

## LIGNIN A JEHO BIOKONVERZE NA POLYHYDROXYALKANOÁTY BAKTERIÍ *PSEUDOMONAS PUTIDA*

DOMINIK MARŠÍK

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

Došlo 29.12.21, přijato 15.1.23.

Rostlinná biomasa je velice slibným zdrojem surovin pro výrobu udržitelných paliv a chemikálií jinak pocházejících z ropných produktů. Součástí rostlinné biomasy je mimo jiné lignin, který je jedním z hlavních přírodních zdrojů aromatických sloučenin. Přestože se jedná o rozsáhlý vedlejší produkt průmyslu a obnovitelný zdroj uhlíku, další zpracování na produkty s přidanou hodnotou je v současné době velice omezené. Jednou z mnoha aktuálně studovaných aplikací ligninu je jeho biokonverze na polyhydroxyalkanoáty neboli biologicky odbouratelné polymery, které by mohly díky svým vlastnostem nalézt uplatnění ve výrobě produktů pro každodenní použití nebo v lékařských aplikacích a v budoucnu nahradit plasty na bázi ropy. Produkovány jsou řadou bakterií ve formě intracelulárních granulí, jejich průmyslovému zavedení však brání vysoké výrobní náklady, které se odvíjí zejména od ceny zdroje uhlíku využitého pro kultivaci. Účinnou biokonverzí ligninu na polyhydroxyalkanoáty bychom mohli získat ekologické a nákladově efektivní biorafinérie. Nicméně k úspěšnému převedení technologie do průmyslového měřítka je nutné připravit biologického činitele, který bude rychle a účinně asimilovat aromatické složky ligninu. Nadějným kandidátem je metabolicky všestranná bakterie *Pseudomonas putida*. I přestože se jedná o bakterii s lignolytickou aktivitou, komercializace procesu vyžaduje vedle výzkumu v oblasti genetické a metabolické regulace také přípravu kvalitního substrátu, který závisí na zdroji a samotném izolačním postupu a pravděpodobně se neobejde bez dobré charakterizace a předúpravy ligninu.

Klíčová slova: lignin, polyhydroxyalkanoáty, *Pseudomonas putida*, bioplasty

### Obsah

1. Úvod
2. Lignin
  - 2.1. Biosyntéza ligninu
3. Polyhydroxyalkanoáty
  - 3.1. Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů
4. Závěr

### 1. Úvod

Plasty tvoří neodmyslitelnou součást našich každodenních životů a jsou nezbytné pro fungování moderní společnosti. V mnoha průmyslových a medicínských aplikacích úspěšně nahrazují sklo, dřevo i kov. Na druhou stranu, stále rostoucí množství biologicky nerozložitelného plastového odpadu představuje pro lidstvo globální ekologický problém. Každoroční celosvětová produkce plastů přesahuje více než 350 milionů tun (cit.<sup>1,2</sup>) a přibližně 50 % z celkového množství je použito na produkty určené ke spotřebě a likvidaci do jednoho roku od nákupu<sup>3</sup>. Zásoby fosilních paliv jsou navíc omezené a v dohledné době dojde k jejich vyčerpání. Z těchto důvodů je vyvíjena snaha nahradit plasty na bázi ropy bioplasty s obdobnými vlastnostmi<sup>4</sup>. Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC)<sup>5</sup> definuje bioplasty jako polymery na biologické

bázi odvozené z biomasy nebo monomerů získaných z biomasy. Tyto materiály mohou být jak biodegradovatelné, tak nebiodegradovatelné. V literatuře se lze setkat s označením bioplast i pro biodegradovatelné plasty odvozené z fosilních paliv, nicméně zařazení do této skupiny se nedoporučuje<sup>6</sup>.

