

# POTENCIAL PAPIRNIŠKEGA MULJA V PROCESU PROIZVODNJE ENCIMOV

## POTENTIAL OF PAPER MILL SLUDGE IN THE PROCESS OF ENZYME PRODUCTION

Mija SEŽUN<sup>1</sup>, Matej SKOČAJ<sup>2</sup>, Andrej GREGORI<sup>3</sup>, Maja GRUNDNER<sup>2</sup>, Kristina SEPČIČ<sup>2</sup>

### IZVLEČEK

V naši študiji smo raziskovali rast glive *Pleurotus ostreatus* na papirniškem mulju. Natančneje smo raziskali primernost substrata DS (deinking proces) in PS mulja (kemično mehansko čiščenje) v procesu proizvodnje encimov s pomočjo glive *P. ostreatus*. Encimi, ki se proizvedejo tekom kultivacije glive igrajo pomembno vlogo za industrijo celuloze in papirja. Po kultivaciji smo ekstrahirali ekstracelularne proteine in določili specifične aktivnosti štirih encimov: aktivnosti celuloze, ksilanaze, lipaze in peroksidaze. Poleg tega so bili določeni učinki pH vrednosti ekstrakcijskega pufru na encimske aktivnosti. Preverili smo tudi kakšen učinek na rast glive in proizvodnjo encimov ima inkubacijski čas. Rezultati kažejo, da lahko *P. ostreatus* raste na trdnih odpadkih iz papirniške industrije, kar pripomore k zmanjšanju količine odpadkov in zmanjšanju ekološkega vpliva. Poleg tega so trdni odpadki papirniške industrije dober substrat za proizvodnjo komercialno zanimivih encimov.

Ključne besede: celuloza, encim, lipaza, papir, papirniški mulj, peroksidaza, *Pleurotus ostreatus*, ksilanaza.

### ABSTRACT

We studied the growth of *Pleurotus ostreatus* on pulp and paper industry wastes. Specifically, we investigated whether solid-state fermentation and growth substrates (de-inking paper mill sludge, primary sludge) are appropriate for the production of enzymes by *P. ostreatus* relevant to the pulp and paper industry. Following fermentation, the extracellular protein was extracted and the specific activities of four enzymes were determined: the cellulase, xylanase, lipase, and peroxidase activities. Furthermore, the effects of extraction buffer pH on these enzyme activities were determined, along with the effects of incubation time. These data show that *P. ostreatus* can grow on pulp and paper industry solid wastes, which helps to minimize the waste volume and to decrease the ecological impact. Additionally, these pulp and paper industry solid wastes are good substrates for the production of commercially interesting enzymes.

Keywords: cellulase, enzyme, lipase, paper, paper mill sludge, peroxidase, *Pleurotus ostreatus*, xylanase.

## 1 UVOD

Papirniški mulj je največji stranski proizvod v papirniški industriji in predstavlja velik problem kar zadeva odstranjevanje [1,2]. Poznamo številne načine odstranjevanja papirniškega mulja, med najpogostejše prištevamo pokrivanje različnih površin in sežig [3]. Med alternativne metode pa vključujemo predelavo v hidravlično bariero za prikrievanje odlagališč [4] v postopku odstranjevanja metalnih ionov [5], kot absorbent za čiščenje vodne površine [3], ter kot gradbeni material [6]. Kljub številnim alternativnim rešitvam papirniški mulj še vedno predstavlja velik izziv, zaradi njegovih ugodnih karakteristik. Papirniški mulj je sestavljen iz celuloznih vlaken in anorganskih polnil (kalcijev karbonat in kaolinit), ter iz številnih raztopljenih kemikalij v vodi [3]. Poleg tega papirniški mulj vsebuje težke kovine, klorirane organske spojine (dioksini in poliklorirani bifenili) ter številna druga onesnažila [7, 8]. Za glive je značilno, da lahko razgradijo številne lignocelulozne materiale, vključno z odpadki, ki nastajajo v kmetijski, gozdarski in živilski industriji [9, 10]. Glive imajo velik biotehnološki potencial, saj so zelo enostavne za uporabo, obenem pa imajo veliko ekonomsko, ekološko in medicinsko vrednost [11–13]. Lignocelulozni odpadki pred-

