

BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE BUTANOLU

BARBORA BRANSKÁ

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
barbora.branska@vscht.cz

Došlo 10.7.23, přijato 23.11.23.

Biotechnologická produkce butanolu a dalších doprovodných rozpouštědel má více než stoletou historii a v současnosti představuje alternativní možnost produkce žádaných chemikálií z různých odpadních proudů v souladu s konceptem oběhového hospodářství. Tento přehledový článek shrnuje současný stav možné průmyslové produkce, představuje hlavní producenty rozpouštědel, solventogenní klostridia a jejich metabolismus spolu s hlavními aspekty, které ovlivňují fyziologické a produkční charakteristiky. Poslední část je věnována substrátům, které mohou být k produkci biobutanolu využívány, zejména lignocelulose, všudypřítomné odpadní rostlinné hmotě, do níž jsou stále vkládány velké naděje ve spojitosti s velkoobjemovou biotechnologickou produkcí mnoha komodit.

Klíčová slova: butanol, ABE fermentace, *Clostridium*, lignocelulosa, alternativní substráty

Obsah

1. Průmyslová produkce butanolu – vize a skutečnost
2. Solventogenní zástupci rodu *Clostridium*
 - 2.1. Centrální metabolismus solventogenních klostridií a tvorba cílových produktů
 - 2.1.1. Klasická teorie ABE fermentace a její regulace
 - 2.1.2. Úloha redoxního potenciálu v regulaci solventogeneze, tvorba H₂
 - 2.2. Sporulace jako stresová odpověď?
3. Využití alternativních surovin k produkci rozpouštědel
 - 3.1. Využití lignocelulosity
 - 3.1.1. Inhibitory z lignocelulosity a jejich působení na produkční organismy
 - 3.2. Nelignocelulosové substráty
4. Závěr

1. Průmyslová produkce butanolu – vize a skutečnost

Historie průmyslové produkce rozpouštědel butanolu a acetonu sahá do počátku 20. století a nedávno slavila své 100. výročí. Poměrně málokdo ví, že patřila spolu s výrobou lihu k jednomu z největších průmyslových biotechnologických aplikací na světě. Továrna na fermentační produkci butanolu stála dokonce i na území České republiky a to v Rájci nad Svitavou¹. Poměrně záhy po svém rozvoji byla ale vytlačena levnější chemickou výrobou a zažívala pouze krátká období vzrůstu hlavně v souvislosti s válečnými konflikty a nedostatkem surovin.

V 70. letech 20. století zbývala ve světě jen torza výrobních továren, a to v Africe a Asii, později byla výroba ukončena i tam.

Začátkem 21. století byla myšlenka biotechnologické produkce rozpouštědel oprávněna ve snaze produkovat čisté chemické látky z obnovitelných surovin a ekologičtější způsobem. Biotechnologická produkce butanolu budila opět velké naděje, tentokrát jako alternativní biopalivo, neboť jeho fyzikálně-chemické vlastnosti vyhovují spalovacím motorům používaným v automobilové dopravě dokonce více než dnes již běžně přidávaný bioethanol². Vědecké skupiny po celém světě začaly hledat cesty, jak zvýšit produkci butanolu, upravovaly motory pro využití čistého butanolu, postavily několik dobře fungujících prototypů, výrobci a dodavatelé pohonných hmot si od butanolu slibovali mnohé a začali se připravovat na jeho implementaci. V létě roku 2006 oznámili dva ropní giganti BP a DuPont spojení svých sil ve snaze dostat na trh toto nové aditivum a přestavět obrovské kapacity výroby ethanolu na produkci butanolu³.

Biobutanol je vyráběn přirozeně, fermentační cestou mikroorganismy, které patří do skupiny tzv. solventogenních klostridií v procesu známém jako ABE fermentace (A, B a E značí první písmena hlavních produktů primárního metabolismu: acetonu, butanolu a ethanolu). Řada těchto solventogenních klostridií má navíc velmi široký utilizační potenciál ve vztahu k použitým zdrojům uhlíku i dusíku⁴⁻⁶, což ještě umocňuje jejich potenciál ve výrobě chemikálií z obnovitelných surovin. Bohužel, i výčet omezení je poměrně rozsáhlý a mezi ty největší se řadí dvoufázovost celého procesu, ve kterém dochází nejprve k tvorbě určitého množství kyselin (octové a máselné), a tím ke

ztrátám vstupní suroviny na nežádoucí produkty. Hlavní problém ale spočívá v nízké koncentraci produkovaných rozpouštědel způsobené jejich toxicitou vůči producentovi. Přirozeně se koncentrace butanolu pohybuje u divokých kmenů kolem 10 g l^{-1} (většinou od 8 do 12 g l^{-1}) a v případě „super-producentů“ maximálně okolo 20 g l^{-1} s nejslibnějšími výsledky pro *Clostridium acetobutylicum* JB200, který je schopen tvořit 19 g l^{-1} butanolu⁷ a *Clostridium beijerinckii* BA101 (cit.⁸) s koncentrací až 21 g l^{-1} . Veškeré snahy přimět mikroorganismy k vyšší produkci končí u jednotek či desítek procent zlepšení, což ale stále zůstává velmi daleko za koncentracemi dosahoványými při produkci ethanolu a za současné situace je izolace produktu ekonomicky nerentabilní. Teoretické hodnoty pro rentabilní průmyslovou produkci se pohybují okolo 50 g l^{-1} butanolu s produktivitou minimálně $3 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (cit.⁹).

Přes velké naděje vkládané do butanolu tak ani v době sepsování tohoto textu není ve světě žádný fungující průmyslový provoz. Samozřejmě s přihlédnutím k dostupným pramenům. Na evropské úrovni byla novodobá komerční výroba zastoupena firmou Green Biologics, kterou založil v roce 2003 v Oxfordu Edward Green a která stála za konstrukcí několika pilotních provozů ve Velké Británii a Spojených státech¹⁰. Dle dostupných informací ale žádný z těchto provozů dnes nestaví své komerční aktivity na produkci butanolu. Současná snaha nejen Evropské unie o udržitelnost a oběhové hospodářství, primárně využívající již existující zdroje, dává mikrobiální produkci butanolu (ve směsi s acetonem a ethanollem) ještě stále určitou naději. Průkopníky obnovy průmyslové produkce ABE z odpadních surovin je anglická firma Celtic Renewables, která představila možnost produkce biobutanolu ze zbytků po výrobě whisky a která staví v Caledon Green ve skotském Grangemouthu komerční zpracovatelský závod¹¹, který by měl zároveň sloužit i jako demonstrační jednotka.

