RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **233359**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425858**

(22) Data zgłoszenia: **08.06.2018**

(51) Int.Cl.
B01J 20/24 (2006.01)
C02F 1/28 (2006.01)

(54) **Zastosowanie α-(1→3)-glukanu jako biosorbentu do usuwania metali ze środowisk wodnych oraz sposób usuwania metali z użyciem biosorbentu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
08.04.2019 BUP 08/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.10.2019 WUP 10/19

(73) Uprawniony z patentu:
INSTYTUT AGROFIZYKI IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Lublin, PL
UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE, Lublin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
ADAM WAŚKO, Lublin, PL
KATARZYNA NOWAK, Piotrków-Kolonia, PL
ADRIAN WIATER, Lublin, PL
ANDRZEJ BIEGANOWSKI, Abramowice Prywatne, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Magdalena Tarała

PL 233359 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie α-(1→3)-glukanu jako biosorbentu pochodzenia grzybowego do usuwania metali, zwłaszcza metali ciężkich, ze środowisk wodnych. W szczególności, biosorbent pozyskiwany jest z owocników twardnika japońskiego, znanego również pod nazwą twardziak jadalny albo shiitake (*Letinus edodes*). Przedmiot wynalazku stanowi również sposób usuwania metali z użyciem biosorbentu.

W publikacji autorstwa M. Zabochnickiej-Świątek *Biosorbenty stosowane w usuwaniu jonów metali ciężkich z zanieczyszczonego środowiska* (CHEMIK 2013, 67, 10, 971–978) omówiono możliwości wykorzystania wybranych biosorbentów do usuwania jonów metali ciężkich z zanieczyszczonego środowiska. Jako jedną z grup biosorbentów metali ciężkich wymieniono grzyby i drożdże, których biomasa często poddawana jest modyfikacjom fizyczno-chemicznym w celu zwiększenia ilości zaabsorbowanych metali. Jako biosorbenty ołowiu (Pb^{2+}) wykorzystuje się biomasę uzyskaną z grzybów: *Aspergillus versicolor, Metarrhizium anisopliae* oraz *Penicillium verrucosum*. Natomiast do biosorpcji ołowiu, kadmu oraz miedzi badano zastosowanie biomasy z kropidlaka czarnego (Aspergillus Niger).

Z publikacji opisu polskiego zgłoszenia patentowego P.410386 znany jest biosorbent pochodzenia roślinnego, którego głównym sorbentem jest inulina. Biosorbent ma zastosowanie do oczyszczania środowisk wodnych z metali ciężkich, związków organicznych i pierwiastków radioaktywnych. Pozyskiwany jest zwłaszcza ze słonecznika bulwiastego (topinambura), dalii lub cykorii.

Twardziak jadalny (*Letinus edodes*) to grzyb należący *Tricholomataceae*, *Agaricales*, ze względu na obecność blaszek i białych zarodników. Występuje on na stanowiskach naturalnych na Dalekim Wschodzie, w takich krajach jak Chiny, Japonia czy Korea. Jednocześnie, od tysięcy lat, istnieje wielowiekowa tradycja uprawy tego grzyba w krajach azjatyckich. Obecnie twardziak jadalny jest jednym z najczęściej uprawianych na skalę przemysłową grzybów na świecie. Z danych literaturowych wynika że gatunek ten zajmuje drugie miejsce na świecie (25,4%), po pieczarce dwuzarodnikowej (31,7%) pod względem skali upraw i obserwuje się dynamiczny wzrost liczby upraw tego gatunku.

Skład chemiczny owocników twardziaka jadalnego uzależniony jest od wielu czynników, między innymi od składu podłoża na jakim rosły grzyby, temperatury, wilgotności, ilości światła czy zawartości dwutlenku węgla. Badania wykonane w Polsce wskazują, że zawartość suchej masy w owocnikach grzyba shiitake wynosi około 8%. Największą część suchej masy owocników stanowią węglowodany. W skład węglowodanów grzybowych wchodzą następujące polisacharydy: α i β glukany, mono- i disacharydy, alkohole cukrowe, glikogen i chityna. Owocniki twardziaka jadalnego wyróżniają się wysoką zawartością węglowodanów, na poziomie 67–78% w przeliczeniu na suchą masę.