stavljajo obetavne substrate za gojenje gliv in nadaljnjo proizvodnjo hidrolitskih in oksidativnih encimskih mešanice glivnega izvora. Med temi encimi, ki se navadno uporabljajo pri izdelavi papirja, so najpomembnejši: (i) hidrolitični encimi celuloza in ksilanaza, lipaze in mangan peroksidaze [9, 14]. V naši študiji smo se osredotočili na proizvodnjo hidrolitskih in oksidativnih encimov s pomočjo bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*), kjer smo uporabili kot substrat dva različna papirniška mulja.

## 2 MATERIAL IN METODE

Papirniška mulja DS (deinking proces) in PS (kemično mehansko čiščenje) sta bila pridobljena iz slovenske papirnice in sta bila uporabljena kot substrat za kultivacijo gliv. Sev bukovega ostrigarja (PLAB *P. ostreatus*) je bil pridobljen iz zbirke glivnih kulture MycoMedica d.o.o. v Podkornu (Slovenija).

V procesu kultivacije gliv smo uporabili 300 g substrata. Kozarce z vsebino smo inokulirali z glivo bukovega ostrigarja in jih inkubirali pri 23°C ± 0,5°C. Vzorec je potekalo v različnih časovnih obdobjih in sicer: 34., 40., 48., 53. in 61. dan. Za različna časovna obdobja smo se odločili z namenom, da preverimo kako se obnaša gliva in kakšne so aktivno-

sti posameznih encimov skozi časovna obdobja.

Določanje suhe snovi substrata je bil v skladu s standardom SIST EN 14346: 2007 in celotni organski ogljik (TOC) v skladu s standardom SIST EN 13137: 2002. Vsebnost težkih kovin smo določili po naslednjih standardih: Cu, DIN 38406-E7-2: 1991; Zn, SIST ISO 8288: 1996; Ni, DIN 38406-E11-2: 1991; Cd, SIST EN ISO 5961: 1996; Hg, SIST ISO 5666: 2000; Cr, SIST ISO 9174: 1999; Pb, DIN 38406-E6-2: 1998. Vsebnost celuloze smo določili po Kürschner et al. [15], vsebnost hemiceluloz po Wise in Karl [16] in vsebnost lignina po Fukushima et al. [17].



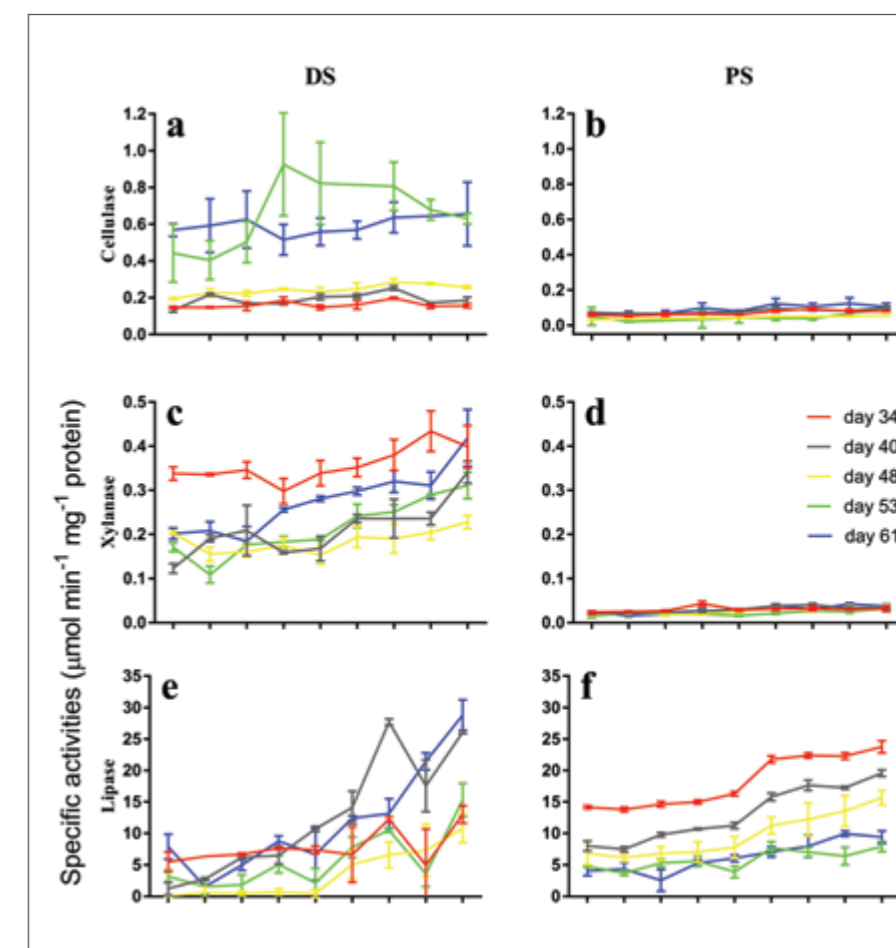
Slika 1: Rast micelija na substratu (papirniški mulj)  
Figure 1: Growth of mycelium on the substrate

