

VYUŽITÍ GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ PRO ZLEPŠENÍ PROCESU FERMENTAČNÍ VÝROBY BUTANOLU

JAN KOLEK a PETRA PATÁKOVÁ

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

Došlo 3.3.15, přijato 24.4.15.

Klíčová slova: butanol, klostridium, metabolické inženýrství, genové úpravy

Obsah

1. Úvod
2. Aceton-butanol-ethanolové kvašení
3. Hlavní problémy využití aceton-butanol-ethanolového kvašení
4. Metody pro genovou manipulaci klostridií
5. Zvýšení odolnosti buněk
 - 5.1. Efluxové systémy
 - 5.2. Proteiny teplotního šoku
 - 5.3. Změny v cytoplasmatické membráně
 - 5.4. Další stresové odpovědi a genomová analýza
6. Zvýšení produkce butanolu
7. Produkce butanolu pomocí alternativního mikroorganismu
8. Závěr

1. Úvod

Aceton-butanol-ethanolové kvašení (ABE fermentace) je proces, který byl objeven patrně již v polovině 19. století Louisem Pasteurem a dále detailněji popsán na začátku 20. století Dr. Chaimem Weizmannem. ABE bylo velmi využívanou technologií především v období světových válek, kdy výrazně stoupla poptávka po acetonu, který byl v té době základní surovinou pro výrobu korditu a dalších produktů zbrojního průmyslu. Po skončení 2. světové války se stal nejvíce ceněným produktem ABE fermentace butanol. Je to jednoduchý, čtyřuhlíkatý alkohol, který je využitelný v surovém stavu, jako rozpouštědlo nebo desinfekční prostředek. Butanol je také důležitou surovinou pro výrobu dalších chemikálií či bioplastů a je velmi často diskutovaným biopalivem či možnou přísadou pohonných hmot. Přídavek butanolu do pohonných hmot poskytuje mnoho výhod oproti dnes běžně používanému bezvodému ethanolu. Je to především vyšší obsah využitelné energie vztažený na jednotku objemu, menší korozivní působení na kovové součásti, menší těkavost a výrazně nižší schopnost vázat vodu¹, která je hlavní nevýhodou ethanolu. Přestože se butanol v současnosti v průmyslovém měřítku nevyrábí, americká legislativa

předjímá a povoluje jeho použití, jako přídavku do benzinových paliv až do 16 hm.% obsahu (Renewable Fuel Standard 2 – <http://www.epa.gov/otaq/fuels/renewablefuels>, staženo 9. února 2015).

Ve druhé polovině 20. století se začaly využívat pro výrobu butanolu nové technologie, především tzv. „oxoproces“, který využívá jako surovinu propylen, kdy je nejprve získáván butaraldehyd, který je dále hydratován na butanol. Hlavní výhodou chemických procesů výroby je mnohem menší cena vyrobeného butanolu. Díky tomu se stala výroba pomocí ABE fermentace nekonkurenceschopným procesem a do konce 20. století došlo k postupnému uzavření téměř všech průmyslových provozů zaměřených na tento proces. V současnosti jsou provozovány menší fermentační poloprovozní jednotky v USA, Číně a Brazílii.

V souvislosti s neustále se zvyšující poptávkou pro využití alternativních paliv z obnovitelných zdrojů spolu se ztenčováním světových zásob ropy se v posledních letech dostává výroba butanolu pomocí ABE fermentace opět do popředí zájmu světového výzkumu. Ten se zaměřuje především na možné využití alternativních substrátů a na genové a metabolické inženýrství produkčních kmenů, které by mohly vést k výraznému zlepšení jejich vlastností. Zmíněné modifikace by mohly v budoucnu umožnit zásadní zlevnění celého procesu a tím i jeho opětovné využití v praxi.

2. Aceton-butanol-ethanolové kvašení

ABE fermentace je životní strategií některých bakterií rodu *Clostridium*, konkrétně tzv. solventogenních druhů. Klostridia jsou obecně striktně anaerobní, gram-pozitivní, sporotvorné bakterie vyskytující se především v půdě, trávicím traktu živočichů, sladkovodních sedimentech a dalších anaerobních lokalitách. Nejznámějšími zástupci solventogenních klostridií jsou druhy *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* a *C. saccharoperbutyl-aceticum*. Kromě těchto tří tradičně zkoumaných druhů však existuje ještě mnoho dalších popsanych producentů různých organických rozpouštědel, jako jsou např. *C. pasteurianum*, *C. saccharobutylicum*, *C. tetanomorphum* a další.

