

PERSPEKTIVY PRODUKCE BUTANOLU ZE ŠKROBNATÝCH A CELULOSOVÝCH MATERIÁLŮ

JAKUB LIPOVSKÝ, PETRA PATÁKOVÁ,
MOJMÍR RYCHTERA, HANA ČÍŽKOVÁ
a KAREL MELZUCH

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
lipovskj@vscht.cz

Došlo 16.9.08, přijato 5.11.08.

Klíčová slova: aceton-butanolové kvašení, škrob, celuloza, fermentace

Obsah

1. Úvod
2. Aceton-butanolové kvašení
3. Možnosti využití škrobnatých a celulosových materiálů
4. Uspořádání procesu
5. Separace produktu
6. Závěr – vyhlídky do budoucnosti

1. Úvod

Technologie tzv. aceton-butanolového kvašení má dlouhou a zajímavou historii, může se pyšnit mnoha prvenstvími na poli kvasných technologií a v současnosti se těší obnovenému zájmu i velkých průmyslových gigantů, jako jsou např. společnosti British Petroleum nebo DuPont. Zatímco v minulosti byl v centru pozornosti hlavně aceton, používaný jako příměs do leteckých benzinů, nyní jde zejména o butanol, který by na základě svých výhodných vlastností (vyšší obsah energie, nižší těkavost, hydrofilita a nižší korozivita) mohl být přidáván nejen do motorové nafty, ale též do benzínu namísto tzv. bioethanolu¹. Stejně jako v případě bioethanolu zde však vyvstává potřeba nalézt vhodný, dostatečně levný substrát, z něhož by se butanol vyráběl fermentací bakteriemi rodu *Clostridium* a který by primárně nebyl potravinářskou surovinou. Jednoznačnou volbou pro výrobu biopaliv tzv. druhé generace jsou proto zemědělské odpady jako např. obilná sláma a dřevní štěpky a nebo i organické odpady z domácností^{2,3}. Nevýhodou těchto substrátů je však nutnost hydrolytické předúpravy (kyselé, alkalické nebo enzymové hydrolyzy, parní exploze nebo jejich kombinace)² před vlastní fermentací.

2. Aceton-butanolové kvašení

Rozpouštědlově schopná klostridia mají schopnost využívat širokou škálu sacharidů od monosacharidů, jako je glukosa, fruktosa, ale i xylosa a arabinosa přes disacharidy jako je sacharosa a laktosa až po polysacharidy, jako je škrob, pektin nebo xylan⁴. Rod *Clostridium* využívá k degradaci hexos EMP (Embden-Mayerhof-Parnas) metabolickou dráhu, pentosy jsou konvertovány na ribosa-5-fosfát a xylulosa-5-fosfát, které vstupují do pentosa-fosfátového cyklu, přičemž následně vzniklé metabolity – fruktosa-6-fosfát a glyceraldehyd-3-fosfát jsou dále využívány v EMP metabolické dráze^{4,5}. Centrálním metabolitem, společným téměř pro všechny produkty, je acetyl-CoA. Avšak pouze dvě třetiny celkového množství hexos je zpracováno na tento metabolit, zbylá třetina odchází do atmosféry v podobě oxidu uhličitého⁶.

Při vsádkové kultivaci tvoří rozpouštědla produkující druhy rodu *Clostridium* vodík, oxid uhličitý, acetát a butyrát během fáze exponenciálního růstu, která se zároveň často označuje jako acidogenní fáze. Při přechodu kultury do stacionární fáze růstu dochází ke změně metabolismu, kdy se koncovými produkty stávají rozpouštědla a nastává tak solventogenní fáze. Během této fáze dochází k reasimilaci kyselin za stálé spotřeby uhlikatého zdroje⁴. Rovnováha mezi koncovými množstvími redukovaných, neutrálních a oxidovaných produktů v průběhu celé fermentace je vyvažována regulací produkce vodíku a ATP. Celkový zisk těchto látek je závislý na kultivačních podmínkách a použitím klostridiálního kmenu⁶. Butanol může být také tvořen přímo ze sacharidického zdroje bez zpětného využití již vytvořených kyselin, přičemž se netvoří vodík a nedochází k tvorbě ATP⁴. Alespoň částečná reutilizace kyselin je typická pro druhy *C. acetobutylicum* a *C. beijerinckii*, ale v případě *C. tetanomorphum* se tvoří simultánně butyrát s butanolem, aceton se netvoří a k reutilizaci butyrátu nedochází vůbec⁶.

