



III KONGRES
BIOTECHNOLOGII



Produkcja polihydroksykwasów z osadu czynnego

Ewa Klimiuk, Tomasz Pokój

Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska,
Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

The synthesis of polyhydroxyalkanoates by activated sludge

Summary

Polyhydroxyalkanoates are polyesters insoluble in water, synthesized by microorganisms and accumulated intracellularly as storage materials. They are marked by high degree of polymerization, non-toxicity, wide range of application and biodegradability. Until now, there have been applied mainly pure microbial cultures for industrial PHAs production. Currently, for that purpose there are conducted intensive investigations on use of mixed microbial cultures (activated sludge). The microorganisms of activated sludge accumulate polyhydroxyalkanoates as storage materials when availability of organics as electron donors and oxygen or nitrate (electron acceptors) is distributed in time and space or when the sludge is submitted to consecutive periods of external substrate accessibility and unavailability. The process efficiency depends on feed composition and reactor operating conditions. Nowadays, there are two types of reactor operational strategies. In municipal wastewater treatment plants, a two-stage process is used: 1^o – selection of excess sludge to specific type of substrate (molasses, whey) in SBR, and 2^o – PHAs production in batch reactor. In wastewater treatment plants from agricultural and food industry, acidogenic fermentation is introduced as an additional stage, where the organic wastes are converted into a mixture of organic acids, and then used as a substrate for PHAs storage.

Key words:
polyhydroxyalkanoates, activated sludge, operating systems.

Adres do korespondencji

Ewa Klimiuk,
Katedra Biotechnologii
w Ochronie Środowiska,
Wydział Ochrony
Środowiska i Rybactwa,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. Słoneczna 45G,
10-709 Olsztyn.

1. Wprowadzenie

Polihydroksykwas (PHA) są to nierozpuszczalne w wodzie poliestry, gromadzone przez mikroorganizmy jako źródło węgla/energii oraz równoważników redukcyjnych (1). Cechuje je wysoki stopień polimeryzacji (10^5 - 10^7 Da), nietoksyczność, biokompatybilność oraz podatność na biodegradację (2). Rozwój biotechnologii polihydroksykwasów jest istotny, ponieważ:

- polihydroksykwasy mogą być wytwarzane z odnawialnych surowców, co przyczynia się do zmniejszenia zużycia ropy naftowej. Obecnie, do produkcji polimerów syntetycznych, wykorzystuje się około 4% tego surowca,

- wykazują podatność na biodegradację, co jest ważne z punktu widzenia unieszkodliwiania odpadów na składowiskach. Według Association of Plastics Manufacturers (APME), ilość odpadów z tworzyw sztucznych w Europie Zachodniej w 2002 r. wyniosła około 20 321 tys. ton, z czego 32% poddano recyklingowi, a pozostała część (62%) trafiła na składowiska (3),

- ich produkcja umożliwia tworzenie systemów zagospodarowywania odpadów w cyklu zamkniętym, co jest zgodne z ideą zrównoważonego rozwoju.

Mikroorganizmy syntezują wiele polihydroksykwasów różniących się budową chemiczną. Do tej pory w makrocząsteczkach polihydroksykwasów zidentyfikowano około 150 różnych merów (4). Oprócz homopolimerów, mikroorganizmy kumulują również kopolimery, czyli polihydroksykwasy zawierające przynajmniej dwa różne mery.

Większość autorów dzieli polihydroksykwasy na krótko- i średniołańcuchowe (5-7). Polihydroksykwasy krótkołańcuchowe (PHA_{SCL}) zawierają od 3 do 5 atomów węgla w monomerach. Z aplikacyjnego punktu widzenia, najważniejszym przedstawicielem PHA_{SCL} jest kwas poli-3-hydroksymasłowy – P(3HB) oraz jego kopolimer z kwasem poli-3-hydroksywalerianowym – P(3HB-co-3HV), które posiadają właściwości termoplastów. Polimery te znajdują zastosowanie do produkcji opakowań w przemyśle kosmetycznym, tac, pojemników oraz innych tego typu artykułów użytkowych.

Polihydroksykwasy średniołańcuchowe (PHA_{MCL}) posiadają mery zawierające łańcuchy nasycone lub nienasycone o liczbie atomów węgla od 6 do 14. Do najważniejszych przedstawicieli tej grupy należą kwas poli-3-hydroksyoktanowy P(3HO) oraz poli-3-hydroksydekanowy P(3HD) (8). Z PHA_{MCL} wytwarza się lateksowe osłony do żywności oraz farby i pigmenty do znakowania i opisywania pojemników ze szkła i tworzyw sztucznych. Aktualnie prowadzi się badania nad przekształcaniem PHA_{MCL} , pod wpływem czynników sieciujących, w wysokoelastyczną gumę. Obiecujące, jak się wydaje, są również możliwości wykorzystywania tej grupy biopolimerów w medycynie do produkcji materiałów chirurgicznych (np. implantów), środków opatrunkowych czy w farmakologii jako osłonek leków.

Zdolność gromadzenia PHA wykazuje ponad 300 gatunków bakterii (9). Większość z nich gromadzi poli-3-hydroksymasłan (P(3HB)), stanowiący homopolimer

kwasu 3-hydroksymasłowego. Jednak tylko nieliczne kumulują PHA w stężeniu przekraczającym 50% suchej masy komórek. Należą do nich *Cupriavidus necator* (wcześniej *Ralstonia eutropha*), rosnący na pożywce zawierającej niskocząsteczkowe kwasy organiczne oraz glukozę i fruktozę jako źródło węgla (10-12), a także *Alcaligenes latus* – wykorzystujący jako substrat sacharozę i bardziej złożone związki organiczne występujące np. w melasie oraz serwatce (13,14). *Methylobacterium organophilum* lub *Protomonas extorquens* syntezują kwas poli-3-hydroksymasłowy w obecności metanolu, stanowiącym tanie i łatwo dostępne źródło węgla. Przydatność w procesach biotechnologicznych wykazują również bakterie z rodzaju *Pseudomonas* jak np. *P. oleovorans* czy *P. putida*, które syntezują polihydroksykwasy średniołańcuchowe podczas wzrostu na węglowodorach alifatycznych (15,16) lub kwasach tłuszczowych (17-19).

Z danych literaturowych wynika, że synteza PHA następuje podczas nie zrównoważonego wzrostu komórek, tj. w warunkach nadmiaru węgla organicznego (substratu), przy okresowym niedoborze pierwiastków niezbędnych do wzrostu drobnoustrojów, np. azotu, fosforu, siarki lub magnezu. Większość gatunków gromadzi PHA, gdy pożywka nie zawiera azotu, bądź zawiera ten pierwiastek w stężeniu niewystarczającym do syntezy nowego materiału komórkowego. *C. necator* efektywnie kumuluje polihydroksykwasy również w warunkach limitowanego stężenia fosforu.

Niektóre gatunki jak *C. necator*, intensywnie gromadzą PHA w fazie wzrostu stacjonarnego. Do tej grupy należą również *P. extorquens* i *P. oleovorans*. W praktyce, hodowle z ich udziałem prowadzone są w dwóch fazach. W fazie pierwszej, namnaża się biomasa, podczas gdy w drugiej – po ograniczeniu stężenia azotu lub fosforu w pożywce – uzyskuje kumulację polihydroksykwasów.

A. latus oraz *Azotobacter vinelandii* UWD kumulują polihydroksykwasy nawet, wówczas gdy pożywka zawiera wszystkie niezbędne składniki pokarmowe, a mikroorganizmy znajdują się w fazie wzrostu. W przypadku, gdy synteza PHA i wzrost komórek następują równocześnie, stosunek pomiędzy stężeniem substratu i substancji limitującej wzrost np. węgla do azotu (C/N) stanowi istotny czynnik pozwalający na kształtowanie zakładanej proporcji między szybkością namnażania mikroorganizmów a szybkością gromadzenia PHA.

