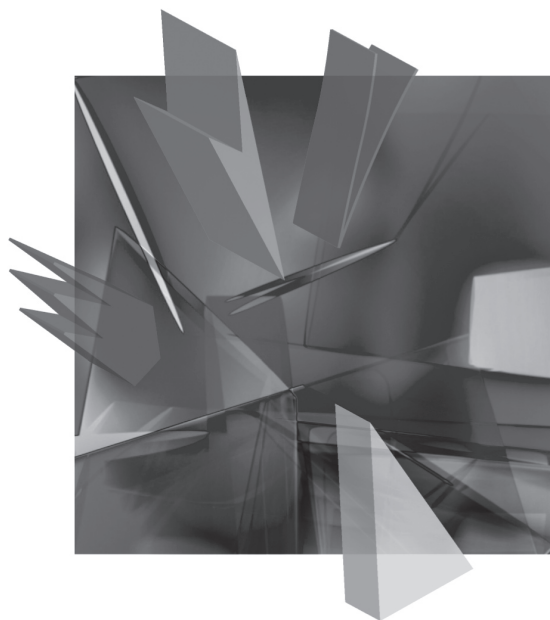


# NAUKI INŻYNIERSKIE I TECHNOLOGIE ENGINEERING SCIENCES AND TECHNOLOGIES

4(15)•2014



Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu  
Wrocław 2014

Redaktor Wydawnictwa: Joanna Świrska-Korlub

Redaktor techniczny: Barbara Łopusiewicz

Korektor: Justyna Mroczkowska

Łamanie: Beata Mazur

Projekt okładki: Beata Dębska

Publikacja jest dostępna w Internecie na stronach:

[www.ibuk.pl](http://www.ibuk.pl), [www.ebscohost.com](http://www.ebscohost.com),

w Dolnośląskiej Bibliotece Cyfrowej [www.dbc.wroc.pl](http://www.dbc.wroc.pl),

AGRO <http://agro.icm.edu.pl>, <http://journals.indexcopernicus.com>,

The Central and Eastern European Online Library [www.ceeol.com](http://www.ceeol.com),

a także w adnotowanej bibliografii zagadnień ekonomicznych BazEkon

[http://kangur.uek.krakow.pl/bazy\\_ae/bazekon/nowy/index.php](http://kangur.uek.krakow.pl/bazy_ae/bazekon/nowy/index.php)

Informacje o naborze artykułów i zasadach recenzowania znajdują się na stronie internetowej Wydawnictwa

[www.wydawnictwo.ue.wroc.pl](http://www.wydawnictwo.ue.wroc.pl)

Kopiowanie i powielanie w jakiegokolwiek formie wymaga pisemnej zgody Wydawcy

© Copyright by Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu  
Wrocław 2014

**ISSN 2080-5985**

Wersja pierwotna: publikacja drukowana

Druk i oprawa:

EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, sp.j.

ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

## Spis treści

<b>Wstęp</b> .....	7
<b>Maria Baranowska, Władysław Chojnowski, Hanna Nowak:</b> Dezynfekcja w zakładach mleczarskich .....	9
<b>Marta Ciecierska:</b> Ocena poziomu świadomości konsumentów w zakresie migracji niepożądanych substancji chemicznych do żywności z opakowań i materiałów będących w kontakcie z żywnością .....	23
<b>Aleksandra Gołoś, Dariusz Piotrowski, Piotr Grzegory, Mariusz Wojnowski:</b> Wpływ temperatury na strukturę i barwę truskawek suszonych wybranymi metodami .....	31
<b>Natalia Kordala, Małgorzata Lewandowska, Artur Kleina, Karolina Świątek:</b> Ocena właściwości celuloリティcznych <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> do biokonwersji polisacharydów słomy rzepakowej .....	43
<b>Tomasz Lesiów, Kamila Orzechowska-Przybyła, Alina Niewelt:</b> Rola przeglądów zarządzania w doskonaleniu jakości i bezpieczeństwa żywności, obsługi klienta oraz systemu zarządzania jakością w dwóch wybranych przedsiębiorstwach przemysłu żywnościowego .....	56
<b>Alicja Mańka, Karolina Kosatka, Klaudia Dąbrowska, Renata Stańczyk, Małgorzata Krzywonos:</b> Finansowy i ekonomiczny aspekt prowadzenia własnej winnicy .....	76
<b>Andrzej Okruszek, Teresa Skrabka-Blotnicka:</b> Automatyczne linie uboju bydła i trzody chlewnej.....	84
<b>Agnieszka Pilarska:</b> Wykorzystanie fermentacji metanowej do zagospodarowania wybranych produktów odpadowych przemysłu spożywczego .....	100
<b>Karolina Świątek, Małgorzata Lewandowska, Andrzej Juszcuk, Natalia Kordala:</b> Otrzymywanie etanolu ze słomy rzepakowej w procesie symultanicznej hydrolizy i fermentacji w systemie półciąglym .....	112
<b>Maria Wachowska, Marek Adamczak:</b> Wpływ sposobu i czasu solenia oraz dojrzewania sera edamskiego na jego wybrane parametry jakościowe.....	126
<b>Tomasz Lesiów, Ewa Biazik, Andrzej Okruszek:</b> Sprawozdanie z VI Konferencji Naukowo-Technicznej z cyklu Nauka – Praktyce pt. „Zastosowanie nowatorskich rozwiązań technologicznych w przemyśle spożywczym” ...	137

## Summaries

<b>Maria Baranowska, Władysław Chojnowski, Hanna Nowak:</b> Disinfection in dairy plants .....	22
<b>Marta Ciecierska:</b> Evaluation of level of consumer awareness in migration of undesirable chemicals to food from food packaging and food contact materials.....	30
<b>Aleksandra Gołoś, Dariusz Piotrowski, Piotr Grzegory, Mariusz Wojnowski:</b> Influence of the temperature on the structure and color of strawberries dried by selected methods .....	42
<b>Natalia Kordala, Małgorzata Lewandowska, Artur Kleina, Karolina Świątek:</b> Evaluation of cellulolytic properties of microorganisms for bioconversion of food industry wastes .....	55
<b>Tomasz Lesiów, Kamila Orzechowska-Przybyła, Alina Niewelt:</b> The role of management reviews in the improvement of food quality and safety, customer service and quality management system in two selected enterprises of food industry .....	75
<b>Alicja Mańka, Karolina Kosatka, Klaudia Dąbrowska, Renata Stańczyk, Małgorzata Krzywonos:</b> Financial and economic aspect of running own vineyard .....	83
<b>Andrzej Okruszek, Teresa Skrabka-Blotnicka:</b> Automated commercial slaughter lines of pigs and cattle.....	99
<b>Agnieszka Pilarska:</b> The use of methane fermentation in the development of selected waste products of food industry.....	111
<b>Karolina Świątek, Małgorzata Lewandowska, Andrzej Juszcuk, Natalia Kordala:</b> Obtaining of ethanol from rape straw in the process of simultaneous hydrolysis and fermentation in fed-batch system.....	125
<b>Maria Wachowska, Marek Adamczak:</b> Influence of the brine composition and time of Edam cheese salting and ripening on its selected quality parameters.....	136