Klasická ABE fermentace probíhá ve dvou hlavních fázích. V první fázi dochází ke zpracování zdroje uhlíku, kterým mohou být různé hexosy, pentosy, disacharidy, škroby nebo např. glycerol, na organické kyseliny. S tvorbou kyselin samozřejmě dochází k výraznému poklesu pH kultivačního média a celá fáze se tudíž často nazývá acidogenní. Ve druhé, solventogenní fázi, která je často doprovázena počátkem sporulace, dochází k přeměně částí vytvořených organických kyselin na organická rozpouštědla (především aceton, butanol a ethanol). To

souvisí s opětovným mírným vzestupem pH v kultivačním médiu, čímž je také umožněno krátkodobé pokračování růstu kultivovaného mikroorganismu. Na konci ABE fermentace dochází k akumulaci organických rozpouštědel, na což producent reaguje zpravidla posílením tvorby odolných endospor a zastavením růstu i produkce metabolitů. Kromě tvorby kapalných metabolitů se tvoří i plyny, oxid uhličitý a vodík. Podrobnější popis metabolických drah ABE fermentace, viz Lipovský a spol.²

Využitelnými produkty ABE fermentace jsou obecně vytvářené organické kyseliny (máselná a octová) a aceton, butanol, ethanol v poměru zhruba 3:6:1. Některé solventogenní druhy se však mohou v proporcích produkovaných metabolitů i průběhu samotné fermentace výrazně odlišovat. *C. tetanomorphum* například neprodukuje vůbec aceton a produkuje pouze ethanol a butanol v poměru cca 1:2 (cit.³). Některé kmeny *C. beijerinckii* zase mohou produkovat namísto acetonu isopropanol⁴.

3. Hlavní problémy využití aceton-butanol-ethanolového kvašení

Hlavním problémem efektivního využití ABE fermentace je nízká dosažitelná finální koncentrace butanolu. To způsobuje jeho náročnou a drahou izolaci a nutnost pracovat s velkým objemem fermentačního média. Problémem je také skutečnost, že solventogenní klostridia produkují butanol společně s dalšími rozpouštědly a těkavými organickými kyselinami. To vede k nižším výtěžkům vzhledem k množství vloženého substrátu a opět znesnadňuje jeho izolaci a purifikaci pomocí nejčastěji využívané metody, a sice destilace. Druhým významným problémem ABE fermentace je vysoká cena vstupního substrátu, kterým jsou nejčastěji různé monosacharidy, polysacharidy nebo glycerol, tedy obecně poměrně drahé substráty, které navíc figurují již v mnoha zavedených biotechnologických procesech (např. výroba lihu z melasy nebo kukuřice, výroba kosmetických výrobků z glycerolu atd.).

Butanol je alkohol s krátkým uhlíkatým řetězcem, a tudíž je stejně jako jiné alkoholy (např. ethanol) silně toxický pro bakteriální buňky. Alkoholy a uhlovodíky s krátkým řetězcem způsobují destabilizaci a narušování cytoplasmatických membrán, degradaci či precipitaci extracelulárních i intracelulárních proteinů, narušení enzymových aktivit uvnitř buňky atd. Butanol je pro bakteriální buňky toxický znatelně více než ethanol a způsobuje zastavení růstu a smrt bakteriálních buněk již v koncentraci okolo 0,5–1 obj.%. Tato toxicita samozřejmě úzce souvisí s nízkou dosažitelnou finální koncentrací, jelikož již při malém množství butanolu jsou buňky producenta značně inhibovány.

Dalšími, z hlediska ekonomiky a vedení procesu důležitými negativními aspekty, jsou také např. tvorba endospor spotřebovávající velkou část energie získané z vloženého substrátu nebo anaerobní metabolismus klostridií a jejich vysoká citlivost k přítomnosti kyslíku kladoucí speciální požadavky na vedení procesu. Komplikací zcela specifickou pro solventogenní klostridia je tzv. degenerace produkčních kmenů. Jedná se o stav, kdy producent přestává z neznámých důvodů tvořit endospory a rozpouštědla a produkuje dále pouze organické kyseliny.