Přechod z acidogenní fáze růstu do solventogenní bývá dáván do souvislosti s poklesem pH a akumulací kyselin uvnitř buňky a samotná tvorba rozpouštědel z kyselin je také považována za detoxifikační proces, chránící buňky před acidifikací vnitřního prostředí. Přechod z acidogenní do solventogenní fáze je však velmi komplikovaným dějem, který je podmíněn řadou požadavků ze strany klostridiálních buněk⁹.

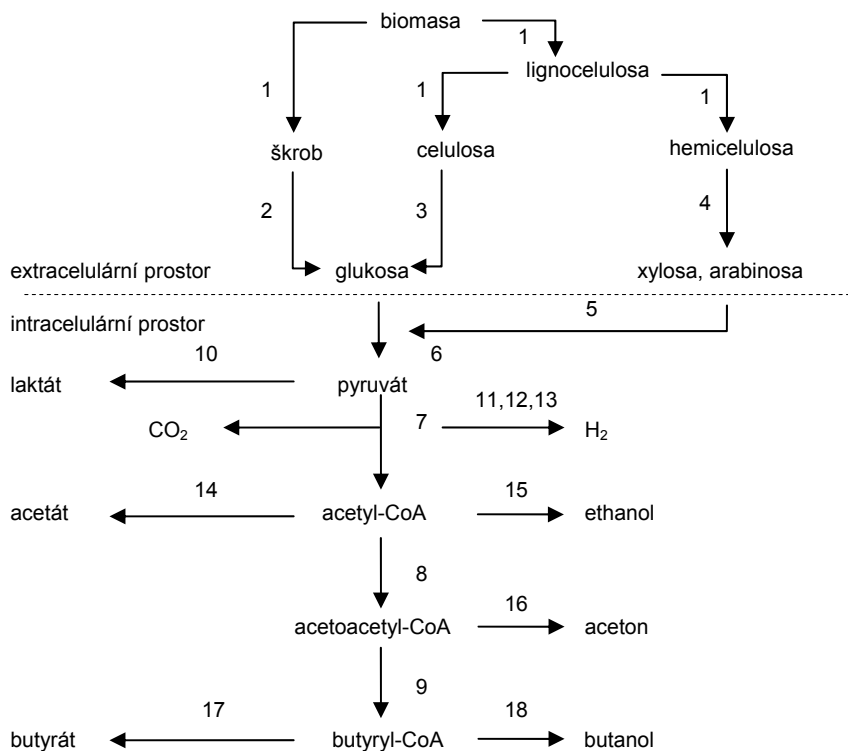
Počáteční zkušenosti s tvorbou rozpouštědel u klostridií naznačovaly, že regulace tvorby rozpouštědel je přímo spojená s regulací sporulace. Tento předpoklad však byl vyvrácen izolací mutantních, nesporulujících klostridiálních kmenů, tvořících rozpouštědla⁴. Nicméně podrobným mapováním procesu sporulace a sledováním morfologických změn kmene *C. acetobutylicum* P262 bylo zjištěno, že tvorba rozpouštědel není podmíněna proběhnutím kom-

pletní sporulace, ale že je nutné, aby se změnila morfologie klostridiálních buněk z tyčinkovitého tvaru do tzv. „typicky klostridiálního tvaru“ tj., aby buňky byly nafouklé, připomínající doutníčky nebo paličky. Pokud buňky nepodstoupí tuto morfologickou změnu, která je zároveň prvním předstupněm sporulace, nejsou ani schopné tvořit rozpouštědla^{10,11}. Toto pozorování bylo potvrzeno i nalezením genu *spo0A* u *C. beijerinckii* NCIMB 8052, který je zodpovědný jak za nastartování sporulace, tak za tvorbu rozpouštědel¹².