Z uwagi na coraz większą skalę upraw owocników grzyba shiitake, w wyniku której powstaje duża ilość niezagospodarowanych odpadów, jak również biorąc pod uwagę znaczną zawartość glukanów (szczególnie α-(1→3)-glukanów) w jego ścianie komórkowej, grzyb ten stał się przedmiotem zainteresowania pod kątem zastosowania go jako materiał do usuwania metali ciężkich. Materiał ten może stanowić składnik filtrów do oczyszczania ścieków lub wód zanieczyszczonych metalami ciężkimi. W literaturze już od 1907 lat istnieją doniesienia o zdolności grzybów do akumulacji metali ciężkich (13. T. R. White, R. C. A. Thompson, W. J. Penhale, G. Chihara, (1988). *The effect of lentinan on the resistance of mice to Mesocestoides corti.* Parasitology Research 74, 6, pp. 563–568), dotyczą one również grzyba shiitake. Badania te nie precyzują jednak, który składnik odpowiedzialny jest za ten proces, a jedynie określają zawartość poszczególnych pierwiastków w całej zawartości owocników. W publikacji N. Bilandžić, B. Čalopek, M. Sedak (2016), *Heavy metal contents in three cultivated mushrooms species*. Veterinarska Stanica 47,5 pp. 405–-414 szczegółowo opisana jest struktura i biosynteza grzybowych α-glukanów, jednak nie ma w niej informacji o wiązaniach metali ciężkich przez tę frakcję grzybową.

Celem wynalazku było uzyskanie skutecznego nowego biosorbentu, mającego zastosowanie w środowiskach wodnych, charakteryzującego się zdolnością do wiązania metali ciężkich. Nieoczekiwanie okazało się, że rolę taką pełnić może α-(1→3)-glukanu pochodzenia grzybowego.

Istotę wynalazku stanowi zastosowanie α-(1→3)-glukanu jako biosorbentu pochodzenia grzybowego do usuwania metali ze środowisk wodnych.

Istotą sposobu usuwania metali ze środowisk wodnych z użyciem biosorbentu pochodzenia grzybowego jest to, że biosorbentem jest α-(1→3)-glukan, wyizolowany korzystnie z owocników twardziaka jadalnego, przy czym biosorbent stosowany jest w postaci proszku w ilości minimum 8 mg czystego aα-(1→3)-glukanu na 10 mL wodnego roztworu o stężeniu sorbowanych metali rzędu 50–150 mg/L i przy pH procesu biosorpcji wynoszącym od 4 do 7, korzystnie 5.

α-(1→3)-glukanu zastosowany jako biosorbent charakteryzuje się dobrymi właściwościami sorpcyjnymi. Ponadto α-(1→3)-glukanu pozyskiwany jest z odpadów z produkcji uprawianych na szeroką skalę owocników grzyba shiitake, α-(1→3)-glukanu jest łatwy do pozyskania, a jego pozyskiwanie jest dodatkowo sposobem zagospodarowania materiału odpadowego.

Przedmiot wynalazku został szczegółowo przedstawiony poniżej w przykładach realizacji oraz na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia zdjęcia płatków próbki α-(1→3)-glukanu przy różnych powiększeniach otrzymane z zastosowaniem mikroskopu optycznego;

Fig. 2 przedstawia mikrografie α-(1→3)-glukanu w różnych powiększeniach otrzymane za pomocą mikroskopu SEM;

Fig. 3 przedstawia dyfraktogram proszkowy α-(1→3)-glukanu;

Fig. 4 przedstawia porównanie widm FT-IR(wykres A) i FT-Ramana (wykres B) próbki.

α-(1→3)-glukan

W celu scharakteryzowania użytego do badań materiału w postaci α-(1→3)-glukanu, dokonano szeregu analiz. Wykonano m.in. zdjęcia za pomocą spolaryzowanego mikroskopu optycznego, które obrazują włóknisto-płatkową morfologię badanego materiału, co przedstawiono na Fig. 1. Wyniki te zostały potwierdzone wykorzystując skaningowy mikroskop elektronowo (SEM), za pomocą którego można zaobserwować również gąbczastą strukturę biopolimeru Fig. 2).

Zaobserwowane cechy badanego materiału są korzystne ze względu na zdolności sorpcyjne badanego materiału.

Niski stopień krystaliczności badanego glukanu określony za pomocą dyfrakcji promieni X według doniesień literaturowych przekłada się na dobre zdolności wiązania metali. Otrzymany dyfraktogram przedstawiony jest na Fig. 3.