**Natalia Kordala, Małgorzata Lewandowska, Artur Kleina,  
Karolina Świętek**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

e-mail: natalia.kordala@uwm.edu.pl

---

## **OCENA WŁAŚCIWOŚCI CELULOLITYCZNYCH *CELLULOSIMICROBIUM CELLULANS* DO BIOKONWERSJI POLISACHARYDÓW SŁOMY RZEPAKOWEJ**

---

**Streszczenie:** Celulazy są ważnymi enzymami o zastosowaniu przemysłowym, które mogą być syntetyzowane na podłożach zawierających tanie odpady lignocelulozowe. Przeprowadzono badania, których celem było określenie przydatności bakterii celulolitycznych *Cellulosimicrobium cellulans* PCM 2385 w produkcji celulaz podczas hodowli z odpadową słomą rzepakową jako głównym źródłem węgla i energii. W doświadczeniu uzyskano aktywność enzymów scukrzających celulozę (FP-az) na poziomie 0,02 FPU · ml<sup>-1</sup>. Suplementacja podłoża hodowlanego dodatkowymi związkami o charakterze potencjalnie indukującym biosyntezę enzymów nie przyczyniła się do zwiększenia sekrecji celulaz u testowanego szczepu bakterii. Optymalizacja parametrów działania celulaz z zastosowaniem programu Statistica – plan Box-Behnkena wykazała ich najwyższą aktywność hydrolityczną w warunkach: temperatura 40°C i pH 7,5 (aktywność FP-az na poziomie 0,0232 IU · cm<sup>-3</sup>). W wyniku procesu hydrolizy polisacharydów słomy rzepakowej w ustalonych warunkach, z zastosowaniem płynu pochodzącego natywnego i zateżonego 50-krotnie uzyskano odpowiednio 1,51 i 14 g · dm<sup>-3</sup> cukrów redukujących w medium poreakcyjnym.

**Słowa kluczowe:** celulazy, *Cellulosimicrobium cellulans*, lignoceluloza, słoma rzepakowa.

DOI: 10.15611/nit.2014.4.04

### **1. Wstęp**

Postęp w rolnictwie i przemyśle spożywczym niesie za sobą wzrost ilości generowanych w trakcie różnych procesów produktów ubocznych, w tym głównie odpadów lignocelulozowych. Biomasa roślinna stanowi doskonale źródło wielu pożądaných produktów – m.in. cukrów prostych, które otrzymywane są na drodze enzymatycznej hydrolizy i mogą być wykorzystane np. do produkcji bioetanolu. Szacuje się, że w procesie fotosyntezy produkowanych jest rocznie 200 mld ton biomasy lignocelulozowej [Ragauskas i in. 2006]. Taka obfitość substratów czyni je potencjalnie niewyczerpalnym źródłem energii. Cenne energetycznie, a zupełnie nieprzydatne

w rolnictwie są słomy: rzepakowa, bobikowa i słonecznikowa. Rocznie w Polsce produkuje się ok. 25 mln ton słomy, natomiast w całej Europie, według danych FAO, słoma (głównie pszenicy i jęczmienia) wytwarzana jest w ilości 149 mln ton rocznie [FAO 2004; Janowicz 2006]. Zagospodarowanie przynajmniej części olbrzymiej ilości zasobów lignocelulozy występujących w przyrodzie znacznie zmniejszyłoby spodziewany deficyt biopaliw. Rozwiązanie to wymaga jednak uzyskania tanich i wydajnych enzymów celulozowych i hemicelulozowych niezbędnych w procesach biokonwersji ukierunkowanych na wspomniany cel [Grzybowski 2009].

Mimo że celuloza jest homopolimerem, konieczne jest użycie kilku enzymów do jej degradacji. Wyróżnia się trzy grupy aktywności o różnej specyficy działania: endo-1,4-glukanazy (EC 3.2.1.4), które hydrolizują wewnętrzne struktury amorficznej celulozy, egzo-1,4-glukanazy (EC 3.2.1.91, znane też jako celobiohydrolazy), odpowiadające za odłączenie cząsteczek celobiozy od końców celulozy, a także  $\beta$ -glukozydazy (EC 3.2.1.21), które hydrolizują celobiozę do glukozy. Enzymy te zdolne są do rozkładu celulozy dzięki szczególnym właściwościom synergistycznego działania. Dla większości z nich optymalne warunki to temperatura 50°C przy pH 4,0÷5,0 [Kristensen 2009; Russel, Górka, Wyczółkowski 2005].

Obecnie celulazy należą do jednej z trzech najczęściej produkowanych przemysłowo grup enzymów. Znajdują szerokie zastosowanie w przetwórstwie żywności, produkcji pasz, przemyśle włókienniczym, papierniczym i detergentów [Kaur i in. 2007; Sukumaran, Singhanian, Pandey 2005; Sukumaran i in. 2009]. Produkcja celulaz stale rośnie również z powodu wzrastającego zapotrzebowania na nie w technologiach produkcji bioetanolu z substratów lignocelulozowych, z przeznaczeniem na paliwo transportowe [Singhanian i in. 2010]. Jednak wysokie koszty produkcji enzymów celulozowych są ograniczeniem w przemysłowej skali biokonwersji celulozy, stanowiąc 50% kosztów procesu jej hydrolizy. Wynika to z niskiej specyficznej aktywności celulaz, która powoduje konieczność zastosowania dużej ilości enzymu na jednostkę substratu w celu uzyskania znacznego stopnia hydrolizy [Hao, Yu, Yan 2006].

