

PRIDOBIVANJE PRODUKTOV Z VISOKO DODANO VREDNOSTJO IZ PAPIRNIŠKIH MULJEV S POMOČJO GLIV

HIGH VALUE ADDED PRODUCTS ACQUISITION BY FUNGI FROM PAPER MILL SLUDGE

M. SEŽUN,¹ J. ZULE,¹ R. MARINŠEK LOGAR,² G. Drago ZUPANČIČ,³ A. GREGORI⁴

IZVLEČEK

Številne vrste odpadkov so za odlaganje problematične in zahtevajo nekoliko več pozornosti pri njihovem odstranjevanju. Med te prištevamo tudi papirniške mulje. Ravnanje s papirniškimi mulji je danes nezadovoljivo, saj odpadke zahteva velik stroškovni zalogaj odstranjevanja, poleg tega pa je še vedno neizkoriščen. Glede na njegove karakteristike zavzema mesto bogate surovine, predvsem v smislu pridobivanja produktov z dodano vrednostjo, kot so npr. encimi. Z leti se povpraševanje po encimih povečuje, zaradi njihovih pozitivnih učinkov. Glive trohnobe proizvajajo številne vrste encimov in lahko odigrajo zelo pomembno vlogo pri tistih organskih odpadkih, ki so problematični za odlaganje. Ker je gojenje gliv trohnobe izjemno enostavno se vedno bolj uveljavlja kot biotehnološki proces v industriji, vključno z lesno in papirno industrijo. Številne študije poročajo o uspešnem gojenju gliv na lignoceluloznih substratih. Na Inštitutu za celulozo in papir smo uporabili za substrat primarni papirniški mulj različnih papirnic. V raziskavi smo uporabili vrsto glive *Pleurotus ostreatus*. Rezultati gojenja so pokazali, da je papirniški mulj primeren substrat za gojenje tovrstnih gliv. V nadaljevanju bomo vzpostavili postopek uspešne glivne proizvodnje encimov na papirniških muljih, Pridobljene encime bomo poskušali uporabiti v proizvodnji papirja ter tako prispevali k tehnološkemu razvoju. Takšno ravnanje bi imelo dvojni učinek, zmanjšanje količine odpadnega materiala, obenem pa pridobitev produkta z dodano vrednostjo.

Ključne besede: biološka predobdelava, glive bele trohnobe, papirniški odpadki, primarni papirniški mulji, produkti z dodano vrednostjo

ABSTRACT

Numerous wastes are not suitable for landfilling and thus need to be handled with special attention which applies also for paper sludge. Currently available sludge treatment methods are still unsatisfactory, as they are expensive and the material is not exploited as it could be. According to its nature and properties, it is considered a rich raw material with potential to be converted to value added products (enzymes). Over the years, there has been an increased interest in enzymes due to their positive effects. Wood decay fungi produce numerous enzymes and have a great impact on the organic waste materials that are problematic for landfilling. As their cultivation is extremely simple, it is being introduced in the industry as a biotechnological process, including in papermaking and wood converting. Different studies are reported about successful fungi cultivation on the lignocellulosic substrates. At the Pulp and Paper Institute, we have used different primary paper sludges as substrates. The fungus *Pleurotus ostreatus* has been applied in our research. The cultivation results have proved that paper sludges are appropriate substrates for this species. In the future, we will start producing enzymes by fungi using paper sludges as substrates. The enzymes produced will be further used in paper manufacture to optimize different technological procedures. Such development may significantly contribute to waste reduction and simultaneous production of high value added products.

Key words: biological pretreatment, white-rot fungi, paper mill waste, primary paper mill sludges, products with added value

UVOD

Rezultat današnje velike porabe in proizvodnje papirja so ogromne količine papirniških odpadkov. Trendi kažejo, da nastajanje papirniških muljev z leti narašča in po napovedih, naj bi bila stopnja naraščanja v naslednjih 50 letih med 48 % in 86 %. Posledica tega bo kopičenje papirniških muljev, v smislu prostorske stiske ter preseženih kapacitet zaradi omejenih zmogljivosti sežigalnic [1].

V kolikor upoštevamo to napoved, lahko sklepamo, da bo v prihodnje papirniški mulj predstavljal velik okoljski problem ali pa bo bogata surovina za nove alternativne produkte.

Prihodnost papirniških muljev je predvsem odvisna od rezultatov znanstvenih študij,

ki bodo raziskovale možnosti njihovega čim boljšega izkoristka in razvijale tehnologije za nove produkte. Trenutno so primarni in sekundarni papirniški mulji neizkoriščeni, oziroma slabo izkoriščeni.