2. Solventogenní zástupci rodu *Clostridium*

Rod *Clostridium* byl poprvé popsán v roce 1880 (cit.¹²) a zahrnuje obsáhlou skupinu mikroorganismů z kmene *Firmicutes* (nově *Bacillota*¹³), jejichž charakteristickými znaky jsou nízký obsah GC bazí, obligátní anaerobiosa, tvorba tyčinek s grampozitivní stavbou buněčné stěny a produkce endospor. Taxonomické studie postavené na analýze dostupných genomů a 16S rRNA ale ukazují, že se jedná o rod zahrnující mnohé, jen vzdáleně příbuzné organismy^{14–16}, které pravděpodobně čeká v dohledné době reklasifikace. V současnosti je rod rozdělen do sedmi hlavních klastřů a největší z nich, klastř I, je jako jediný označován jako „pravá klostridia“¹⁶. Do tohoto klastru spadají všechna dosud popsaná solventogenní klostridia spolu s celou řadou dalších, mnohdy známějších a prostudovanějších patogenních zástupců, jako jsou *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* či *Clostridium perfringens*. Nicméně, jak se zdá, schopnost produkovat toxiny není

charakteristickým taxonomickým znakem a mezi jednotlivými druhy byla předávána pravděpodobně pomocí horizontálního přenosu genů¹⁶, což je předání genetické informace mimo standardní (vertikální) přenos z rodičovské generace na její potomky. Průmyslově uvažované druhy a kmeny pro produkci rozpouštědel jsou tedy sice blízkými příbuznými klostridiálních patogenů, ale geny pro produkci známých toxinů neobsahují.

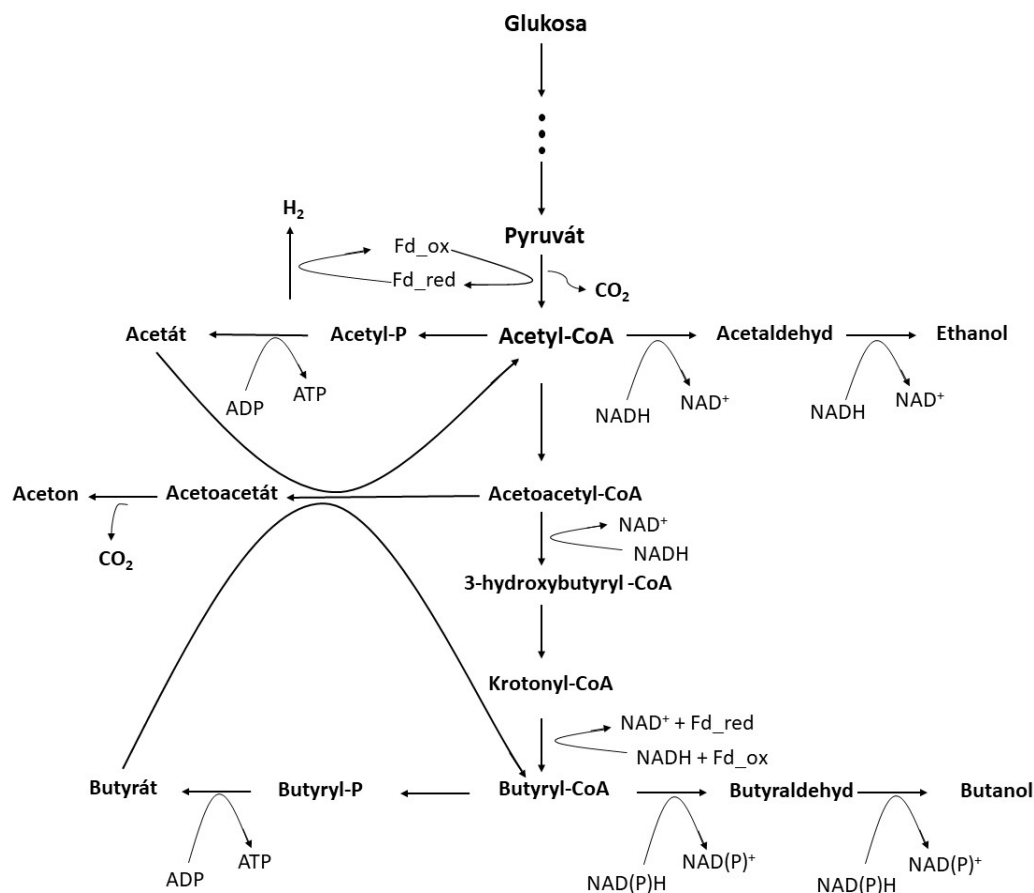
Mezi nejvýznamnější průmyslově uvažované druhy patří *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* a *C. saccharobutylicum*. Do těchto druhů byly mnohé kmeny zařazeny až v roce 2001, kdy Keis a spol.¹⁷ navrhli toto třídění na základě fenotypových projevů a s využitím molekulárně genetických přístupů včetně analýzy 16S rRNA. Ve starší literatuře jsou tak některé druhy uvedeny pod jinými názvy a naopak, některým druhům byl navržen název nový. Fenotypová charakteristika jednotlivých druhů je dodnes v mnohých případech matoucí. Z porovnání dostupných genomů vyplývá, že jejich evoluce není přímočará a přiřazení jednotlivých kmenů konkrétním druhům vyžaduje spíše srovnání na celogenomové úrovni než pouze na základě přítomnosti některých genů či fenotypových znaků¹⁸.

2.1. Centrální metabolismus solventogenních klostridií a tvorba cílových produktů

Hlavní intermediáty a enzymy centrálního metabolismu u solventogenních klostridií jsou poměrně dobře známy a popsány, nicméně nevyřešenou otázkou zůstává, jak je regulován tok těchto látek a jejich redistribuce do rozvětveného schématu ABE fermentace. Metabolické schéma vycházející z glukosy začíná glykolýzou a poté se rozděluje do dvou hlavních směrů, viz obr. 1. Prvním je tvorba kyselin a druhým je tvorba rozpouštědel. Nejedná se ale o separátní metabolické cesty, nýbrž o propojený systém, do kterého vstupuje ještě další proměnná a tou je regenerace ferredoxinu a redukovaných kofaktorů NADH a NADPH a efektivní využití energie s tím spojené. V neposlední řadě pak podíl dvou možných transportních mechanismů pro glukosu, fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferasový systém (PTS) a ATP-dependentní přenos využívající enzym glukokinasu.