Poznano wiele gatunków drobnoustrojów zdolnych do produkcji enzymów celulozowych, ale tylko nieliczne z nich mogą znaleźć zastosowanie w produkcji przemysłowej. Cechą limitującą jest zdolność do wydzielania dużych ilości pozakomórkowego białka. Wśród najlepszych celulozolitów wymienia się bakterie termofilne i mezofilne (*Cellulomonas* i *Clostridium*), promieniowce (*Streptomyces*, *Actinomyces*), a przede wszystkim grzyby z rodzaju *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Humicola*, *Fusarium* i *Aspergillus* [Sukumaran, Singhanian, Pandey 2005].

W celach handlowych pozyskiwanie preparatów celulaz ogranicza się do wykorzystywania hodowli grzybów nitkowatych. Za najbardziej produktywnie i wydajnie uważa się należące do rodzaju *Trichoderma* grzyby celulozowe. Handlowe preparaty celulaz opierają się na genetycznie zmodyfikowanych mutantach *Trichoderma reesei* i są produkowane na skalę przemysłową przez wiele firm na świecie. W przypadku grzybów z rodzaju *Aspergillus* większość badań nad tymi mikroorganizmami

została ukierunkowana do pozyskiwania  $\beta$ -glukozydazy, ksylanazy i ksyloglukanazy [Gusakov 2011]. Innym ważnym źródłem enzymów celulolitycznych są bakterie. Sposób wytwarzania bakteryjnych enzymów celulolitycznych jest uwarunkowany stosunkiem drobnoustrojów do obecności tlenu. Bakterie beztlenowe produkują kompleksy celulaz, zwane celulosomami, związane w glikokaliksie. Ze względu na takie umiejscowienie celulosomu obszar działania kompleksu celulolitycznego jest ograniczony do miejsca przylegania komórki bakteryjnej do powierzchni hydrolizowanej. Aparat hydrolizujący celulozę jest wytwarzany tylko wtedy, gdy komórki bakteryjne rosną na podłożu z materiałem zbudowanym z krystalicznych fibryli celulozowych. Przykładem bakterii wytwarzających celulosomy są bakterie z gatunku *Clostridium* i *Ruminococcus* [Lynd, Weimer, Zyl 2002]. Z kolei bakterie aerobowe wytwarzają nanokompleksy układów enzymatycznych nie związane ze ścianą komórkową. Wszystkie enzymy wytwarzane są na zewnątrz komórki prokariotycznej, dzięki czemu powierzchnia działania enzymów nie ogranicza się do miejsca przylegania komórki. Najlepiej poznane zewnątrzkomórkowe hydrolazy pochodzą z *Cel lulomonas* i *Thermobifida* [Lynd, Weimer, Zyl 2002; Wilson 2009]. Główną zaletą bakterii jest ich przeżywalność w wyższych temperaturach i lepsze przystosowanie do trudnych warunków.

Poszukiwanie wysokowydajnych szczepów, ustalenie czynników wpływających na ich wzrost i wytwarzanie enzymów celulolitycznych jest ważnym zagadnieniem wpływającym na rozwój procesów syntezy tej grupy enzymów w skali przemysłowej. Materiały lignocelulozowe ze względu na swój charakter odpadowy, łatwą dostępność i odnawialność są atrakcyjnym ekonomicznie substratem w produkcji celulaz.

Celem przeprowadzonych badań było określenie zdolności bakterii *Cellulosimicrobium cellulans* PCM 2385 do biosyntezy enzymów celulolitycznych oraz potencjalnego wykorzystania płynu pochodzącego do hydrolizy polisacharydów biomasy lignocelulozowej. Efekty hydrolizy oceniano na podstawie ilości wydzielonych cukrów, możliwych do wykorzystania przez drożdże w procesie fermentacji alkoholowej.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Materiał badawczy

W badaniach wykorzystano szczep bakterii *Cellulosimicrobium cellulans* PCM 2385, pochodzący z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Hodowle bakterii prowadzono w temperaturze 27°C przez 24 h, stosując podłoże Congo – Red Agar [Gupta, Samant, Sahu 2012], o składzie:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g · dm<sup>-3</sup>,  $\text{MgSO}_4$  0,25 g · dm<sup>-3</sup>, celuloza mikrokryształiczna (Sigma-Aldrich) 2,0 g · dm<sup>-3</sup>, żelatyna 2,0 g · dm<sup>-3</sup>, agar 16,0 g · dm<sup>-3</sup>, pH 6,8 – 7,2. Podłoże Congo – Red Agar stosowano również do przechowywania szczepu.

Substratem lignocelulozowym zastosowanym w doświadczeniu była słoma rzepakowa (*Brassica napus* L. var. *napus*) rozdrobniona do poziomu 1-2 mm, o zawartości ok. 95% suchej masy. Poddano ją chemicznej obróbce w warunkach: temperatura: 120°C, czas: 1 h, dodatek: NaOH 0,1 g · g<sup>-1</sup> s.s. substratu, stosunek frakcji stałej do płynnej: 1:9 (parametry te wyznaczono na podstawie wcześniejszych badań [Świątek i in. 2014]). Materiał po obróbce, detoksykacji i korekcie kwasowości środowiska do pH 5,0 (za pomocą 99% kwasu octowego) wykorzystano jako składnik podłoża do syntezy celulaz oraz jako źródło celulozy w procesie hydrolizy enzymatycznej.

## 2.2. Metody prowadzenia hodowli

Do przygotowania inokulum bakterii wykorzystano podłoże [Agarwal, Mahanty, Venkata Dasu 2009] o składzie: karboksymetyloceluloza: 4 g · dm<sup>-3</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 g · dm<sup>-3</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 g · dm<sup>-3</sup>, KCl 0,5 g · dm<sup>-3</sup>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,5 g · dm<sup>-3</sup>, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,01 g · dm<sup>-3</sup>, ekstrakt drożdżowy: 2,0 g · dm<sup>-3</sup>, NaNO<sub>3</sub> 0,5 g · dm<sup>-3</sup>. Podłoże rozlano po 100 cm<sup>3</sup> do kolb stożkowych o pojemności 250 cm<sup>3</sup>, które po zaszczepieniu inkubowano w temperaturze 27°C przez 48 h, w warunkach niestacjonarnych (350 obr. · min<sup>-1</sup>; inkubator Innova 40, New Brunswick Scientific). Uzyskaną zawiesinę bakterii w podłożu (400 cm<sup>3</sup>) wprowadzono do bioreaktora (Chemap FZ 2000), zawierającego 4000 cm<sup>3</sup> podłoża według Agarwal i in. [Agarwal, Mahanty, Venkata Dasu 2009], w którym karboksymetylocelulozę zastąpiono odpadową słomą rzepakową (przygotowaną jak opisano). Stężenie substratu lignocelulozowego w podłożu roboczym ustalono na poziomie 1% s.s. Hodowlę prowadzono przez 72 h, w temperaturze 27°C, stosując mieszanie 250 obr. · min<sup>-1</sup> oraz napowietrzanie 1,5 l · min<sup>-1</sup>, przy pH początkowym 6,8. Po zakończeniu hodowli uzyskany supernatant poddano zagęszczeniu w wyparce (BÜCHI R-210; 30°C, 60 min, 16 mbar), do uzyskania 5- i 50-krotnego stopnia koncentracji płynu. W zagęszczonym płynie pochodzonym oznaczano aktywność celulaz (FPU<sup>1</sup>, zgodnie z zaleceniami IUPAC) [Ghose 1987].