Jedním z velice slibných bioplastů jsou biodegradovatelné polyhydroxyalkanoáty (PHA). Zdrojem PHA je řada mikroorganismů, které ukládají tento polymer na biologické bázi intracelulárně jako zásobu uhlíku a energie. Jejich fyzikální vlastnosti jsou srovnatelné s běžnými komoditními plasty na bázi ropy, jako je polypropylen, polyethylen nebo polystyren<sup>7</sup>. V současné době jsou využívány jako přísada k polylaktidovým vláknům (PLA) a polyvinylchloridu (PVC) využívaných v kosmetice, medicíně a textilních materiálech<sup>4</sup>. I přes příznivé prognózy nárůstu produkce PHA jsou bioplasty obecně ve srovnání s plasty na bázi ropy stále využívány zřídka. Dle údajů zveřejněných European Bioplastics ve spolupráci s nova-Institute (Hürth, Německo)<sup>2</sup> dosahovala celosvětová kapacita produkce bioplastů v roce 2020 přibližně 2,11 milionů tun. Téměř 60 % těchto materiálů bylo biologicky rozložitelných, 1,7 % zaujímaly PHA. Do roku 2025 se předpokládá navýšení produkce PHA na 11,5 % celkového množství bioplastů.

Aby byla mikrobiální výroba PHA schopná průmyslově konkurovat výrobě syntetických plastů, je potřeba

snížit náklady na bakteriální kultivaci. Zdroj uhlíku tvoří asi 50 % celkových výrobních nákladů. Z tohoto důvodu stále roste potřeba vývoje nových mikrobiálních procesů využívajících levné zdroje uhlíku. Důležitými požadavky na substrát je konstantní kvalita a stabilita, dostupnost ve stálém množství a kvalitě po celý rok<sup>4</sup>. Vhodným kandidátem je lignin, který tvoří s polysacharidy celulosou a hemicelulosou více než 90 % lignocelulosové biomasy<sup>8</sup>. Zatímco celulóza je široce využívána v papírenském, textilním, potravinářském nebo chemickém průmyslu<sup>9</sup>, lignin je obvykle považován za vedlejší nebo odpadní produkt výroby<sup>10</sup>. V roce 2017 dosahovala celosvětová produkce sulfátové buničiny pro výrobu papíru přibližně 130 milionů tun, čímž bylo současně vyprodukováno okolo 70 milionů tun ligninu. Odpadní lignin lze potenciálně spalováním převést na teplo a energii<sup>11</sup>, nicméně jeho přímé spalování je bez ohledu na původ limitováno vysokým obsahem vody, heterogenním složením polymeru a tvorbou toxických produktů<sup>12,13</sup>. V současné době se na výrobu produktů s přidanou hodnotou využívá pouze 5 % z celkového dostupného množství ligninu. Z těchto důvodů je více než žádoucí najít cesty k valorizaci a dalšímu využití tohoto odpadního produktu<sup>11</sup>.

Mezi metabolicky všestranné mikroorganismy schopné degradace ligninu patří zástupci rodu *Pseudomonas*<sup>14</sup>. Jedná se o rozsáhle studované bakterie produkující polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA)<sup>4</sup>. Nalezení účinné cesty přeměny ligninu na PHA by otevřelo cestu pro zavedení udržitelné moderní lignocelulosové biorafinérie<sup>15</sup>.