2.1.1. Klasická teorie ABE fermentace a její regulace

Obecně přijímaná klasická teorie vychází ze studia nejprostudovanějšího kmene solventogenních klostridií *C. acetobutylicum* ATCC 824. Uvádí, že v první, exponenciální fázi růstu, dochází k tvorbě kyselin octové a máselné (v menším množství se může tvořit i kyselina mléčná z pyruvátu, ta ale nepatří mezi hlavní metabolity). Tím dochází k rychlému okyselování růstového média, což v určitém bodě znamená pro buňky značnou zátěž, neboť se vlivem nízkého pH zvyšuje koncentrace nedisociovaných kyselin, které mohou přecházet přes membrány, kde v intracelulárním prostoru s vyšším pH opět disociují a tím okyselují intracelulární kompartment. K udržení vitální hodnoty intracelulárního pH pak buňky musí proto-

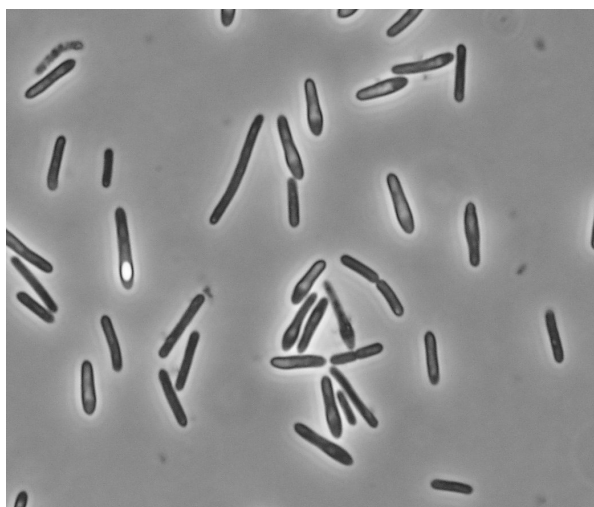


Obr. 1. Obecné metabolické schéma Aceton-Butanol-Ethanolové fermentace

ny za vynaložení velkého množství energie pumpovat ven¹⁹ a hrozí nedostatek ATP i kolaps protonmotivní síly. Aby se buňky vyrovnaly s touto nežádoucí situací, „zapínají“ druhou část svého centrálního metabolismu, kterou je tvorba rozpouštědel a reutilizace vzniklých kyselin, čímž dochází k opětovnému růstu pH (cit.²⁰). Produkovaná rozpouštědla představují ale jen dočasné řešení, neboť jejich toxicita vůči produkčním buňkám je vysoká a s dosažením poměrně nízké koncentrace buňky odumírají. Z toho důvodu v tom samém okamžiku, kdy přechází kultura z tzv. acidogeneze do solventogeneze je nastartován další záchranný mechanismus, kterým je tvorba endospor, které předchází akumulace polysacharidu granulosity. Akumulace granulosity vede k viditelnému rozšiřování buňek, jejichž tvar, typický pro klostridia, pak připomíná „doutníčky“ (angl. cigar shape). Endospory jsou zpravidla širší než vegetativní buňky a je pozorován tvar podobný vřetenu (angl. spindle like), viz obr. 2. Obě klíčové událos-

ti v životním cyklu klostridií, tedy přepnutí z acidogeneze do solventogeneze a nastartování sporulačního cyklu by měl řídit globální transkripční regulátor Spo0A (cit.²¹). Pravdou ale je, že skutečný impuls a regulační mechanismus jak přechodu z acidogeneze do solventogeneze, tak zahájení sporulace nebyl zatím odhalen a jejich vzájemné propojení je otázkou názoru té či oné vědecké skupiny. Poslední výzkumy poukazují na roli malých nekódujících RNA (cit.²²) či mezibuněčné komunikace pomocí quorum sensing (QS)²³.

Většina dostupných experimentálních dat je pro kmeny *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 a *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. Oba druhy *C. acetobutylicum* i *C. beijerinckii* patří do prvního klastru klostridií, tj. *Clostridium sensu stricto*, a uvedené metabolické schéma (obr. 1) je pro oba zástupce víceméně společné, nicméně u obou druhů mohou být do metabolismu glukosy zapojeny jiné geny, alternativní dráhy a jejich regulace je



Obr. 2. Zobrazení různých morfologických forem bakterie *C. beijerinckii* v různých stádiích životního cyklu

v mnoha případech také odlišná²⁴. Zásadní rozdíl je i v lokalizaci genů pro solventogenezi. *C. beijerinckii* i většina průmyslově uvažovaných producentů má celou dráhu pro produkci rozpouštědel kódovanou v chromosomální DNA, zatímco u *C. acetobutylicum* se tato dráha nachází na megaplasmidu. Toto je pravděpodobně také důvod, proč si mnohé studie neodpovídají a jedna vyvrací tvrzení druhé. Mnohé poznatky získané pro kmen ATCC 824 jsou brány jako obecně platné, ale ve skutečnosti se ukazuje, že jde o kmen, který stojí poněkud stranou²⁵ a svými fenotypovými projevy se odlišuje od ostatních druhů uvažovaných pro průmyslovou výrobu rozpouštědel. V genomech obou druhů je často kódováno několik izoenzymů pro vybrané reakce fermentační dráhy, přičemž se aktivně zapojuje jen jeden, případně dochází k jejich výměně během různých fází životního cyklu²⁶.

I přes přetrvávající drobné neznámé v zapojení jednotlivých enzymů do ABE fermentace je proces poměrně dobře popsán a poznán. Je tedy s podivem, že se přes všechny pokročilé nástroje a poznatky zatím nikomu nepodařilo odhalit, co skutečně leží za zmiňovaným přepnutím metabolismu. Klasická teorie nízkého pH (cit.²⁷) spolu s akumulací kyselin staví na jednom z potenciálních regulačních pilířů, ale ten sám o sobě určitě nestačí. Jednak prosté přidání kyselin do média a snížení pH nestačí pro iniciaci solventogeneze a za druhé vedení kultivace za neutrálního pH vede taktéž k nezanedbatelné produkci rozpouštědel²⁸. Dalšími kandidáty na regulační funkci jsou v tomto případě redoxní potenciál a množství či poměr $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$, ADP/ATP , případně další.