Encime in druge topne ekstracelularne proteine smo ekstrahirali z dodatkom 2 ml ustrezne pufrske raztopine na 1 g substrata, 2 uri pri 4°C (stresanje). Učinek pH ekstrakcijskega pufru na encimske aktivnosti smo testirali z devetimi različnimi pufrmi z naraščajočimi vrednostmi pH na osnovi 50 mM MES (pH 4,0–6,0) in 50 mM TRIS (pH 6,5–8,0).

Po ekstrakciji smo vzorce centrifugirali pri 13.200 × g 10 minut pri 4°C. Ugotovljene supernatante smo analizirali za encimske aktivnosti in skupni ekstracelularni protein. Koncentracije beljakovin smo določili z uporabo komponent BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, ZDA).



Slika 2: Encimski ekstrakt  
Figure 2: Enzyme extract



Slika 3: Produkcija encimov tekom kultivacije glive *P. Ostreatus*  
Figure 3: Production of enzymes during the cultivation of *P. Ostreatus*

Preglednica 1: Delež težkih kovin v substratu (mg/kg suhe snovi)  
Table 1: Proportion of heavy metals in the substrate (mg/kg dry matter)

(mg/kg dry matter)	Cu	Zn	Ni	Cd	Hg	Cr	Pb
DS	165	58	2	0,15	<0,01	5	21
PS	104	55	6	0,2	0,2	9	21

Tabela 2: Delež celuloze, lignina in hemiceluloze v substratu (%)  
Table 2: Proportion of cellulose, lignin and hemicellulose in the substrate (%)

%	celuloza	lignin	hemiceluloza
DS	34	6	4
PS	33	8	6

## 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Cilj te študije je bil oceniti DS in PS kot potencialne substrate za proizvodnjo encimov *P. ostreatus* v kultivaciji bukovega ostrigarja v različnih inkubacijskih obdobjih. Vsebnost TOC za DS in PS je bila 21,0 % oziroma 28,5 %. Vsebnost težkih kovin in vsebnost celuloze, lignina in hemiceluloze sta podani v Tabelah 1 in 2.

Ker so vsebnosti celuloze, lignina in hemiceluloz v DS in PS primerljive; višja vsebnost TOC za PS bo spodbudila boljšo rast micelija v primerjavi s DS. Nekateri težki kovine inhibirajo rast gliv, vendar inhibicije zaradi težkih kovin nismo zaznali.