## 2. Lignin

Lignin je nejrozšířenějším obnovitelným zdrojem aromatických sloučenin<sup>16,17</sup> a po celulóze druhým nejvíce zastoupeným biopolymerem na Zemi<sup>18</sup>, který tvoří 15 až 40 % sušiny většiny vyšších suchozemských rostlin<sup>16,17</sup>. Jako jedna ze tří hlavních složek biomasy představuje významný rezervoár uhlíku a jeho rozklad významně ovlivňuje uhlíkový cyklus<sup>19</sup>. Funkcí ligninu je posilovat buněčné stěny rostlinných buněk, usnadňovat transport vody a působit jako fyzická bariéra chránící rostliny před patogeny. Strukturálně se jedná o heteropolymer složený z guayacylových (G), syringylových (S) a *p*-hydroxyfenylových (H) podjednotek odvozených z odpovídajících hydroxykořicových alkoholů – koniferylalkoholu, sinapylalkoholu a *p*-kumarylalkoholu lišících se pouze stupněm methoxylace (schéma 1). Dosud bylo ve struktuře ligninu objeveno celkem 35 přirozeně se vyskytujících sloučenin z jedenácti skupin – hydroxykořicové alkoholy, hydroxyarylpropanoly, hydroxykořicové estery, hydroxykořicové aldehydy, hydroxykořicové kyseliny, estery hydroxycinamátu, hydroxycinnamidy, hydroxybenzaldehydy, hydroxybenzoové kyseliny, hydroxystilbeny a flavonoid tricín<sup>20</sup>. Během lignifikace jsou vzniklé monomery připojeny k rostoucímu řetězci mechanismem radikálové polymerace, která je vysoce flexibilní<sup>17,21</sup>. Výsledné množství

a složení ligninu je ovlivněno stupněm vývoje rostliny či environmentálními podmínkami a liší se v závislosti na druhu rostliny, pletivu, typu buněk a vrstvě buněčné stěny. Komplexnost a rigidita ligninu nicméně znesnadňuje determinaci struktury polymeru a v současnosti neexistuje jednoduchá metoda umožňující přesnou kvantifikaci monomerních jednotek včetně vzájemného propojení. S využitím několika metod lze stanovit pouze aproximační složení, které by nemělo být generalizováno pro daný rostlinný druh nebo tkáň. Obecně však vlákna a cévy rostlin obsahují z největší části tři základní hydroxykořicové alkoholy a od nich odvozené acetáty, *p*-hydroxybenzoáty a *p*-kumaráty. Ostatní monolignoly jsou obvykle zastoupeny zřídka<sup>20</sup>. Pro lignin nahosemenných rostlin je pak typická absence S podjednotek a větvenější struktura v porovnání s ligninem krytosemenných rostlin, který je bohatý na podjednotky G a S. Feruláty a kumaráty jsou zastoupeny především v buněčných stěnách trav, kde mechanicky chrání mikrofibrily složené z celulosy proti působení mikroorganismů<sup>17</sup>. Lignin jednoděložných trav rovněž obsahuje malé, ale významné množství H podjednotek, které se u dvouděložných rostlin nacházejí pouze ve stopovém množství<sup>22</sup>.

### 2.1. Biosyntéza ligninu

Komplexní strukturu ligninu lze přiblížit s pomocí biosyntézy ligninových monomerů. Syntéza dosud známých monolignolů je odvozena z obecné fenylpropanoidové dráhy (schéma 1). Výchozím substrátem biosyntézy je fenylalanin, který je konvertován působením ammonia-lyasy na kyselinu skořicovou. Tyrosin slouží pouze jako dodatečný substrát biosyntézy ligninu trav a za působení ammonia-lyasy je přeměněn na kyselinu *p*-kumarovou. Vzniku hydroxykořicových alkoholů předchází redukce karboxylové kyseliny a v případě koniferyl a sinapyl alkoholů rovněž methoxylace aromatického kruhu. Redukce karboxylové kyseliny je katalyzována prostřednictvím 4CL, CCR a CAD a po reakci jsou postupně uvolňovány příslušné thioestery CoA, aldehydy a alkoholy. Hydroxylaci aromatického kruhu zajišťují enzymy cytochromu-P450, konkrétně C4H, C3H a F5H, zatímco 3-*O*-methylaci a 5-*O*-methylaci zprostředkovávají *O*-methyltransferasy COMT a CCoAOMT (cit.<sup>20</sup>). Alternativně mohou být konečnými produkty biosyntézy kyselina ferulová a sinapová vzniklé oxidací příslušných aldehydů po katalýze HCALDH (cit.<sup>23,24</sup>). Vysvětlení zkratk viz legenda k schématu 1.