Obecnie na skalę przemysłową produkowane są cztery biopolimery (20). Należą do nich:

- Biopol™ (kopolimer 3HB i 3HV) syntezowany przez *C. necator*, a ostatnio również modyfikowaną genetycznie *Escherichia coli*,
- Biomer™ (homopolimer 3HB) uzyskiwany w hodowlach *A. latus*,
- Nodax™ (kopolimer 3HB i 3Hx) otrzymywany z udziałem modyfikowanego genetycznie *C. necator*,
- Biocycle™ (homopolimer 3HB, kopolimer 3HB i 3HV) kumulowany przez *Burkholderia sacchari*.

Czynnikiem ograniczającym upowszechnienie produkcji polihydroksykwasów jest wysoki koszt ich wytwarzania z udziałem czystych kultur (9 €/kg w porównaniu z 1 €/kg dla tworzyw sztucznych) (21). Kierunki badań mające na celu obniżenie

ceny tej grupy polimerów koncentrują się na wykorzystaniu do ich biosyntezy tanih źródeł węgla (ścieków i odpadów) oraz/lub mieszanych populacji mikroorganizmów (osadu czynnego).

W porównaniu z czystymi kulturami, wytwarzanie PHA z osadu czynnego jest korzystne, głównie z uwagi na:

- możliwość wykorzystania jako surowców produktów ubocznych i odpadów poprodukcyjnych pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego,

- łatwość sterowania syntezą PHA poprzez zmianę warunków operacyjnych procesu. Mieszane populacje gromadzą polihydroksykwas, wówczas gdy funkcjonowanie ich pierwotnego metabolizmu zostaje zakłócone,

- naturalną selekcję gatunkową mikroorganizmów, dzięki której hodowle wykazują wysoką stabilność, co ułatwia prowadzenie i kontrolę procesu technologicznego (22),

- brak konieczności utrzymywania sterylnych warunków podczas hodowli,

- niskie nakłady inwestycyjne i koszty eksploatacji obiektów. Jak podają Reis i wsp. (23) cena polihydroksykwasów uzyskanych z osadu czynnego kształtuje się na poziomie około 4 \$/kg i jest porównywalna lub niższa w stosunku do ceny PHA otrzymywanych z udziałem czystych kultur.

Z danych literaturowych wynika, że w porównaniu z czystymi kulturami, mieszane populacje mikroorganizmów charakteryzują się niższą szybkością gromadzenia polihydroksykwasów i produktywnością objętościową (24). Stąd też rozpoznanie czynników umożliwiających intensyfikację procesu poprzez podniesienie wydajności PHA, stanowi obecnie ważny kierunek badawczy w tym zakresie.

W pracy przedstawiono perspektywy rozwoju technologii polihydroksykwasów w aspekcie zdolności ich gromadzenia przez mikroorganizmy osadu czynnego w warunkach beztlenowo-tlenowych oraz tlenowych – z dynamiczną dostępnością substratu. Zaprezentowano układy technologiczne i zdefiniowano warunki operacyjne procesu. Omówiono budowę i właściwości fizyczno-chemiczne polihydroksykwasów syntezy w osadzie czynnym oraz metody ich odzysku. Wskazano czynniki ograniczające wydajność syntezy polihydroksykwasów w osadzie czynnym.

2. Wpływ warunków środowiskowych i operacyjnych procesu na zdolność gromadzenia polihydroksykwasów

Mikroorganizmy osadu czynnego gromadzą polihydroksykwas, wówczas gdy:

- dostępność związków organicznych stanowiących donory elektronów oraz tlenu (akceptor elektronów) jest rozdzielona w czasie lub przestrzeni,

- w reaktorze występuje nadmiar substratu zewnętrznego, po wyczerpaniu którego, mikroorganizmy wykorzystują zmagazynowany polimer jako endogenne źródło węgla.

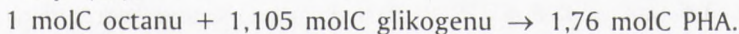
2.1. Gromadzenie polihydroksykwasów w osadzie czynnym pracującym w warunkach beztlenowo-tlenowych

W reaktorach z osadem czynnym, rozdzielenie dostępności donorów i akceptorów elektronów w przestrzeni lub czasie, uzyskuje się wydzielając strefę/komórę beztlenową (układy przepływowe) lub stosując przemiennie mieszanie i napowietrzanie (układy porcjowe). Tego typu rozwiązania są obecnie powszechnie stosowane w oczyszczalniach ścieków komunalnych. Warunki beztlenowe i obecność łatwo przyswajalnych związków organicznych, sprzyjają rozwojowi gatunków wykazujących zdolność gromadzenia polihydroksykwasów. Z analizy piśmiennictwa wynika, że w osadzie czynnym takie właściwości posiadają bakterie kumulujące polifosforany (typ PAO) oraz gatunki nie wykazujące zdolności gromadzenia polifosforanów, ale kumulujące glikogen (typ GAO) (25). Bakterie kumulujące polifosforany (typ PAO), w warunkach beztlenowych pobierają kwas octowy, który przekształcają w acetylo-CoA. W kolejnych etapach, acetylo-CoA ulega kondensacji do acetoacetylo-CoA, a następnie redukcji do 3-hydroksymaślanilo-CoA, który w wyniku polimeryzacji jest przekształcany w P(3HB). Hydroliza zgromadzonych wewnątrzkomórkowo polifosforanów połączona z uwalnianiem ortofosforanów do środowiska dostarcza energii, podczas gdy równoważniki redukcyjne, niezbędne w syntezie biopolimeru, uzyskiwane są z rozkładu glikogenu w cyklu Entnera-Doudoroffa (ED). Bakterie kumulujące glikogen (GAO) wykorzystują natomiast szlaki metaboliczne, w których rozkład glikogenu jest sprzężony z fermentacją propionową. Energia do akumulacji kwasu poli-3-hydroksymaślowego pochodzi z glikolizy, a nie z hydrolizy polifosforanów (26).

Metabolizm bakterii kumulujących polifosforany był przedmiotem badań wielu autorów, co umożliwiło szczegółowe zdefiniowanie procesów jednostkowych prowadzących do kumulacji polifosforanów oraz gromadzenia P(3HB) (27-31). Smolders i wsp. (32,33), a następnie Filipe i wsp. (34) sformułowali równanie, stanowiące obecnie podstawę do obliczania wydajności procesu z udziałem bakterii typ PAO:



Wydajność PHA u bakterii zaliczanych do typu GAO została natomiast określona przez Liu i wsp. (35):



W osadzie pracującym w przemiennych warunkach beztlenowych i tlenowych, stężenie PHA w biomacie nie jest duże. Czynnikiem ograniczającym syntezę PHA jest dostępność wewnątrzkomórkowych polifosforanów i glikogenu. W zależności od stężenia węgla organicznego w dopływie i warunków operacyjnych procesu, zawartość polihydroksykwasów w suchej masie osadu zazwyczaj mieści się w przedziale od 15 do 20% (1,36).

2.2. Gromadzenie polihydroksykwasów w warunkach mikroaerofilowych

Satoh i wsp. (37) udowodnili, że w reaktorach porcjowych (SBR, ang. *Sequencing Batch Reactor*), stężenie polihydroksykwasów w osadzie czynnym można zwiększyć, wprowadzając małą ilość powietrza w fazie mieszania. W takich warunkach, mikroorganizmy uzyskują energię do syntezy PHA z utleniania związków organicznych i nie muszą do tego celu wykorzystywać polifosforanów i/lub glikogenu. W wyniku selekcji, w osadzie czynnym dominantami stają się gatunki wykazujące większą zdolność syntezy PHA aniżeli glikogenu. Skutkiem tego, stężenie polihydroksykwasów może osiągnąć wartość nawet 62% suchej masy osadu, ale hodowle prowadzone w warunkach mikroaerofilowych charakteryzują się małą stabilnością.

