

ZASTOSOWANIE BIOMASY DO WYTWARZANIA POLIMEROWYCH MATERIAŁÓW PRZYJAZNYCH ŚRODOWISKU



PROJEKT 01.01.02-10-123/09 WSPÓŁFINANSOWANY ZE ŚRODKÓW EUROPEJSKIEGO FUNDUSZU ROZWOJU REGIONALNEGO W RAMACH PROGRAMU OPERACYJNEGO INNOWACYJNA GOSPODARKA 2007-2013

Zadanie 2.1. PREPARATY WIELOENZYMOWE DO UKIERUNKOWANEJ DEGRADACJI BIOMASY ROŚLINNEJ

Tomasz Ramięga, Radosław Wachała, Alicja Kaczmarek, Milena Stępczyńska, Tadeusz Antczak
Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, Polska

WYTWARZANIE PREPARATU ENZYMATYCZNEGO PRZYDATNEGO DO OTRZYMYWANIA NANOCELULOZY

Wprowadzenie

Nanostruktury uzyskiwane z materiałów ligninocelulozowych stały się jednym z bardziej pożądanych komponentów biokompozytów. Obecnie nanowłókna celulozy otrzymywane są głównie metodami fizyko-chemicznymi, które generują stosunkowo dużą ilość uciążliwych dla środowiska odpadów. Wymusza to konieczność opracowania nowych, ekologicznych metod konwersji biomasy, którymi mogą być metody enzymatyczne.

Szczególnie ważną rolę w finalnym procesie otrzymywania nanocelulozy odgrywa endo-1,4-β-glukanaza hydrolizująca celulozę w jej amorficznych obszarach. Niestety biosynteza tego enzymu w warunkach hodowli mikroorganizmów jest zazwyczaj ściśle powiązana z biosyntezą β-glukozydazy, której aktywność skutkuje rozkładem nanostruktur celulozy do pojedynczych cząsteczek glukozy.