Několik enzymů fenylpropanoidové dráhy jako 4CL, CCR, CAD, HCT, COMT, HCALDH a F5H katalyzuje více substrátů, díky čemuž mohou být koniferyl alkohol a sinapyl alkohol syntetizovány více paralelními cestami<sup>20</sup>. Vzniklé hydroxykořicové alkoholy mohou sloužit jako monomery ligninu nebo mohou být za katalýzy acyltransferas PMT či FMT transformovány na  $\gamma$ -*O*-acylované esterové konjugáty. Mimoto slouží aktivované formy derivátů skořicové kyseliny k biosyntéze dalších tříd ligninových monomerů. *p*-Kumaroyl-CoA je substrátem pro



známo více než 150 odlišných monomerních struktur PHA, jejichž struktura závisí např. na producentovi či zdroji uhlíku použitým při kultivaci<sup>4</sup>. Dle počtu atomů uhlíku obsažených v monomeru lze PHA rozdělit na polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (scl-PHA), polyhydroxyalkanoáty se středním řetězcem (mcl-PHA) a PHA obsahující opakující se scl a mcl (scl-co-mcl PHA) jednotky, přičemž monomer scl-PHA obsahuje od 3 do 5 atomů uhlíku, zatímco monomer mcl-PHA je složen z 6 až 14 atomů uhlíku<sup>29</sup>. Vzhledem k vyšší pružnosti, pevnosti v tahu, nižšímu stupni krystalinity a dostatečnému bodu tání jsou polymery mcl-PHA preferovaným produktem před scl-PHA (cit.<sup>4</sup>) pro výrobu bioplastů.

Mimo zásobní funkci přispívají PHA k odolnosti mikrobiálních buněk proti stresovým podmínkám. Obecně napomáhají zachovat buněčnou integritu při náhlé osmotické nerovnováze, slouží jako účinné kryoprotektanty a například 3-hydroxybutyrát zvyšuje odolnost enzymů proti tepelné denaturaci a oxidačnímu stresu<sup>4</sup>. Především se ale jedná o udržitelný, biokompatibilní, kompletně biologicky rozložitelný materiál s nízkými emisemi CO<sub>2</sub>, díky čemuž jsou PHA vhodnou alternativou k současným plastům vyrobených z ropy. Mimoto možnost přizpůsobení molekulové hmotnosti, tepelných a mechanických vlastností, umožňuje využít PHA jako chemické prekurzory a paliva na bázi methylesterů<sup>15</sup>.

### 3.1. Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

Za optimálních podmínek může produkce PHA bakteriálními buňkami dosahovat až 90% výtěžků, vztaheno na suchou hmotnost biomasy<sup>4</sup>. Ve studii Langenbach a spol.<sup>30</sup> se podařilo syntetizovat vysoký obsah PHA v *E. coli* s využitím mastných kyselin jako zdroje uhlíku. Z důvodu vysoké ceny mastných kyselin bylo potřeba nalézt další možnosti syntézy. Wang a spol.<sup>29</sup> úspěšně produkovali PHA v rekombinantní *E. coli* s využitím glukosy a glycerolu. Vzhledem k tomu, že glukosu lze získat z celulosy a glycerol je vedlejším produktem výroby bio-nafty, jedná se o potenciálně vhodné zdroje uhlíku k produkci PHA, jejichž cena bude pravděpodobně s rozvojem technologií klesat. I přes úspěšnou produkci PHA v *E. coli* s využitím celulosy a glycerolu jako zdroje uhlíku je v současné době stále poptávka po alternativních systémech, které by snížily produkční náklady. Celulosa a glycerol jsou rovněž využívány i v dalších odvětvích průmyslu<sup>31,32</sup>. Naproti tomu je použití ligninu v současné době stále limitováno<sup>33</sup> a vzhledem k jeho rozšíření se jedná o vhodný zdroj uhlíku s potenciálem snížit náklady na produkci PHA. Biologická valorizace ligninu mikroorganismy však vyžaduje nejprve rozklad polymeru za vzniku nízkomolekulárních látek, které mohou být dále přeměněny na produkty s přidanou hodnotou.