3. Možnosti využití škrobnatých a celulosových materiálů

Klostridia jsou schopná produkovat různé enzymy, které štěpí polysacharidy na monomery (obr. 1), např. α -amylasu, α -glukosidasu, β -amylasu, β -glukosidasu, glukono-

amylasu, pullulanasu a amylopullulanasu^{7,13}. Příkladem škrobnatých materiálů, které mohou být použity pro výrobu biobutanolu jsou brambory, které jsou také původním substrátem, který byl při aceton-butanolovém kvašení používán. Patrně nejlepších výsledků s kmenem *C. beijerinckii* NRRL B592 bylo dosaženo při použití čistě bramborového média bez přidavku dalších látek, a proto jsou brambory velmi atraktivní surovinou pro zpracování ve velkém měřítku¹⁴. Experimenty s klostridiálními kmeny různých druhů porovnávaly použití brambor bez přidavku enzymového amylolytického preparátu a s jeho přidavkem, přičemž bylo zjištěno, že kmeny z různých taxonomických skupin tvořících rozpouštědla jsou schopny utižovat bramborového škrobu i bez použití enzymových přípravků¹⁵. Kromě brambor byly jako další škrobnaté zdroje v minulosti i ve velkém měřítku s úspěchem používány další zemědělské plodiny – obilí, kukuřice a rýže a v laboratoři byly také testovány netradiční suroviny – topinambury a biomasa mořských řas⁴.



Obr. 1. Zjednodušená konverze rostlinné biomasy na rozpouštědla u bakterií rodu *Clostridium*; 1. předúprava zrna / lignocelulosa; 2. hydrolýza škrobu (α -amylasa, β -amylasa, pullulanasa, glukamylasa, α -glukosidasu); 3. hydrolýza celulosy (celulasa, β -glukosidasu); 4. hydrolýza hemicelulosy; 5. absorpce xylosy/arabiny a následná transformace transketolasovou-transaldolasovou sekvencí na fruktosa 6-fosfát a glyceraldehyd 3-fosfát postupnou metabolizací Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) drahou; 6. přenos glukosy fosfotransferasovým systémem a konverze na pyruvát EMP drahou; 7. pyruvát-ferredoxin oxidoreduktasa; 8. thiolasa; 9. 3-hydroxybutyl-CoA dehydrogenasa, krotonasa a butyryl-CoA dehydrogenasa; 10. laktát dehydrogenasa; 11. NADH-ferredoxin oxidoreduktasa; 12. NADPH-ferredoxin oxidoreduktasa; 13. hydrogenasa; 14. fosfát acetyltransferasa, acetát kinasa; 15. acetaldehyd dehydrogenasa, ethanol dehydrogenasa; 16. acetoacetyl-CoA:acetát/butyryl-CoA transferasa, acetoacetát dekarboxylasa; 17. fosfát butyltransferasa, butyrát kinasa; 18. butyraldehyd dehydrogenasa, butanol dehydrogenasa^{7,8}

Ačkoliv u kmene *C. acetobutylicum* ATCC 824 byly identifikovány geny pro tvorbu enzymů celulosomu a bylo prokázáno, že se řada těchto enzymů i exprimuje za podmínek indukce příslušným substrátem, celulosom jako celek není funkční a tento ani jiný rozpouštědlový kmen rodu *Clostridium* celulosu nedegraduje^{16,17}. Schopnost využívat celulosu je omezena na termofilní klostridia např. *C. thermocellum*, neprodukcující rozpouštědla¹⁸. Z tohoto důvodu je při využití celulosových a lignocelulosových materiálů nutno přistoupit k předúpravě.

Velkoobjemové kvasné výroby používající lignocelulosové materiály využívají většinou techniku parní expanze k rozrušení lignocelulosy na hemicelulosu, lignin a celulosu. Dále jsou jednotlivé složky odděleny a celulosu zcukřena enzymovou hydrolýzou. Cukry získané z celulosy a hemicelulosy jsou pak následně použity jako substrát pro aceton-butanol-ethanolovou (ABE) fermentaci⁴. Většina monosacharidů a disacharidů, které se z lignocelulosových materiálů uvolní, jako jsou glukosa, celobiosa, galaktosa, mannosy, arabinosa a xylosy jsou přímo využitelné pro ABE fermentaci. Názory se však různí v tom, zda je v případě směsi těchto sacharidů přednostně využívána glukosa¹⁹ nebo zda se směs těchto sacharidů využívá příslušným klostridiálním kmenem simultánním způsobem²⁰.

Bylo zjištěno, že při alkalické hydrolýze lignocelulosových materiálů se tvoří soli, které vykazují inhibiční účinek na *C. beijerinckii* P260. Fermentační médium je pak nutno zbavit inhibitorů, má-li být fermentace úspěšná. Při kontrolních kultivacích, kde byla jako zdroj uhlíku použita glukosa, bylo zjištěno 21,37 g l⁻¹ ABE v porovnání s kultivacemi s hydrolyzátem zbaveným solí, kde koncentrace ABE dosáhla 22,17 g l⁻¹ a kultivací s neupraveným hydrolyzátem, kde bylo dosaženo jen 2,59 g l⁻¹ ABE (cit.²¹).