Izolację nierozpuszczalnego w wodzie α-(1→3)-glukanu z owocników twardziaka przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w pracy Kiho i wsp. (Biol. Pharm. Bull., 17, 1994). Metoda oparta jest na izolacji α-(1→3)-glukanu z wysuszonych owocników przy pomocy roztworów: metanolu, 5% r-ru Na_2CO_3 oraz 1M NaOH w którym rozpuszcza się izolowany polimer. Ostatnim etapem procedury jest wytrącenie α-(1→3)-glukanu przy pomocy 1M HCl oraz 3 krotne przepłukanie go wodą. Zdolności sorpcyjne metali ciężkich na przykładnie czterech metali: niklu, kadmu, cynku i ołowiu na grzybowym α-(1→3)-glukanie według wynalazku badano poprzez sporządzenie odpowiednich roztworów metali ciężkich, które dodawano do określonych ilości wyizolowanego α-(1→3)-glukanu. Proces sorpcji charakteryzowano stosując następujące parametry:

- wydajność usuwania metalu (ang. MRE metal-removal efficiency) stosując następujący wzór: $MRE= C_i-C_f / (t_f-t_i) M$,
- gdzie C_i i C_f oznacza początkowe i końcowe stężenie metalu w roztworze wodnym, t_f i t_i czas końca i rozpoczęcia procesu sorpcji, M masa sorbentu, wyrażono w μg h^{-1} mg-1 (μg usuwanego metalu w jednostce czasu na masę sorbentu),
- współczynnik biosorpcji R (ang. removal ratio) stosując następujący wzór:

  $R = 100\% \times [(C_i-C_f)/C_i]$

- gdzie C_i i C_f oznacza stężenie początkowe i końcowe metalu w roztworze wodnym, wyrażono w %.

Ilość związanego jonu metalu określano techniką ICP (*Inductively Coupled Plasma*) poprzez różnicę między wyjściowym stężeniem roztworu użytego do badania a analizą roztworu po procesie sorpcji.

Wyniki sorpcji metali według wynalazku przedstawiono w przykładach I–V i Tabeli zamieszczonej poniżej.

Potwierdzeniem wiązania metali ciężkich na grzybowym α-(1→3)-glukanie są wyniki uzyskane za pomocą spektroskopii FT-IR oraz Ramann (Fig. 4).

P r z y k ł a d I

Wykorzystanie α-(1→3)-glukanu wyizolowanego z owocników twardziaka (*Letinus edodes*) do sorpcji niklu.

W kolbach miarowych o pojemności 25 mL sporządzono roztwór wodny Ni(II) o stężeniu 100 mg/L, rozcieńczając wodą dejonizowaną roztwór podstawowy (stężenie 1000 mg/L). Proces biosorpcji prowadzono w przedziale pH 4–7, optymalne pH roztworu dla sorpcji metalu było równe 5. Następnie do falkonów odważono po około 0,01 g α-glukanu i zalano roztworem Ni(II) w objętości 10 mL. Roztwór mieszano na wytrząsarce z prędkością 230 rpm w temperaturze pokojowej (22±2°C), a następnie oddzielono

roztwór od sorbentu poprzez wirowanie (12 000 rpm, 5 min.). Oznaczono zawartość niklu w fazie ciekłej stosując technikę ICP wykorzystując urządzenie: AA-6800; Shimadzu, Kyoto, Japonia. Uzyskano następujące wartości parametru procesu biosorpcji: MRE 9,9 $\mu g\ h^{-1}\ mg^{-1}$, R 22,3%.

P r z y k ł a d II

Wykorzystanie α-(1→3)-glukanu wyizolowanego z owocników twardziaka (*Letinus edodes*) do sorpcji kadmu.

W kolbach miarowych o pojemności 25 mL sporządzono roztwór wodny Cd(II) o stężeniu 100 mg/L, rozcieńczając wodą dejonizowaną roztwór podstawowy (stężenie 1000 mg/L). Proces biosorpcji prowadzono w przedziale pH 4–7, optymalne pH roztworu dla sorpcji metalu było równe 5. Następnie do falkonów odważono po około 0,01 g α-glukanu i zalano roztworem Cd(II) w objętości 10 mL. Roztwór mieszano na wytrząsarce z prędkością 230 rpm w temperaturze pokojowej (22±2°C), a następnie oddzielono roztwór od sorbentu poprzez wirowanie (12 000 rpm, 5 min.). Oznaczono zawartość niklu w fazie ciekłej stosując technikę ICP wykorzystując urządzenie: AA-6800; Shimadzu, Kyoto, Japonia. Uzyskano następujące wartości parametru procesu biosorpcji: MRE 19 $\mu g\ h^{-1}\ mg^{-1}$, R 37,3%.