Degradovat lignin jsou schopné tzv. houby bílé hniloby. Jejich průmyslové využití nebylo nikdy úspěšně komercializováno z důvodu nestability, obtížné exprese rekombinantních proteinů a komplexnosti genomu. Naproti tomu bakterie rodu *Pseudomonas*, které jsou známé rov-

něž lignolytickou aktivitou, velmi dobře akumulují energeticky bohaté složky jako PHA, dobře se adaptují na různé typy prostředí a jsou pro ně běžně dostupné systémy pro genetickou modifikaci<sup>19</sup>. Vhodný zástupce rodu *Pseudomonas* pro utilizaci ligninu je *P. putida*, která produkuje mcl-PHA (cit.<sup>34</sup>) a je rovněž ceněna pro své nízké nutriční požadavky, vysokou toleranci vůči toxickým látkám a širokou metabolickou diverzitu<sup>35</sup>. Navíc se jedná o bakteriální druh efektivně transportující extracelulární aromatické sloučeniny do interiéru buňky jak aktivním, tak pasivním transportem<sup>35</sup>. Samotný rozklad ligninu zahajuje *P. putida* oxidoreduktasami (lakasami, peroxidasami), jejichž účinkem jsou z polymeru uvolňovány sloučeniny, které mohou být následně využívány metabolickými drahami pro aromatické látky<sup>15</sup>. Z důvodu komplexní struktury ligninu se obvykle pro studium a optimalizaci procesu volí modelové sloučeniny jako kyselina vanilová, *p*-kumarová nebo ferulová<sup>36</sup>. Kyselina vanilová je klíčový mezi-produkt v metabolismu ligninu, protože spojuje několik periferních drah s centrální metabolickou dráhou β-ketoadipátu, která generuje acetyl-CoA potřebný k *de novo* syntéze mastných kyselin využitých k produkci PHA (cit.<sup>15</sup>). Obdobně jako u *E. coli* lze i u *P. putida* využít jako zdroj uhlíku k produkci PHA přímo mastné kyseliny podléhající β-oxidaci. Obě zmíněné metabolické cesty vedou ke vzniku (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, který je pomocí PHA-synthas kódovaných geny *PhaC* začleněn do řetězce mcl-PHA. Pokud je zdrojem uhlíku při kultivaci přímo mastná kyselina, předchází vzniku (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA hydratace meziprojektu β-oxidace *trans*-2-enoyl-CoA katalyzovaná hydratasou kódovanou genem *PhaJ*. V opačném případě, kdy je potřeba syntézu mastných kyselin zajistit, dochází ke konverzi meziprojektů metabolické dráhy na (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP, který podléhá hydrolyze na volnou hydroxy mastnou kyselinu, ke které je následně připojen prostřednictvím ligasy kódované genem *AlkK* koenzym A (schéma 2). V případě úplného vyčerpání zdroje uhlíku může nastat rovněž depolymerace PHA katalyzovaná prostřednictvím PHA-depolymeras *PhaZ* (cit.<sup>36</sup>).

K akumulaci mcl-PHA u *P. putida* dochází zejména za podmínek kultivace v nadbytku uhlíku a limitaci jednoho z dalších nutrientů, např. dusíku. Při nedostatku dusíku nastává při kultivaci s využitím kyseliny vanilové indukce enoyl-CoA-hydratasy kódované genem *PhaJ*, která pravděpodobně přispívá k produkci mcl-PHA. Nedostatek dusíku na druhou stranu limituje růst, což ovlivňuje jeden z kritických faktorů produkce PHA, a to množství celkové biomasy<sup>15</sup>. Ve snaze zvýšit efektivitu produkce mcl-PHA byla využita celá řada metod genového inženýrství s cílem posílit expresi operonu syntézy PHA; vyřadit konkurenční metabolickou dráhu – β-oxidaci mastných kyselin; zvýšit dodávku NADH nebo NADPH; změnit morfologii a zvětšit buňky nebo zamezit utilizaci PHA (cit.<sup>36</sup>). Komercializace procesu se neobejde bez efektivní biokonverze ligninu, která vyžaduje mimo nalezení optimálních podmínek kultivace rovněž cílený zásah do metabolismu *P. putida*<sup>35</sup>. U *P. putida* se podařilo odstraněním genu pro Crc protein