W drugiej części doświadczeń oceniono wpływ induktorów (laktozy, laktulozy lub maltozy) na produkcję celulaz przez badany szczep bakterii. W tym celu płynne podłoże [Agarwal, Mahanty, Venkata Dasu 2009] rozlano po 100 cm<sup>3</sup> do kolb stożkowych o pojemności 250 cm<sup>3</sup> i uzupełniono dodatkiem wymienionych induktorów każdorazowo w ilości 1g. Hodowlę bakterii *C. cellulans* prowadzono przez 48 h, w temperaturze 27°C i przy pH początkowym 6,8, stosując wytrząsanie 350 obr. · min<sup>-1</sup> (inkubator Innova 40, New Brunswick Scientific). Po zakończeniu hodowli w uzyskanym filtracie pochodzonym zmierzono aktywności enzymów celulolitycznych [Ghose 1987].

Przeprowadzono również badania, których celem było określenie wpływu wartości pH i temperatury na aktywność celulaz. Doświadczenia zaplanowano przy wy-

---

<sup>1</sup> FPU (z ang. *filter paper units*) – ilość enzymu uwalniająca 1 μmol równoważnika glukozy w wyniku hydrolizy bibuły Whatman No. 1 w czasie 1 minuty [Ghose 1987].



korzystaniu programu STATISTICA – plan Box-Behnkena. Wielkości wejściowe stanowiły dwie zmienne – temperatura:  $35\div 45^{\circ}\text{C}$ , i pH:  $6,6\div 8,1$ . Wielkością wyjściową była aktywność celulaz wyrażona wartością FPU. Wyniki uzyskane w doświadczeniach pozwoliły na wyznaczenie optymalnej temperatury i pH, których zastosowanie miało sprzyjać wydajnej hydrolizie celulozy przez enzymy zawarte w płynie pohodowlanym testowanych bakterii.

Proces hydrolizy enzymatycznej polisacharydów słomy rzepakowej prowadzono w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  z zastosowaniem wytrząsania ( $250 \text{ obr.} \cdot \text{min}^{-1}$ ; inkubator Innova 40, New Brunswick Scientific), przy wykorzystaniu natywnego, 5- i 50-krotnie zatężonego płynu pohodowlanego. Efekty hydrolizy określono na podstawie stężenia uwolnionych cukrów redukujących oznaczonych przy użyciu metody z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym [Miller 1959].

### 3. Wyniki i dyskusja

Badania opisane w niniejszym artykule dotyczyły możliwości wykorzystania odpadowej słomy rzepakowej jako źródła węgla i energii w procesie biosyntezy celulaz przez bakterie *Cellulosimicrobium cellulans* oraz wykorzystanie płynu pohodowlanego jako surowego preparatu enzymatycznego do biokonwersji lignocelulozy w procesie otrzymywania alkoholu etylowego.

Bakterie *Cellulosimicrobium cellulans* uważane są za jedne z najlepszych producentów zewnątrzkomórkowych enzymów celulolitycznych wśród tlenowych bakterii gram-dodatnich [Agarwali, Mahanty, Venkata Dasu 2009]. Bakteryjne celulazy produkowane są na stałym poziomie, niezależnie od potrzeb fizjologicznych, w przeciwieństwie do celulaz grzybowych, których synteza uzależniona jest od obecności w środowisku celulozy jako substratu [Suto, Tomita 2001].

Aktywność enzymów scukrzających celulozę (FP-az) w płynie pohodowlanym niezatężonym wyniosła  $0,0073 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Po procesie koncentracji aktywność FP-az wzrosła o 47% ( $0,0138 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) i 63% ( $0,02 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), odpowiednio przy 5- i 50-krotnym zagęszczeniu (tab. 1). Zbliżoną wartość aktywności FP-az w swoich badaniach uzyskali Song i Wei [2010]. W procesie biosyntezy celulaz z udziałem *Cellulomonas cellulans* autorzy zastosowali pożywkę minimalną M9 z dodatkiem trzciny cukrowej, osiągając najwyższą aktywność enzymów celulolitycznych na poziomie  $0,03 \text{ IU}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$  po 24 h hodowli. W dalszym etapie doświadczenia aktywność enzymu nieznacznie zmalała, utrzymując się na stałym poziomie ( $0,028 \pm 0,001 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) do 72 h hodowli. Badacze stwierdzili również, że zawartość ksyłanaz w płynie pohodowlanym była wyższa niż celulaz, a ich maksymalna aktywność została osiągnięta w 3 dniu hodowli i wyniosła  $0,70 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Jest to zgodne z doniesieniami

---

<sup>2</sup>  $\text{IU} \cdot \text{cm}^{-3}$  (International Units  $\cdot \text{cm}^{-3} = \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{cm}^3)$ ); jednostka aktywności enzymu (FP-azy) zdefiniowana jako ilość enzymu niezbędna do uwolnienia  $1 \mu\text{mola}$  produktu (równoważników glukozy) w czasie 1 minuty.

wielu autorów, którzy wskazują na fakt, że materiały lignocelulozowe indukują produkcję zarówno enzymów celulolitycznych, jak i ksylanolitycznych, zazwyczaj jednak obserwuje się wyższą sekrecję tych drugich [Adsul i in. 2004].