4. Metody pro genovou manipulaci klostridií

Na vyřešení všech výše zmíněných hlavních problémů ABE fermentace by se teoreticky mohly výraznou měrou podílet cílené úpravy produkčních kmenů pomocí metod genového inženýrství, které zažívají u klostridií v posledních letech velmi výrazný pokrok. Shrnutí možných zlepšení produkčních kmenů, které reflektují současné celosvětově řešené přístupy a jejich potenciální přínosy jsou uvedeny v tab. I.

Metody genového inženýrství jsou dnes běžně využívány ke zlepšení vlastností produkčních kmenů v biotechnologii. Efektivní využití metod genového inženýrství však předpokládá vždy dvě hlavní skutečnosti:

Tabulka I

Shrnutí možných zlepšení produkčních kmenů a jejich potenciální přínos pro využití aceton-butanol-ethanolové fermentace v praxi

Cíle vylepšení produkčních kmenů	Teoretický přínos
Vyšší tolerance producenta k butanolu	možnost vyšší finální koncentrace butanolu, delší růstové fáze a vyšší buněčná denzita
Vyšší finální koncentrace butanolu	efektivnější izolace a purifikace
Asporogenní produkční kmen	efektivnější využití zdroje energie, jednodušší ustanovení kontinuálního uspořádání procesu, vyšší produktivita procesu
Navázání na aerobní metabolismus, tolerance kyslíku	zjednodušení celého procesu vzhledem k možnosti tolerance malých množství kyslíku, efektivnější využití zdroje energie, nižší produkce kyselin v aerobním metabolismu
Kmen nepodléhající degeneraci	odstranění nahodilých ekonomických ztrát, možnost provedení v dlouhodobém uspořádání (přítokovaná a kontinuální kultivace)
Selektivní produkce butanolu a snížení produkce vedlejších produktů	lepší výtěžnost butanolu vztažená na jednotku vloženého substrátu, zjednodušení izolace a purifikace

vývoj efektivních metod pro genovou manipulaci daného organismu a dokonalou znalost produkčního organismu, jeho metabolických drah i genetického pozadí. V případě klostridií, bohužel prozatím není zcela splněna ani jedna z těchto podmínek. Na druhou stranu, v posledních patnácti letech došlo k velkému posunu ve výzkumu solventogenních klostridií i vývoji nástrojů pro jejich genové manipulace. Mezi hlavní objevy posledních let patří např. vývoj univerzálního systému modulárních kyvadlových plasmidů pMTL80000 využitelných pro širokou škálu druhů bakterií rodu *Clostridium*⁵, nové unikátní systémy pro provedení místně specifické mutagenese CloStron a TargeTron^{6,7} či např. postupy genového „knock-downu“ (výrazné snížení přepisu daného genu) na základě využití „antisense-RNA“ molekul (asRNA) u klostridií^{8,9}.

5. Přístupy pro zvýšení odolnosti buněk

Nejvyšší popsané dosažené koncentrace butanolu během ABE fermentace se pohybují okolo 20 g l⁻¹, přičemž samotná tvorba butanolu je hlavní překážkou v dosažení vyšších koncentrací. Přibližné hodnoty nejvyšší tolerovatelné koncentrace butanolu u různých mikroorganismů jsou uvedeny v tab. II. Dosud největší tolerance vůči butanolu byla popsána u uměle selektovaného kmene bakterie *Pseudomonas putida*, který byl delší dobu udržován na médiu s přísadkou butanolu (literatura uvádí toleranci k butanolu o koncentraci až 6 obj.%). V této koncentraci však dokázal kmen růst rychlostí odpovídající pouze necelému jednomu procentu standardní růstové rychlosti¹⁰. Vedle butanolu nelze zcela opomenout vliv ethanolu a acetonu (popř. dalších minoritních rozpouštědel) ani vliv organických kyselin, které jsou schopny ve vyšších koncentracích výrazně inhibovat růst bakteriálních buněk, popř. měnit poměr výsledných produktů¹¹.

Obecně mohou bakteriální buňky odolávat stresu způsobenému organickými rozpouštědly několika způsoby. Patří mezi ně především systémy efluxových pump (membránové proteiny zajišťující aktivní export určitého metabolitu), produkce proteinů teplotního šoku (skupina proteinů napomáhajících např. sbalení proteinů do nativní

konformace, jejímu udržení a degradaci poškozených proteinů), remodelace cytoplasmatické membrány a další složky obecné stresové odpovědi¹².