dosáhnout usnadněné konverze ferulové a *p*-kumarové kyseliny na kyselinu *cis,cis*-mukonovou. Crc protein řídí v bakterii katabolickou represi aromatických sloučenin v přítomnosti preferovaných substrátů, jako je acetat a jeho odstraněním tak lze zvýšit produktivitu kmene v prostředí heterogenního substrátu<sup>37</sup>. Samotnou asimilaci aromatických sloučenin lze přímo podpořit např. vysokou expresí genu *VanAB* kódujícího vanilát-*O*-demethylasu, která katalyzuje klíčový krok metabolismu aromatických sloučenin – přeměnu kyseliny vanilové na kyselinu protocatechovou (schéma 2). Nadprodukce tohoto enzymu u *P. putida* zlepšila růst a akumulaci PHA v případě využití kyseliny vanilové nebo ligninu jako jediného zdroje uhlíku<sup>35,38</sup>. Při depolymerizaci ligninu mohou vznikat rovněž substráty, které není *P. putida* schopna přirozeně užívat. Jako příklad lze uvést guajakol vznikající bazicky katalyzovanou depolymerizací měkkého dřeva. Toto omezení se podařilo vyřešit ve studii García Hidalgo a spol.<sup>39</sup>, kteří zavedli do *P. putida* cytochrom P450 z *Rhodococcus rhodochrous* za účelem demethylace guajakolu na catechol, který je pro *P. putida* snadno využitelný.

#### 4. Závěr

Přestože je *P. putida* schopna lignin sama depolymerovat, jedná se o metabolicky a časově náročný proces, který dále limituje špatná rozpustnost polymeru v kultivačním médiu. Již tak rozmanitá struktura ligninu navíc závisí na vstupní surovině a samotném procesu izolace z lignocelulose biomasy. Klíčovým krokem procesu je samotná extrakce velmi čistého ligninu, které předchází uvolnění sacharidové frakce přerušáním vazeb v lignocelulose komplexu. Následuje depolymerace, která zvyšuje rozpustnost produktu a umožňuje separaci ligninu od biomasy. V průběhu procesu má lignin rovněž tendenci repolymerovat, čímž roste jeho komplexnost. Komericializace procesu se tak pravděpodobně neobejde bez efektivní předúpravy ligninu použitého pro kultivaci zahrnující separaci výhodných, ve vodě rozpustných substrátů získaných z rozpadu polymeru a snížení tvorby inhibitorů bakteriálního růstu. Pouze s kvalitním vstupním substrátem lze naplno využít výhod biologického systému, který funguje dobře v mírných podmínkách. Během návrhu procesu předúpravy ligninu je potřeba nalézt rovnováhu mezi ekonomickými aspekty a efektivitou při zachování environmentálně šetrného provozu. U procesu je dále potřeba zohlednit možnost implementace v komerčním měřítku<sup>40,41</sup>.

*Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2\_FPBT\_2023\_036.*

#### Seznam zkratk

4CL	4-kumarát-CoA-ligasa (4-coumarate:CoA ligase)
<i>AlkK</i>	mastná kyselina se středním řetězcem-CoA-ligasa (medium-chain-fatty-acid-CoA ligase)
C3H	<i>p</i> -kumarát-3-hydroxylasa ( <i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase)
C4H	cinamát-4-hydroxylasa (cinnamate 4-hydroxylase)
CAD	cinnamylalkohol-dehydrogenasa (cinnamyl alcohol dehydrogenase)
CCoAOMT	kafeoyl-CoA- <i>O</i> -methyltransferasa (caffeoyl-CoA <i>O</i> -methyltransferase)
CCR	cinnamoyl-CoA-reduktasa (cinnamoyl-CoA reductase)
CoA/HSCoA	koenzym A (coenzyme A)
COMT	kyselina kávová- <i>O</i> -methyltransferasa (caffeic acid <i>o</i> -methyltransferase)
Crc	regulátor represe katabolitů (catabolite repression control)
CSE	kafeoyl-šikimát-esterasa (caffeyol shikimate esterase)
F5H	ferulát-5-hydroxylasa (ferulate 5-hydroxylase)
FMT	feruloyl-CoA-monolignol-transferasa (feruloyl-CoA monolignol transferase)
G	guayacyl (guaiacyl)
H	<i>p</i> -hydroxyfenyl ( <i>p</i> -hydroxyphenyl)
HCALDH	hydroxycinnamaldehyd-dehydrogenasa (hydroxycinnamaldehyde dehydrogenase)
HCT	<i>p</i> -hydroxycinnamoyl-CoA:chinát/šikimát- <i>p</i> -hydroxycinnamoyl-transferasa ( <i>p</i> -hydroxycinnamoyl-CoA:quinat/shikimate <i>p</i> -hydroxycinnamoyltransferase)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a udržitelnou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem (medium chain length polyhydroxyalkanoate)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
PHA	polyhydroxyalkanoáty (polyhydroxyalkanoates)
<i>Phac</i>	poly(3-hydroxyalkanoát)-polymerasa [poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase]
<i>PhaJ</i>	( <i>R</i> )-specifická-enoyl-CoA-hydratasa [( <i>R</i> )-specific enoyl-CoA hydratase]
<i>PhaZ</i>	PHA-depolymerasa (PHA depolymerase)
PLA	polylaktid (polylactide)
PMT	<i>p</i> -kumaroyl-CoA-monolignol-transferasa ( <i>p</i> -coumaroyl-CoA monolignol transferase)
PVC	polyvinylchlorid (polyvinyl chloride)
S	syringyl (syringyl)



scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (short chain length polyhydroxyalkanoate)
<i>VanA</i>	vanilát- <i>O</i> -demethylasa podjednotka A (vanillate <i>O</i> -demethylase oxygenase subunit)
<i>VanB</i>	vanilát- <i>O</i> -demethylasa podjednotka B (vanillate <i>O</i> -demethylase oxidoreductase subunit)

