

Mikrobna aktivnost tijekom kompostiranja otpadne mikrobne biomase od fermentacijske proizvodnje antibiotika*

KUI 31/2003
Prispjelo 24. veljače 2003.
Prihvaćeno 26. lipnja 2003.

J. Glavica, J. Friedrich** i A. Pavko

Fakulteta za kemiju in kemijsko tehnologiju, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

**Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, Slovenija

Otpadna biomasa pri proizvodnji antibiotika fermentacijom uz dodatak drvenih strugotina i drugih biljnih otpadaka bila je kompostirana u perforiranim kutijama. Tijekom kompostiranja praćena je temperatura, vlaga i pH vrijednost kompostne smjese. Određivane su aktivnosti enzima, koji razgrađuju prirodne polimere – škrob, celulozu, lignin, proteine i lipide. Rezultati su pokazali da na razvoj specifičnih mikroorganizama za razgradnju kompostne smjese utječu kvaliteta otpadne biomase kao i dodano drvo, koje kao strukturni materijal služi kao supstrat i istovremeno omogućava bolje prozračivanje. U povoljnim uvjetima zbog aktivnosti mikroorganizma naraste temperatura u kompostnoj smjesi od sobne temperature do gotovo 60 °C, a nakon maksimuma lagano opada. Vrijednost pH smjese povećava se od 5,6 na 8,4. Maseni udjel vlage tijekom kompostiranja sporo pada od 57 % do 51 %. Već u samim ishodnim materijalima prisutni mikroorganizmi iskazuju neke enzimске aktivnosti. Tako u otpadnom miceliju postoji proteolitička aktivnost i slijed celulolitičke aktivnosti, a u strukturnom materijalu može postojati proteolitička, amilolitička, esterazna, celulolitička i ligninolitička aktivnost. Tijekom samog procesa kompostiranja aktivirane su sve navedene aktivnosti, a poslije prvog dana dodatno i ksilanolitička aktivnost. Sve aktivnosti bile su ekstracelularne, ali kod celulaze je veća aktivnost vezana za membrane. Lipolitičke i lignin-peroksidazne aktivnosti nisu bile dokazane.

Ključne riječi: Prerada farmaceutskih otpadaka, otpadna mikrobna biomasa, kompostiranje, enzimске aktivnosti

Uvod

Pri industrijskoj proizvodnji antibiotika fermentacijom, poslije izdvajanja procesnih proizvoda ostaju velike količine otpadne mikrobne biomase. Zbog sve restriktivnijeg zakonodavstva potrebno je takve otpatke uništiti ili preraditi. Budući da taj materijal ima u sebi još mnogo vrijednih neiskorištenih organskih tvari, jedna od mogućnosti za preradu je kompostiranje. Ta metoda je u posljednje vrijeme postala vrlo popularna i u Sloveniji, jer s pomoću aktivnosti mješovite mikrobne kulture, koja se spontano razmnožava u kompostnoj smjesi iz netopljivih organskih otpadaka, dobiva se visokokvalitetni materijal za gnojivo. Kompostiranje je jednostavan i jeftin postupak i zbog toga zanimljiv za primjenu kod velikih količina otpadaka za koje se ne želi uložiti mnogo sredstava. Ovisno o prirodi organskih tvari u otpadnom materijalu mikroorganizmi sintetiziraju odgovarajuće enzime koji razgrade pojedine komponente u njihove fragmente. Zatim te fragmente asimiliraju mikroorganizmi i služe se njima za daljnji rast ili metaboličku aktivnost. Konačni ostatak je stabilni proizvod, kompost.^{1,2}

Otpadna mikrobna biomasa iz fermentacijske proizvodnje dobivena je mikrofiltracijom ili centrifugiranjem fermentacijske komine. Otpad u tom obliku još ima od 90 % do

60 % vlage i sklon je truljenju u anaerobnim uvjetima. Zbog toga se za kompostiranje dodaje čvrst materijal koji omogućava poroznu strukturu, a time se ujedno postižu aerobni uvjeti u unutrašnjosti kompostne smjese. U tu svrhu upotrebljavaju se različiti mljeveni drveni otpaci. Kompostiranje počinje kod određenih vrijednosti temperature, vlage i pH u aerobnim uvjetima. Tijekom procesa prisutni mikroorganizmi počinju se razmnožavati i razgrađivati organske tvari, a osobito prirodne tvorevine iz kojih mogu dobiti jednostavne molekule za rast i metabolizam. Aktivnost mikroorganizama odražava se u promjeni temperature u kompostnoj smjesi, pH vrijednosti, vlazi, broju mikroorganizama kao i u iniciranim enzimskim aktivnostima. Taj princip se dosta uspješno upotrebljava za stabiliziranje otpadnog mulja iz aerobnih uređaja za obradu otpadnih voda.^{1,2}