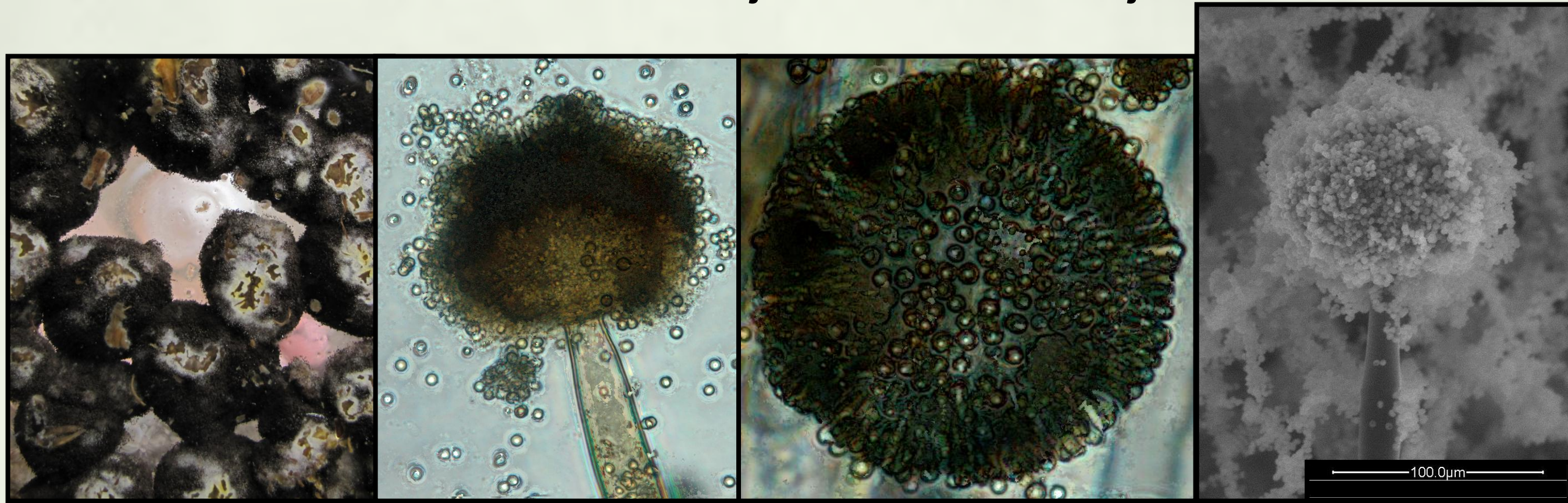
Cel badań

Celem projektu jest wytworzenie preparatu celulaz przydatnego do ukierunkowanej na otrzymywanie nanocząstek celulozy, biorafinacji biomasy (słomy lnianej i konopnej), w oparciu o hodowlę solid-state pleśni *Aspergillus niger*. W ramach badań zoptymalizowano warunki hodowli (w tym sposób wyjaławiania pożywki, stosując w tym celu ozon), dobrano metodę wydajnej ekstrakcji białek enzymatycznych i ich oczyszczenia od substancji niebiałkowych.

Solid – State Fermentation

Jako fermentację solid–state, definiuje się proces, w którym wzrost drobnoustrojów jak i gromadzenie produktu zachodzi na lub w pobliżu stałego substratu. Przy czym substrat ten stanowi zarówno pożywkę jak i miejsce bytowania drobnoustrojów. Hodowla mikroorganizmów w stałym złożu, zachodzi w środowisku pozbawionym wolnej wody, lub przy niewielkiej jej zawartości.

Materiał biologiczny: szczep *Aspergillus niger* IBT-90 pochodzący z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej



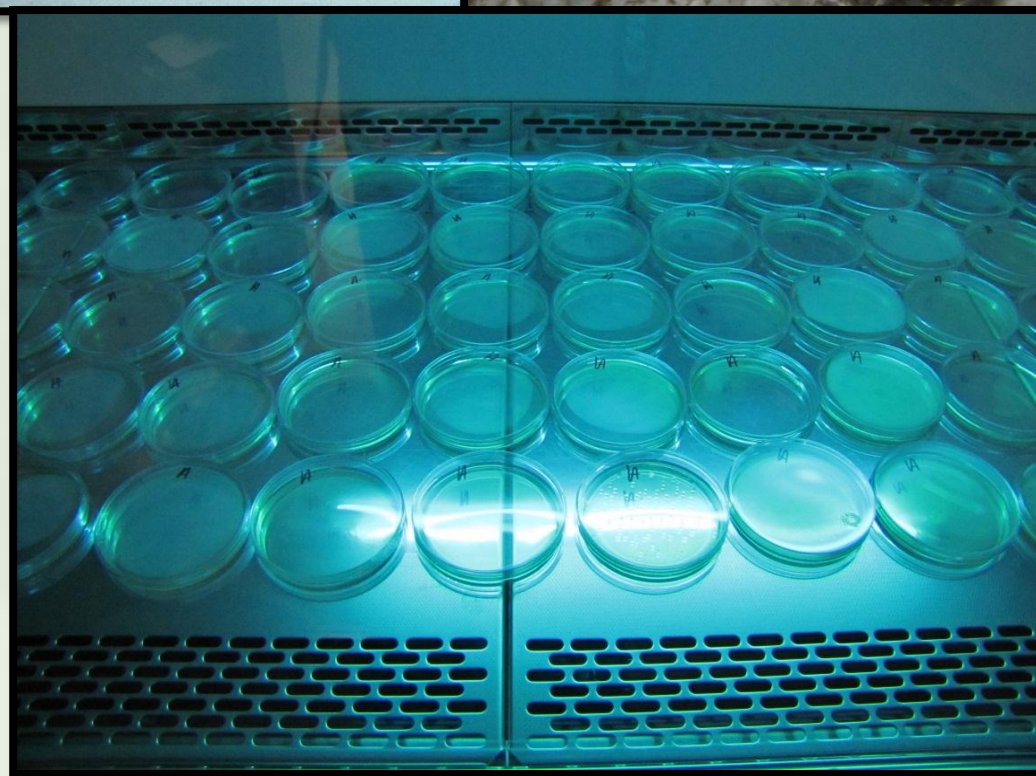
Podłoże

Hodowle prowadzono na podłożu zawierającym: otręby pszenne, wysładki buraczane, kielki słodowe, wytloki cytrusowe oraz roztwór soli w wodzie destylowanej. Przed szczepieniem poddawano je sterylizacji termicznej i/lub ozonowaniu.