**Tabela 1.** Oznaczenie aktywności enzymów scukrzających celulozę w płynie pochodzącym z niezatężonym, zatężonym 5- i 50-krotnie

**Table 1.** Determination of the activity of cellulase in not concentrated post-culture liquid, 5- and 50-fold concentrated

Wyszczególnienie	Płyn pochodzący		
	natywny (niezatężony)	5-krotnie zatężony	50-krotnie zatężony
Aktywność [IU · cm <sup>-3</sup> ]	0,0073	0,0138	0,02

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Niski poziom ekspresji zewnątrzkomórkowych białek enzymatycznych testowanego szczepu bakterii mógł być spowodowany zbyt niskim dodatkiem substratu lignocelulozowego do podłoża hodowlanego. W badaniach przeprowadzonych przez Milala i in. [2005] wykazano, że zawartość słomy kukurydzianej w podłożu na poziomie 5% stymulowała wysoki poziom biosyntezy celulaz przez szczep *A. niger*. Aktywność badanych enzymów we wspomnianym podłożu była nawet pięciokrotnie wyższa w porównaniu z wariantem hodowli, w którym zastosowano dodatek 1% induktora. Do podobnych wniosków doszli Vintila i in. [2010], którzy badali wpływ wzrastającej w zakresie od 0,5 do 4% ilości otrębów pszennych w podłożu na aktywność enzymów celulolitycznych. Autorzy, wykorzystując do biosyntezy szczep *T. viride* CMIT35, zanotowali najwyższą aktywność endocelulaz (0,29 U · ml<sup>-1</sup>) w podłożu zawierającym 4% substratu.

Produkcja celulaz jest precyzyjnie kontrolowana przez mechanizmy aktywacji i represji. Indukcja syntezy następuje w obecności nierozpuszczalnego w wodzie substratu, jakim jest celuloza, a także celobiozy lub innego sacharydu zawierającego β – wiązania. Słumienie syntezy następuje zaś nawet przy głodowych ilościach cukrów użytkowych (glukozy) [Sukumaran, Singhania, Pandey 2005]. Zastosowanie induktorów syntezy celulaz pozwala na otrzymanie większej ilości enzymów hydrolizujących. Najpopularniejszym induktorem syntezy celulaz jest celuloza, jednakże ze względu na wysokie koszty jej otrzymywania oraz trudności operacyjne i reologiczne podczas hodowli w bioreaktorze zaproponowano wykorzystanie innych induktorów, jak np. laktuloza, kwas laktobionowy, sorboza [Janas, Targoński, Mleko 2002]. W komercyjnej produkcji celulaz jako induktor ich sekrecji wykorzystywana jest głównie laktoza.

W badaniach własnych nie odnotowano pozytywnego wpływu laktozy jako induktora syntezy celulaz. Aktywność enzymatyczna w płynie po hodowli testowa-

nych bakterii w obecności laktozy wyniosła  $0,0041 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Najwyższą aktywność celulaz ( $0,01029 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) osiągnięto w podłożu z wyłącznym udziałem karboksymetylocelulozy (CMC) jako źródła węgla (tab. 2).

**Tabela 2.** Wpływ dodatku potencjalnych induktorów syntezy celulaz na aktywność celulaz w płynie po hodowli *C. cellulans*

**Table 2.** Effect of addition potential inducers of cellulase synthesis on cellulolytic activity in the liquid after *C. cellulans* culture

Substrat	CMC	Maltoza + CMC	Laktoza + CMC	Laktuloza + CMC
Aktywność [ $\text{IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ]	0,0103	0,0089	0,0041	0,0047

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Pozytywny wpływ karboksymetylocelulozy, jako induktora syntezy celulaz w hodowli bakterii *Cellulomonas cellulans* NRRL B 4567, odnotowali w swoich badaniach także Agarwal i in. [Agarwal, Mahanty, Venkata Dasu 2009]. Wspomniani autorzy zastosowali różne stężenia karboksymetylocelulozy (od 2 do  $12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), uzyskując najwyższą aktywność enzymów celulolitycznych ( $1,5 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) przy dodatku CMC w ilości  $4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ten sam związek został wykorzystany w badaniach nad aktywnością celulolityczną bakterii *Bacillus subtilis* AS3 [Deka i in. 2011]. Najlepsze wyniki autorzy osiągnęli, stosując podłoże zawierające  $18 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  CMC,  $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  peptonu i  $4,789 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  ekstraktu drożdżowego. W tych warunkach aktywność celulolityczna w płynie pohodowlanym wyniosła  $0,49 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Wyższa aktywność enzymów celulolitycznych uzyskiwana przez cytowanych autorów mogła być spowodowana wyższym dodatkiem karboksymetylocelulozy od stosowanego w badaniach własnych.

Na podstawie uzyskanych wyników można również zauważyć, że odpady substrat lignocelulozowy, w tym przypadku słoma rzepakowa, wydajniej indukował biosyntezę celulaz. Aktywność FP-az w płynie pohodowlanym 50-krotnie zatężonym była 1,9-krotnie wyższa w porównaniu z wynikiem uzyskanym w hodowli prowadzonej z udziałem CMC ( $0,0103 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ). Podobne wnioski zaobserwowali w swoich badaniach Goldbeck i in. [2013]. Autorzy zastosowali w hodowlach *Acremonium strictum* trzy substraty: celulozę, karboksymetylocelulozę i wytloki trzciny cukrowej po eksplozji parą wodną ( $12 \text{ kG} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $188,5^\circ\text{C}$ ). Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wykazały, że efektywniejszym induktorem syntezy celulaz były wytloki trzciny cukrowej po obróbce wstępnej. Wartość aktywności FP-az uzyskana po hodowli na podłożu z materiałem odpadowym po 192 h wyniosła  $10,82 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$  i była wyższa o 52% ( $5,2 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i 83% ( $1,8 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) od zmierzonych w hodowlach z udziałem pozostałych induktorów, odpowiednio mikrokryształicznej celulozy i CMC. Liming i Xueliang [2004] natomiast wykazali w swoich badaniach, że poziom aktywności celulaz był zbliżony w przypadku zastosowania odpadowych kaczanów

kukurydzianych oraz oczyszczonej celulozy i wyniósł odpowiednio  $5,25 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$  oraz  $5,42 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ .

W badaniach nad optymalizacją warunków działania celulaz najwyższą aktywność FP-az uzyskano w pH 7,5 i temperaturze  $40^\circ\text{C}$ . Przy zastosowanych parametrach środowiska reakcji aktywność zewnątrzkomórkowych hydrolaz wyniosła  $0,0232 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$  ( $0,0014 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$  białka). Najmniej korzystne warunki działania enzymów celulolitycznych określono w pH 6,6 i temperaturze  $45^\circ\text{C}$ . Aktywność celulaz w tych warunkach była niższa o 27% ( $0,0170 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) w porównaniu z maksymalną wartością aktywności enzymatycznej FP-az osiągniętą w ramach przeprowadzonych doświadczeń.