Aktivnosti celuloze in ksilanaze, so bile pri DS višje kot pri PS. Pri DS je bila celulozna aktivnost najvišja po 53 in 61 dneh inkubacije, medtem ko je aktivnost ksilanaze najvišjo aktivnost dosegla na 34. in 61. dan inkubacije. Aktivnosti teh encimov niso posebej vplivale na pH ekstrakcijskega pufru (slika 1), dokazali smo širok razpon odpornosti na pH, kot so poročali že Liguori et al. [18].

Aktivnosti lipaze, so bile primerljive za DS in PS in so bile najvišje pri pH 8, kar je skladno z literaturo [19]. Pri PS se je aktivnost lipaze zmanjšala s časom inkubacije. Ta trend ni bil viden pri DS, saj so aktivnosti, specifične za lipaze, močno nihale (slika 3). Najvišje aktiv-

nosti peroksidaze določimo na 34. in 40. dan inkubacije. Najvišje aktivnosti peroksidaze pri DS in PS smo beležili pri kislem pH (slika 3).

Proizvodnja oksidacijskih encimov, ki omogočajo rast gliv bele trohnoabe na različnih lignoceluloznih substratih je močno odvisna od sestave rastnega medija, pH in temperature, pa tudi od faze rasti glive in njegove celice [20].

## 4 SKLEPI

Podatki naše študije kažejo, da so lignocelulozni odpadki (mulji) iz papirne industrije (DS in PS), dober substrat za rast glive (*P. ostreatus*). Produkcija posameznih encimov je tekom inkubacije različna in nelinearna. Takšni rezultati predstavljajo izziv pri optimizaciji maksimalnega izplena encimov tekom kultivacije gliv. Izboljšanje produkcije encimov bi lahko povečali tudi z vpepljavo co-substratov, ki imajo podobne karakteristike kot papirniški mulji. Takšen način reševanja problematike prekomernih količin odpadkov in pridobivanja produktov z dodano vrednostjo (encimov) iz odpadnih materialov je iz vidika okoljske in stroškovne sprejemljivosti izjemno atraktiven tudi v procesu krožnega gospodarstva.

## 5 LITERATURA

[1] BATTAGLIA, A., N. CALACE, E. NARDI., B.M. Paper mill sludge-soil mixture: Kinetic and thermodynamic tests of cadmium and pollutants in pulp and paper mill sludge suggest that lead sorption capability, *Microchem. J.*, 2003, 75, str. 97-102.

[2] GENG, X., DENG, J., ZHANG, S.Y. Effects of hot-pressing parameters and wax content on the properties of fibreboard made from paper mill sludge, *Wood Fiber Sci.*, 2007, 38, str. 736-741.

[3] LIKON M., CERNEC F., SVEGL F., SAARELA J., ZIMMIE T. F. Papermill industrial waste as a sustainable source for high efficiency absorbent production, *Waste Management*, 2011, 31, 6, str. 1350-1356.

[4] KORTNIK J., ČERNEC F., HRAST K. Paper sludge layer as low permeability barrier on waste landfill, *Soil & Sediment Contamination*, 2008, 17, 4, str. 381-392

[5] CALACE N., NARDI E., PETRONIO B., PIETROLETTI M., TOSTI G. Metal ion removal from water by sorption on paper mill sludge, *Chemosphere*, 2003, 51, 3, str. 797-803.

[6] ČERNEC F., ZULE J., MOZE A., IVANUŠ A. Chemical and microbiological stability of waste sludge from paper industry intended for brick production. *Waste Management & Research*, 2005, 23, 2, str. 106-112.

[7] Bauchamp C. J. Examination of environmental quality of raw and composting de-inking paper sludge, *Chemosphere*, 2002, 46, str. 887-895.

[8] MONTE M. C., FUENTE E., BLANCO A., NEGRO C. Waste management from pulp and paper production in the European Union, *Waste Management*, 2009, 29, 1, str. 293-308.

[9] DA LUZ, J.M.R., NUNES, M.D., PAES, S.A., TORRES, D.P., SILVA, M. DE C.S. DA, KASUYA, M.C.M. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes, *Braz. J. Microbiol.*, 2012, 43, str. 1508-1515.