Pro využití odpadní zemědělské biomasy jako substrátu ABE fermentace lze použít kyselou hydrolýzu^{4,20,21}. Kyselá hydrolýza užívá ošetření materiálu zředěnou kyselinou sírovou za zvýšené teploty. Nevýhodou této metody je tvorba komplexní směsi mikrobiálních inhibitorů, mezi které patří furaldehyd, 5-hydroxymethylfuraldehyd (HMF), kyselina glukuronová, kyselina ferulová a kyselina o-kumarová^{4,20}.

Některé studie ukazují, že furaldehyd a jeho deriváty, vznikající při kyselou hydrolýze, v koncentracích překračujících 2 g l⁻¹, mají při ABE fermentaci 50% inhibiční efekt³. Při kultivaci *C. beijerinckii* BA101 však bylo zjištěno, že furaldehyd a 5-hydroxymethylfuraldehyd působí na růst tohoto mikroorganismu stimulačně, naopak výrazný inhibiční vliv na produkci rozpouštědel byl pozorován v přítomnosti 0,3 g l⁻¹ kyseliny ferulové (kompletní inhibice při 1 g l⁻¹) a 0,5 g l⁻¹ kyseliny *p*-kumarové²⁰.

Další možností předúpravy lignocelulosových materiálů pro ABE fermentaci je enzymová hydrolýza. Užití ligninolytických enzymů dřevokazných hub je další alternativou enzymové hydrolýzy, které ale prozatím brání nízká množství produkovaných enzymů za neindukčních podmínek²².

4. Uspořádání procesu

Vsádkové uspořádání procesu pro výrobu biobutanolu je omezeno produktivitou menší než 0,5 g l⁻¹ h⁻¹ z důvodu zejména nízké koncentrace buněk a produktové inhibice. U vsádkového uspořádání fermentace se dosahuje koncentrací klostridiálních buněk v bioreaktoru nižších než 4 g l⁻¹. Koncentraci buněk v bioreaktoru však lze zvýšit buď recyklací buněk nebo jejich imobilizací. Další nevýhodou použití vsádky je vysoká koncentrace zbytkového substrátu při počáteční koncentraci substrátu vyšší než 70 g l⁻¹ (cit.^{7,23,24}).

Kultivační proces s přítokem substrátu (fed-batch) obchází některé nevýhody vsádkového uspořádání, např. částečně eliminuje inhibici produkty. Reaktor nejdříve pracuje vsádkově s nízkou koncentrací substrátu v malém objemu a poté se začne dávkovat koncentrované médium v množství odpovídajícímu rychlosti spotřeby substrátu – reakční objem i koncentrace produktu se zvyšuje do doby, kdy nastane buď limitace substrátem, produktem nebo kdy je proces ukončen a produkt separován. Přítokované uspořádání se bohužel samostatně nehodí pro ABE fermentaci z důvodu vysoké toxicity butanolu k produkčním kmenům, a proto ho lze použít jen v případě, že je současně separován butanol z fermentačního média²⁴.

V posledních dekádách bylo provedeno mnoho studií zabývajících se alternativami butanolové fermentace a separací produktu. Tyto techniky využívají kontinuálního uspořádání procesu s imobilizovanými buňkami nebo s recyklem buněk v návaznosti na on-line separaci produktu⁷.

5. Separace produktu

Vypuzování rozpouštědel plynem (stripování) je technika, která může být použita pro získávání butanolu v průběhu ABE fermentace. Tato technika využívá probublávání fermentačního média plynem, který unáší těkavé látky z fermentoru do kondenzátoru, z kterého jsou po zkapalnění jímány. Suchý plyn se vrací do fermentoru a celý proces se opakuje. Na vypuzování lze použít inertní dusík nebo pro zlepšení ekonomiky procesu kvasný plyn, který je šetrný vůči mikrobiální kultuře. Kvasný plyn obsahuje především CO₂ a H₂. Použití tohoto procesu pro extrakci butanolu z média může zvýšit produktivitu reaktoru o více než 40 %. Koncentrace butanolu v kondenzátu dosahuje 8 %, což je několikrát více než koncentrace v kontrolních vsádkách^{2,4,7,24–27}.