**Tabela 3.** Aktywność enzymów celulolitycznych w zależności od temperatury i pH wyznaczona według planu Boxa-Behnkena

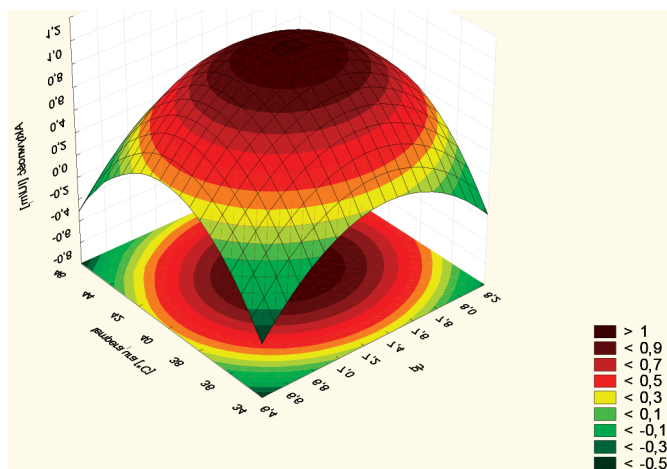
**Table 3.** Cellulolytic enzyme activity depending on temperature and pH, designated according to Box-Behnken plan

Nr układu	pH	Temperatura [ $^\circ\text{C}$ ]	Aktywność celulaz [ $\text{IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ]
1	6,6	40	0,0205
2	6,6	45	0,0170
3	7,5	35	0,0197
4	7,5	40	0,0232
5	7,5	45	0,0197
6	8,1	35	0,0171
7	8,1	40	0,0206
8	8,1	45	0,0171

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Na podstawie oceny efektów ANOVA przeprowadzonej z wykorzystaniem programu STATISTICA stwierdzono, że temperatura i pH środowiska reakcji mają porównywalny wpływ na aktywność enzymów celulolitycznych. Świadczy o tym kształt płaszczyzny odpowiedzi (rys. 1), na której widoczne jest ugięcie płaszczyzny w dwóch kierunkach. Uzyskane wyniki planu Boxa-Behnkena i danych z modelu powierzchni odpowiedzi pozwoliły na wyznaczenie optymalnych warunków działania celulaz: pH 7,5 i temperatura  $40^\circ\text{C}$ . Aproksymowana aktywność enzymów wyniosła  $0,0254 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$  i była niewiele wyższa (8%) od wartości uzyskanych doświadczalnie. Odmienne wartości optymalnej aktywności białek enzymatycznych wytwarzanych przez *C.cellulans* odnotowali Song i Wei [2012], którzy najkorzystniejszy rezultat ( $0,028 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) uzyskali w temperaturze  $50^\circ\text{C}$  i pH 5,0. Mogło to być spowodowane zastosowaniem innego źródła węgla i sposobu jego obróbki wstępnej, a także systemem prowadzenia hodowli.



**Rys. 1.** Schemat powierzchni odpowiedzi obrazujący wpływ temperatury i pH na aktywność enzymów celulolitycznych

**Fig. 1.** The response surface plot showing the influence of temperature and pH on the activity of cellulolytic enzymes

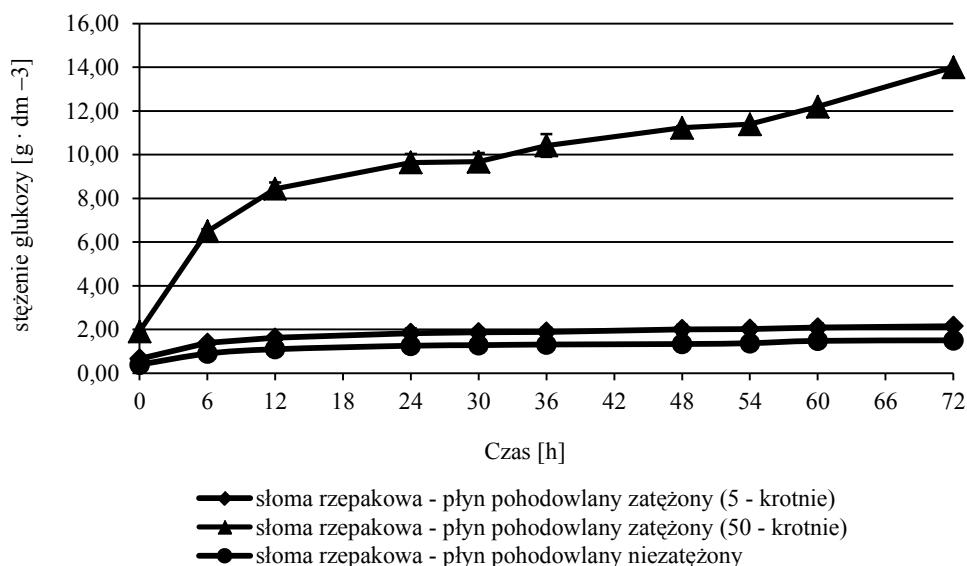
Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Model powierzchni odpowiedzi w eksperymencie nad optymalizacją działania enzymów syntetyzowanych przez *Aspergillus heteromorphus* zastosowali także Singh i in. [2009]. Najkorzystniejsze warunki działania celulaz wyznaczono w pH 4,8 i 60°C. Przy zastosowaniu wspomnianych wartości temperatury i pH oszacowano aktywność celulaz na poziomie 11,26 IU · cm<sup>-3</sup>. W rezultacie doświadczeń we wskazanych warunkach otrzymano 13,05 IU · cm<sup>-3</sup> aktywności celulolitycznej enzymów.

Przeprowadzenie 72-godzinnej hydrolizy polisacharydów słomy rzepakowej po obróbce alkalicznej z zastosowaniem natywnego i 5-krotnie zatężonego płynu pochodzącego w wyznaczonych warunkach optymalnych pozwoliło na uzyskanie stężenia uwolnionych cukrów redukujących na poziomie odpowiednio 1,51 i 2,16 g · dm<sup>-3</sup> hydrolizatu (rys. 2). Zastosowanie płynu pochodzącego, natywnego i 5-krotnie zatężonego jako surowego preparatu enzymatycznego przyczyniło się do uzyskania wydajności hydrolizy polisacharydów w odniesieniu do wartości teoretycznej, wyznaczonej na podstawie stężenia celulozy i hemicelulozy w materiale natywnym, na poziomie nieprzekraczającym 4%.

