

# **Cílená volba vhodného biologického činitele pro rozklad lignocelulosového komplexu**

**Ing. Jiří Mikeš, Ing. Martina Siglová, Ph.D., Ing. Miroslav Minařík, Ing. Vlastimil Pištěk**

**EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice  
e-mail: [eps@epsro.cz](mailto:eps@epsro.cz), web: [www.epsro.cz](http://www.epsro.cz)**

Nalezení prostředků, jak rozšířit spektrum biologicky rozložitelných odpadů pro další praktické aplikace spojených s tvorbou energie nebo biomasy, má společného jmenovatele v podobě překlenutí překážky spojené s rozkladem lignocelulosového komplexu. Ačkoliv existuje mnoho způsobů založených na fyzikálně-chemických principech, jejich nevýhodou je vysoká hodnota provozních nákladů. Biologické řešení představuje způsob ekonomicky výrazně výhodnější, nicméně naráží na poměrně úzké spektrum kmenů, s nimiž lze potenciálně počítat pro konstrukci vhodného technologického mezistupně, jehož cílem je transformovat lignocelulosový komplex do podoby mikroorganismy využitelného substrátu. Smyslem tohoto příspěvku je ukázat cestu izolace, selekce a propagace takových mikrobiologických činitelů, kteří splňují výše uvedené požadavky na ně kladené.

## **Úvod**

Lignocelulosový komplex je dominující strukturální element v biomase rostlinného původu. Právě tato hmota tvoří značný podíl biologicky rozložitelných odpadů (BRO), na které je v současnosti nahlíženo výrazně jinak, zejména pod vlivem měnící se legislativy v odpadovém hospodářství. Ústup od pouhé depozice na skládkových plochách směrem k aktivnímu využívání jako substrátu pro tvorbu biomasy (sorbenty), mikrobiálních produktů (bioethanol) nebo zelené energie (anaerobní digesce) je hlavním trendem v odpadovém managementu BRO. S ohledem na skutečnost, že technologie zmíněných výrob jsou poměrně propracované, racionalizované a v rámci možností efektivní, představuje kritický bod právě již uvedená konverze lignocelulosového komplexu v fragmenty, jež mikroorganismy, na nichž jsou tyto technologie postavené, dokážou zapojit do svých metabolických systémů.

## **Biologie rozkladu lignocelulosového komplexu**

V přirozeném prostředí sehraává biologický rozklad ligninu, celulosy a hemicelulos důležitou roli v procesu koloběhu hmoty na Zemi. Výskyt organismů disponujících nástroji pro enzymový útok vazeb přítomných v uvedených molekulárních strukturách lze vymezit zejména na ty lokality, kde dlouhodobá depozice celulosových materiálů, dřevní hmoty apod. vytvořila selekční tlak v podobě substrátu pro přítomná mikrobiální společenstva, která se musela přizpůsobit této skutečnosti z hlediska přežití (kompostárny, skládky, trouchnivějící dřevo). Enzymy, které hydrolyticky štěpí příslušné vazby v makromolekulách ligninu a celulosy (lignasy a celulasy) disponuje určitá skupina organismů, která tímto způsobem získává zdroj uhlíku a energie v rámci svého metabolismu. Jedná se o enzymy vylučované do prostředí vně buňky, čímž se makromolekuly štěpí na fragmenty, které následně jsou prostřednictvím vhodných přenašečových systémů dostávány dovnitř buňky. Zde metabolický systém zabudovává tyto zdroje uhlíku, dusíku a dalších biogenních prvků do procesu tvorby buněčných složek a zároveň je může zapojovat i do metabolismu energetického (plní funkci akceptoru elektronů).