2.1.2. Úloha redoxního potenciálu v regulaci solventogeneze, tvorba H_2

Redukční potenciál ve formě redukovaných pyridinových kofaktorů NADH a NADPH spolu s určitou hladinou ATP hraje roli nejen v regulaci metabolické změny, ale i v řadě dalších životních fází vegetativního i sporulačního cyklu klostridií. Z hlediska produkce žádaných metabolitů se ukázalo, že zvýšení intracelulární hladiny NADH zlepšilo růst a produkci rozpouštědel²⁹. Podobně tomu bylo i v mnoha dalších studiích, kde bylo zvýšení redukčního potenciálu dosaženo s využitím přidavku aditivních složek³⁰, přímou dodávkou elektronů³¹ nebo přidávkem elektronových mediátorů (typicky neutrální červeň, benzyl či metyl viologen)^{31–33}, jejichž přítomnost vede k odlišné redistribuci elektronů mezi redukované kofaktory, ferredoxin a vodík.

Jedním z primárních akceptorů elektronů v centrální metabolické dráze je ferredoxin. Typickou cestou jeho regenerace je tvorba vodíku, který patří (vedle CO_2) k hlavním plynným produktům ABE fermentace. Vzhledem k současné vizi budoucí energetické udržitelnosti a bezemisních biopaliv je vodík skloňován jako jedna z majoritních komodit uvažovaných jako alternativní biopalivo. Fermentačně vyráběný vodík se proto dostává do popředí zájmu mnohých výzkumných skupin. Přestože takto vyrobený H_2 skýtá řadu nevýhod a omezení pro využití ve stávajících palivových člancích (zejména vzhledem k požadavku na jeho čistotu), je dnes další žádanou komoditou. Díky tomu je zvýšena i pozornost na regulaci jeho produkce, identifikaci a charakterizaci vybraných hydrogenas, přičemž právě zástupci rodu *Clostridium* patří mezi mikroorganismy se širokým spektrem těchto enzymů³⁴. Podobně jako v regulaci centrální metabolické dráhy, i v regeneraci ferredoxinu a produkci vodíku existují poměrně zásadní rozdíly mezi druhy *C. acetobutylicum* a *C. beijerinckii*. Tím nejzásadnějším je přítomnost membránově vázaného komplexu Rnf u druhu *C. beijerinckii*, který u *C. acetobutylicum* zcela chybí.

Rnf komplex je proteinová struktura, jejíž název vychází z první popsané podobné struktury u *Rhodobacter – Rhodobacter nitrogen fixation*³⁵. Jde o elektronový transportní systém asociovaný s membránou, který neslouží pouze k fixaci plynného dusíku, jak by se z názvu mohlo zdát, ale je přítomen i v genomech bakterií, které nejsou schopny dusík fixovat. Rnf je Na^+ (případně H^+) translokasa, která využívá zbylou energii získanou z oxidace ferredoxinu při redukcí NAD^+ na přenos iontu přes cytoplasmatickou membránu proti jeho koncentračnímu gradientu^{36,37}. *C. beijerinckii* a řada dalších solventogenních klostridií²⁵ takto využívá energie uvolněné při regeneraci ferredoxinu k tvorbě elektrochemického gradientu na cytoplasmatické membráně. Tento gradient je pak možné využít na tvorbu ATP za účasti H^+ nebo Na^+ -dependentní F_0F_1 -ATP synthasy. Celý proces může probíhat i opačným směrem, kdy je naopak endergonická redukce ferredoxinu pomocí NADH poháněna energií získanou transportem protonů³⁸. Naopak u *C. acetobutylicum*, který Rnf komplex nemá, existují jen dvě hlavní cesty regenerace ferre-

doxinu a redukováných kofaktorů, a to přes produkci vodíku a redukováných produktů metabolismu.

2.2. Sporulace jako stresová odpověď?

Produkce rozpouštědel je tradičně spojována se sporulací. Buňky, které tvoří spory, vždy tvoří i rozpouštědla, přičemž ale rozpouštědla mohou být tvořena i buňkami, které nesporulují³⁹. Co však přesně leží za spuštěním i dokončením sporulačního cyklu u solventogenních klostridií je prozatím neznámo.

Sporulace je program asymetrického buněčného dělení, který je spuštěn v reakci na signály z vnějšího prostředí a jeho výsledkem je vznik diferencované podoby bakteriální buňky – spory. Spora je většinou vysoce rezistentním, dormantním stádiem, schopným přežít desetky let a možná i mnohonásobně více. Buňka původní, mateřská, po ukončení své role ve sporulačním cyklu zaniká. U bakterií se spory tvoří uvnitř buňky a správně se tedy označují jako endospory, nicméně běžně jsou označovány jen jako spory. Morfologické znaky sporulace jsou podobné všem známým sporulujícím bakteriím a z pohledu pozorovatelných a odlišitelných znaků je lze rozdělit do 7 stádií, jejichž popis je součástí mnohých mikrobiologických učebnic a pohled na tuto část se již desetky let nemění. To, co je zajímavé a je předmětem výzkumu, je genetické zázemí sporulace, její regulace a iniciace. Modelovým organismem pro studium sporulace je *Bacillus subtilis* a tudíž se většina poznatků o bakteriální sporulaci opírá o studium tohoto druhu a i v případě studia klostridiální sporulace se vychází z nastaveného modelu. Soubor genů souvisejících se sporulací se mezi rody liší, přičemž ve většině sporotvorných rodů je přítomno jen několik desítek hlavních genů. I v případě, kdy se jedná o homology, nemusí mít u zástupců klostridií a bacilů jejich produkty stejnou funkci^{40,41}. U obou druhů se pak nachází řada genů souvisejících se sporulací, ale postrádající homology v jiných rodech či druzích, u těchto se předpokládá, že zastávají převážně funkci regulační⁴². Z dostupných materiálů je zřejmé, že zejména regulace iniciace sporulace se diametrálně liší mezi zástupci rodu *Bacillus* a *Clostridium*^{40,43,44}.

Pochopení mechanismu iniciace sporulace by jistě napomohlo i odhalení spouštěcích mechanismů tohoto děje. Řada vědců akceptuje dlouho známou teorii, že sporulace je stresová odpověď vyvolaná zejména nedostatkem živin, která buňkám pomáhá překonat období nepřízně až do znovunalezení vhodného, na živiny bohatého prostředí. V případě klostridií je pak tím stresujícím faktorem stoupající koncentrace rozpouštědel, která, byť jsou buňce vlastní, působí na ni toxicky⁴⁵ a v závěrečných fázích letálně. Pravdivost těchto teorií je minimálně diskutabilní a ukazuje se, že stres může naopak sporulaci potlačit⁴⁶ a že jednu z klíčových regulačních rolí by mohla mít mezibuněčná komunikace v podobě quorum sensing^{47,48}. Klostridia jsou pleomorfní organismy a reagují na změny prostředí mnoha morfologickými projevy, kdy sporulace je jedním z limitních projevů a další vizuálně pozorovatelnou reakcí na stres je například prodlužování buněk^{49,50}.