Primarni papirniški mulji so kompleksna mešanica snovi in kemikalij, ki jih lahko z različnimi biološkimi obdelavami uporabimo za proizvodnjo novih produktov z dodano vrednostjo z namenom izboljšanja proizvodnih procesov ali proizvodnje novih surovin in proizvodov, kamor štejemo tudi encime. Enostavno gojenje gliv, katere proizvajajo encime, omogoča gojenje v kontroliranih pogojih. Naravna vloga mikroorganizmov je, da sintetizirajo encime za razgradnjo različnih substratov v svojem okolju. Encimi najprej razgradijo

polimerne molekule v substratu (celulozo, škrob, beljakovine hemiceluloze, lignine itd.) na monomerne molekule [2]. Danes je vedno večji biotehnološki potencial ravno proizvodnja encimov z glivami. Trendi strmijo k procesom, kateri razvijajo nove proizvode z dodano vrednostjo. Proizvodi z dodano vrednostjo nastajajo z uporabo encimov, kateri delujejo kot katalizatorji, poleg tega pa se le ti uporabljajo tudi v pralnih sredstvih in okoljskih biotehnologijah ter za analitične in diagnostične namene [3].

Z leti se povpraševanje po komercialnih encimih povečuje, zaradi njihovih številnih pozitivnih lastnosti, kot npr. stroškovna primernost, nadomeščanje kemikalij v različnih procesih, okoljska prijaznost ter učinkovitost v procesih bioremediacije [4].

PROIZVODNJA PRODUKTOV Z VISOKO DODANO VREDNOSTJO Z GLIVAMI BELE TROHNOBE (*P. ostreatus*) V PAPIRNI INDUSTRIJI

Gojenje bukovega ostrigarja (*P. ostreatus*), katerega uvrščamo med glive bele trohnoobe, se je v zadnjem času močno povečalo in v letu 1997 doseglo 14,2 % skupnega gojenja med užitnimi glivami [5, 6]. Njegova priljubljenost se je povečala predvsem zaradi enostavnih postopkov gojenja, visokega potencialnega donosa in visoke hranilne vrednosti [7].

Osnovne makromolekularne sestavine lignoceluloze so celuloza, hemiceluloza in lignin. Glive imajo, zaradi svojih encimskih sistemov, izredno veliko sposobnost razgradnje lignoceluloznih materialov [8]. Glive bele trohnoobe so sposobne razgradnje in mineralizacije vseh glavnih sestavnih delov lesa; celuloze, hemiceluloze in lignina [9]. Največji izziv za izkoristek potenciala lignoceluloznega materiala je uporaba na področju biotehnologije za izdelavo dragocenih produktov [10]. Glive bele trohnoobe razgradijo lignocelulozni material do enostavnih sladkorjev, s čimer pripravijo material za proizvodnjo novih produktov [11].

Glive bele trohnoobe, vključno z glivo *P. ostreatus*, učinkovito razgrajujejo lignocelulozne materiale, zaradi sinteze hidrolitičnih encimov (celulaze in hemicelulaze) in edinstvene sestave oksidativnih encimov, ki razgrajujejo lignin do nizkomolekularnih sestavin. Glive bele trohnoobe izločajo ekstracelularne encime (mangan peroksidaza, lignin peroksidaza in lakaza), poleg teh sodelujejo pri razgradnji lignina tudi številni drugi encimi: glioksal oksidaza, aril alkohol oksidaza, veratril oksidaza, oksalat dekarboksilaza, NAD odvisna formiat dehidrogenaza in p450 monooksigenaza [12, 13, 14]. Med



Slika 1: *Pleurotus ostreatus*
Figure 1: *Pleurotus ostreatus*

pomembne aplikacije biotehnoloških procesov uvrščamo tudi celulaze, za katere je značilno, da jih sintetizirajo številne glive in različne bakterije na celuloznih materialih [15].

Glive bele trohnoobe lahko proizvajajo različne vrste encimov, kar je odvisno od njihove genetske zasnove in rastnih pogojev [16, 17].