2.3. Gromadzenie polihydroksykwasów w warunkach tlenowych z dynamiczną dostępnością substratu (ADF, ang. *Aerobic Dynamic Feeding*)

Mikroorganizmy kumulują PHA również w hodowlach tlenowych przy zmieniającej się w czasie dostępności substratu (Salehizadeh, Loosdrecht (22) cyt. za Ueno i wsp. (1993)). W warunkach ustalonych, przy stałej koncentracji substratu i innych niezbędnych do wzrostu substancji pokarmowych, stężenie składników komórkowych, tj. białek, RNA i DNA utrzymuje się na określonym poziomie. Po pewnym czasie, gdy fizjologiczna adaptacja mikroorganizmów utrwała się jako stan fizjologiczny, wówczas skład i stężenie enzymów niezbędnych dla syntezy białek osiąga wartość optymalną. Taki typ wzrostu jest definiowany jako zrównoważony. Porcjowe doprowadzenie pożywki do reaktora SBR, jest powodem pojawienia się warunków nieustalonych, tj. takich, w których stężenie substratu zmienia się w czasie. Mikroorganizmy osadu czynnego muszą zatem przystosowywać swój metabolizm do zmieniającego się w przemienny sposób dużego i małego stężenia substratu.

Gdy faza niedoboru lub braku substratu trwa wystarczająco długo, wówczas dochodzi do obniżenia stężenia składników komórkowych mających istotne znaczenie dla procesów biosyntezy. Niższa zdolność do podziału komórek nie stanowi przeszkody w pobieraniu substratu, zwłaszcza prostych związków organicznych, w kolejnej fazie. Substancje takie jak kwas octowy, są pobierane i zatrzymywane przez mikroorganizmy w komórkach lub ulegają przemianom do małocząsteczkowych metabolitów pośrednich (38). Jednak z powodów termodynamicznych, wzrost stężenia octanu wewnątrz komórek powoduje spadek szybkości jego pobierania z pożywki. Kumulacja metabolitów pośrednich jest również zjawiskiem niekorzystnym, ponieważ zgromadzone w zbyt dużym stężeniu mogą działać jak inhibitory. W tej sytuacji, zdolność mikroorganizmów do syntezy polimerów pozwala zarówno utrzymać odpowiednio niskie stężenie substratu jak i stężenie małocząsteczkowych metabolitów wewnątrz komórek. Synteza polihydroksykwasów może być zatem rozważana jako mechanizm adaptacyjny u mikroorganizmów. Zdolność gromadze-

nia polihydroksykwasów posiada wiele gatunków, ponieważ fizjologiczna adaptacja do syntezy PHA zachodzi szybciej niż adaptacja do syntezy białek i innych składników komórkowych (39,40).

Gdy proporcja pomiędzy czasem trwania faz o małej i dużej dostępności substratu jest odpowiednia, wówczas synteza polimerów może stać się jednym z dominujących procesów. Szybkość gromadzenia PHA zależy również od innych czynników, w tym składu populacji i stanu fizjologicznego komórek, które są następstwem warunków operacyjnych procesu takich jak rodzaj i stężenie źródła węgla oraz stężenie innych substancji odżywczych, a zwłaszcza azotu (41-43). Z danych literaturowych wynika, że mikroorganizmy zazwyczaj magazynują polimery, w obecności łatwo przyswajalnych związków organicznych, co zapobiega wewnątrzkomórkowej akumulacji substratu oraz metabolitów pośrednich.

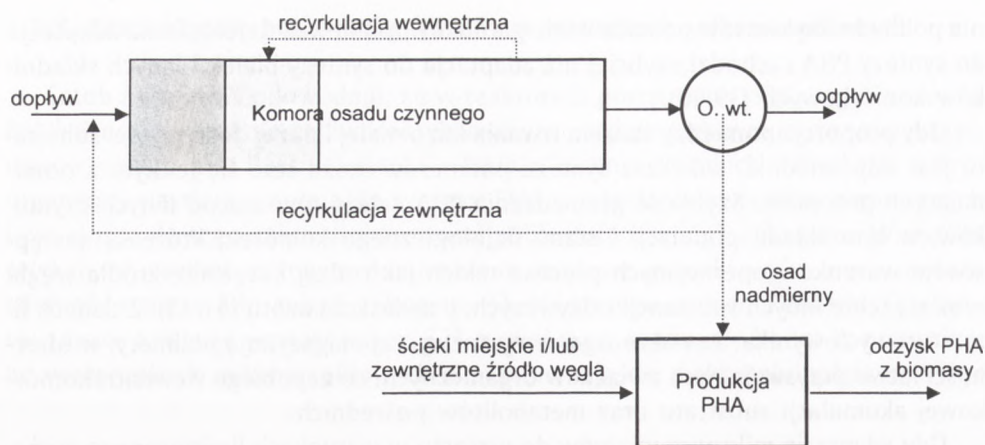
Gdy adaptacja mikroorganizmów do wzrostu w warunkach limitowanego stężenia substratu nie zostaje utrwalona jako stan fizjologiczny, wówczas mikroorganizmy zachowują zdolność syntezy białek i mogą zwiększać swoją specyficzną szybkość wzrostu w odpowiedzi na wzrost stężenia substratu, zwłaszcza gdy w pożywce występuje azot. W takich warunkach, gromadzenie polihydroksykwasów zachodzi z małą wydajnością.

Eksploatacja systemów ADF wymaga starannego doboru warunków operacyjnych. Optymalne stężenie źródła węgla, właściwe stężenie azotu oraz wystarczająco długi czas trwania fazy niedoboru substratu, prowadzą do selekcji gatunkowej i wpływają na zwiększenie liczebności populacji gatunków charakteryzujących się zdolnością gromadzenia PHA. Z danych eksperymentalnych wynika, że w systemach ADF, procentowe stężenie polihydroksykwasów w osadzie czynnym może się zmieniać w szerokim zakresie od 31,9 do 78,5%, w zależności od warunków hodowli (44).

3. Systemy wytwarzania polihydroksykwasów z osadu czynnego

Podstawą koncepcji technologicznej wytwarzania polihydroksykwasów, w warunkach gdy dostępność związków organicznych oraz tlenu jest rozdzielona w czasie lub przestrzeni (warunki beztlenowo-tlenowe), jest wykorzystanie do tego celu osadu nadmiernego. W obiektach pracujących w systemach ze zintegrowanym usuwaniem związków węgla, azotu i fosforu, polihydroksykwasy mogą być wytwarzane z osadu nadmiernego w bocznym ciągu technologicznym (rys. 1). Układ technologiczny oczyszczania ścieków wyposaża się w dodatkowy reaktor, do którego kieruje się osad nadmierny oraz doprowadza ścieki komunalne, ścieki komunalne z dodatkiem przyswajalnych związków organicznych, najczęściej małowcząsteczkowych kwasów organicznych jak octowy lub propionowy lub tylko związki organiczne jako zewnętrzne źródło węgla.