5.1. Efluxové systémy

Doposud nebyla bohužel uspokojivě zodpovězena základní otázka, a sice jak se butanol dostává během ABE fermentace z buněk do extracelulárního prostředí. Konkrétně, zda se jedná o volnou difuzi cytoplasmatickou membránou, nebo zda existuje specifický efluxový protein zajišťující odčerpávání butanolu do extracelulárního prostředí, popřípadě se jedná o kombinaci obou systémů. Genů kódujících efluxové pumpy zajišťující toleranci mikroorganismů vůči organickým rozpouštědlům bylo popsáno v posledních letech hned několik. Příkladem může být např. efluxová pumpa *srpABC* (Solvent-Resistance-Pump ABC) u bakterie *Pseudomonas putida* S12, která je schopná účinně exportovat hexan, oktanol a další organická rozpouštědla¹³. U *Pseudomonas putida* DOT-T1E byl zase popsán systém pump zajišťujících buňkám vysokou rezistenci vůči toluenu¹⁴. Další pumpy se schopností exportu organických rozpouštědel a uhlovodíků byly zkoumány u *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa*¹⁵. Prozatím nejlépe popsaným typem pump pro eflux organických rozpouštědel jsou pumpy patřící do rodiny RND (Resistance-Nodulation-Division), které se řadí mezi tzv. „multidrug“ transportéry u gram-negativních bakterií¹⁶. Z celé řady popsaných genů pro tyto efluxové pumpy se nikdy nepodařilo docílit pomocí jejich „over-exprese“ (výrazné navýšení přepisu genu) zvýšení tolerance mikroorganismu (většinou *E. coli*) vůči butanolu. V mnoha případech dokonce byla zvýšením exprese dané pumpy tato tolerance snížena. Prozatím se tedy zdá, že popsané efluxové pumpy nejsou příliš účinné pro exkreci alkoholů a uhlovodíků s krátkým uhlíkatým řetězcem. Jelikož tedy prozatím nebyl objeven systém aktivního transportu butanolu z bakteriálních buněk, převládá názor, že jeho exkrece probíhá výhradně na základě prostupu butanolu přímo cytoplasmatickou membránou^{12,15} a genetické modifikace založené na zvýšení efluxu butano-

Tabulka II

Tolerovatelné koncentrace butanolu (nedochází k úplnému zastavení růstu a metabolismu) pro některé mikroorganismy

Mikroorganismus	Zaznamenaná tolerance vůči butanolu	Lit.
<i>Escherichia coli</i>	1,5 obj.%	31
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1,6 obj.%	32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,0 obj.%	33
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,0 obj.%	33
<i>Enterococcus faecalis</i> (izolát z půdy zasažené org. rozpouštědly)	3,5 obj.%	34
<i>Pseudomonas putida</i> (přírodní izolát)	1,5 obj.%	10
<i>Pseudomonas putida</i> (kmen selektovaný v přítomnosti butanolu)	6 obj.%	10

lu tedy nejsou, alespoň prozatím, použitelné pro vylepšení produkčního kmene.

5.2. Proteiny teplotního šoku

Stres způsobený alkoholy a uhlovodíky s krátkým uhlíkatým řetězcem se obecně velmi podobá teplotnímu šoku. V obou případech dochází k destabilizaci buněčné membrány a zároveň k poškození funkce proteinů. To souvisí především se ztrátou nativní konformace a špatným sbalováním nově syntetizovaných proteinů. Tzv. proteiny teplotního šoku zpravidla usnadňují sbalování proteinů, udržování jejich správné konformace a urychlují degradaci špatně sbalených proteinů. Za normálních podmínek jsou tyto proteiny neustále produkovány v minimální hladině. „Over-exprese“ genů pro proteiny teplotního šoku může být obecně využito ke zvýšení odolnosti bakterií vůči rozpouštědlům. Nejvíce prací bylo provedeno opět s modelovou bakterií *E. coli*, u které bylo úspěšně dosaženo zvýšení tolerance vůči butanolu při zvýšení exprese genů pro různé proteiny z této skupiny (např. *dnaJ*, *dnaK*, *hspG*, *ibpAB*)¹⁷. Výrazného zvýšení bylo také dosaženo „over-expressí“ genu pro stresový sigma-faktor RNA polymerasy RpoH, který aktivuje celou síť genů zapojených do stresové odpovědi způsobené vysokou teplotou nebo organickými rozpouštědly¹⁸.