Další metodou pro získávání butanolu z fermentačního média je extrakce kapalina-kapalina. Extrakce kapalina-kapalina využívá organického s vodou nemísitelného extrakčního činidla, ve kterém je butanol rozpustnější než ve vodě. Butanol se koncentruje v organické fázi, ze které se získává po oddělení od fermentačního média. Jako extraktant se obvykle používá olej alkohol pro jeho nízkou toxicitu a dobré extrakční vlastnosti. Další extrakční činidla, která byla pro extrakci kapalina-kapalina zkou-

šena, jsou např. dibutyl ftalát nebo methylovaný surový palmový olej. Jednou z výhod této metody je, že neodstraňuje z média substrát, vodu ani nutrienty. Extrakční činidlo se přidává k fermentačnímu médiu v poměru 1–1,5 : 1 (médium : extraktant), míchá a následně přivádí do extraktoru, kde se oddělí organická a vodní fáze. Nevýhodou metody je toxicita extraktantu, možnost tvorby suspenzí (špatné dělení směsi), spotřeba extrakčního činidla. Zvýšení produktivity systému a zamezení hromadění buněk na mezifázovém rozhraní lze dosáhnout imobilizací buněk na matici^{7,28,29}.

Pertrakce je proces využívající principu extrakce kapalina-kapalina s oddělením kultivačního média od extraktantu pomocí membrány. Tato metoda má několik výhod proti klasické extrakci – neprojevuje se toxicita extraktantu na buňky kultury, nedochází k akumulaci buněk v extraktantu nebo na mezifázovém rozhraní a nedochází k tvorbě suspenzí. V systému s pertrakční membránou pak dochází k přednostní difuzi butanolu membránou, přičemž jiné komponenty média či fermentační meziprodukty zůstávají ve vodní fázi. Celkový přenos butanolu přes membránu tedy závisí na rychlosti difuze membránou⁷.

Pervaporace je technika, která umožňuje selektivní odstraňování těkavých organických látek z fermentačního média pomocí membrány, která je z jedné strany v kontaktu s fermentačním médiem, a proto mohou těkavé látky difundovat přes membránu. Požadované látky jsou pak získávány kondenzací par na opačné straně membrány. Tento proces nevykazuje nepříznivé účinky na fermentační mikroorganismy a je levnější než klasická destilace. Membrány se vyrábí ze silikonu, polypropylenu a mají v pórech imobilizovaný polypropylen-oleyl alkohol^{7,24,30}.

K odstraňování butanolu z fermentačního média adsorbci se používají např. silikáty, které jsou selektivní pro butanol a mají kapacitu okolo 90 mg g⁻¹ a 20 mg g⁻¹ pro aceton. Po adsorbci se butanol desorbuje sekvenčním zahříváním. Tato metoda poskytuje na výstupu koncentrovaný roztok butanolu (okolo 80 %). Silikát se po každém cyklu regeneruje zahřátím na 200 °C. Jiné testované adsorbenty jsou např. aktivní uhlí, polymerní pryskyřice, polyvinylpyridin a další³¹.

6. Závěr – vyhlídky do budoucnosti

Biobutanolová fermentace má v současnosti řadu omezení jako např. nízkou výtěžnost a produktivitu procesu způsobenou především malou tolerancí solventogenních klostridií k butanolu. Dalšími problémy jsou často pozorovaná degenerace použitého kmene, spočívající ve ztrátě nebo snížení schopnosti tvořit rozpouštědla a také citlivost produkčních kmenů k napadení bakteriofágem. Rovněž regulace metabolických drah není ještě zcela zvládnutá.

Pro možné průmyslové využití je proto jednou z možností genetické vylepšení klostridiálních kmenů používaných pro ABE fermentaci. K potřebné modifikaci metabolických cest solventogenních klostridií je používáno kombinace technologie využívající rekombinantní DNA

s klasickou mutagenezí a selekcí⁷. Další možností je pak izolace nových klostridiálních kmenů s technologicky výhodnějšími vlastnostmi; v nedávné době byl izolován nový kmen *C. butyricum* se značným potenciálem pro průmyslové využití při ABE fermentaci³².

Jinou alternativou je lepší zvládnutí jak techniky hydrolýzy lignocelulosových materiálů, tak izolace fermentačních produktů z kultivačního média, čímž by se zvýšila rentabilita celého procesu.

Tato studie byla zpracována s finanční podporou projektu NAZV č. QH81323/2008 a výzkumného záměru MSM6046137305.