[10] SANCHEZ, C. (2010) Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 81, str. 1321-1337.

[11] DE AZVEDO, J.L.D., ESPOSITO, E. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. EDUCS, 2005, Cincias Biol-gicas e Naturais edition.

[12] SCHMIDT, P., WECHSLER, F.S., DO NASCIMENTO, J.S., JUNIOR, V., DE, F.M. Pretreatment effects on fiber degradation of brachiaria hay by *Pleurotus ostreatus* fungus. *Rev. Bras. Zootec.*, 2003, 32, str. 1866-1871.

[13] ZHANG, C.K., GONG, F., LI, D.S. A note on the utilisation of spent mushroom composts in animal feeds. *Biores. Tech.*, 1995, 52, str. 89-91.

[14] RODRIGUES-COUTO, S. Industrial and environmental applications of white-rot fungi, *Mycosphere*, 2017, 8, str. 456-466.

[15] KÜRSCHNER, K., HOFFER, A., JENKINS, S.H., VIEWEG, W., SCHWARZKOPF, O., SCHRAMEK, W., SCHUBERT, C., VELTEN, H., HESS, K., TROGUS, C., ET AL. Cellulose und Cellulosederivate. *Z. Für Anal. Chem.*, 1933, 92, str. 145-154.

[16] WISE E.L., KARL, H.L., Cellulose and Hemicelluloses in Pulp and Paper Science and Technology, 1. izdaja, New York, Pulp.Eds. Earl. C.L. McGraw Hill-Book Co, str. 55-73.

[17] FUKUSHIMA, R.S., KERLEY, M.S., RAMOS, M.H., PORTER, J.H., KALLENBACH, R.L. Com-

parison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in-vitro forage degradability. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2015, 201, str. 25-37.

[18] LIGUORI, R., IONATA, E., MARCOLONGO, L., PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L., LA CARA, F., FARACO, V. Optimization of *Arundo donax* saccharification by (hemi)cellulolytic enzymes from *Pleurotus ostreatus*. *BioMed Res. Int.*, 2015, str. 1.

[19] DIAZ, R., TÉLLEZ-TÉLLEZ, M., SANCHEZ, C., BIBBINS MARTINEZ, M.D., DIAZ-GODINEZ, G., SORIANO-SANTOS, J. (2013) Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Env. Biotech.*, 2013, 16, str. 1-13.

[20] KNOP, D., YARDEN, O., HADAR, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, str. 1025-1038.

<sup>1</sup> Inštitut za celulozo in papir, Bogišičeva 8, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> MycoMedica d.o.o., Podkoren 72, 4280 Kranjska Gora, Slovenija

# POVZETKI IZ TUJE STROKOVNE LITERATURE

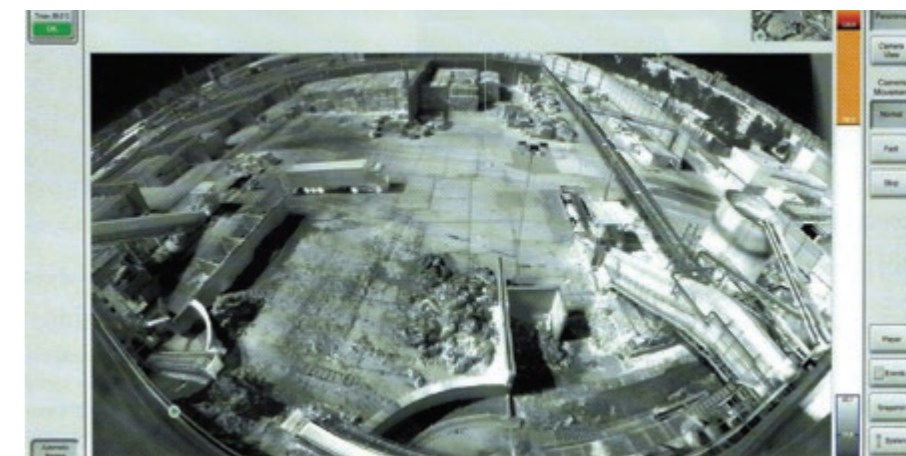
## ABSTRACTS FROM FOREIGN EXPERT LITERATURE