Podstatného zvýšení tolerance vůči butanolu bylo pomocí „over-exprese“ proteinů teplotního šoku dosaženo také u klostridií. Bylo popsáno několik proteinů (*GroESL*, *DnaKJ*, *Hsp18*, *Hsp90*), jejichž zvýšená kontinuální exprese vedla ke zvýšení tolerance vůči butanolu¹⁹. V případě „over-exprese“ proteinu GroESL byl navíc vzestup tolerance doprovázen také prodloužením doby aktivního metabolismu a tedy i zvýšením finální koncentrace rozpouštědla v kultivačním mediu²⁰.

Z těchto experimentů jasně vyplývá, že proteiny teplotního šoku jsou jedním z hlavních obranných mechanismů buňky při obraně proti působení butanolu. Další základní výzkum působení těchto proteinů v klostridiích společně s dalším posunem v metodách genového inženýrství (především přesně regulovatelných promotorů využitelných pro přesně definovatelnou hladinu exprese proteinu) by mohly společně zásadně pomoci vylepšit toleranci produkčních kmenů vůči produkovanému butanolu.

5.3. Změny v cytoplasmatické membráně

Schopnost aktivně transformovat cytoplasmatickou membránu je jednou ze základních schopností mikroorganismů, které vykazují vysokou odolnost vůči organickým rozpouštědlům. Hlavním mechanismem pro zvýšení odolnosti membrány je především změna ve složení obsažených mastných kyselin. Klasickou reakcí na přítomnost rozpouštědla je zvýšení podílu nasyčených mastných kyselin oproti nenasyceným a změnou v podílu *cis/trans* nenasycených mastných kyselin. Oba tyto mechanismy vedou ke snížení fluidity membrány a tím k její stabilizaci. Vedle

mastných kyselin může být stabilizace membrán zajištěna také změnou v molekulách fosfolipidů (polární hlavičky, délky řetězců, atd.)²¹.

Klostridia se stavbou svojí membrány v mnoha bodech zásadně liší od dobře popsaných aerobních bakterií. Hlavní rozdíly spočívají ve vysokém zastoupení cyklopropanových mastných kyselin, rozdílném zastoupení polárních lipidů (např. vyšší obsah kardiolipinů) nebo v přítomnosti vysokého podílu fosfolipidů s etherově vázanými mastnými kyselinami (tzv. plasmalogenů)²². Stabilizace membrány může být tedy teoreticky docíleno např. zvýšením exprese pro nasyčené mastné kyseliny, určité formy fosfolipidů, atd. Hlavním problémem v tomto případě je však skutečnost, že snížením fluidity membrány dojde také k poklesu exkrece butanolu z buněk (za předpokladu, že butanol prochází volnou difúzí, viz výše). Teoretickou možností by bylo např. spojení zvýšení stability membrány společně s aktivním efluxem butanolu nebo přesné načasování změn v membráně reagující rychleji na přítomnost organických rozpouštědel.

5.4. Další stresové odpovědi a genomová analýza

Kromě výše uvedených hlavních systémů pro překonávání butanolového stresu se na odolnosti vůči butanolu podílí mnoho dalších, někdy i zdánlivě nesouvisejících systémů. Při pokusu zmapovat pomocí rozsáhlé analýzy založené na metodě DNA-mikročipů celkové změny genové exprese u modelového kmene *C. acetobutylicum* ATCC 824 bylo prokázáno, že během přechodu z acidogenní do solventogenní fáze dochází k mnoha změnám v mnoha oblastech genomu²³ a nejedná se tedy o odpověď na úrovni jedné nebo několika genových drah. Komplexní analýza změn genové exprese napříč genomem byla sledována u *C. acetobutylicum* ATCC 824 také za umělého přídatku butanolu¹⁹ a podobným způsobem (metodou založenou na sekvenaci mRNA molekul) byla analyzována genová exprese také u dalšího modelového producenta butanolu, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (cit.²⁴). Změny v expresi v bodě, kdy začal být přítomen v systému butanol, zahrnovaly jak vzestup, tak pokles exprese různých skupin genů. Zvýšení exprese bylo popsáno jak u tradičních, výše popsaných stresových markerů, jako jsou proteiny obecné stresové odpovědi či proteiny teplotního šoku (*DnaK*, *DnaJ*, *GroESL*, *Hsp80* atd.), tak i mnoha proteinů s dosud nepopsanou funkcí či proteinů s odolností vůči butanolu zdánlivě nesouvisející (např. geny kódující proteiny nefunkčního celulosomu u *C. acetobutylicum* ATCC 824, geny pro překonávání kyslíkového stresu atd.). Celková analýza ukázala, že neexistuje protein nebo regulační gen, který by se sám o sobě zásadně podílel na zvýšení odolnosti buněk vůči butanolu v solventogenní fázi, ale jedná se o velice komplexní děj, na kterém se podílí mnoho genů z mnoha různých oblastí genomu. Zmapování exprese dále potvrdilo fakt, že přidavek butanolu či ethanolu aktivuje expresi genů kódujících proteiny homologní s popsánými efluxovými pumpami.