Ozonowanie



Skuteczność metody wyjaławiania kontrolowano przy pomocy metody wysiewów płytkowych.



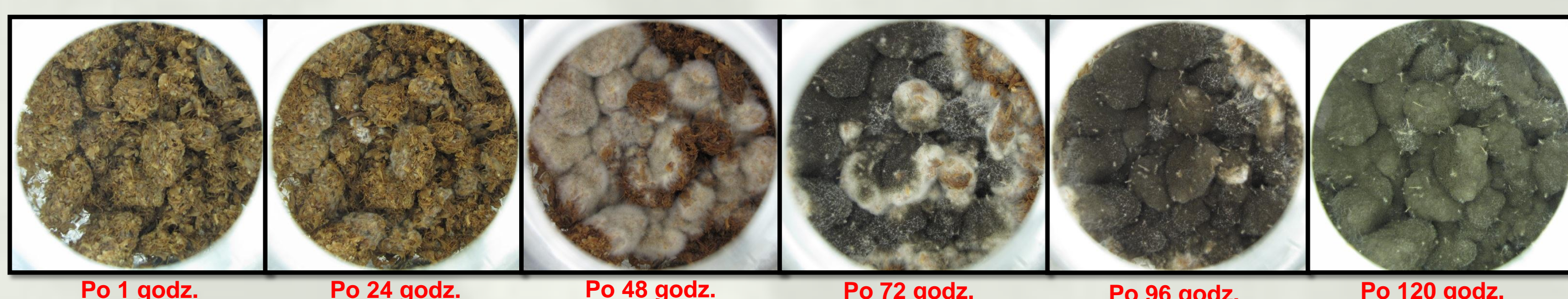
Warunki hodowli

Reaktor	Kolba Erlenmayera (1 dm ³)
Wilgotność podłoża [%]	80
Temperatura [°C]	30
Mieszanie	Okresowe (raz na dobę)
Czas [doba]	6
Masa podłoża [kg] / pojemność reaktora [dm ³]	0,1 / 1
Inokulum	zarodniki: 2,7±0,3×10 ⁸ / 1 g podłoża (zmyte ze skosów soi fizjologiczną)