LITERATURA

1. Lee S. Y., Park J. H., Jang S. H., Nielsen L. K., Kim J., Jung K. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, v tisku.
2. Qureshi N., Saha B. C., Hector R. E., Hughes S. R., Cotta M. A.: *Biomass Bioenergy* 32, 168 (2008).
3. Claassen P. A. M., Budde M. A. W., López-Contreras A. M.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 39 (2000).
4. Jones D. T., Woods D. R.: *Microbiol. Rev.* 50, 484 (1986).
5. Rehm H. J., Reed G. (ed.), v knize: *Biotechnology*. Vol. 1, str. 298. VCH, Weinheim 1993.
6. Flickinger M. C., Drew S. W. (ed.): *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Wiley, New York 1999.
7. Ezeji T. C., Qureshi N., Blaschek H. P.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 220 (2007).
8. Castaño D. M.: *Dizertace*. Technische Universität München, München 2003.
9. Terracciano J. S., Kashket E. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 86 (1986).
10. Jones D. T., van der Westhuizen A., Long S., Allock E. R., Reid S. J., Woods D. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1434 (1982).
11. Long S., Jones D. T., Woods D. R.: *Biotechnol. Lett.* 6, 529 (1984).
12. Ravagnani A., Jennert K. C. B., Steiner E., Grünberg R., Jefferies J. R., Wilkinson S. R., Young D. I., Tidswell E. C., Brown D. P., Youngman P., Morris J. G., Young M.: *Mol. Microbiol.* 37, 1172 (2000).
13. Badr H. R., Toledo R., Hamdy M. K.: *Biomass Bioenergy* 20, 119 (2001).
14. Nimcevic D., Schuster M., Gapes J. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 426 (1998).
15. Gutierrez N. A., Maddox I. S., Schuster K. C., Swoboda H., Gapes J. R.: *Bioresour. Technol.* 66, 263 (1998).
16. Nöling J., Breton G., Omelchenko M. V., Makarova K. S., Zeng Q., Gibson R., Lee H. M., Dubois J., Qiu D., Hitti J.: *J. Bacteriol.* 183, 4823 (2001).
17. López-Contreras A. M., Gabor K., Martens A. A., Renckens B. A. M., Claassen P. A. M., van der Oost J., de Vos W. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5238 (2004).

18. Zhang Y-H. P., Lynd L. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7321 (2005).
19. El Kanouni A., Zerdani I., Zaafa S., Znassni M., Loutfi M., Boudouma M.: *World J Microbiol Biotechnol* 14, 431 (1998).
20. Ezeji T., Qureshi N., Blaschek H. P.: *Biotechnol. Bioeng.* 97, 1460 (2007).
21. Qureshi N., Saha B. C., Hector R. E., Cotta M. A.: *Biomass Bioenergy*, v tisku.
22. Šušla M., Svobodová K.: *Chem. Listy* 100, 889 (2006).
23. Badr H. R., Toledo R., Hamdy M. K.: *Biomass Bioenergy* 20, 119 (2001).
24. Qureshi N., Ezeji T. C.: *Biofuels Bioprod. Bioref.* 2, 319 (2008).
25. Qureshi N., Saha B. C., Cotta M. A.: *Biomass Bioenergy* 32, 176 (2008).
26. Qureshi N., Li Xin-Liang, Hughes S., Saha B. C., Cotta M. A.: *Biotechnol. Prog.* 22, 673 (2006).
27. Qureshi N., Blaschek H. P.: *Renewable Energy* 22, 557 (2001).
28. Qureshi N., Maddox I. S.: *J. Ferment. Bioeng.* 80, 185 (1995).
29. Ishizakia A., Michiwakia S., Crabbea E., Kobayashia G., Sonomotoa K., Yoshinob S.: *J. Biosci. Bioeng.* 87, 352 (1999).
30. Qureshi N., Meagher M. M., Huang J., Hutkins R.W.: *J. Membr. Sci.* 187, 93 (2001).
31. Qureshi N., Hughes S., Maddox I. S., Cotta M. A.: *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27, 215 (2005).
32. Montoya D., Arevalo C., Gonzales S., Aristizabal F., Schwarz W. H.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 329 (2001).

J. Lipovský, P. Patáková, M. Rychtera, H. Čížková, and K. Melzoch (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Prospects of Butanol Production from Starch and Cellulose Materials**

An interest in butanol production technologies based on clostridial fermentation of various polysaccharides has recently revived. In particular starch materials were used in an original process. At present cellulose is considered to be superior for production of second-generation biofuels. Various modifications of the process are discussed.