6. Zvýšení produkce butanolu

Klasická finální dosažitelná koncentrace butanolu ve fermentačním médiu se pohybuje okolo 8–15 g l⁻¹. Prozatím vůbec nejvyšší dosažené koncentrace butanolu se pohybují kolem hodnoty 25 g l⁻¹. Metody pro zvýšení produkce butanolu samozřejmě podléhají již od začátku značnému omezení. K tomu, aby bylo možno zvýšit uměle produkci butanolu, je také nutné zvýšit výrazně odolnost producenta, jelikož bez tohoto kroku by se syntéza butanolu opět nutně zastavila na koncentraci, která začíná být pro jeho buňky letální (viz výše). Podle dosavadních prací se navíc bohužel zdá, že produkce butanolu a tolerance vůči němu nejsou propojené procesy, a tudíž s výrazným vzestupem tolerance většinou nedochází automaticky také k vzestupu produkce. Někdy dokonce dochází k jejímu značnému poklesu.

Velmi důležitým nástrojem pro vývoj průmyslových produkčních kmenů jsou vždy regulační zásahy do metabolických drah. Takovým zásahem může být u solventogenních klostridií např. narušení drah pro syntézu některých organických kyselin nebo odklonění drah vedoucí k ostatním rozpouštědlům. Tím lze docílit stavu, kdy je takřka veškerý metabolizovaný uhlík, který není použit pro nutnou údržbu buňky, zpracován právě na butanol. Podobně působícím zásahem může být také např. odstranění regulačních genů spouštějících sporulaci, jelikož sporulace sama o sobě spotřebovává velmi podstatnou část veškeré buněčné energie.

Konečná koncentrace butanolu může být zvýšena např. narušením biosyntetické dráhy pro aceton. Pomocí „knock-outu“ (naprosté vyřazení přepisu) genu pro acetoacetát dekarboxylasu (*adc*) u kmene *C. acetobutylicum* EA 2018 stoupl zastoupení butanolu mezi produkovanými rozpouštědly ze 70 % na 81 %, zatímco produkce acetonu klesla z konečné koncentrace 2,8 g l⁻¹ na 0,2 g l⁻¹ (cit.²⁵). Podobně byla exprese *adc* narušena pomocí asRNA u *C. acetobutylicum* ATCC 824, kdy došlo taktéž ke snížení produkce acetonu, avšak produkce butanolu zůstala oproti očekávání zachována⁷. Zvýšení finální koncentrace butanolu bylo dosaženo také pomocí „knock-outu“ genu pro butyrát kinasu (*buk*). Došlo ke znatelnému snížení produkce kyseliny máselné a acetonu, zatímco produkce butanolu stoupla cca o 10 % (cit.²⁶).

Přístupem k samotnému zvýšení produkce butanolu může být typicky zvýšení množství kopií genů pro jeho biosyntézu. A to jak samotných genů *sol* operonu, tak některých dalších, které *sol* dráze předchází (např. hexokinasa a některé další enzymy glykolýzy). Možností je také klonování nových genů pro transportní proteiny, zajišťující opět rychlejší metabolismus glukosy a tím i rychlejší a celkově vyšší produkci butanolu.

7. Produkce butanolu pomocí alternativního mikroorganismu

Další, v posledních letech často uvažovanou možností, která by mohla výrazně přispět k vylepšení procesu

produkce butanolu, je jeho produkce pomocí alternativního mikroorganismu. Uvažuje se např. o využití bakterie *E. coli*, *Pseudomonas putida* nebo kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Hlavní výhodou těchto mikroorganismů je fakt, že využívají aerobní metabolismus a tudíž jsou schopny využívat vložený substrát s mnohem větší účinností a není nutné dodržovat při manipulaci s nimi striktně anaerobní podmínky. Dále jsou také všechny asporogenní, nepatogenní, nepodléhají degeneraci a je pro ně k dispozici velké množství sekvenčních dat a zavedených technik pro genové manipulace a sledování exprese.