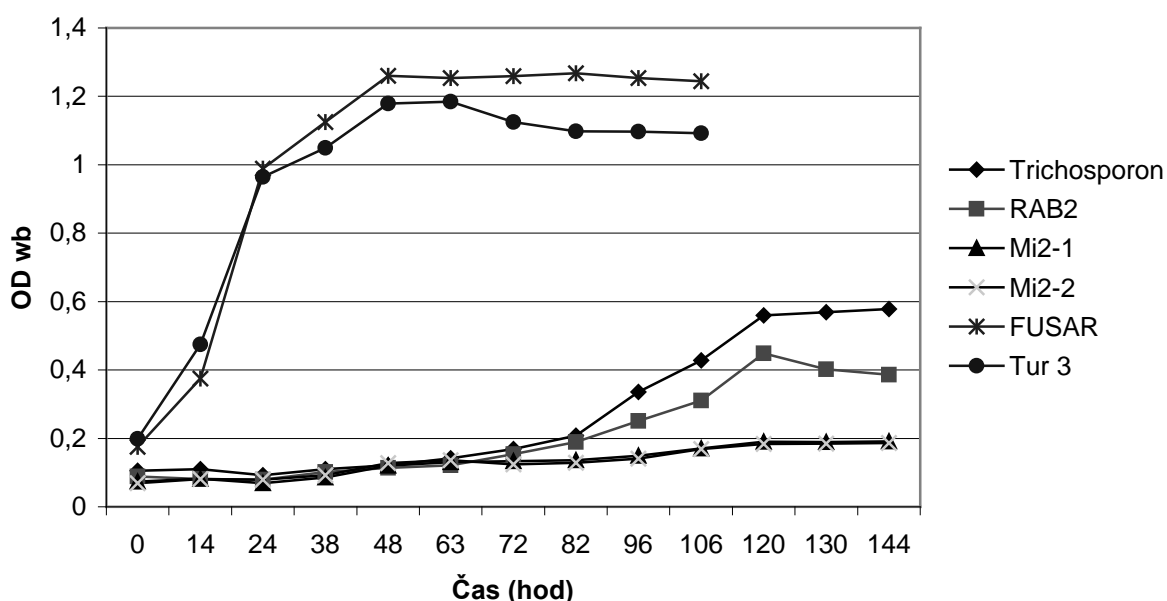
Nejlépe popsanou oblastí této součásti mikrobiologie je fyziologie hub dřevokazných, zejména tzv. hub bílé a červené hniloby. Dále řada plisňových taxonů, které žijí na rostlinném těle, disponuje metabolickými nástroji, jimiž aktivně narušuje strukturu rostlinných pletiv s cílem získat substrát pro svůj růst a reprodukci. Tito tzv. fytopatogeni v konečném důsledku představují skupinu, na niž lze upřít zájem při hledání vhodných činitelů dekompozice lignocelulosového komplexu. Podmínkou úspěšného začlenění těchto organismů do vyvíjených biotechnologií je dostatečné poznání jejich životních nároků, včetně poznání míry vlivu vnějšího prostředí na uvedené životní funkce. Standardně volený postup při rozšiřování spektra vhodných technologických kmenů je v první fázi vymezení lokality odběru vzorku matric prostředí. Zájem se orientuje zejména tam, kde je dřevní a jiná rostlinná

hmota přítomna v různých stupních rozkladu. V systémech, které jsou produktem lidského úsilí tak jde zejména o kompostárny, úložiště biologicky rozložitelného odpadu, skládkové systémy apod.

#### Strategie hledání biologického činitele

Vlastnímu praktickému bloku předcházelo podrobné zmapování publikovaných výstupů v odborných periodikách, které se týkají problematiky produkce enzymů štěpících vazby v lignocelulosem komplexu. Obecně je za nejvíce prostudovaný druh považována kvasinka *Trichoderma reesei* (disponuje velmi účinnými enzymy štěpení celulosy a hemicelulos). Již od 50. let minulého století se podařilo shromáždit mnoho výsledků a zejména je efektivně převést do průmyslové podoby ve výrobě příslušných enzymů (Nieves 1998). Její nevýhodou je neschopnost štěpit lignin. V této rovině se však velmi osvědčil jeden ze zástupců hub bílé hniloby, konkrétně plíseň *Penicillium chrysosporum*, jež produkuje unikátní sadu enzymů s vysokou účinností rozkladu komplexní struktury ligninových molekul (Akin 1995). Také mezi bakteriemi existuje určitá skupina mikroorganismů vybavená schopností rozkládat lignin a celulosu. Vedle mechanismu, kdy enzym je vylučován mimo buňku, se zde lze setkat i s příslušnými enzymy ukotvenými v buněčné stěně těchto bakterií. Některé účinné taxony byly nalezeny v zaživacím traktu hospodářských přežvýkavců. Konkrétně se jedná v případě bakteriálních zástupců štěpících lignin a celulosu o rody *Cellulomonas* a *Ruminococcus*.