Badania nad produkcją polihydroksykwasów z osadu zapoczątkowali Takabatake i wsp. (45), którzy testowali osad czynny pochodzący z czterech oczyszczalni, róż-



Rys. 1. Schemat wytwarzanie polihydroksykwasów w oczyszczalniach ścieków miejskich w bocznym ciągu technologicznym (O. wt. – osadnik wtórny) (1).

niący się miejscem pobierania próbek (komora beztlenowa i anoksydacyjna) oraz sposobem adaptacji (warunki tlenowe – 10 próbek, beztlenowo-tlenowe – 6 próbek oraz anoksydacyjne – 2 próbki). Syntezę PHA prowadzili w hodowlach okresowych, wykorzystując octan jako źródło węgla w stężeniu od 100 mg/dm^3 do 300 mg/dm^3 . Efektywność procesu oceniali na podstawie maksymalnej szybkości zużycia octanu, szybkości syntezy PHA, procentowej zawartości PHA w osadzie oraz współczynnika wydajności PHA względem kwasu octowego. Na podstawie badań wykazano, że procentowe stężenie PHA w osadzie czynnym zmieniało się od 6,0 do 29,5%, a średnia wartość dla wszystkich prób wyniosła 18,8%. W eksperymencie dowiedziono, że efektywność gromadzenia PHA zależała raczej od pochodzenia próbek osadu, a nie od sposobu jego adaptacji.

Zdaniem autorów poprawę warunków produkcji PHA z osadu czynnego można uzyskać poprzez:

- bardziej efektywną, niż to ma miejsce w komorach osadu czynnego, selekcję kultur mikroorganizmów zdolnych do magazynowania PHA,
- utrzymanie odpowiednio wysokiej koncentracji biomasy osadu podczas produkcji PHA.

W tym celu rozbudowano układ wprowadzając, zamiast jednego, dwa reaktory w bocznym ciągu technologicznym. Pierwszy reaktor, zasilany osadem nadmiernym, służy do selekcji gatunkowej mikroorganizmów, zaś drugi do produkcji PHA, z wykorzystaniem biomasy pochodzącej z pierwszego reaktora, jako zaszczepienia.

Obecnie istnieje zgoda co do tego, że najlepsze warunki selekcji uzyskuje się w reaktorach typu SBR. Osad zawierający wyselekcjonowane kultury jest następnie podawany do reaktora okresowego lub okresowego z zasilaniem substratem, w którym poprzez zapewnienie optymalnych warunków substratowych oraz środowisko-

wych dąży się do uzyskania wysokiej produktywności PHA. W ostatnim dziesięcioleciu tego typu rozwiązania były przedmiotem badań wielu autorów (1,46).

Takabatake i wsp. (46) adaptowali osad czynny do produkcji PHA w reaktorze SBR zwanym PABER (PHA, ang. *Accumulation Bacteria Enrichment Reaktor*). Reaktor pracował w warunkach beztlenowo-tlenowych. Pojedynczy cykl trwał 6 h (dekantacja – 30 min, przedmuchiwanie azotem – 30 min, warunki beztlenowe – 1 h, warunki tlenowe – 3 h, sedymentacja – 1 h). System PABER testowano również w warunkach mikroaerofilowych oraz tlenowych. Reaktor zasilano mieszaniną octanu i propionianu w zmiennej proporcji lub samym octanem oraz ekstraktem drożdżowym i peptonem jako źródłem azotu, na końcu fazy przedmuchiwania azotem. Wiek osadu wynosił 5 dni, a czas zatrzymania pożywki w reaktorze – 10 h, co uzyskiwano stosując odpowiedni stopień wymiany objętościowej. W badaniach wykazano, że maksymalne stężenie PHA w osadzie pracującym w warunkach beztlenowo-tlenowych mieściło się w przedziale 17-57%, w osadzie pracującym w warunkach mikroaerofilowo-tlenowych 33-50% i tlenowych 20-30%. Osad charakteryzował się małą stabilnością. Reaktory okresowe (2°), w zależności od założeń eksperymentu były zasilane octanem i propionianem w zmiennej proporcji lub samym octanem.

Analogiczne badania prowadzili Chua i wsp. (1), wykorzystując osad czynny oczyszczający ścieki miejskie pochodzące z oczyszczalni w Tokio. Stężenie substancji organicznych (ChZT) w ściekach było silnie zróżnicowane i zmieniało w szerokim zakresie od 60 mg O₂/dm³ do 300 mg O₂/dm³. Polihydroksykwasy wytwarzane były w bocznym ciągu technologicznym wyposażonym w dwa reaktory. Pierwszy stanowił reaktor SBR pracujący w warunkach beztlenowo-tlenowych, zaś drugi – reaktor okresowy. Reaktor SBR zasilany był ściekami miejskimi oraz ściekami miejskimi z dodatkiem octanu i pracował w 4-godzinnym cyklu (dekantacja – 15 min, zasilanie ściekami – 5 min, faza beztlenowa – 1 h, faza tlenowa – 2 h, sedymentacja – 40 min). Czas zatrzymania ścieków wynosił 30 h. W reaktorze okresowym jako źródło węgla stosowano octan, który wprowadzano porcjowo 2-krotnie: na początku i po 6 h hodowli. Czas hodowli okresowej wynosił 24 h. Poszczególne eksperymenty różniły się stężeniem początkowym zawiesin osadu czynnego, stężeniem octanu oraz odczynem. W badaniach wykazano, że w reaktorze SBR osad czynny oczyszczający ścieki miejskie gromadził PHA w stężeniu 21% suchej masy osadu, podczas gdy osad zasilany ściekami miejskimi z dodatkiem octanu – 31%. Produkcja PHA była wyższa, gdy wiek osadu wynosił 3 dni w porównaniu z dłuższym wiekiem wynoszącym 10 dni. W badaniach w reaktorze okresowym (2°) wykazano, że osad pochodzący z reaktora SBR zasilany ściekami miejskimi z dodatkiem octanu charakteryzował się wyższą zdolnością gromadzenia polihydroksykwasów aniżeli osad zasilany samymi ściekami. Gromadzenie polihydroksykwasów zachodziło efektywnie w środowisku zasadowym przy odczynie pH 8 i pH 9, podczas gdy przy obojętnym i lekko kwaśnym (pH 7 i pH 6) osad czynny nie wykazywał zdolności kumulacji PHA. Z badań cytowanych autorów (1,45) wynika, że w warunkach beztlenowo-tlenowych kumulacja polihydroksykwasów kształtowała się na poziomie od

20 do 30%. Proces charakteryzował się niską stabilnością, a utrzymanie stałej wydajności polihydroksykwasów, w dłuższym przedziale czasowym nastręczało wiele trudności.

Stężenie PHA w biomacie jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na cenę produktu końcowego. Przy niskim stężeniu PHA w biomacie, rosną koszty jego odzysku, ponieważ relatywnie wysokie stają się nakłady na środki trawiące oraz koszty składowania odpadów poprodukcyjnych. Szacunkowo, dla czystych kultur, przy stężeniu P(3HB) wynoszącym 50% s.m., koszt odzysku polimeru z biomasy wynosi 4,8 \$/kg P(3HB), podczas gdy przy stężeniu P(3HB) na poziomie 88% s.m. jest około 5-krotnie niższy (47). Z tego powodu, odzysk PHA z osadu staje się opłacalny, gdy stężenie polimeru w suchej masie osadu wynosi 50% lub powyżej, co jest możliwe do uzyskania w systemach ADF.

Układ technologiczny produkcji PHA w systemie ADF jest analogiczny jak opisany wcześniej w warunkach beztlenowo-tlenowych i składa się z dwóch stopni. Pierwszy stopień stanowi reaktor SBR, w którym wytwarza się biomasę zawierającą mikroorganizmy charakteryzujące się zdolnością gromadzenia PHA oraz odpowiednio wysoką specyficzną szybkością wzrostu. Odbierana na końcu cyklu biomasa służy jako zaszczerpienie w drugim stopniu. Reaktor okresowy (2°) pracuje zazwyczaj w dwóch fazach. W fazie pierwszej, doprowadza się pożywkę zawierającą źródło węgla i wszystkie niezbędne składniki pokarmowe, co prowadzi do zwiększenia stężenia biomasy w reaktorze. Po uzyskaniu odpowiedniej koncentracji biomasy, do reaktora doprowadza się pożywkę z wyłączeniem np. azotu, co prowadzi do kumulacji polihydroksykwasów.