Při prvním pokusu o heterologní produkci butanolu bylo přeneseno 6 genů kódujících nutné enzymy dráhy produkce butanolu do *E. coli* na dvou různých plasmidech pod regulací indukovatelného *lac* promotoru. Za anaerobní kultivace bylo takto sice úspěšně dosaženo produkce butanolu, avšak pouze v koncentraci 13 mg l⁻¹. Za aerobních podmínek došlo k výraznému poklesu produkce, jelikož skoro veškerý vzniklý acetyl-CoA a NADH byly spotřebovány v citrátovém cyklu. Nejvyšší koncentrace butanolu bylo dosaženo překvapivě s pouze malým přídavkem kyslíku do systému. Tento jev je patrně způsoben tím, že NADH vznikající za striktně anaerobních podmínek není dostatečný k tvorbě butanolu. Nejvyšší dosažená koncentrace butanolu produkovaného v tomto experimentu byla asi 70 mg l⁻¹ (cit.²⁷).

Dalším mikroorganismem, který je zkoumán pro potenciální produkci butanolu, je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Nejvyšší dosažené koncentrace se v případě produkce butanolu pomocí *S. cerevisiae* prozatím pohybují kolem 240 mg l⁻¹ 1-butanolu²⁸ a 1,5 g l⁻¹ v případě isobutanolu²⁹. Další mikroorganismy, které byly testovány pro produkci butanolu, jsou např. *Pseudomonas putida*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* a další³⁰. Hlavním problémem produkce butanolu v alternativním producentovi je prozatím velice malá produkce butanolu. To může být způsobeno kompeticí vložené dráhy s jinými buněčnými enzymy, snížením aktivity enzymů v prostředí cizí buňky či nepřítomností systémů pro export butanolu nebo ochranu buněčných proteinů před ztrátou nativní konformace.

8. Závěr

ABE fermentace v současném stavu poznání rozhodně nemůže konkurovat výrobě butanolu z ropy a nelze zatím uvažovat o jeho průmyslové výrobě, ať už jako alternativního paliva či jako základní chemikálie. Jelikož se však ropa řadí mezi fosilní paliva, spolu s její neustále se zvyšující spotřebou a obecně předpokládaným neustálým ztenčováním světových zásob ropy, které se navíc často nalézají v politicky nestabilních regionech, lze očekávat další pokrok v metodách metabolického a genového inženýrství, které může vést k vytvoření nových, lepších kmenů pro ABE fermentaci.

Rozvoj genových modifikací bakterií druhu *Clostridium* zaznamenal v posledních patnácti letech velmi rychlý vývoj a bylo vyvinuto mnoho nových metodik zaměřených

výhradně na genovou manipulaci právě klostridií. Nové metody také umožnily zásadně urychlit a usnadnit základní výzkum v této oblasti. S pokračujícím výzkumem se bohužel ukazuje, že problematika produkce butanolu a buněčné odolnosti k němu není vůbec snadná a není možné ji vyřešit jednoduchými genetickými zásahy (na úrovni jednoho či několika genů), jak bylo v některých starších pracích předpokládáno. Pro lepší a racionálnější plánování dalších kroků vedoucích ke skutečnému zlepšení vlastností producentů butanolu je také nutno neopomíjet důležitost základního výzkumu různých druhů solventogenních klostridií, vedoucího ke komplexnímu pochopení těchto mikroorganismů.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2015) a projektu MŠMT: MSM No. 6046137305.