Glive bele trohnoobe se lahko uporabljajo v lesni in papirni industriji v procesih delignifikacije in za proizvodnjo biogoriv (bioetanola in bioplina), bioplastike, farmacevtskih izdelkov in encimov [11]. Mnogo postopkov obdelave z encimi je že uveljavljenih in se že redno uporablja v industriji [18]. V papirniški industriji se vedno bolj pojavlja težnja po vpeljavi novih postopkov obdelave, predvsem v smislu zamenjave klasičnih postopkov z novimi in naprednejšimi, kateri vključujejo uporabo encimov. Trenutno se v papirniški industriji

za namene beljenja vlaknin posredno ali neposredno uporabljajo naslednji encimi: ksilanaze, pektinaze, glukoza-oksidge, lakaze, celulaze, mangan- in lignin-peroksidaze [19, 20, 21, 22, 23]. Encimi ksilanaze, celulaze in pektinaze imajo že redno industrijsko uporabo pri beljenju, ostali encimi pa pri procesih beljenja še nimajo vidnejše industrijske vloge [21]. Uporaba gliv bele trohnoobe v papirništvu vključuje predvsem procese proizvodnje lesne pulpe, biobeljenje lesne pulpe in proizvodnjo encimov za uporabo v tehnoloških procesih, predvsem celulaze in ksilanaze [24].

PRIMARNI PAPIRNIŠKI MULJ KOT SUBSTRAT ZA GOJENJE GLIV BELE TROHNOBE (*P. ostreatus*)

Glive bele trohnoobe odigrajo zelo pomembno vlogo pri tistih organskih



Slika 2, 3: Priprava vzorcev za nadaljnje analize (po gojenju gliv)
Figure 2, 3: Preparation of samples for follow-up analysis (after fungi cultivation)

odpadkih, ki so problematični za odlaganje [25]. Med te štejemo tudi papirniške mulje.

Primarni papirniški mulji so sestavljeni iz organske snovi (celulozna vlakna) in anorganske snovi (polnila). Glede sestave primarnih papirniških muljev lahko trdimo, da so primeren substrat za gojenje gliv trohnobe, saj vsebujejo hranila, primerna za rast teh vrst gliv.

Tudi na Inštitutu za celulozo in papir smo preskusili učinkovitost gojenja bukovega ostrigarja na različnih vzorcih primarnih papirniških muljev. Rezultati so podprli dosedanje študije, kar zadeva primernosti tovrstnih odpadkov za gojenje omenjenih gliv. Na podlagi rezultatov smo dobili konkretno potrditev primernosti substrata za gojenje gliv in tako tudi izziv za nadaljnje raziskave. Gojenje bukovega ostrigarja je potekalo v laboratoriju Zavoda za naravoslovje (Podkoren). Kemijske in biološke analize smo izvedli na Inštitutu za celulozo in papir.

ZAKLJUČEK

Problem papirniškega mulja kot odpadka in hkrati potencialne surovine za proizvodnjo produktov z visoko dodano vrednostjo je že kar nekaj časa odprta tema raziskovanja. Še vedno se ni našla optimalna rešitev in še vedno papirniški mulj predstavlja velik stroškovni zalogaj za proizvajalce papirja, predvsem v smislu odstranjevanja. Trendi vedno bolj stremijo h konceptu »zero waste« tehnologij, obenem pa se danes vedno bolj poudarja, kako je iz odpadka treba iztržiti čim več, tudi v smislu pridobivanja produktov z dodano vrednostjo. Papirniški mulj predstavlja odpadke, katerega bomo uporabili kot substrat za kultivacijo gliv, istočasno pa iz njega pridobili produkt z dodano vrednostjo (encime). Že dolgo je znano, da se v tehnoloških procesih v papirniški industriji uporabljajo encimi, katere proizvajajo glive bele trohnobe. Vzpostavili bomo postopek uspešne glivne proizvodnje encimov na papirniških muljih,

tako pridobljene encime pa bomo poskušali uporabiti v proizvodnji papirja in s tem prispevali k tehnološkemu razvoju. Hkrati bomo dosegli dvojni učinek, zmanjšanje količine odpadnega materiala, obenem pa pridobitev produkta z dodano vrednostjo.