3. Využití alternativních surovin k produkci rozpouštědel

Původní biotechnologické výroby ABE stavěly na snadno užitelných substrátech, jako jsou bramborový škrob, řepná melasa či šťáva z cukrové třtiny²⁰. Žádný z těchto substrátů už ale nelze v dnešní době považovat za přijatelný, neboť jejich zpracování na nepotravinářské komodity přímo konkuruje výrobě potravinářské a přesto, že se jedná o zdroj obnovitelný, jen těžko lze jeho masivní zpracování na rozpouštědla považovat za udržitelné. V bio-palivářské terminologii se jedná o suroviny tzv. první generace a přesto, že za ně stále nemáme žádnou adekvátní náhradu, veřejná i politická vůle jasně vyjadřuje odklon od jejich využívání a budoucí technologie musí stavět na surovinách jiných. Zde se sice nabízí celá řada možností, ale všechny mají svá omezení.

Materiálem tzv. druhé generace, do které je vkládána velká naděje, je odpadní lignocelulosa biomasa. Její využití v biotechnologiích ale není zdaleka triviální, stejně jako využití surovin dalších.

3.1. Využití lignocelulosity

Lignocelulosa biomasa, jak název sám napovídá, je složena převážně z celulosy a ligninu. Další významnou složkou jsou tzv. hemicelulosity, což jsou heteropolysacharidy sestávající z různých druhů monomerních jednotek a jejich složení i zastoupení je závislé na zdrojovém organismu. Všechny tyto komponenty jsou spolu vzájemně velmi úzce provázány a vytvářejí strukturu, která je základní složkou sekundární buněčné stěny rostlin⁵¹. Jako taková je tedy téměř neomezeným obnovitelným zdrojem, který v sobě navíc nese záporný příspěvek k bilanci oxidu uhličitého spotřebovaného pro vlastní tvorbu rostlinné hmoty. V součtu se tedy právě lignocelulosa jeví jako jasný klíč k uhlíkové neutralitě, ale... sekundární buněčná stěna slouží rostlinám nejen jako strukturní komponenta, ale také jako funkční struktura k ochraně před působením vnějších vlivů, a to jak biotických, tak i abiotických. Komplex těchto tří polymerů je natolik odolný, že je nejprve nutné celý komplex rozvolnit za podmínek, se kterými rostlina během svého dlouhého vývoje nepočítala – tj. za vysoké teploty, tlaku, působení alkalického či kyselého prostředí, ozónu, rozpouštědel, iontových kapalin a dalších⁵². Tento, teprve první krok, je často natolik energeticky náročný, že významně posouvá dosud neutrální bilanci CO₂ a neobnovitelných zdrojů, směrem ke kladným hodnotám. Těchto fyzikálních a fyzikálně chemických předúprav je dnes známá a popsána celá řada a jejich volba ovlivňuje vlastnosti výstupního materiálu, který je pak dále zpracováván.

Jsou-li formy předúpravy šetrné, je výsledkem takového ošetření většinou pevná složka bohatá na celulosu s nižším obsahem hemicelulosity a ligninu, přičemž v kapalném podílu jsou přítomny rozpustné frakce hemicelulosity, případně ligninu. V naprosté většině všech vědeckých prací se setkáváme s tím, že je kapalná fáze v tomto

roku odfiltrována, pevná část promyta a přelita vhodným pufrem, který má optimální pH pro působení následně aplikované směsi celulólytických enzymů⁵³.

Přídavek celulólytických enzymů je vnímán negativně, protože jako jedna z nejdražších položek, značně znevýhodňuje ekonomickou bilanci. Enzymový krok lze obejít chemickým rozkladem a nejlevnější a současně asi i nejvíce používanou metodou je rozklad kyselinou sírovou⁵². Nešetrný přístup ovšem vede ke vzniku mnoha rozkladných produktů, které mají inhibiční charakter ve vztahu k produkčním organismům.

Ve skutečnosti se ani šetrné metody neobejdou bez tvorby tzv. inhibitorů, ale samozřejmě v menší míře. I tak se jedná o koncentrace, které zhoršují kultivační podmínky, a tím i celkové výtěžnosti, produktivity apod.⁵⁴ Nespočet vědeckých publikací je tedy zaměřen na možnosti, jak se s těmito inhibitory v biotechnologiích vypořádat.

3.1.1. Inhibitory z lignocelulosity a jejich působení na produkční organismy

Inhibitory vznikající během zpracování lignocelulosity je možné rozdělit na základě jejich chemické struktury do tří skupin, jsou to jednak alifatické organické kyseliny, dále fenolové sloučeniny a nakonec furanové deriváty. Furanové deriváty vznikají dehydratací pentos a hexos, přičemž z pentos vzniká 2-furaldehyd (furfural) a z hexos 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd (HMF)^{55,56}. Jejich koncentrace v hydrolyzátech může být poměrně vysoká a v mnohých studiích jsou právě tyto látky označovány za původce zhoršených růstových a produkčních parametrů^{57,58}. Působení furfuralu a jeho derivátů na buňku je komplexní, vyvolává stresovou odpověď v podobě syntézy proteinů tepelného šoku (HSP), změny v syntéze proteinů mnoha klíčových drah včetně centrálního metabolismu, ovlivnění intracelulární hladiny NADH a NAD(P)H (cit.^{59,60}), motility a dalších⁶¹. Během zpracování lignocelulosity mohou být furfural i HMF dále degradovány na kyselinu mravenčí a HMF pak také na kyselinu levulovou. Jedná se o alifatické organické kyseliny, které v hydrolyzátech doprovází ještě kyselina octová, která ovšem nevzniká jako degradační produkt, ale hydrolyzou acetylových skupin přítomných v hemicelulose⁵².

Inhibiční efekt kyselin je připisován schopnosti nedisociovaných kyselin procházet cytoplasmatickou membránou, kde v intracelulárním prostoru vlivem vyššího pH opět disociují a přispívají k okyselování intracelulárního kompartmentu, což pak klade vyšší energetické nároky na pumpování H⁺ iontů opět ven z buňky ve snaze udržet si optimální vnitřní pH (cit.²⁷). Efekt je tedy stejný, jaký je připisován kyselinám máselné a octové, které jsou produkovány v acidogenní fázi primárního metabolismu klostridií a v tomto spojení může být tedy poměrně významný aditivní efekt.