LITERATURA

- Mužíková Z., Baroš P., Pospíšil M., Šebor G.: Chem. Listy 107, 717 (2013).
- Lipovský J., Patáková P., Rychtera M., Čížková H., Melzoch K.: Chem. Listy 103, 479 (2009).
- Gottwald M., Hippe H., Gottschalk G.: Appl. Environ. Microbiol. 48, 573 (1984).
- George H. A., Johnson J. L., Moore W. E. C., Holdeman L. V., Chen J. S.: Appl. Environ. Microbiol. 45, 1160 (1983).
- Heap J. T., Pennington O. J., Cartman S. T., Minton N. P.: J. Microbiol. Methods 78, 79 (2009).
- Heap J. T., Pennington O. J., Cartman S. T., Carter G. P., Minton N. P.: J. Microbiol. Methods 70, 452 (2007).
- Shao L., Hu S., Yang Y., Gu Y., Chen J., Yang Y., Jiang W., Yang S.: Cell Res. 17, 963 (2007).
- Tummala S. B., Junne S. G., Papoutsakis E. T.: J. Bacteriol. 185, 3644 (2003).
- Liyanage H., Young M., Kashket E. R.: J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2, 87 (2000).
- Ruhl J., Schmid A., Blank L. M.: Appl. Environ. Microbiol. 75, 4653 (2009).
- Xue C., Zhao X. Q., Liu C. G., Chen L. J., Bai F. W.: Biotechnol. Adv. 31, 1575 (2013).
- Dunlop M. J.: Biotechnol. Biofuels 4, 32 (2011).
- Kieboom J., Dennis J. J., de Bont J. A. M., Zylstra G. J.: J. Biol. Chem. 273, 85 (1998).
- Rojas A., Duque E., Mosqueda G., Golden G., Hurtado A., Ramos J. L., Segura A.: J. Bacteriol. 183, 3967 (2001).
- Dunlop M. J., Dossani Z. Y., Szmids H. L., Chu H. C., Lee T. S., Keasling J. D., Hadi M. Z., Mukhopadhyay A.: Mol. Syst. Biol. 7, 487 (2011).
- Putman M., van Veen H. W., Konings W. N.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 672 (2000).
- Rutherford B. J., Dahl R. H., Price R. E., Szmids H. L., Benke P. I., Mukhopadhyay A., Keasling J. D.: Appl. Environ. Microbiol. 76, 1935 (2010).
- Brynildsen M. P., Liao J. C.: Mol. Syst. Biol. 5, 277 (2009).
- Tomas C. A., Beamish J., Papoutsakis E. T.: J. Bacteriol. 186, 2006 (2004).
- Tomas C. A., Welker N. E., Papoutsakis E. T.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 4951 (2003).
- Isken S., de Bont J. A. M.: Extremophiles 2, 229 (1998).
- Tian B., Guan Z. Q., Goldfine H.: Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids 1831, 1185 (2013).
- Grimmler C., Janssen H., Krausse D., Fischer R. J., Bahl H., Durre P., Liebl W., Ehrenreich A.: J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 20, 1 (2011).
- Wang Y., Li X. Z., Mao Y. J., Blaschek H. P.: BMC Genomics 12, 479 (2011).
- Jiang Y., Xu C. M., Dong F., Yang Y. L., Jiang W. H., Yang S.: Metab. Eng. 11, 284 (2009).
- Green E. M., Boynton Z. L., Harris L. M., Rudolph F. B., Papoutsakis E. T., Bennett G. N.: Microbiology 142, 2079 (1996).
- Atsumi S., Cann A. F., Connor M. R., Shen C. R., Smith K. M., Brynildsen M. P., Chou K. J. Y., Hanai T., Liao J. C.: Metab. Eng. 10, 305 (2008).
- Si T., Luo Y. Z., Xiao H., Zhao H. M.: Metab. Eng. 22, 60 (2014).
- Matsuda F., Ishii J., Kondo T., Ida K., Tezuka H., Kondo A.: Microb. Cell Fact. 12, 119 (2013).
- Zheng J., Tashiro Y., Wang Q., Sonomoto K.: J. Biosci. Bioeng. 119, 1 (2014).
- Fischer C. R., Klein-Marcuschamer D., Stephanopoulos G.: Metab. Eng. 10, 295 (2008).
- Ezeji T., Milne C., Price N. D., Blaschek H. P.: Appl. Environ. Microbiol. 85, 1697 (2010).
- Knoshaug E. P., Zhang M.: Appl. Biochem. Biotechnol. 153, 13 (2009).
- Kanno M., Katayama T., Tamaki H., Mitani Y., Meng X. Y., Hori T., Narihiro T., Morita N., Hoshino T., Yumoto I., Kimura N., Hanada S., Kamagata Y.: Appl. Environ. Microbiol. 79, 6998 (2013).

J. Kolek and P. Patáková (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*):
Use of Genetic Engineering for Improvement of the Fermentative Production of Butanol

The acetone-butanol-ethanol fermentation (ABE) is a process suitable for butan-1-ol production from some renewable resources. Unfortunately, ABE fermentation according to the current state of knowledge cannot compete with standard butanol production from oil. Methods of metabolic and genetic engineering could be used for improvement of some properties of solventogenic *Clostridium* strains like their resistance to butanol or final butanol concentration in media.