Raziskave iz tujine

### Infrardeča termografija v skladiščih papirja Infrared thermography in a waste paper storage yard

Lantzsch, J.: Professional Papermaking 15 (2018) 1: 22 – 24

Papir je zelo enostaven material za recikliranje. V Evropi recikliramo že več kot 70 % papirnih izdelkov. Porabljen papir zbiralci ustrezno sortirajo in stisnejo v bale, ki jih dostavijo predelovalcem. Ti bale običajno skladiščijo na odprtih prostorih, kjer je požarno tveganje zelo visoko. Uporaba IR tehnologije omogoča zgodnje odkrivanje ognja. Temelji na dejstvu, da vsi predmeti emitirajo elektromagnetno valovanje, in sicer predvsem v IR območju. Natančen IR spekter je odvisen od temperature predmeta, zato omogoča vgradnja IR senzorjev detekcijo ognja v začetni fazi, ko je temperatura še pod temperaturo vžiga.



Slika 1: Infrardeča panoramska slika kaže temperaturo v vsaki točki merilnega območja  
Figure 1: The infrared panoramic image shows a temperature for every point in the monitoring area

Janja Zule

### Radarske in radiometrične meritve Radar and radiometric measurement

Lambrecht, J, Langensiepen, C.: Professional Papermaking 15 (2018) 1: 30 - 33

Nekontaktne metode merjenja z uporabo radiometričnih senzorjev so postale rutinske tudi v papirni industriji. Omogočajo določitev parametrov kakovosti na papirnem stroju ter merjenje nivojev in masnih tokov, hkrati pa ni vpliva zunanjih pogojev. Senzorji lahko zaznajo posamezne celulozne zvitke in pomagajo optimirati delovanje razpuščevalnika, s čimer se znatno poveča kapaciteta dela. Najnovejša generacija radarskih merilnikov za tekočine deluje s pomočjo 80 GHz tehnologije. Tako visoke frekvence omogočajo precizno fokusiranje na merilno mesto, hkrati pa se izniči vse interference iz okolja. Možno je natančno merjenje nivojev v vlakninskih suspenzijah med procesom razpuščanja. Radiometrični senzorji predstavljajo velik potencial v nadaljnjem razvoju papirništva.

Janja Zule



Slika 2: Radarski senzor in radiometrični merilni sistem  
Figure 2: Radar sensor and radiometric measurement system

### Popravek Correction

V prejšnji številki revije Papir 19, XLVI (junij 2018) je prišlo pomotoma do zamenjave naslova članka avtorjev Hočevar, Bjelić in Grilc, ki je bil objavljen na strani 48. Pravilni naslov se glasi: **Odpadna biomasa – nova surovina za pridobivanje kemikalij.**

Članek pod naslovom **Rastlinska biomasa – možni alternativni vir papirnih vlaken avtorjev Zule, Frelih, Flajšman** je bil objavljen v reviji Papir 18, XLV (november 2017) na straneh 34 – 37.

Uredniški odbor revije Papir se avtorjem iskreno opravičuje.

*In Paper Magazine 19 (XLVI, June 2018), the title of the article by Hočevar, Bjelić and Grilc, which was published on page 48, was inadvertently swapped. The correct title is **Waste biomass – new raw material for the acquisition of chemicals.***

*The article entitled **Plant biomass – potential alternative source of paper fibers** by Zule, Frelih and Flajšman was published in Paper Magazine 18 (XLV, November 2017) on pages 34–37.*

*The Editorial Board of the Paper Magazine sincerely apologizes to the authors.*

**Melamin**

**Kot pika na i**

Z našim znanjem za kvaliteto vaših izdelkov

www.melamin.si