Dionisi i wsp. (3) określili wpływ stężenia azotu w pożywce oraz odczynu na kumulację PHA. Źródło węgla stanowiła mieszanina kwasów octowego, mlekowego oraz propionowego w proporcji 40:40:20%, w przeliczeniu na wskaźnik ChZT. Na podstawie badań wykazano, że mikroorganizmy kumulowały głównie kopolimer P(3HB-co-3HV) o zawartości kwasu 3-hydroksywalerianowego 31 mol%. Ograniczenie stężenia azotu w pożywce nie poprawiło zdolności gromadzenia PHA w osadzie czynnym. Najwyższe stężenie P(3HB-co-3HV) w biomacie autorzy odnotowali w zakresie odczynu pH 6,5-8,5. Serafim i wsp. (44) stosowali octan w stężeniu od 15 mmol C/dm³ do 150 mmol C/dm³ oraz azot w stężeniu od 0 mmol N/dm³ do 2,8 mmol N/dm³. Najwyższe stężenie P(3HB) w biomacie, wynoszące 78,5% uzyskali, wówczas gdy pożywka zawierała 180 mmol C/dm³ octanu i 0,7 mmol/dm³ azotu.

Choi, Lee (48) podają, że koszt surowca może stanowić nawet 40% ceny produktu handlowego. Z tego powodu, od szeregu lat prowadzone są badania nad poszukiwaniem tanich i efektywnych źródeł węgla do wytwarzania PHA, jak np. hydrolizaty skrobi, serwatka, cukier drzewny, melasa, sól i odpady sojowe. Większość badań dotyczyła jednak czystych kultur bakterii (49-54). Przykłady wydajności procesu i udział ceny surowca w ogólnych kosztach wytwarzania PHA przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

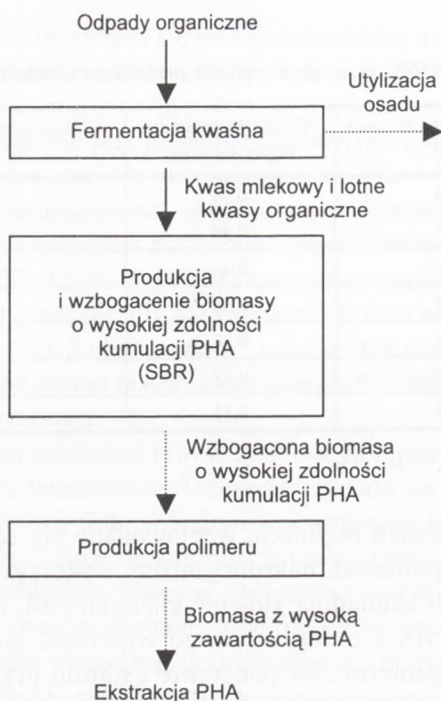
Wydajność i koszt produkcji P(3HB) przez drobnoustroje przy wykorzystaniu różnych źródeł węgla (55)

Surowiec	Orientacyjna cena surowca (\$/kg)	Wydajność polimeru (kg/kg surowca)	Udział ceny surowca w cenie produktu (\$/kg polimeru)
glukoza	0,493	0,38	1,35
sacharoza	0,295	0,40	0,72
metanol	0,180	0,43	0,42
kwask octowy	0,595	0,38	1,56
etanol	0,502	0,50	1,00
melasa	0,220	0,42	0,52
serwatka	0,071	0,33	0,22

W przypadku mieszanych populacji, węglowodany nie są odpowiednim surowcem do syntezy PHA, ponieważ mikroorganizmy wykorzystując je jako substrat, w warunkach tlenowych akumulują głównie glikogen (56). Z tego powodu, do tej pory do wytwarzania PHA z osadu czynnego większość autorów stosowała jako źródło węgla kwasy organiczne. Na podstawie ostatnio przeprowadzonych badań wskazuje się, że do produkcji polihydroksykwasów mogą być stosowane wody osadowe z fermentacji produktów ubocznych i odpadów z przemysłu rolno-spożywczego, zawierające małowcząsteczkowe kwasy organiczne.

Wykorzystanie odpadów wymaga zatem rozbudowy układu ADF o komorę fermentacji. Schemat układu technologicznego produkcji polihydroksykwasów przedstawiono na rysunku 2. Układ składa się z trzech stopni. W pierwszym stopniu prowadzi się fermentację odpadów, a woda nadosadowa, zawierająca małowcząsteczkowe kwasy organiczne takie jak octowy, propionowy i masłowy jest kierowana do drugiego stopnia (SBR). W reaktorze SBR namnaża się biomasa w warunkach umożliwiających selekcję gatunkową mikroorganizmów prowadzącą do zapewnienia odpowiedniej liczebności kultur charakteryzujących się odpowiednio wysoką szybkością wzrostu i zdolnością kumulacji PHA. Z reaktora SBR biomasa jest kierowana do trzeciego stopnia (reaktor okresowy), w którym odbywa się produkcja polihydroksykwasów.

Albuquerque i wsp. (56) syntezowali polihydroksykwasy w obecności melasy i trzciny cukrowej w układzie 3-stopniowym składającym się z fermentacji kwaśnej, reaktorów (SBR) oraz reaktora okresowego. Kontrolując podczas fermentacji odczyn w zakresie od pH 5 do pH 7, autorzy uzyskiwali zmienną proporcję małowcząsteczkowych kwasów organicznych (octowego, propionowego i masłowego) w wodzie osadowej. Przy wyższym odczynie, w wodzie osadowej dominowały kwasy octowy i propionowy, zaś przy niższym – masłowy i walerianowy. W dalszych badaniach wykazano, że udział frakcji molowej monomerów 3-hydroksymaślanu w polihydroksykwasach, był proporcjonalny do udziału molowej frakcji octanu i ma-



Rys. 2. Schemat technologiczny produkcji PHA z odpadów organicznych (57).

ślanu w wodzie osadowej po fermentacji, podczas gdy udział molowej frakcji 3-hydroksywalerianu – do udziału propionianu, walerianu i mleczanu. Duże stężenie azotu amonowego w dopływie do SBR, powodowało spadek stężenia PHA w osadzie czynnym, ale stymulowało wzrost liczebności gatunków zdolnych do kumulacji polihydroksykwasy. Dla uzyskania wysokiej produktywności PHA należało zapewnić odpowiednie warunki substratowe i właściwą proporcję C/N w reaktorze okresowym.

4. Charakterystyka polihydroksykwasy wytwarzanych przez osad czynny i metody ich pozyskiwania z biomasy

Wielu autorów (58-60) uważa, że mikroorganizmy włączają w łańcuch polihydroksykwasy monomery o strukturze chemicznej analogicznej do struktury substratu. Wang i wsp. (61) udowodnili, że homopolimer kwasu 3-hydroksymasłowego jest akumulowany, wówczas gdy jako źródło węgla zastosuje się maślan. Kwas poli-3-hydroksymasłowy gromadzony jest również, gdy źródło węgla do jego syntezy stanowią kwasy organiczne o parzystej liczbie atomów węgla, jak np. kwas octowy (62).