Materijal i metode

Priprema kompostne smjese

Nakon filtracije fermentacijske komine netopljivi dio sastoji se od micelija proizvodnog mikroorganizma i od neistrušenih ostataka netopljivih sastojaka hranjive podloge. Netopljivi dio još se ispire i napušta proizvodnu liniju u obliku približno 10 %-ne vodene suspenzije (OMB). Toj suspenziji dodan je samljeveni otpadni drveni materijal i drugi biljni otpaci (OD) u omjeru oko 1 : 3 koji pružaju

* I. Hrvatska konferencija, Ekoinženjerstvo 2002, Plitvička jezera, 22. – 24. 10. 2002.

suspenciji čvrstu i poroznu strukturu. Ovako priređena smjesa kompostirana je u 40 l sanduku sa perforiranim stijenkama i dnom, smještenom u laboratorijskom digestoru.

Metode rada

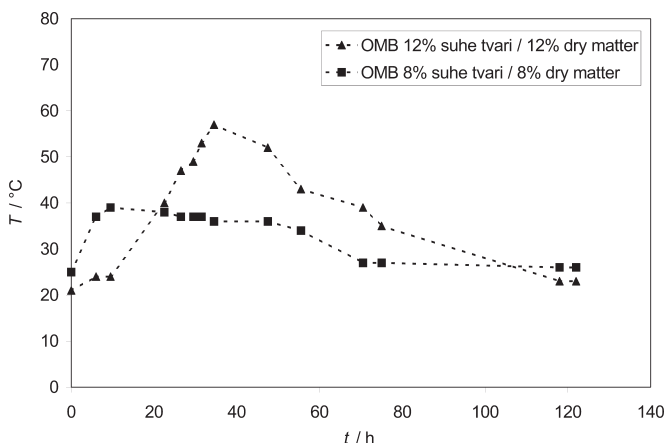
Temperatura je mjerena živinim termometrom u sredini kompostne smjese više puta dnevno. Vлага je određivana gravimetrijski. Za kemijske analize uzorak kompostne smjese iz središta komposta ekstrahiran je destiliranim vodom, filtriran kroz gazu i centrifugiran pri brzini vrtnje 3200 min^{-1} (LC 320, Tehnica Železniki). Supernatant je filtriran membranskim filterom $0,45 \mu\text{m}$. Vrijednosti pH određivane su u ekstraktima komposta (MA 5741, Iskra). Analize enzimskih aktivnosti određivane su u izvornim materijalima, otpadnoj micelijskoj biomasi i strukturnom materijalu kao i u smjesi tijekom kompostiranja. Amilazna, esterazna, ksilanazna i proteazna aktivnost određivana je na agarim pločama³ koje su sadržavale samo jedan od supstrata (škrob, Tween 80, ksilan, mlijeko u prahu) za odgovarajući enzim. Dodatkom uzorka u pripremljeni otvor na agarnoj ploči i inkubiranjem 3–4 dana na temperaturi $37 \text{ }^\circ\text{C}$ oko otvora oblikuje se zona bistrenja ili obojenja ovisno o dodanom supstratu. Širina zone mjera je za enzimsku aktivnost uzorka. Metoda iz literature³ koja služi za određivanje aktivnosti mikroorganizama modificirana je tako da su izuzeti svi sastojci potrebni za rast mikroorganizama, a ostavljen samo enzimski supstrat, eventualni indikator i agar-agar. Ksilanazna aktivnost mjerena je po postupku za celulaze, samo je umjesto celuloze upotrijebljen ksilan kao supstrat.