Poslední skupinou inhibitorů vznikajících přímo z lignocelulosity jsou látky na bázi fenolu, které vznikají z ligninu. Na rozdíl od předchozích, poměrně úzkých skupin, se zde jedná o velmi širokou škálu aromatických kyselin, aldehydů a ketonů. Prozatím nejpodrobnější výčet je

dostupný v publikaci Klinke a spol. z roku 2004 (cit.⁶²).

Lignin je heteropolymer jehož základními stavebními jednotkami jsou *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol, jejichž poměr, množství i míra polymerace jsou závislé na druhu rostlinného materiálu. Během zpracování lignocelulosity dochází v závislosti na zvolených podmínkách k rozkladu ligninu, jeho převodu do kapalné frakce a vzniku řady degradačních produktů, přičemž nejčastější jsou 4-hydroxybenzaldehyd, 4-hydroxybenzoová kyselina, vanilin, dihydrokoniferylalkohol, koniferylaldehyd, syringaldehyd a syringová kyselina⁶². U bylinné biomasy, a to zejména obilovin a trav, je přítomno značné množství kyseliny ferulové a *p*-kumarové.

Jak přesně skupina fenolických inhibitorů na buňku působí, není uspokojivě popsáno, ale na základě jejich vyšší hydrofobity se předpokládá zejména narušení biologických membrán, destabilizace a tím i ovlivnění funkčnosti⁶³. Studie postavené na transkriptomice a proteomice ukazují, že každá skupina látek ovlivňuje trochu jinou sadu genů a jejich produktů^{64,65}, i tak se ale podobně jako u předchozích typů inhibitorů ukazuje, že odpověď buňky na jejich přítomnost je komplexní.

Zajímavé je, že přítomnost výše zmíněných inhibitorů v subletálních koncentracích často nevede k ovlivnění růstu klostridiální populace jako takové⁶⁵, ale zásadně ovlivňuje produkční profil, a to bohužel často právě směrem k nechtěnému efektu, kterým je zvýšená produkce kyselin a snížená produkce rozpouštědel. Limitní situací je pak úplná absence solventogeneze, přičemž vlastní produkce kyselin vede v závěru k překyselení extracelulárního prostředí a buněčné smrti.

3.2. Nelignocelulosové substráty

Generace třetí počítá s produkcí a zpracováním biomasy z řas: jednobuněčných i velkých mořských^{66,67}. (Poznámka: Od druhé generace dále je oficiálně používán souhrnný název – „Advanced biofuels“, tj. pokročilá biopaliva. V evropské legislativě je tato skupina definována jako ...“*biopaliva vyrobená ze surovin uvedených v příloze IX části A*“... ve Směrnici Evropského parlamentu a rady EU 2018/2001 – RED II, cit.⁶⁸.)

Obrovský potenciál řas spočívá v jejich schopnosti tvořit organickou hmotu z oxidu uhličitého a sluneční energie s minimálními požadavky na živiny, tj. zdánlivě ideální volba. Ta se ale komplikuje tím, že schopnost využitelného záření procházet vodním prostředím je značně omezena. Jednobuněčné řasy tak lze efektivně produkovat jen ve velmi tenké vrstvě nebo specializovaných reaktorech, což zásadně zvyšuje požadavky na kultivační plochu a venkovní pěstování je zase omezeno jen na určité klimatické podmínky. Tyto řasy navíc dorůstají do poměrně nízkých buněčných koncentrací⁶⁹ a jejich efektivní sklizeň je předmětem intenzivního výzkumu⁷⁰. Některé slibné projekty na pěstování tzv. makrořas, které nabízí větší koncentraci biomasy, probíhají i u evropských břehů⁷¹, ale snaha o jejich využití k výrobě biobutanolu či biolihu zatím naráží na problémy s vysokým zasolením a poněkud

atypickým složením biopolymerů⁷². V neposlední řadě je pak zásadní otázkou, společnou všem těmto substrátům i lignocelulose, jak z komplexní biomasy uvolnit a zpřístupnit jednotlivé složky využitelné v biotechnologiích, aniž by náklady na vstupy a energie několikrát nepřevýšily výsledný zisk.

Dalším alternativním substrátem je glycerol⁷³, které ho je zatím nadbytek díky tomu, že se jedná o vedlejší výstupní proud z produkce bionafty. Kvůli této úzké spojitosti s diskutabilní oblastí produkce biopaliv na bázi esterů mastných kyselin z rostlinné výroby (v ČR zejména řepky) je i dostupnost glycerolu v budoucnu nejistá. Nicméně, mezi solventogenními klostridii existují druhy, které glycerol poměrně dobře využívají a hlavními primárními produkty jsou v závislosti na kultivačních podmínkách hlavně butanol a 1,3-propanol^{74,75}. Nejznámějším kmenem schopným využít glycerol je *Clostridium pasteurianum* DSM 525 (cit.⁷⁶). Dalším typickým zástupcem solventogenních klostridií využívajícím glycerol je druh *Clostridium diolis*⁷⁷, který dostal své jméno právě podle schopnosti produkovat výše uvedený diol⁷⁸.

Další variantou, která zažívá velký rozmach, je využití tzv. syntézního plynu neboli syngasu acetogeny – mikroorganismy schopnými využívat H₂ spolu s CO₂ či CO na tvorbu acetátu. Takových mikroorganismů je celá řada a má zastoupení v obou doménách prokaryotních organismů. Prvním objeveným a popsáným acetogenem byla právě bakterie rodu *Clostridium*, konkrétně *Clostridium acetivum*⁷⁹. Některé acetogeny tvoří výhradně acetát, ale jiné jsou schopné vedle acetátu produkovat také ethanol, např. *Clostridium ljungdahlii*⁸⁰ a *Clostridium autoethanogenum*⁸¹, či při vhodné transformaci kmene také butyrát a butanol⁸².

Biotechnologii na podobné bázi využívá firma Lanza-Tech a její provozy již běží v Číně, kde jsou jako zdroj uhlíku využívány výstupní plyny z provozu oceláren. Nově byl v květnu 2023 zahájen provoz i na evropské půdě v belgickém Ghentu, projekt Steelanol⁸³.