Średni ciężar cząsteczkowy kwasu poli-3-hydroksymasłowego mieści się w zakresie od $6 \cdot 10^5$ do $1,6 \cdot 10^6$ g/mol. W komórkach mikroorganizmów P(3HB) występuje w stanie amorficznym, lecz po ekstrakcji staje się częściowo krystaliczny, o krystaliczności od 55 do 80%. Z innych ważnych właściwości fizycznych można wymienić temperaturę zeszklenia ($t_g - 4^\circ\text{C}$) oraz temperaturę topnienia ($t_m - 180^\circ\text{C}$), tylko niewiele niższą od temperatury jego destrukcji termicznej (200°C). Mechaniczne właściwości P(3HB), mierzone wartością modułu Younga (3,5 GPa) oraz wytrzymałością na zerwanie (40 MPa), są podobne do właściwości polipropylenu (PP), podczas gdy inny parametr taki jak wydłużenie przy zerwaniu P(3HB) wynosi zaledwie 5%, i w porównaniu z PP (400%), jest znacznie niższy (63,64). Mała stabilność termiczna P(3HB), jego niska wytrzymałość mechaniczna oraz kruchość stwarzają trudności podczas obróbki przemysłowej. Duża różnica pomiędzy temperaturą topnienia a temperaturą rozkładu termicznego jest natomiast korzystna, ponieważ umożliwia termiczne przetwarzanie polimeru bez ryzyka uszkodzenia jego chemicznej struktury. Poprawę właściwości P(3HB) można uzyskać stosując plastyfikatory lub sporządzając mieszaniny z innymi polimerami.

W osadzie czynnym, polihydroksykwasy są wytwarzane równocześnie przez wiele gatunków mikroorganizmów, które mogą syntezować zarówno homopolimery jak i kopolimery. Satoh i wsp. (65) udowodnili, że w warunkach beztlenowo-tlenowych mikroorganizmy syntezują 3-hydrokso-2-metyloamślan (3H2MB) oraz 3-hydrokso-2-metylowalerian (3H2MV). Z użytkowego punktu widzenia, korzystna jest synteza kopolimeru kwasu 3-hydroksymasłowego i 3-hydroksywalerianowego P(3HB-co-3HV), która zachodzi w obecności przynajmniej dwóch związków chemicznych w pożywce, z których jeden pełni rolę kosubstratu. Badania nad wpływem różnego rodzaju kosubstratów na skład gromadzonych w osadzie czynnym polihydroksykwasów prowadzone były przez wielu autorów. Wykazano w nich istotną rolę kwasu propionowego i walerianowego podczas syntezy kopolimeru P(3HB-co-3HV) (31,66,67). Kopolimer może być syntezowany również na kwasie walerianowym jako jedynym źródłem węgla (67) oraz z wykorzystaniem bardziej złożonych substratów, w tym niektórych ścieków z przemysłu rolno-spożywczego (61,68).

W tabeli 2, podsumowano wyniki badań różnych autorów uwzględniając warunki syntezy i wydajność gromadzenia PHA w osadzie czynnym oraz podano udział jednostek monomerycznych w syntezowanych polihydroksykwasach. W prezentowanych danych wskazuje się wyraźnie na możliwość wytwarzania kopolimerów o różnej proporcji jednostek monomerycznych w cząsteczce, w zależności zarówno od rodzaju substratu jak i warunków hodowli.

W ostatnio przeprowadzonych badaniach Dai i wsp. (73) wykazano, że w warunkach beztlenowych mikroorganizmy zaliczane do typu metabolicznego GAO mają zdolność wytwarzania terpolimerów, wykorzystując kwas octowy jako jedyne źródło węgla. Udział jednostek 3HV i 3HMV wynosił od 30 mol% do 35 mol%, pozostałe jednostki w polimerze stanowił 3HB. Uzyskany terpolimer charakteryzował się niską temperaturą topnienia (t_m), dużą masą cząsteczkową (od 380 do 550 kDa) i małym

stopniem polidispersji (od 1,4 do 1,8). Autorzy wykazali, że warunki procesu (beztlenowe lub tlenowe) mają wpływ na skład kopolimerów. PHA syntezowane w warunkach beztlenowych zawierały stałą zawartość innych niż 3HB monomerów, podczas gdy w warunkach tlenowych udział frakcji 3HV ulegał zmianom. Wytworzone w osadzie czynnym w warunkach beztlenowych polihydroksykwasy wykazywały podobne właściwości fizyczne jak produkt handlowy znany pod nazwą Biopol.

Tabela 2

Warunki syntezy, rodzaj oraz wydajność gromadzenia PHA przez osad czynny

Substrat	Warunki hodowli	PHA (%)	Rodzaj PHA (mol:mol)	Literatura
1	2	3	4	5
kwas octowy	beztlenowo-tlenowe	16,7	P(3HB/3HV) (90:10)	(32)
	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (83:17)	(69)
	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (79:21)	(67)
	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (75:25)	(66)
	mikroaerofilowo-tlenowe	62,0	P(3HB)	(37)
	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	50,0	P(3HB)	(70)
	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	40,0	P(3HB)	(71)
	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	31,9	P(3HB)	(44)
kwas propionowy	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (10:90)	(67)
	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (28:72)	(66)
	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	13,6	P(3HB/3HV/3H2MV) (12:61:27)	(20)
kwas masłowy	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (60:40)	(66)
	tlenowe, limitowane stężenie azotu	37,0	P(3HB)	(72)
	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	14,5	P(3HB)	(20)
kwas walerianowy	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (11:89)	(67)
	tlenowe, limitowane stężenie azotu	22,0	P(3HB/3HV) (46:54)	(72)
	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	14,3	P(3HB/3HV/3H2MV) (32:52:16)	(20)
mieszanina kwasów octowego i propionowego	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	25,4	P(3HB/3HV/3H2MV) (54:33:13)	(20)
mieszanina kwasów octowego, propionowego i masłowego	beztlenowo-tlenowe		P(3HB/3HV) (55:45)	(66)

1	2	3	4	5
mieszanina kwasów octowego, propionowego, masłowego i walerianowego	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu		P(3HB/3HV) (50:50)	(70)
mieszanina kwasów octowego, propionowego i mlekowego (40%/20%/40%)	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	46,0	P(3HB/3HV) (69:31)	(57)
fruktoza ^{a)}	tlenowe	50,0	P(3HB/3HV) (20:80)	(61)
glukoza ^{a)}	tlenowe	50,0	P(3HB/3HV) (55:45)	(61)
odpady słodowe ^{a)}	tlenowe	70,0	P(3HB/3HV) (90:10)	(61)
odpady sojowe ^{a)}	tlenowe	70,0	P(3HB/3HV) (75:25)	(61)
fermentowane wytłoczyny z oliwek	tlenowe z dynamiczną dostępnością substratu	54,0	P(3HB/3HV) (96:4)	(68)

^{a)} hodowla prowadzona z udziałem wyizolowanej z osadu czynnego *Klebsiella* spp.

Do tej pory, uwaga wielu badaczy koncentrowała się na szczegółowym rozpoznananiu mechanizmów syntezy PHA i optymalizacji warunków operacyjnych z udziałem mieszanych kultur. Mniej liczne są natomiast doniesienia dotyczące wyników badań odzysku polihydroksykwasów z biomasy.

Metody odzysku PHA są warunkiem ciągłości procesu technologicznego, zatem muszą być tak dobrane, aby:

- zapobiec degradacji polimeru,
- nie stanowić zagrożenia dla środowiska,
- nie podnieść znacząco ceny polimeru.

W przypadku czystych kultur rozwijane są metody odzysku polegające na rozpuszczaniu polihydroksykwasów w odpowiednich rozpuszczalnikach lub rozbijaniu oraz trawieniu ścian komórkowych mikroorganizmów. Jako rozpuszczalniki organiczne stosuje się chloroform, chlorek metylenowy, 1,2-dichloroetan lub cyjanek etylu. Z powodu dużej lepkości, wyekstrahowanie biopolimeru wymaga dużego, nawet 20-krotnego nadmiaru rozpuszczalnika w stosunku do masy próby, co podnosi koszt procesu nawet, wówczas gdy rozpuszczalnik jest oczyszczany i użyty powtórnie (9).