Lignolitička i celulolitička aktivnost određivana je spektrofotometrijski (Varian Techtron 635). Za lignin peroksidaznu, lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost (apsorbanca) upotrijebljena je metoda po Podgorniku⁴ s modifikacijom.⁵ Za celulolitičku aktivnost (g l^{-1} glukoze) upotrijebili smo kao supstrat otopinu karboksimetilceluloze (CMC).⁶

Rezultati i rasprava

Razvoj mikroorganizama ovisi o masenoj koncentraciji suhe tvari u otpadnom miceliju kao i o vrsti drveta i njegovoj pripremi. Na kompostiranje povoljno utječe veća koncentracija suhe tvari u mikrobnjoj biomasi i pH blizu neutralnog, kao i manja količina crnogoričnog drveta u strukturnom materijalu koji se melje i prosijava kroz sito s promjerom otvora oko $2,0 - 5,0 \text{ cm}$. Prije upotrebe taj materijal treba biti nekoliko dana na zraku i povoljnoj temperaturi zbog adsorpcije mikroorganizama iz okoline. Dva pokusa kompostiranja otpadne micelijske biomase, prvi s 12 % i drugi s 8 % suhe tvari, trajala su pet dana. Temperatura je počela rasti zbog aktivnosti mikroorganizama prisutnih u samom izvornom materijalu i okolnom zraku u oba pokusa već od samog početka. U prvom pokusu, povišenje temperature u prvim satima bilo je sporije, a kasnije se ubrzalo dok temperatura nije dostigla maksimalnu vrijednost $57 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon prvog dana kompostiranja. Poslije tog vremena zabilježeno je nešto sporije, ali konstantno opadanje temperature do kraja pokusa, kada se temperatura kompostne smjese izjednačila s temperaturom okoline. Kompostiranje je u drugom pokusu bilo manje intenzivno; temperatura je dostigla maksimalnu vrijednost $38 \text{ }^\circ\text{C}$, jer je strukturni materijal imao više crnogoričnog drveta, a ot-

padni micelij manje suhe tvari, što je utjecalo na manju aktivnost mikroorganizama (slika 1). Mjerenje pH vrijednosti u kompostu pokazalo je neprekidno povećanje od početne kisele vrijednosti pH 5,6 do pH 7,5 već nakon prvog dana, a poslije na pH 8,0 do kraja prvog pokusa i od pH 7,0 do pH 7,4 do kraja drugog pokusa. Porast pH-vrijednosti vjerojatno je posljedica alkalizacije komposta zbog hidrolize proteina do peptida i aminokiselina te na kraju do amonijaka. Udjel vlage tijekom kompostiranja sporo je pao od 57 % do 51 % u prvom i od 56 % do 51 % u drugom pokusu.



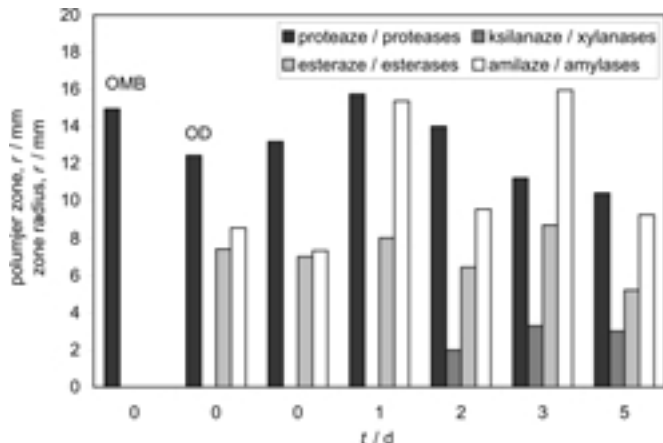
Slika 1 – Promjena temperature tijekom kompostiranja smjese drvenih ostružaka (OD) i otpadne mikrobnost biomase (OMB) s različitim količinom suhe tvari

Fig. 1 – Time course of temperature during composting of wood chips (OD) and waste microbial biomass (OMB) with different contents of dry matter

Za bolje razumijevanje procesa koji se odvijaju u kompostnoj smjesi, tijekom kompostiranja praćene su i različite enzimске aktivnosti koje bi mogle sudjelovati u samom procesu razgrađivanja otpadne mikrobnost biomase i drvnih strugotina. Kako se pokazalo već u samim početnim uzorcima pojavile su se neke enzimске aktivnosti. Na slici 2 prikazane su vrijednosti za proteolitičku, ksilanaznu, esteraznu i amilaznu aktivnost u ovisnosti o trajanju prvog pokusa kompostiranja. Potrebno je naglasiti da se kvantitativno ne mogu uspoređivati rezultati različitih aktivnosti jer se svaka aktivnost mjeri na specifičnom supstratu.