Hledání vhodných biologických činitelů bylo postaveno na dvou směrech, jak příslušné mikroorganismy získat. V první řadě se vytypovaly lokality, na nichž lze předpokládat přítomnost mikrobiální aktivity vedoucí k rozkladu materiálů s obsahem celulosy, hemicelulos a ligninu. Matrice pro izolace vhodných kmenů pocházely z kompostáren, skládek biologického odpadu, odpadních proudů potravinářských závodů apod. Druhou možností je zkoušení sbírkových kmenů, u nichž lze tuto enzymovou aktivitu předpokládat nebo je dokonce známa. Proces získání kmenů z přirozeného prostředí se sestává z izolace, selekce a propagace biologických činitelů. K uvolnění mikroorganismů z pevných matic (zejména půda a horninové prostředí) byl použit standardní izolační roztok pyrofosfátu sodného. Izolace dále pokračovala formou kultivačních vyšetření (komplexní agar) s cílem získat přehled o přítomných kmenech ve vytipoovaných vzorcích a vytvořit z nich biologicky čisté kultury pro další experimentální práci. Tou byla pasáž selekční, jejíž hlavní smysl spočívá v oddělení kmenů disponujících biodegradačním potenciálem od těch, které tuto vlastnost postrádají. Tyto pokusy byly provedeny v režimu submersní kultivace, tzn. v baňkách s minerálním médiem a definovaným obsahem modelového substrátu, jenž byl zvolen v podobě rozpustné celulosy (CMC). Nárůst biomasy se sledoval měřením hodnot absorbance v závislosti na čase. Získané hodnoty jsou znázorněny na obrázku 1.



**Obr. 1** Kinetika růstu vybraných mikrobiálních kmenů po provedené selekci; *Trichosporon* (kvasinka) RAB2, Mi2-1, Mi2-2, Tur 3 (bakterie), FUSAR (plíseň)

Z těchto výstupů je zřejmé, že velice dobrých výsledků lze dosahovat aplikací eukaryotních kmenů. Předpoklady pro tuto schopnost lze spatřovat zejména ve vyšším stupni metabolické regulace a schopnosti vytvářet vhodné typy enzymů pro rozklad lignocelulosové hmoty. Uvedené bakteriální kmeny (RAB2, Mi2-1, Mi2-2, Tur 3) mohou sehrát svou důležitou roli při konstrukci mikrobiálních konsorcií, tedy společenstev, v nichž figurují 2 a více mikrobiálních druhů, které si vzájemně nekonkurují.

#### Závěr

Smyslem tohoto příspěvku je ukázat směr výzkumu a vývoje vedoucího k rozšíření možností ve využívání lignocelulosových materiálů pro zavedené biotechnologie (mezi které produkce bioplynu bezesporu patří). Na tuto práci bude navazovat další zpřesňování souboru informací o životních projevech získaných mikroorganismů za účelem efektivního nasazení v průmyslové praxi. Náleží sem vedle optimalizačních kroků technologického charakteru, také legislativní aspekt spojený se stanovením míry zdravotních rizik a s tím související identifikace.

#### Literatura:

**Akin** DE, Rigsby LL, Sethuraman A, et al. (1995): Alterations in the structure, chemistry, and biodegradation of grass lignocellulose treated with white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Cyathus stercoreus*. Appl. Environ. Microbiol. 61:1591-1598.

**Nieves** RA, Ehrman CI, Adney WS, et al. (1998): Technical communication: survey and commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. World J. Microbiol. Biotechnol. 14:301-304.

**Naše poděkování za financování uvedeného projektu patří programu podpory výzkumu a vývoje MPO, vedeném pod identifikačním číslem projektu 2A 2TP1/088 (MPO ČR).**