Do rozbicia ścian komórkowych stosuje się metody mechaniczne, chemiczne oraz enzymatyczne. W metodach chemicznych wykorzystuje się chloran (I) sodu, kwasy, alkalia oraz surfaktanty. Zastosowanie chloranu (I) sodu powoduje rozpuszczenie składników komórkowych takich jak: kwasy nukleinowe, lipidy, fosfolipidy, węglowodany, białka z wyjątkiem PHA. Wadą metody jest częściowa degradacja PHA z powodu utlenienia, czego konsekwencją może być obniżenie średniej masy cząsteczkowej biopolimerów nawet o 50% (74). Zdaniem Roh i wsp. (75), dodatek przeciwutleniacza w postaci disiarczanu sodu przeciwdziała degradacji P(3HB) średnio o 14-30%. Zwiększając odczyn do pH 12 oraz wprowadzając dodatkowo środki powierzchniowo czynne można uzyskać polimer o wyższej czystości.

W celu obniżenia stopnia rozkładu polihydroksykwasów stosuje się chloran (I) sodu w mieszaninie z chloroformem. Hahn i wsp. (76) odzyskiwali kwas poli-3-hydroksymasłowy z biomasy *C. necator* stosując 30% roztwór chloranu (I) sodu i chloroformu w proporcji objętościowej 1:1. Efektywność ekstrakcji P(3HB) wyniosła 91%, a czystość polimeru powyżej 97%. Zdaniem autorów, chloroform powoduje szybkie rozpuszczenie P(3HB), zapobiegając w ten sposób jego degradacji. Odzysk PHA z biomasy można również zwiększyć wprowadzając do chloranu (I) sodu surfaktanty. Ramsay i wsp. (77) badali wpływ wstępnego przemywania środkami powierzchniowo czynnymi (Triton X-100 oraz dodecylosiarczan sodu – SDS) na stopień odzysku PHA z komórek *C. necator*. Po zastosowaniu wstępnej obróbki biomasy, uzyskali polihydroksykwas o czystości od 97 do 98% i masie cząsteczkowej pomiędzy 730 000 a 790 000 w zależności od użytego surfaktantu. PHA izolowane za pomocą samego chloranu (I) sodu charakteryzowały się wyższą czystością, ale mniejszą masą cząsteczkową.

W metodzie enzymatycznej, do dezintegracji ścian komórkowych przez długi czas wykorzystywano lizozym. W skali technicznej jego stosowanie jest zbyt kosztowne. Obecnie bada się przydatność do tego celu tańszych enzymów jak trypsyna, pepsyna, papaina i inne proteazy. Lakshman, Shamala (78) do lizy komórek *Sinorhizobium meliloti* zastosowali mieszaninę enzymów litycznych wyizolowanych z komórek *Microbispora* sp. i chloroformu. W temperaturze 50°C i przy odczynie pH 7, odzysk polihydroksykwasów o stopniu czystości 92%, kształtował się na poziomie 94%. Obecnie nowe kierunki badawcze koncentrują się na zastosowaniu ekstrakcji PHA dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (79,80).

5. Podsumowanie

Produkcja polihydroksykwasów z osadu czynnego może być realizowana w systemach beztlenowo-tlenowych oraz systemach ADF, które obecnie są bardziej polecane ze względu na możliwość uzyskania wysokiego stężenia PHA w biomacie (do 70%) i z uwagi na stabilność procesu.

Wykorzystanie jako surowca produktów ubocznych i rolniczych odpadów poprodukcyjnych jest możliwe w układach składających się z trzech stopni, przy czym:

- w pierwszym stopniu (fermentacja) uzyskuje się wodę osadową zawierającą małowcząsteczkowe kwasy organiczne stanowiące surowiec do produkcji PHA,
- w drugim stopniu (reaktor SBR ze zmienną dostępnością substratu – ADF) dąży się do uzyskania odpowiedniej liczebności mikroorganizmów zdolnych do kumulacji PHA,
- w trzecim stopniu (reaktor okresowy) produkuje się polihydroksykwasy.

Czynnikiem ograniczającym produktywność objętościową PHA jest mała specyficzna szybkość wzrostu mieszanych populacji ($0,1 \text{ h}^{-1}$). Do tej pory w reaktorze okresowym udało się uzyskać stężenie biomasy na poziomie 7 g s.m./dm^3 , nato-

miast w celu uzyskania porównywaną produktywności z czystymi kulturami należy dążyć do uzyskania od 10 do 12 g s.m./dm³. Wymaga to dalszych badań nad określeniem warunków selekcji mikroorganizmów charakteryzujących się nie tylko wysoką zdolnością kumulacji PHA, ale również większą zdolnością namnażania biomasy.

Zaletą produkcji PHA z udziałem mieszanych populacji mikroorganizmów jest łatwość syntezy kopolimerów, nawet w warunkach gdy substrat stanowi sam kwas octowy. Istnieje natomiast konieczność dokładniejszej oceny właściwości fizycznych polihydroksykwasów, pod kątem ich dalszego łatwego przetwarzania.

Do korzyści wynikających ze stosowania mieszanych populacji należy możliwość oddzielania i zgęszczania biomasy przed ekstrakcją PHA z komórek na drodze sedymentacji grawitacyjnej.

Literatura

1. Chua A. S. M., Takabatake H., Satoh H., Mino T., (2003), *Wat. Res.*, 37, 3602-3611.
2. Steinbüchel A., (2001), *Macromol. Biosci.*, 1, 1-24.
3. Dionisi D., Beccari M., Di Gregorio S., Majone M., Papini M. P., Vallini G., (2005), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 1306-1318.
4. Steinbüchel A., Lütke-Eversloh T., (2003), *Biochem. Eng. J.*, 16, 81-96.
5. Anderson A. J., Dawes E. A., (1990), *Microbiol. Rev.*, 54, 450-472.
6. Steinbüchel A., Valentin H. E., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 128, 219-228.
7. Kim Y. B., Lenz R. W., (2001), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 71, 51-79.
8. Madison L. L., Huisman G. W., (1999), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(1), 21-53.
9. Lee S. Y., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 1-14.
10. Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K., Woo S. I., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 892-898.
11. Kim G. J., Bang K. H., Kim Y. B., Rhee Y. H., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1487-1492.
12. Wang J., Yu J., (2000), *Process Biochem.*, 36, 201-207.
13. Yamane Y., Fukunaga M., Lee Y. W., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 197-202.
14. Wang F., Lee S. Y., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3703-3706.
15. Kellerhals M. B., Hazenberg W., Witholt B., (1999), *Enzyme Microb. Tech.*, 24, 111-116.
16. Durner R., Zinn M., Witholt B., Egli T., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 72(3), 278-287.
17. Huijberts G. N. M., Eggink G., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 233-239.
18. Lee S. Y., Wong H. H., Choi J., Lee S. W., Lee S. C., Han C. S., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68(4), 466-470.
19. Kim B. S., (2002), *Biotechnol. Lett.*, 24, 125-130.
20. Lemos P. C., Serafim L. S., Reis M. A. M., (2006), *J. Biotechnol.*, 122, 226-238.
21. Biby G. D., (2002), *Degradable plastics*: <http://www.icma.com/info/polymers>.
22. Salehizadeh H., Loosdrecht van M. C. M., (2004), *Biotechnol. Adv.*, 22, 261-279.
23. Reis M. A. M., Serafim L. S., Lemos P. C., Ramos A. M., Aguiar F. R., van Loosdrecht M. C. M., (2003), *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 25, 377-385.
24. Beccari M., Dionisi D., Giuliani A., Majone M., Ramadori R., (2002), *Wat. Sci. Technol.*, 45, 157-168.
25. Cech J. S., Hartman P., (1993), *Wat. Res.*, 27, 1219-1225.
26. Satoh H., Mino T., Matsuo T., (1992), *Wat. Sci. Technol.*, 26, 933-942.
27. Comeau Y., Hall K. J., Oldham W. K., (1985), *Wat. Sci. Technol.*, 17, 313-314.
28. Comeau Y., Hall K. J., Hancock R. E. W., Oldham W. K., (1986), *Wat. Res.*, 20, 1511-1521.
29. Wentzel M. C., Lotter L. H., Loewenthal R. E., Marais G. V. R., (1986), *Water SA*, 12(4), 209-244.