Može se vidjeti da proteolitička aktivnost postoji već u otpadnoj micelijskoj biomasi, ali i u otpadnom drvenom strukturnom materijalu. Vjerojatno je taj materijal već bio nastanjen mikroorganizmima koji posjeduju proteolitičku aktivnost. Dodatno u tom materijalu izmjerene su i esterazna te amilazna aktivnost. Dakle, sve enzimске aktivnosti (slika 2) osim ksilanazne, već su bile u izvornoj kompostnoj smjesi. Praćenje aktivnosti tijekom kompostiranja pokazuje da se proteolitička aktivnost u početku pojača do maksimalne vrijednosti nakon prvog dana kompostiranja, a poslije toga opada. Njezina promjena je slična promjeni temperature. Moguće je da kod viših temperatura ima više proteolitičkih mikroorganizama ili da je produkcija proteolitičkih enzima kod tih mikroorganizama veća.

Na istoj slici prikazana je amilazna aktivnost koja je tijekom prvog dana slična proteolitičkoj, a nakon toga aktivnost oscilira do kraja pokusa. Tu pojavu teško je protu-

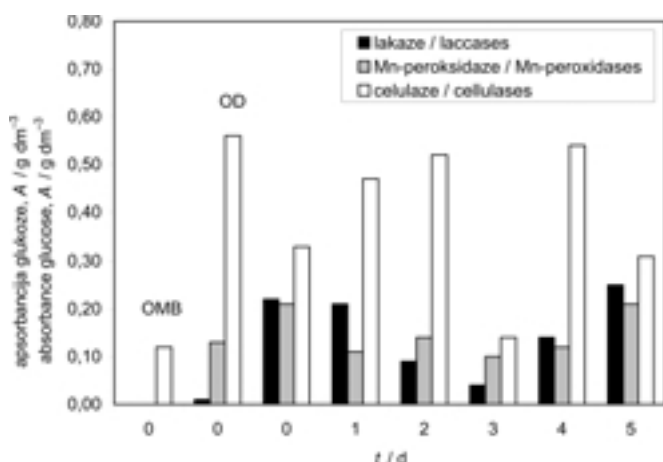


Slika 2 – Proteolitička, amilolitička, esterazna i ksilanazna aktivnost tijekom kompostiranja smjese otpadne mikrobne biomase (OMB) i drvenih ostružaka (OD)
 Fig. 2 – Protease, amylase, esterase and xylanase activity during composting of the mixture of waste microbial biomass (OMB) and wood chips (OD)

mačiti i potrebni bi bili daljnji pokusi. Međutim, može se zaključiti da amilazna aktivnost ostaje do kraja procesa viša ili jednaka polaznoj vrijednosti u strukturnom materijalu. Njezina funkcija je hidroliza škrobu srodnih polisaharida ili oligosaharida u kompostnoj smjesi.

Esterazna aktivnost koja je odgovorna za hidrolitičku razgradnju različitih estera pa i lipida u samom početku bila je aktivirana već u strukturnom drvenom materijalu, a tijekom kompostiranja nije se mnogo mijenjala. Ksilanazna aktivnost, koja je mjera za aktivnost enzima koji hidroliziraju hemicelulozu, pojavila se tek drugi dan. Vjerojatno je bila inducirana od hemiceluloznih polimera ili njihovih odgovarajućih oligomera koji su se mogli osloboditi nakon parcijalne razgradnje lignoceluloze iz strukturnog materijala.

Na slici 3 prikazane su aktivnosti dvaju ligninolitičkih enzima: lakaze i mangan peroksidaze te celulozitičke aktivnosti



Slika 3 – Ligninolitička (apsorbancija) i celulozitička ($g\ l^{-1}$ glukoze) aktivnost tijekom kompostiranja smjese otpadne mikrobne biomase (OMB) i drvenih ostružaka (OD)
 Fig. 3 – Ligninase (absorbance) and cellulase ($g\ l^{-1}$ glucose) activity during composting of the mixture of waste microbial biomass (OMB) and wood chips (OD)