4. Závěr

Biotechnologická produkce butanolu, případně dalších zmiňovaných rozpouštědel, představuje historicky prověřenou průmyslovou velkovýrobu chemikálií, které jsou dnes získávány výhradně z neobnovitelných zdrojů. Hlavní překážka leží zejména v ekonomice procesu využívajícího biologického činitele, který zůstává i přes obrovské pokroky v našich znalostech a dovednostech obtížně ovladatelným prvkem. Lepší pochopení regulačních mechanismů a fyziologických důsledků vnějších zásahů by mohlo vést ke zlepšení rentability biotechnologické výroby, kde solventogenní klostridia představují velmi slibné zpracovatele alternativních substrátů na bázi různých odpadních proudů. Tímto by mohly přispět k současným snahám o ekologičtější, dlouhodobě udržitelné technologie v rámci oběhového hospodářství v souladu s plněním cílů Zelené dohody pro Evropu.

Vypracováno s finanční podporou Grantové agentury České republiky v rámci projektu 23-06941S.

LITERATURA

1. Patáková P., Toure S. S. M., Šimáček P., Čížková H., Lípovský J., Linhová M., Fribert P., Rychtera M., Melzoch K.: Listy Cukrov. Řepař. 127, 46 (2011).
2. Jin C., Yao M., Liu H., Lee C. F. F., Ji J.: Renew. Sustain. Energy Rev. 15, 4080 (2011).
3. <https://cen.acs.org/articles/84/i26/BP-DuPont-Plan-Biobutanol.html>, staženo 31. 5. 2023.
4. Tracy B. P., Jones S. W., Fast A. G., Indurthi D. C., Papoutsakis E. T.: Curr. Opin. Biotechnol. 23, 364 (2012).
5. Servinsky M. D., Liu S., Gerlach E. S., Germane K. L., Sund C. J.: Microb. Cell Fact. 13, 139 (2014).
6. Branska B., Fořtová L., Dvořáková M., Liu H., Patakova P., Zhang J., Melzoch K.: Renew. Energy 145, 1941 (2020).
7. Xue C., Zhao J., Lu C., Yang S. T., Bai F., Tang I. C.: Biotechnol. Bioeng. 109, 2746 (2012).
8. Chen C. K., Blaschek H. P.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 170 (1999).
9. Veas C. A., Neuendorf C. S., Pflügl S.: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 47, 753 (2020).
10. Davies E. T.: Green Process. Synth. 2, 273 (2013).
11. <https://www.celtic-renewables.com/production-facility/>, staženo 31. 5. 2023.
12. Jones D. T., Keis S., v knize: *Handbook on Clostridia* (Durre P., ed.), kap. 3, str. 37. CRC Press, USA 2005.
13. <https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2021/12/10/ncbi-taxonomy-prokaryote-phylo-added/>, staženo 20. 6. 2023.
14. Yutin N., Galperin M. Y.: Environ. Microbiol. 15, 2631 (2013).
15. Lawson P. A., Rainey F. A.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 1009 (2016).
16. Cruz-Morales P., Orellana C. A., Moutafis G., Moonen G., Rincon G., Nielsen L. K., Marcellin E., Bapteste E.: Genome Biol. Evol. 11, 2035 (2019).
17. Keis S., Shaheen R., Jones D. T.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2095 (2001).
18. Sedlar K., Nykrynova M., Bezdicek M., Branska B., Lengerova M., Patakova P., Skutkova H.: Processes 9, 1196 (2021).
19. Branska B., Vasyukivska M., Raschmanova H., Jureckova K., Sedlar K., Provaznik I., Patakova P.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 105, 877 (2021).
20. Jones D. T., Woods D. R.: Microbiol. Rev. 50, 484 (1986).
21. Harris L. M., Welker N. E., Papoutsakis E. T.: J. Bacteriol. 184, 3586 (2002).
22. Jones A. J., Fast A. G., Clupper M., Papoutsakis E. T.: Appl. Environ. Microbiol. 84, 597 (2018).
23. Kotte A. K., Severn O., Bean Z., Schwarz K., Minton