Warunki ekstrakcji białek

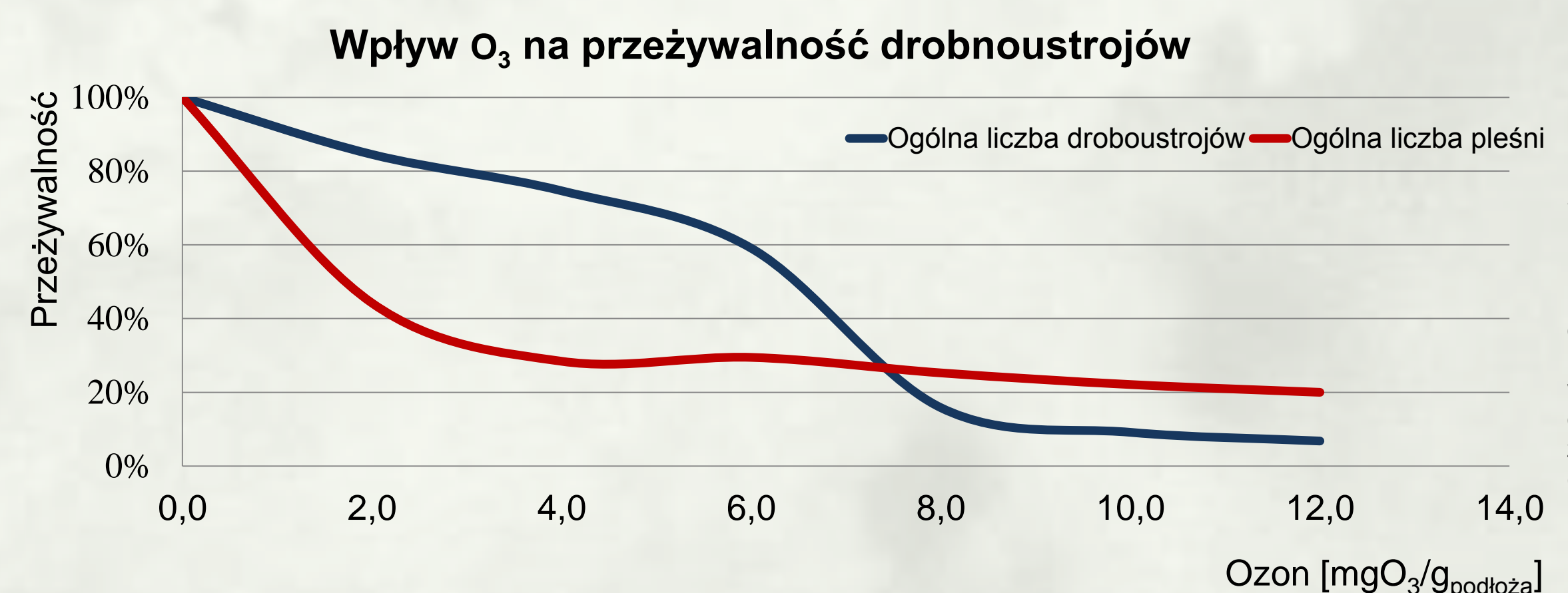
Reaktor	Kolba Erlenmayera (1 dm ³)
Ekstrahent	Woda destylowana
Czas [min]	45
Temperatura [°C]	30
Mieszanie [obr./min.]	100
Metoda separacji cząstek stałych	Filtracja (0,2 μm)