P r z y k ł a d III

Wykorzystanie α-(1→3)-glukanu wyizolowanego z owocników twardziaka (*Letinus edodes*) do sorpcji cynku.

W kolbach miarowych o pojemności 25 mL sporządzono roztwór wodny Zn(II) o stężeniu 100 mg/L, rozcieńczając wodą dejonizowaną roztwór podstawowy (stężenie 1000 mg/L). Proces biosorpcji prowadzono w przedziale pH 4–7, optymalne pH roztworu dla sorpcji metalu było równe 5. Następnie do falkonów odważono po około 0,01 g α-glukanu i zalano roztworem Zn(II) w objętości 10 mL. Roztwór mieszano na wytrząsarce z prędkością 230 rpm w temperaturze pokojowej (22±2°C), a następnie oddzielono roztwór od sorbentu poprzez wirowanie (12 000 rpm, 5 min.). Oznaczono zawartość niklu w fazie ciekłej stosując technikę ICP wykorzystując urządzenie: AA-6800; Shimadzu, Kyoto, Japonia. Uzyskano następujące wartości parametru procesu biosorpcji: MRE 9,9 $\mu g\ h^{-1}\ mg^{-1}$, R 22,6%.

P r z y k ł a d IV

Wykorzystanie α-(1→3)-glukanu wyizolowanego z owocników twardziaka (*Letinus edodes*) do sorpcji ołowiu.

W kolbach miarowych o pojemności 25 mL sporządzono roztwór wodny Pb(II) o stężeniu 100 mg/L, rozcieńczając wodą dejonizowaną roztwór podstawowy (stężenie 1000 mg/L). Proces biosorpcji prowadzono w przedziale pH 4–7, optymalne pH roztworu dla sorpcji metalu było równe 5. Następnie do falkonów odważono po około 0,01 g α-glukanu i zalano roztworem Pb(II) w objętości 10 mL. Roztwór mieszano na wytrząsarce z prędkością 230 rpm w temperaturze pokojowej (22±2°C), a następnie oddzielono roztwór od sorbentu poprzez wirowanie (12 000 rpm, 5 min.). Oznaczono zawartość niklu w fazie ciekłej stosując technikę ICP wykorzystując urządzenie: AA-6800; Shimadzu, Kyoto, Japonia. Uzyskano następujące wartości parametru procesu biosorpcji: MRE 33 $\mu g\ h^{-1}\ mg^{-1}$, R 71,5%.

Wyniki uzyskane w przykładach I–IV, zestawiono w Tabeli 1 poniżej, razem z wynikami uzyskanymi w badaniach biosorpcji metali ciężkich, przeprowadzonych przy analogicznych parametrach procesu na α-(1→3)-glukanie wyizolowanym z owocników boczniaka ostrogowatego (*Pleurotus ostreatus*) jako kontroli.

T a b e l a 1

Pochodzenie α-(1→3)-glukanu	Metal	Wydajność usuwania metalu (MRE) [$\mu g\ h^{-1}\ mg^{-1}$]	Współczynnik biosorpcji (R) [%]
Twardziak/shiitake *Letinus edodes*	Ni(II)	9,9	22,3
	Cd(II)	19	37,7
	Zn(II)	9,9	22,6
	Pb(II)	33	71,5
Boczniak ostrogowaty *Pleurotus ostreatus*	Ni(II)	3,7	9,7
	Cd(II)	5,1	12,6
	Zn(II)	4,3	9,1
	Pb(II)	14	36,2

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie α-(1→3)-glukanu jako biosorbentu pochodzenia grzybowego do usuwania metali ze środowisk wodnych.
2. Sposób usuwania metali ze środowisk wodnych z użyciem biosorbentu pochodzenia grzybowego, **znamienny tym**, że biosorbentem jest α-(1→3)-glukan w postaci proszku, stosowany w ilości minimum 8 mg czystego α-(1→3)-glukanu na 10 mL wodnego roztworu o stężeniu sorbowanych metali rzędu 50–150 mg/L i przy pH procesu biosorpcji wynoszącym od 4 do 7.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że α-(1→3)-glukan wyizolowany jest z owocników twardziaka jadalnego.
4. Sposób według któregokolwiek z zastrz. 2 do 3, **znamienny tym**, że pH procesu biosorpcji wynosi 5.