30. Mino T., Arun V., Tsuzuki Y., Matsuo T., (1987), *Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process*, in: Adv. Water Poll. Control.: *Biological phosphate removal from wastewaters*. 4, Ed: Ramadori R., Pergamon Press, Oxford, 27-38.
31. Matsuo T., Mino T., Sato H., (1992), *Wat. Sci. Technol.*, 25, 83-92.
32. Smolders G. J. F., van der Meij J., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 461-470.
33. Smolders G. J. F., van Loosdrecht M.C. M., Heijnen J. J., (1995), *Water Sci. Technol.*, 31, 79-94.
34. Filipe C. D. M., Daigger G. T., Grady Jr. C. P. L., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 76, 32-43.
35. Liu W.-T., Mino T., Nakamura K., Matsuo T., (1994), *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 535-540.
36. Dias J. M. L., Lemos P. C., Serafim L. S., Oliveira C., Eiroa M., Albuquerque M. G. E., Ramos A. M., Oliveira R., Reis M. A. M., (2006), *Macromol. Biosci.*, 6, 885-906.
37. Satoh H., Iwamoto Y., Mino T., Matsuo T., (1998), *Wat. Sci. Tech.*, 38, 103-109.
38. Wanner J., (1994), *Activated sludge bulking and foaming control*. A Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, Pennsylvania.
39. Loosdrecht van M. C. M., Pot M. A., Heijnen J. J., (1997), *Wat. Sci. Technol.*, 35(1), 41-47.
40. Majone M., Dircks K., Beun J. J., (1999), *Wat. Sci. Technol.*, 39(1), 61-73.
41. Daigger G. T., Grady Jr. C. P. L., (1982), *Wat. Res.*, 16, 365-382.
42. Majone M., Massaniso P., Ramadori R., (1998), *Wat. Sci. Tech.*, 38, 77-84.
43. Dionisi D., Majone M., Tandoi V., Beccari M., (2001), *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40, 5110-5519.
44. Serafim L. S., Lemos P. C., Oliveira R., Reis M. A. M., (2004), *Biotechnol. Bioeng.*, 87, 145-160.
45. Takabatake H., Satoh H., Mino T., Matsuo T., (2002), *Wat. Sci. Technol.*, 45(12), 119-126.
46. Takabatake H., Satoh H., Mino T., Matsuo T., (2000), *Wat. Sci. Technol.*, 42(3-4), 351-356.
47. Lee S. Y., Choi J., (1998), *Polym. Degrad. Stab.*, 59, 387-393.
48. Choi J., Lee S. Y., (1997), *Bioprocess Eng.*, 17, 335-342.
49. Hassan M. A., Shirai Y., Kusubayashi N., Karim M. I. A., Nakanishi K., Hashimoto K., (1996), *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 151-156.
50. Kim B. S., Chang H. N., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 109-112.
51. Yu P. H. F., Chua H., Huang A. L., Lo W. H., Ho K. P., (1999), *Wat. Sci. Technol.*, 40(1), 365-370.
52. Yu J., (2001), *J. Biotechnol.*, 37, 731-738.
53. Pozo C., Martínez-Toledo M. V., Rodelas B., González-López J., (2002), *J. Biotechnol.*, 97, 125-131.
54. Du G., Chen L. X. L., Yu J., (2004), *J. Polym. Environ.*, 12(2), 89-94.
55. Lee S. Y., (1996), *Trends Biotechnol.*, 14, 431-438.
56. Albuquerque M. G. E., Eiroa M., Torres C., Nunes B. R., Reis M. A. M., (2007), *J. Biotechnol.*, 130, 411-421.
57. Dionisi D., Majone M., Papa V., Beccari M., (2004), *Biotechnol. Bioeng.*, 85, 569-579.
58. Huisman G. W., de Leeuw O., Eggink G., Witholt B., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1949-1954.
59. Steinbüchel A., (1991), *Acta Biotechnol.*, 11, 419-427.
60. Chen G. Q., Xu J., Wu Q., Zhang Z., Ho K. P., (2001), *React. Funct. Polym.*, 48, 107-112.
61. Wang Y. J., Hua F. L., Tsang Y. F., Chan S. Y., Sin S. N., Chua H., Yu P. H. F., Ren N. Q., (2007), *Biore-source Technol.*, 98, 1690-1693.
62. Wang J., Yu J., (2001), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 121-126.
63. Mitomo H. P., Barham P. J., Keller A., (1987), *Polym. J.*, 19, 1241-1253.
64. Doi Y., (1990), *Solid-state properties of copolyesters, in: Microbial polyesters*, New York: VCH, 107-134 (Chapter 7).
65. Satoh H., Ramey W. D., Koch F. A., Oldham W. K., Mino T., Matsuo T., (1996), *Wat. Sci. Technol.*, 34(1-2), 9-16.
66. Lemos P. C., Viana C., Salgueiro E. N., Ramos A. M., Crespo J. P. S. G., Reis M. A. M., (1998), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 22, 662-671.
67. Randall A. A., Liu Y., (2002), *Wat. Res.*, 36, 3473-3478.
68. Dionisi D., Carucci G., Papini M. P., Riccardi C., Majone M., Carrasco F., (2005), *Wat. Res.*, 39, 2076-2084.
69. Hesselmann R. P. X., von Rummell R., Resnick S. M., Hany R., Zehnder A. J. B., (2000), *Wat. Res.*, 34, 3487-3494.

70. Beccari M., Majone M., Massaniso P., Ramadori R., (1998), *Wat. Res.*, 32, 3403-3413.
71. Beun J. J., Dircks K., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (2002), *Wat. Res.*, 36, 1167-1180.
72. Hu W. F., Chua H., Yu P. H. F., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 695-698.
73. Dai Y., Yuan Z., Jack K., Keller J., (2007), *J. Biotechnol.*, 129, 489-497.
74. Berger E., Ramsay B. A., Ramsay J. A., Chavarie C., Braunegg G., (1989), *Biotechnol. Tech.*, 3, 227-232.
75. Roh K. S., Yeom S. H., Yoo Y. J., (1995), *Biotechnol. Tech.*, 9, 709-712.
76. Hahn S. K., Chang Y. K., Kim B. S., Chang H. N., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 256-261.
77. Ramsay J. A., Berger E., Ramsay B. A., Chavarie C., (1990), *Biotechnol. Tech.*, 4, 221-226.
78. Lakshman K., Shamala T. R., (2006), *Enzyme Microb. Tech.*, 39, 1471-1475.
79. Hejazi P., Vasheghani-Farahani E., Yamini Y., (2003), *Biotechnol. Prog.*, 19, 1519-1523.
80. Khosravi-Darani K., Vasheghani-Farahani E., Shojaosadati S. A., Yamini Y., (2004), *Biotechnol. Prog.*, 20, 1757-1765.