Niska wydajność hydrolizy polisacharydów słomy mogła być następstwem hamowania aktywności celulaz przez gromadzącą się w hydrolizacie glukozę. Aslam i in. [2010] dowiedli w swoich badaniach, że uzupełnienie podłoża hodowlanego zawierającego CMC glukozą (1%) po 48 h od rozpoczęcia procesu spowodowało spadek ilości oznaczonych CMCaz, FPaz oraz β-glukozydaz, co wskazuje na zahamowanie biosyntezy celulaz obecnością produktu końcowego, jakim jest glukoza.



**Rys. 2.** Postęp hydrolizy enzymatycznej polisacharydów słomy rzepakowej płynem pochodowlanym niezatężonym (●), zatężonym 5- (◆) i 50-krotnie (▲) w trakcie 72 h doświadczenia, wyrażony stężeniem cukrów redukujących w hydrolizacie

**Fig. 2.** Enzymatic hydrolysis rate of rape straw polysaccharides with not concentrated post-culture liquid (●), 5 – (◆) and 50-fold concentrated (▲), during 72-hour experiment, expressed as reducing sugars concentration in hydrolysate

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Zastosowanie wyższej koncentracji płynu pochodowlanego (50-krotnego) pozwoliło na uzyskanie stężenia uwolnionych cukrów redukujących na poziomie  $14,00 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  hydrolizatu, przy 20,5% teoretycznej wydajności glukozy (rys. 2). Wyższą o niespełna 8% (27,82%) wydajność hydrolizy polisacharydów kaczanów kukurydzianych uzyskała Kancelista [2012] po zastosowaniu płynu pochodowlanego z namnażania grzybni *Trichoderma avatum* o aktywności celulolitycznej  $31,48 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Z kolei Chen i in. [Chen, Xia, Xue 2007] otrzymali prawie 4-krotnie wyższą (79,5%) wydajność uwalnianej glukozy w porównaniu z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Autorzy wykorzystali w tym celu grzyby *Trichoderma reesei* ZU-02 i *Aspergillus niger* ZU-07, osiągając aktywność FP-az na poziomie  $6,5 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$  w podłożu z udziałem odpadowych kaczanów kukurydzianych. Wydajność uwalniania cukrów osiągnięta w cytowanym doświadczeniu była zdecydowanie korzystniejsza niż w omawianej pracy i niewątpliwie była rezultatem zastosowania w eksperymencie szczepów grzybów, charakteryzujących się wyższym poziomem ekspresji białek aktywnych wobec celulozy, a także odmienną budową strukturalną wykorzystanego materiału lignocelulozowego. Sukumaran i in. [2009] wykorzystali do przeprowa-

dzenia procesu hydrolizy płyn pochodłany po namnażaniu grzybni *Aspergillus niger* MTCC 7956 i *Trichoderma reesei* RUT C30 o aktywności celulolitycznej  $50 \text{ IU} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Po przeprowadzeniu 48-godzinnej hydrolizy enzymatycznej polisacharydów słomy ryżowej i trzciny cukrowej uzyskali stężenie uwolnionych cukrów redukujących w medium poreakcyjnym na poziomie, odpowiednio,  $26,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  i  $17,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  hydrolizatu. Niższy stopień konwersji polisacharydów słomy rzepakowej osiągnięty w prezentowanych badaniach, w porównaniu z cytowanymi autorami, mógł być spowodowany małą zawartością, a zarazem aktywnością ksylanazy w płynie pochodłanym. Może to prowadzić do uwolnienia dużych ilości ksyloligomerów [Qing, Wyman 2011]. Qing [2010] w swoich badaniach udowodnił, że są one silnymi inhibitorami celulaz, które znacznie spowalniają hydrolizę celulozy.

#### 4. Podsumowanie

Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują, że aplikacyjny potencjał odpadowej słomy rzepakowej związany jest z jednej strony z możliwością stosowania jej jako źródła węgla indukującego produkcję enzymów, z drugiej strony z możliwością użycia przy ich udziale cukrów powstających w procesie hydrolizy enzymatycznej tego odpadowego substratu. Otrzymane produkty – pochodne odpadowej biomasy, mogą być z powodzeniem wykorzystywane w dalszych procesach biotechnologicznych, m.in. w otrzymywaniu bioetanolu czy wysokowartościowych pasz.

Suplementacja podłoża hodowlanego dodatkiem substancji o charakterze indukującym syntezę celulaz u grzybów strzępkowych nie spowodowała analogicznej reakcji u bakterii *C.cellulans*.

Optymalne warunki działania celulaz syntetyzowanych przez *Celulosimicrobium cellulans* PCM 2385 wyznaczono na pH 7,5 i temperaturę  $40^{\circ}\text{C}$ .

Pomimo zachęcających wyników badań uzyskanych w doświadczeniach wstępnych należy stwierdzić, że testowane bakterie celulolityczne są mało konkurencyjne w porównaniu z grzybami strzępkowymi, ponieważ poziom ekspresji pożądanych białek enzymatycznych przez te mikroorganizmy jest znacznie niższy [Gusakov 2011; Wilson 2009]. W związku z tym należy poszukiwać rozwiązań, które umożliwiłyby osiągnięcie wyższych wartości aktywności celulolitycznej, np. w drodze mutagenizacji lub po zastosowaniu innych – skutecznych, induktorów w podłożach hodowlanych.

#### Literatura

Adsul M.G., Ghule J.E., Singh R., Shaikh H., Bastawde K.B., Gokhale D.V., Varma A.J., 2004, *Poly-saccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production*, Carbohydr. Polym., 57, s. 67-72.