Rysunki

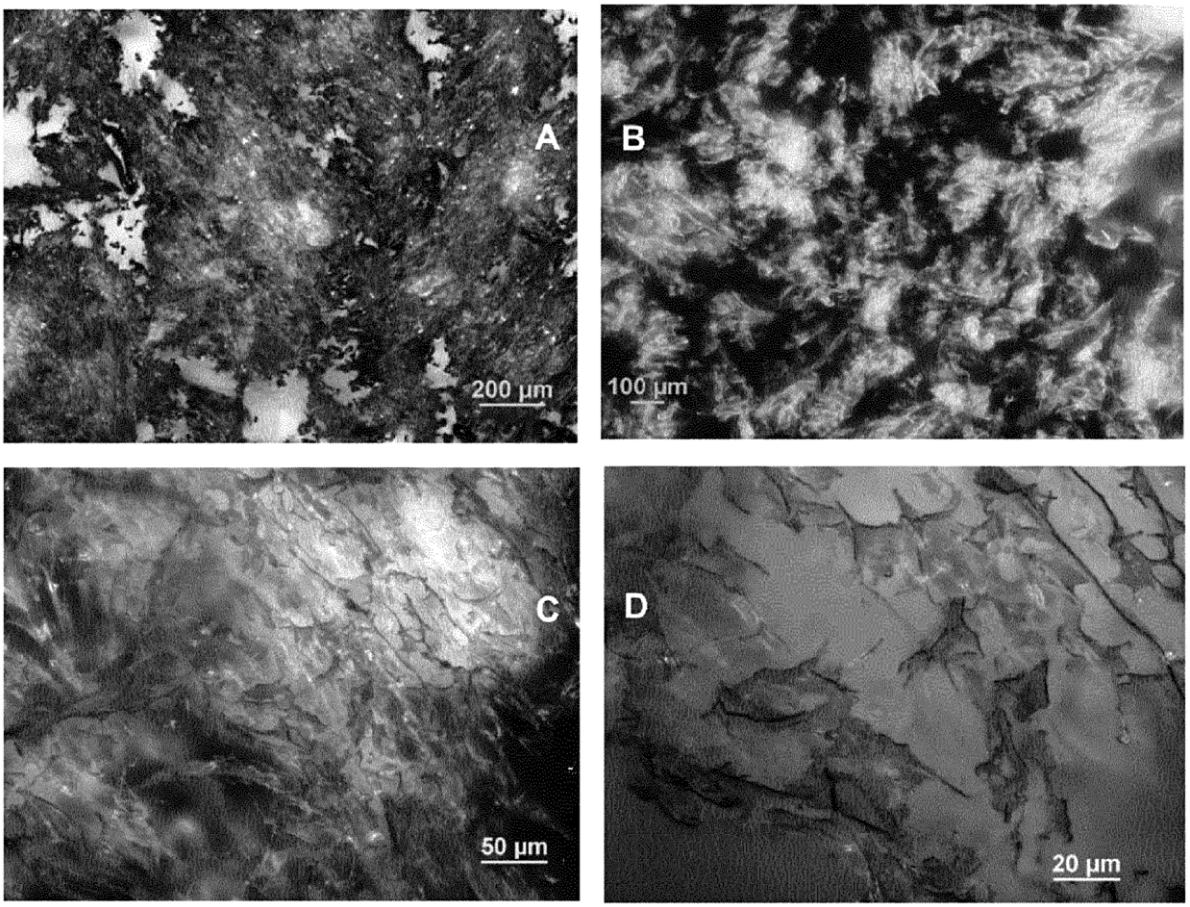


Fig.1

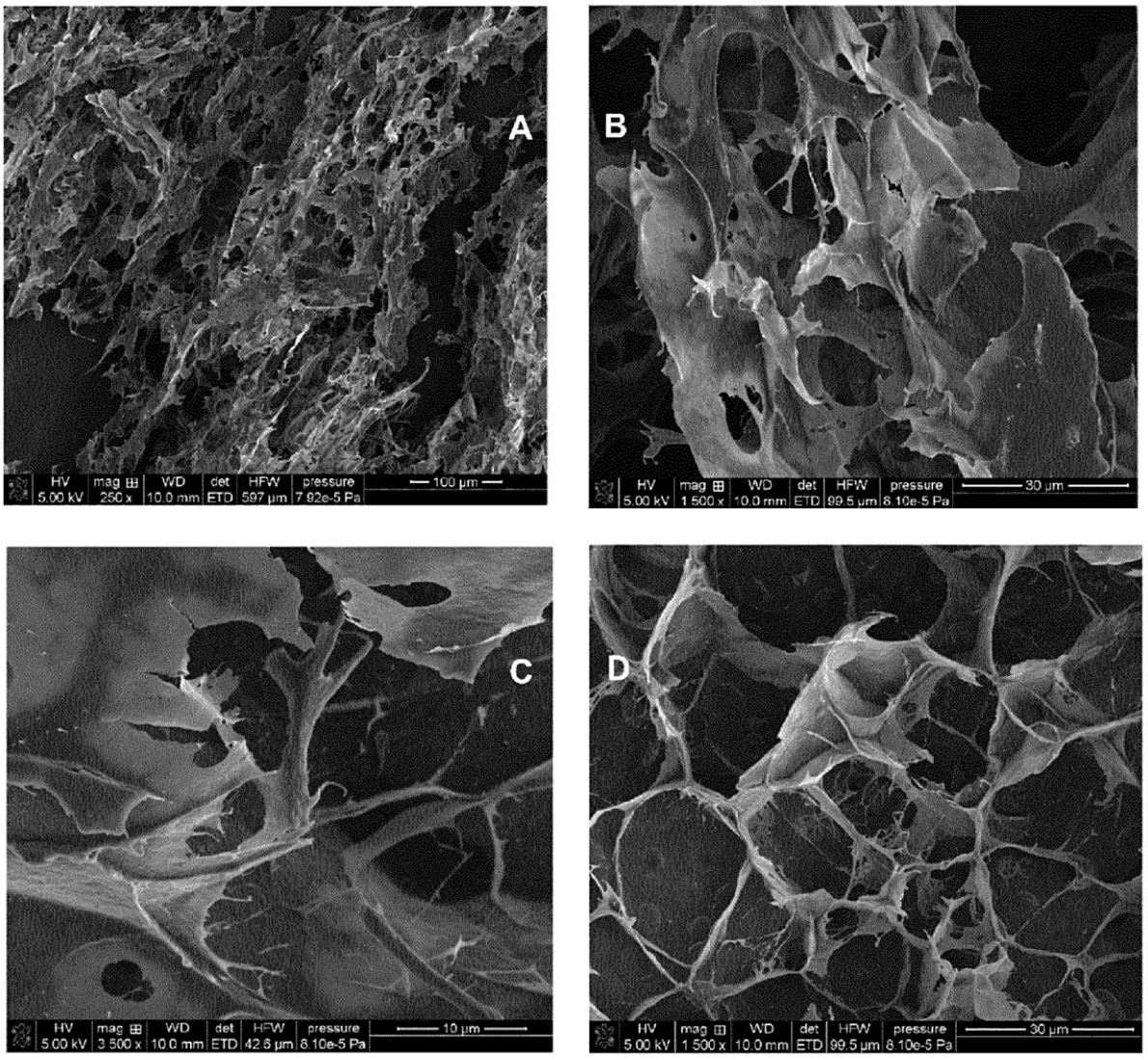

A
HV 5.00 kV | mag 250 x | WD 10.0 mm | det ETD | HFW 597 µm | pressure 7.92e-5 Pa | 100 µm
B
HV 5.00 kV | mag 1 500 x | WD 10.0 mm | det ETD | HFW 99.5 µm | pressure 8.10e-5 Pa | 30 µm
C
HV 5.00 kV | mag 3 500 x | WD 10.0 mm | det ETD | HFW 42.6 µm | pressure 8.10e-5 Pa | 10 µm
D
HV 5.00 kV | mag 1 500 x | WD 10.0 mm | det ETD | HFW 99.5 µm | pressure 8.10e-5 Pa | 30 µm