- N. P., Winzer K.: *Microbiology* 166, 579 (2020).
24. Siemerink M. A. J., Schwarz K., Grimm C., Kuit W., Ehrenreich A., Kengen S. W. M., v knize: *Systems Biology of Clostridium* (Durre P., ed.), kap. 8, str. 193. Imperial College Press, Singapore 2014.
 25. Poehlein A., Solano J. D. M., Flitsch S. K., Krabben P., Winzer K., Reid S. J., Jones D. T., Green E., Minton N. P., Daniel R., Durre P.: *Biotechnol. Biofuels* 10, 15 (2017).
 26. Wang Y., Li X., Mao Y., Blaschek H. P.: *BMC Genomics* 13, 102 (2012).
 27. Russell J. B., Diez-Gonzalez F.: *Adv. Microb. Physiol.* 39, 205 (1997).
 28. Drahoukoupil M., Patáková P.: *Czech J. Food Sci.* 38, 185 (2020).
 29. Liu J., Guo T., Wang D., Shen X., Liu D., Niu H., Liang L., Ying H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 4985 (2016).
 30. Xia M., Wang D., Xia Y., Shi H., Tian Z., Zheng Y., Wang M.: *Microb. Cell Fact.* 21, 1 (2022).
 31. Li J., Zhang Y., Sun K., Liu W., Yan H., Meng J.: *Energy Convers. Manage.* 251, 114987 (2022).
 32. Jiang Y., Xu C., Dong F., Yang Y., Jiang W., Yang S.: *Metab. Eng.* 11, 284 (2009).
 33. Bao T., Hou W., Wu X., Lu L., Zhang X., Yang S. T.: *Biotechnol. Bioeng.* 118, 2703 (2021).
 34. Calusinska M., Happe T., Joris B., Willemotte A.: *Microbiology* 156, 1575 (2010).
 35. Schmehl M., Jahn A., Meyer zu Vilsendorf A., Hennecke S., Masepohl B., Schuppler M., Marxer M., Oelze J., Klipp W.: *Mol. Gen. Genet.* 241, 602 (1993).
 36. Buckel W., Thauer R. K.: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1827, 94 (2013).
 37. Buckel W.: *Front. Microbiol.* 12, 2400 (2021).
 38. Westphal L., Wiechmann A., Baker J., Minton N. P., Müller V.: *J. Bacteriol.* 200, e00357-18 (2018).
 39. Branska B., Pechacova Z., Kolek J., Vasylykivska M., Patakova P.: *Biotechnol. Biofuels* 11, 99 (2018).
 40. Fimlaid K. A., Shen A.: *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 88 (2015).
 41. Diallo M., Kengen S. W. M., López-Contreras A. M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 3533 (2021).
 42. Galperin M. Y., Mekhedov S. L., Puigbo P., Smirnov S., Wolf Y. I., Rigden D. J.: *Environ. Microbiol.* 14, 2870 (2012).
 43. Zhu D., Sorg J. A., Sun X.: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 29 (2018).
 44. Al-Hinai M. A., Jones S. W., Papoutsakis E. T.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 19 (2015).
 45. Sedlar K., Kolek J., Gruber M., Jureckova K., Branska B., Csaba G., Vasylykivska M., Zimmer R., Patakova P., Provaznik I.: *Biotechnol. Biofuels* 12, 243 (2019).
 46. Luo H., Zheng P., Bilal M., Xie F., Zeng Q., Zhu C., Yang R., Wang Z.: *Sci. Total Environ.* 710, 136399 (2020).
 47. Steiner E., Scott J., Minton N. P., Winzer K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1113 (2012).
 48. Martin-Verstraete I., Peltier J., Dupuy B.: *Toxins* 8, 153 (2016).
 49. Jiao S., Zhang Y., Wan C., Lv J., Du R., Zhang R., Han B.: *Sci. Rep.* 6, 38818 (2016).
 50. Zhang Y., Jiao S. Y., Lv J., Du R. J., Yan X. N., Wan C. X., Zhang R. J., Han B.: *Front. Microbiol.* 8, 12 (2017).
 51. Bidlack J., Malone M., Benson R.: *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72, 51 (1992).
 52. Jönsson L. J., Martín C.: *Bioresour. Technol.* 199, 103 (2016).
 53. Paulova L., Patakova P., Branska B., Rychtera M., Melzoch K.: *Biotechnol. Adv.* 33, 1091 (2015).
 54. Baral N. R., Shah A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9151 (2014).
 55. Paulová L., Kačaba J., Patáková P., Rychtera M., Melzoch K.: *Chem. Listy* 106, 626 (2012).
 56. Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N. O.: *Biotechnol. Biofuels* 6, 16 (2013).
 57. Liu J., Jiang Y., Chen T., Dong W., Zhang W., Ma J., Jiang M., Xin F.: *3 Biotech* 8, 406 (2018).
 58. Ujor V., Agu C. V., Gopalan V., Ezeji T. C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6511 (2014).
 59. Ask M., Bettiga M., Mapelli V., Olsson L.: *Biotechnol. Biofuels* 6, 22 (2013).
 60. Ujor V., Bharathidasan A. K., Cornish K., Ezeji T. C.: *Appl. Energy* 136, 590 (2014).
 61. Liu H., Zhang J., Yuan J., Jiang X., Jiang L., Zhao G., Huang D., Liu B.: *Biotechnol. Biofuels* 12, 101 (2019).
 62. Klinke H. B., Thomsen A. B., Ahring B. K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10 (2004).
 63. Liu J., Guo T., Yang T., Xu J., Tang C., Liu D., Ying H.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 86, 14 (2017).
 64. Liu H., Zhang J., Yuan J., Jiang X., Jiang L., Li Z., Yin Z., Du Y., Zhao G., Liu B., Huang D.: *Biotechnol. Biofuels* 13, 163 (2020).
 65. Patakova P., Branska B., Vasylykivska M., Jureckova K., Musilova J., Provaznik I., Sedlar K.: *Biotechnol. Adv.* 58, 107889 (2022).
 66. Hou X., From N., Angelidaki I., Huijgen W. J. J., Bjerre A. B.: *Bioresour. Technol.* 238, 16 (2017).
 67. Sunwoo I. Y., Hau N. T., Ra C. H., Jeong G. T., Kim S. K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185, 1075 (2018).
 68. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32018L2001>, staženo 21. 6. 2023.
 69. Day J. G.: *Biofuels* 4, 459 (2014).
 70. Milledge J. J., Heaven S.: *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 165 (2013).
 71. <https://www.wur.nl/en/project/MACROFUELS-Macro-algae-as-a-sustainable-source-for-biofuels.htm>, staženo 30. 5. 2023.
 72. Schultze-Jena A., Vroon R. C., Macleod A. K. A., Hreggviðsson G., Adalsteinsson B. T., Engelen-Smit N. P. E., de Vrije T., Budde M. A. W., van der Wal H., López-Contreras A. M., Boon M. A.: *Algal Res.* 62, 102618 (2022).

73. Almeida J. R. M., Fávoro L. C. L., Quirino B. F.: *Biotechnol. Biofuels* 5, 48 (2012).
74. Biebl H.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 18 (2001).
75. Biebl H., Marten S., Hippe H., Deckwer W. D.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 592 (1992).
76. Gallazzi A., Branska B., Marinelli F., Patakova P.: *J. Biotechnol.* 216, 29 (2015).
77. Sedlar K., Vasytkivska M., Musilova J., Branska B., Provaznik I., Patakova P.: *Genomics* 113, 1109 (2021).
78. Biebl H., Spröer C.: *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 491 (2002).
79. Wieringa K. T.: *Antonie van Leeuwenhoek* 6, 251 (1939).
80. Richter H., Molitor B., Wei H., Chen W., Aristilde L., Angenent L. T.: *Energy Environ. Sci.* 9, 2392 (2016).
81. Heffernan J. K., Valgepea K., de Souza Pinto Lemgruber R., Casini I., Plan M., Tappel R., Simpson S. D., Köpke M., Nielsen L. K., Marcellin E.: *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 204 (2020).
82. Köpke M., Held C., Hujer S., Liesegang H., Wiezer A., Wollherr A., Ehrenreich A., Liebl W., Gottschalk G., Dürre P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13087 (2010).
83. <http://www.steelanol.eu/en/news/steelanol-produces-first-ethanol>, staženo 20. 11. 2023.

B. Branská (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Biotechnological Production of Butanol**

The biotechnological production of butanol and other accompanying solvents has a history of more than a century and currently represents an alternative to produce desirable chemicals from various waste streams, in accordance with the concept of the circular economy. This review article summarizes the current state of potential industrial production, introduces the main solvent producers, solventogenic clostridia and their metabolism, together with the main aspects that influence physiological and production characteristics. The last part is devoted to substrates that can be used for biobutanol production, in particular lignocellulose, a ubiquitous waste plant matter, with great potential in connection with the large-scale biotechnological production of many commodities.

Keywords: butanol, ABE fermentation, *Clostridium*, lignocellulose, alternative substrates

Acknowledgement

This work was supported by grants from the Czech Science Foundation (GACR) (Grant number: 23-06941S).



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.