5 LITERATURA IN VIRI

- [1] MABEE W. E., ROY D. N. Modelling the role of papermill sludge in the organic carbon cycle of paper products. *Environmental Reviews*, 2003, 11, 1–16.
- [2] WAINWRIGHT M. An introduction to fungal biotechnology, Cichester: J. Wiley & Sons 4, 1992, 3352–3360.
- [3] BUCHHOLTZ K., KASCHE V., BORNSCHEUER U.T. Induction to Enzyme Technology. *Biocatalysis and Enzyme Technology*, 2005, 1–26.
- [4] RADHIKA R. G., Roseline Jebapriya and J. Joel Gnadoss. Production of cellulase and laccase using *Pleurotus* sp. Under submerged and solid state fermentation, *Int. J. Curr. Sci.*, 2013, 6, E7–13.
- [5] CHANG S.T. World production of cultivated and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk) Sing, China, *Int. J. Med. Mush.* 1, 1999, 291–300.
- [6] ROYSE D. J., Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size and time to production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 2002, 527–531.
- [7] BANIK S., NANDI R. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom, *Ind. Crops Prod.* 20 2004, 311–319.
- [8] KIRK, T. K., FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1987, 41, 465–505.
- [9] SIGOILLOT J. C., BERRIN J.G., BEY M., LESAGE-MEESSEN L., LEVASSEUR A., LOMASCOLO A., RECORD E., UZAN. BOUKHRIS E. Fungal strategies for lignin degradation, *Adv. Bot. Res.* 2012, 61, 263–308.
- [10] LEE Y. Y. Cordinated development of leading biomass pretreatment technologies, *Bioresource Technol.*, 2005, 96, 1959–1966.
- [11] TIŠMA, M., ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P., PLAZL I., VASIČ-RAČKI, Đ. IN ZELIČ, B. Oxidation of Coniferyl Alcohol Catalyzed by Laccases from *Trametes versicolor*. *Acta Chim. Slov.*, 2010, 57, 110–117.
- [12] HATAKKA A. Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation, *FEMS, Microbiol. Rev.*, 1994, 13, 125–135.
- [13] ANDER P., MARZULLO L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.*, 1997, 53, 115–131.

[14] ASGHER M., BHATTI H. N., ASHRAF M., LEGGE R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 2008, 19, 771–783.

[15] SANG-MOK L., Y. M. Pilot-scale production of cellulase using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2001, 11 (2), 229–233.

[16] LAMAR R. T. The role of fungal lignin-degrading enzymes in xenobiotic degradation. *Biotechnology*, 1992, 3, 261–266.

[17] VYAS B. R. M., BAKOWSKI S., SASEK V., MATUCHA M. Degradation of anthracene by selected white rot fungi, 1994, *FEMS, Microbiology Ecology*, 65–70.

[18] ŠINKOVEC A. Vpliv lakaz na beljenje bombaža: diplomsko delo, Ljubljana, 2012, 66 str.

[19] CAVACO-PAULO A., GÜBITZ G. M. Textile processing with enzymes. Cambridge, The Textile Institute: Woodhead publishing, 2003.

[20] TZANOV T., BASTO C., GUEBITZ G. M., CAVACO-PAULO A. Laccases to improve the whiteness in conventional bleaching of cotton. *Macromol. Mater. Eng.*, 2003, 288, 807–810.

[21] KENEALY W. R., JEFFRIES T. W. Enzyme process for Pulp and Paper: A Review of Recent Developments. Institut for Microbial and Biochemical Technology, US Department of Agriculture, Madison, 2003.

[22] DUTT D. Biotechnology as a tool for energy conservation in pulp and paper industry. Saharanpur campus, 2008.

[23] FORTE TAVČER P. Priprava tekstilij na plemenitenje, 2002, UL NTF, Oddelek za tekstilstvo, 30–33 in 62–65.

[24] TENGERTDY, R. P., SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 2003, 13, 169–179.

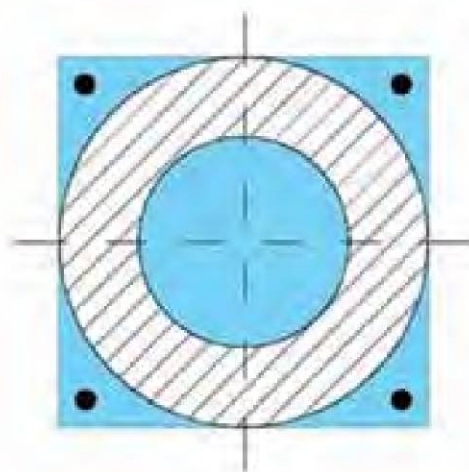
[25] GREGORI A., ŠVAGELJ M., POHLEVEN J. Cultivation of *Pleurotus* spp., *Food Technol. Biotechnol.*, 2007, 45, 3, 236–247.

¹ dr. Mija Sežun, dr. Janja Zule, Inštitut za celulozo in papir, Bogišičeva ulica 8, 1000 Ljubljana

² prof. dr. Romana Marinšek Logar, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale

³ doc. dr. Gregor Drago Zupančič, Zavod za varstvo okolja in senzorje d. o. o., Beloruska ulica 7, 2000 Maribor

⁴ dr. Andrej Gregori, Zavod za naravoslovje, Ulica bratov Učakar 108, 1000 Ljubljana



KOVINO-SERVIS

Tone Žust s.p.

Zg. Besnica 1

1000 Ljubljana

GSM: 041/286-918

email: tone.zust@amis.net