Fig.2

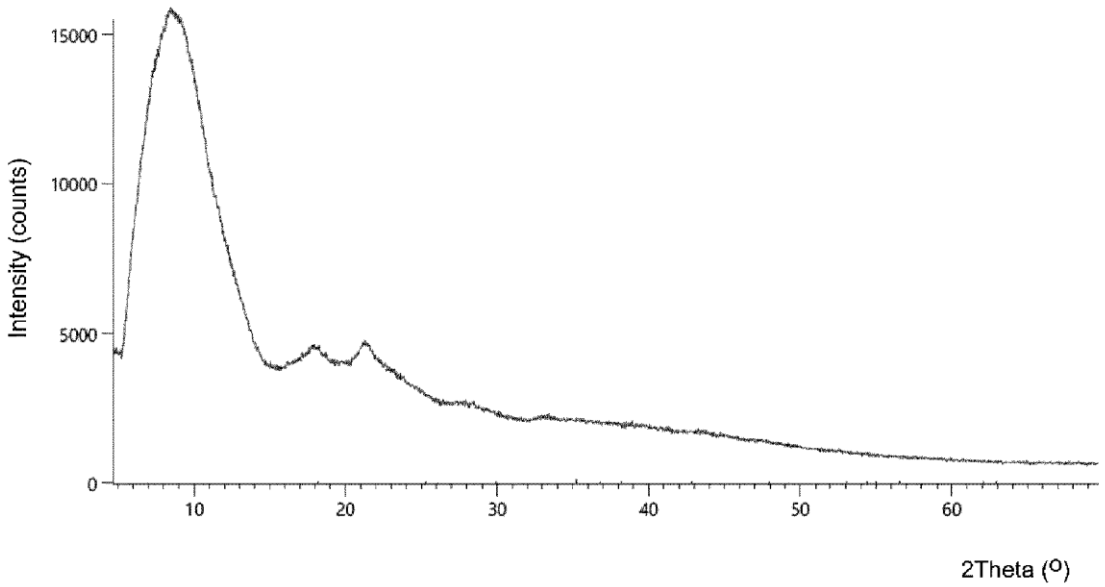

15000
10000
5000
0
Intensity (counts)
10
20
30
40
50
60
2Theta (O)

Fig.3

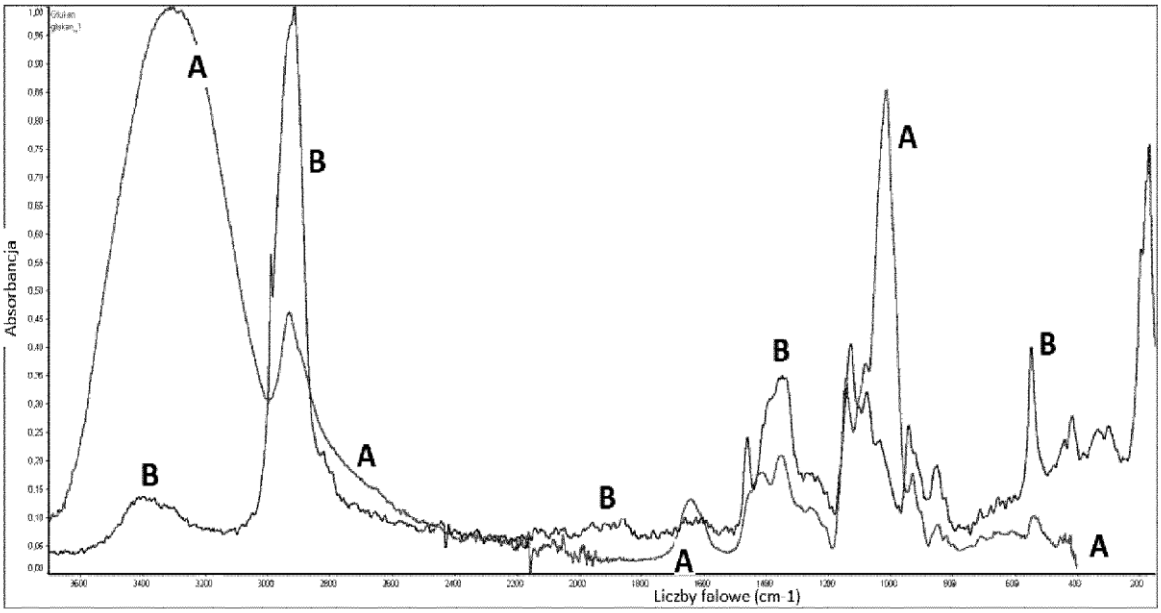

Absorbancja
Liczby falowe (cm-1)
A
B
A
B
A
B
B
A
B
A

Fig.4

Departament Wydawnictw UPRP
Cena 2,46 zł (w tym 23% VAT)