- Agarwal R., Mahanty B., Venkata Dasu V., 2009, *Modeling growth of Cellulomonas cellulans NRRL B 4567 under substrate inhibition during cellulase production*, Chem. Biochem. Eng. Q., 23 (2), s. 213-218.
- Aslam N., Shiekh M.A., Ashraf M., Jamil A., 2010, *Expression pattern of Trichoderma cellulases under different carbon sources*, "Pakistan Journal of Botany", 42 (2), s. 2895-2902.
- Chen M., Xia L., Xue P., 2007, *Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate*, Intl. Biodeterioration and Biodegradation, 59, s. 85-89.
- Deka D., Bhargovi P., Sharma A., Goyal D., Jawed M., Goyal A., 2011, *Enhancement of cellulase activity from new strain of Bacillus subtilis by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates*, Enzyme Res., <http://dx.doi.org/10.4061/2011/151656>.
- FAO, 2004, *Statistical yearbook production. Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- Grzybowski R.A., 2009, *Kierunki rozwoju przemysłu rolno-spożywczego i biotechnologii żywności*, I Kongres Nauk Rolniczych, <http://www.cdr.gov.pl/kongres1/files/4.1.1.pdf>.
- Ghose T.K., 1987, *Measurement of cellulase activities*, Pure Appl. Chem., 59 (2), s. 257-268.
- Goldbeck R., Ramos M.M., Pereira G.A.G., Mauger-Filho F., 2013, *Cellulase production from a new strain Acremonium strictum isolated from the Brazilian Biome using different substrates*, Biores. Technol., 128, s. 797-803.
- Gupta P., Samant K., Sahu A., 2012, *Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/578925>.
- Gusakov A.V., 2011, *Alternatives to Trichoderma reesei in biofuel production*, Trends Biotechnol., 29 (9), s. 419-425.
- Hao X-C., Yu X-B., Yan Z-L., 2006, *Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant Trichoderma reesei WX-112 using response surface methodology*, Food Technol. Biotechnol., 44(1), s. 89-94.
- Janas P., Targoński Z., Mleko S., 2002, *New inducers for cellulases production by Trichoderma reesei M-7*, EJPAU, 5(1).
- Janowicz L., 2006, *Biomasa w Polsce*, „Energetyka” 8, s. 601-604.
- Kancelista A., 2012, *Biodegradacja odpadów lignocelulozowych z udziałem grzybów strzępkowych*, praca doktorska, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław, [http://www.dbc.wroc.pl/Content/17881/Kancelista\\_A\\_doktor\\_048\\_DBC.pdf?handler=pdf](http://www.dbc.wroc.pl/Content/17881/Kancelista_A_doktor_048_DBC.pdf?handler=pdf).
- Kaur J., Chadha B.S., Kumar B.A., Saini H.S., 2007, *Purification and characterization of two endoglucanases from Melanocarpus sp. MTCC 3922*, Biores. Technol., 9, s. 74-81.
- Kristensen J.B., 2009, *Enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. Substrate interactions and high solids loadings*, Forest & Landscape Research 42-2008, Forest & Landscape Denmark, Frederiksberg.
- Liming X., Xueliang S., 2004, *High-yield cellulase production by Trichoderma reesei ZU-02 on corn cob residue*, Biores. Technol., 91 (3), s. 259-262.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Zyl W.H., 2002, *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66, s. 506-577.
- Milala M.A., Shugaba A., Gidado A., Ene A.C., Wafar J.A., 2005, *Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by Aspegillus niger*, Res. J. Agric. Biol. Sci., 1(4), s. 325-328.
- Miller G.L., 1959, *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Anal. Chem., 31 (3), s. 429-418.
- Qing Q., Wyman C.E., 2011, *Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulase*, Bioresour. Technol., 102, s. 1359-1366.
- Qing Q., Yang B., Wyman C.E., 2010, *Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes*, Bioresour. Technol., 101, s. 9624-9630.
- Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J. Jr., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T., 2006, *The path forward for biofuels and biomaterials*, "Science" 311(5760), s. 484-489.



- Russel S., Górská E.B., Wyczółkowski A.I., 2005, *Enzymy biorące udział w hydrolizie celulozy*, „Acta Agrophysica”, Rozprawy i Monografie, 3, s. 27-36.
- Singh R., Kumar R., Bishnoi K., Bishnoi N.R., 2009, *Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of Aspergillus heteromorphus using response surface methodology*, Biochem. Eng. J., 48, s. 28-35.
- Singhania R.R., Sukumaran R.K., Patel A.K., Larroche C., Pandey A., 2010, *Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases*, Enzyme Microb. Technol., 46, s. 541-549.
- Song J.M., Wei D-Z., 2010, *Production and characterization of cellulases and xylanases of Cellulosimicrobium cellulans grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9*, Biomass and Bioenerg., 34, s. 1930-1934.
- Sukumaran R.K., Singhania R.R., Pandey A., 2005, *Microbial cellulases – production, applications and challenges*, J. Scin. Ind. Res., 64, s. 832-844.
- Sukumaran R.K., Singhania R.R., Mathew G.M., Pandey A., 2009, *Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production*, Ren. En., 34, s. 421-424.
- Suto M., Tomita F., 2001, *Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi*, J. Biosci. Bioeng., 92(4), s. 305-311.
- Świątek K., Lewandowska M., Juszczyk A., Kordala N., 2014, *Otrzymywanie etanolu ze słomy rzepakowej w procesie symultanicznej hydrolizy i fermentacji w systemie półciągłym*, NiT 4, artykuł w druku.
- Vintila T., Croitoriu V., Dragomirescu M., Nica D., 2010, *The effects of bioprocess parameters of cellulase production with Trichoderma viride CMIT35*, Anim. Scin. Biotechnol., 43 (1), s. 337-340.
- Wilson D.B., 2009, *Cellulases and biofuels*, Curr. Opin. Biotechnol., 20, s. 295-299.

## EVALUATION OF CELLULOLYTIC PROPERTIES OF MICROORGANISMS FOR BIOCONVERSION OF FOOD INDUSTRY WASTES

**Summary:** Cellulase are industrially important enzymes having application in diverse industries. Substrate cost account for the major fraction of the costs of cellulase production, and the use of cheap lignocellulosic biomass resources as substrates can help reduce cellulase prices. This study was to produce cellulases enzymes using *Cellulosimicrobium cellulans* grown on rape straw as substrate. The maximum cellulase activity of 0,02 FPU ml<sup>-1</sup> of filter paper activity was obtained. The supplementation of culture medium with the inducers of cellulase synthesis did not increase the secretion of enzymes in the tested bacterial strain. The optimization of the operating conditions of the cellulase using Statistica program – a Box-Behnken design indicated the following parameters: pH 7,5, temperature 40°C (FPase activity reached 0,0232 IU cm<sup>-3</sup>). The amount of released reducing sugars after 72 hours hydrolysis of rape straw polysaccharides, at optimal parameters designated, using a 5- and 50-fold concentrated post-culture liquid was 1,51 and 14 g · dm<sup>-3</sup> of reaction medium, respectively.

**Keywords:** cellulases, *Cellulosimicrobium cellulans*, lignocellulose, rape straw.