tijekom prvog pokusa kompostiranja. Celulolitička aktivnost bila je izmjerena već u samim izvornim materijalima. To je bilo očekivano kod biljnog strukturnog materijala, ali je interesantno da je enzim celuloza već postojao i u otpadnom miceliju. Celulolitičku aktivnost mogli su inducirati polisaharidi stanične stijenke gljiva, ukoliko nije bilo i nekih induktora prisutnih u samom fermentacijskom mediju. Celulolitička aktivnost tijekom kompostiranja povećava se dulje vrijeme nego temperatura. Iznimka je aktivnost trećeg dana, kada se aktivnost izrazito smanjila i koja se ne može obrazložiti. Uspoređivanjem rezultata pokusa dobivenih membranskom filtracijom i grubom filtracijom uzoraka, gdje su u filtratu još prisutni mikroorganizmi, pokazalo se da je celulolitička aktivnost u većem omjeru vezana na stanice, a samo manji dio je ekstracelularan. Što se tiče ligninaznih aktivnosti, lakazne aktivnosti praktično nije bilo u izvornim materijalima, ali vrlo brzo poslije početka kompostiranja pojavila se u relativno visokom omjeru i tijekom procesa opadala je ili se povećala. Drugi je enzim ligninolitičke grupe mangan peroksidaza koja je bila izmjerena već u strukturnom materijalu, ali tijekom kompostiranja vrijednosti su malo oscilirale. Ipak je aktivnost postojala sve do kraja. To je bilo i očekivano jer u strukturnom materijalu ima dovoljno lignina koji služi kao induktor sinteze tih enzima.

Zaključak

Metoda kompostiranja primjerna je za uklanjanje otpadne mikrobne biomase iz proizvodnje antibiotika fermentacijom. Za poboljšanje strukture otpadnog micelija u suspenziji potreban je dodatak mljevenog drveta kao strukturnog materijala koji treba biti uzorne kvalitete. Mikroorganizmi koji se spontano razvijaju na kompostnoj smjesi u povoljnim uvjetima sintetiziraju potrebne hidrolitičke i oksidacijske enzime za razgradnju organskih tvari.

ZAHVALA

Rad su financirali: Lek d.d., Ljubljana, Čisto Mesto Ptuj d.o.o. i Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport Republike Slovenije.

Literatura References

1. R. T. Haug, *Compost Engineering*, Ann Arbor Science, Michigan, 1980, str. 1–133.
2. J. Diddlestone, K. R. Gray, *Composting*, u M. Moo-Young (ur.), *Comprehensive Biotechnology*, Part 4, Pergamon Press, New York, 1985, str. 1059–1070.
3. R. R. M. Paterson, P. D. Bridge, *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*, IMI Technical Handbooks, No1, CAB International, Willingford UK, 1994, str. 19–28.
4. H. Podgornik, *Doktorska disertacija*, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2000.
5. J. Glavica, J. Friedrich, A. Pavko, *Acta Chim. Slov.* 49 (2002) 885.
6. D. T. Plummer, *An Introduction to Practical Biochemistry*, McGraw Hill, Berkshire, 1987, str. 180–181.

SUMMARY

Microbial Activities During Composting of Waste Microbial Biomass from the Antibiotic Production*J. Glavica, J. Friedrich*, and A. Pavko*

Composting means the decomposition of organic matter by a mixed microbial population in a warm, moist and mostly aerobic environment. In the last decade, it has gained renewed attention as an alternative technique for treatment of solid organic wastes. Depending on the nature of organic material, the microorganisms produce various types of enzymes, which break down components with higher molecular weight into the fragments that can be assimilated while the rest is converted into a stable product, compost.

In the presented research, a waste microbial biomass, remaining after fermentation and isolation of an industrial pharmaceutical product, was treated by composting. For this reason the wet waste biomass was mixed with wood chips and the mixture was put into a 40 liter perforated plastic box. The process was followed for five days. Temperature was measured in the middle of the composting mixture. Humidity and pH of the withdrawn samples were determined, while various extracellular enzyme activities were analysed after extraction of a sample in water followed by centrifugation. Amylases, esterases and proteases were determined using a standard semiquantitative biochemical technique on solid agar plates, while cellulases and ligninases were determined quantitatively in supernatant by using spectrophotometrical methods.

In the first 10 hours of composting, temperature increased from initial room temperature to a maximum of almost 60 °C, while in the next five days it slowly decreased (Fig 1). Humidity was in the range of 57 % to 51 % while pH varied between 5.6 and 8.4. Already in the initial mixture for composting different enzyme activities were detected, some of them originating from the microbial biomass, others from the wooden structural material. During composting the following enzymes were active: proteases, esterases, cellulases, amylases, and two ligninases: laccase and manganese peroxidase (Figs. 2 and 3). In some experiments some xylanase activity was present also while lipolytic activity and lignin peroxidase activity could not be detected. The measured enzymes were extracellular, however, in the case of cellulases the activity was mostly associated to the cell membrane.

*Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana,
Aškerčeva 5, 1000 Ljubljana, Slovenia*
**National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19,
1000 Ljubljana, Slovenia*

*Received February 24, 2003
Accepted June 26, 2003*