Wzrost pleśni *Aspergillus niger* IBT-90 w czasie hodowli



Wyniki

Etap I: Sprawdzenie właściwości biobójczych ozonu względem mikroflory złoża.*

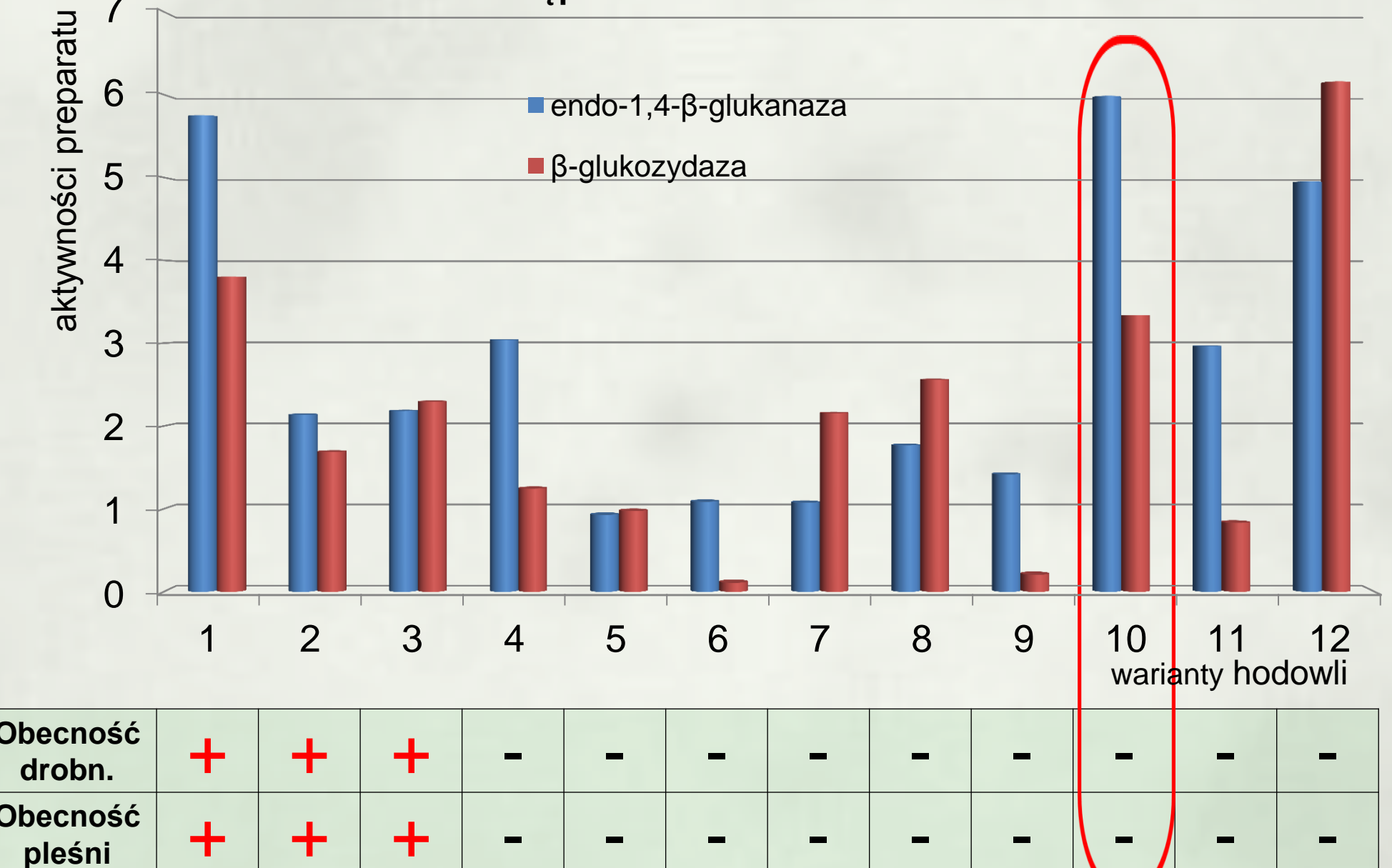


Etap II: Sprawdzenie skuteczności ozonowania wspomaganego sterylizacją termiczną.

Przygotowane warianty hodowli poddanych lub nie ozonowaniu i wstępnej sterylizacji termicznej

Nazwa próby	Dostarczony ozon [mgO ₃ /g podłoża]	Sterylizacja termiczna 121°C [min]
1	3	-
2	9	-
3	12	-
4	3	20
5	9	20
6	12	20
7	3	10
8	9	10
9	12	10
10	3	5
11	9	5
12	-	20

Aktywność enzymatyczna** preparatów z hodowli poddanych wstępnemu ozonowaniu



** Aktywność preparatów oznaczana była w warunkach:
- endo-1,4-β-glukanaza. Próby inkubowano w czasie 10 minut w temp. 60°C w łaźni wodnej. Substratem reakcji była karboksymetyloceluloza.
- β-glukozydaza. Próby inkubowano w czasie 10 minut w temp. 55°C w łaźni wodnej. Substratem reakcji była salicyna.

Wnioski

Kompilacja 5-cio minutowej termicznej sterylizacji pożywki z ozonowaniem (3 mgO₃/g podłoża) zapewnia zarówno całkowite jej wyjałowienie jak i biosyntezę badanych celulaz.

Poza tym stwierdzono pozytywny wpływ zastosowania tej metody wyjaławiania na stosunek endo-1,4-β-glukanazy do β-glukozydazy w uzyskiwanym preparacie.

Ozonowanie nie zapewnia całkowitego wyjałowienia pożywek solid-state (o składzie: otręby pszenne, kielki słodowe, wysładki buraczane i susz cytrusowy). Przy dawce powyżej 8 mgO₃/g podłoża usunięciu uległo 90% ogólnej liczby drobnoustrojów i mniej niż 80% ogólnej liczby pleśni przy dawce 12 mgO₃/g podłoża.

Stwierdzono również niekorzystny wpływ wysokich dawek ozonu (9-12 mgO₃/g podłoża) na biosyntezę badanych komponentów celulaz.