Bustamante, 2011. Residual Glycerol from Biodiesel Manufacturing, Waste or Potential Source of Bioenergy: A Review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71, 3, 469 - 475
10. Sathianachiyar, S., A. Devaraj, 2013. Biopolymer Producing by Bacterial Species Using Glycerol, a Byproduct of Biodiesel. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3, 8, 1-5
11. Sousa, M. de, I. T. Dantas, A. K. N. Felix, H. B. de Sant'Ana, V. M. M. Melo, L. R. B. Gonçalves, 2014. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 2, 295-301.
12. Todorova, S., L. Kozhuharova, 2010. Characteristics and Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 7, 1207 – 1216
13. Todorova, S., V. Stanchev, L. Kozhuharova, 2015. Optimization of Complex Culture Medium for Increase of *Bacillus subtilis* TS 01 Antimicrobial Activity against Phytopathogens. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 17, 3, 61-67 (под печат)