## LITERATURA

- Chinthapalli R., Skoczinski P., Carus M., Baltus W., de Guzman D., Káb H., Raschka A., Ravenstijn J.: *Ind. Biotechnol.* **15**, 237 (2019).
- Nova-Institute.: *15<sup>th</sup> European Bioplastics Conference, 30 November–3 December 2020, virtual*, poster Bioplastics market development update 2020, [https://docs.european-bioplastics.org/conference/Report\\_Bioplastics\\_Market\\_Data\\_2020\\_short\\_version.pdf](https://docs.european-bioplastics.org/conference/Report_Bioplastics_Market_Data_2020_short_version.pdf), staženo 15. 12. 2021.
- Singh P., Sharma V. P.: *Procedia Environ. Sci.* **35**, 692 (2016).
- Mozejko-Ciesielska J., Szacherska K., Marciniak P.: *J. Polym. Environ.* **27**, 1151 (2019).
- Vert M., Doi Y., Hellwick K. H., Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schué F.: *Pure Appl. Chem.* **85**, 377 (2012).
- Rosenboom J. G., Langer R., Traverso G.: *Nat. Rev. Mater.* **7**, 117 (2022).
- Muhammadi S. A. M., Hameed S.: *J. Polym. Environ.* **27**, 1151 (2019).
- Williams C. L., Emerson R. M., Tumuluru J. S., v knize: *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy* (Tumuluru J. S., ed.), str. 251. IntechOpen, Rijeka 2017.
- Sundarraj A. A., Ranganathan T. V.: *Drug Invent. Today* **10**, 89 (2018).
- Luo H., Klein I. M., Jiang Y., Zhu H., Liu B., Kenttämaa H. I., Abu-Omar M. M.: *ACS Sustainable Chem. Eng.* **4**, 2316 (2016).
- Supanchaiyamat N., Jetsrisuparb K., Knijnenburg J. T. N., Tsang D. C. W., Hunt A. J.: *Bioresour. Technol.* **272**, 570 (2019).
- Tsvetkov M. V., Salganskii E. A.: *Russ. J. Appl. Chem.* **91**, 1129 (2018).
- Font R., Esperanza M., García A. N.: *Chemosphere* **52**, 1047 (2003).
- Bugg T. D. H., Ahmad M., Hardiman E. M., Singh R.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 394 (2011).
- Wang X., Lin L., Dong J., Ling J., Wang W., Wang H., Zhang Z., Yu X.: *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, 18 (2018). doi: 10.1128/AEM.01469-18.
- Cao Y., Chen S. S., Zhang S., Ok Y. S., Matsagar B. M., Wu K. C. W., Tsang D. C. W.: *Bioresour. Technol.* **291**, 121878 (2019).
- Ragauskas A. J. a 15 spoluautorů: *Science* **344**, 709 (2014).
- Argyropoulos D. S., Menachem S. B., v knize: *Biopolymers from renewable resources*, (Kaplan D. L., ed.), str. 292. Springer, Heidelberg 1998.
- Lin L., Wang X., Cao L., Xu M.: *Environ. Microbiol.* **21**, 1847 (2019).
- Vanholme R., De Meester B., Ralph J., Boerjan W.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **56**, 230 (2019).
- Ralph J., Lapierre C., Boerjan W.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **56**, 240 (2019).
- Vogel J.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 301 (2008).
- Nair R. B., Bastress K. L., Ruegger M. O., Denault J. W., Chapple C.: *Plant Cell* **16**, 544 (2004).
- Vanholme R. a 12 spoluautorů: *Plant J.* **64**, 885 (2010).
- Petrik D. L. a 12 spoluautorů: *Plant J.* **77**, 713 (2014).
- Smith R. A. a 11 spoluautorů: *Biotechnol. Biofuels* **10**, 109 (2017).
- Saleme M. d. L. S. a 14 spoluautorů: *Plant Physiol.* **175**, 1040 (2017).
- Ha C. M., Escamilla-Trevino L., Yance J. C. S., Kim H., Ralph J., Chen F., Dixon R. A.: *Plant J.* **86**, 363 (2016).
- Wang Q., Tappel R. C., Zhu C., Nomura C. T.: *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 519 (2012).
- Langenbach S., Rehm B. H., Steinbüchel A.: *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 303 (1997).
- Jedvert K., Heinze T.: *J. Polym. Eng.* **37**, 845 (2017).
- Fan X., Burton R., Zhou Y.: *Open Fuels Energy Sci. J.* **3**, 17 (2010).
- Chio C., Sain M., Qin W.: *Renewable Sustainable Energy Rev.* **107**, 232 (2019).
- Borrero-de Acuña J. M., Bielecka A., Häussler S., Schobert M., Jahn M., Wittmann C., Jahn D., Poblete-Castro I.: *Microb. Cell Fact.* **13**, 88 (2014).
- Lee S., Sohn J.-H., Bae J.-H., Kim S. C., Sung B. H.: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **25**, 862 (2020).
- Salvachúa D. a 17 spoluautorů: *Microb. Biotechnol.* **13**, 290 (2020).
- Johnson C. W., Abraham P. E., Linger J. G., Khanna P., Hettich R. L., Beckham G. T.: *Metab. Eng. Commun.* **5**, 19 (2017).
- Lin L., Cheng Y., Pu Y., Sun S., Li X., Jin M., Pierson E. A., Gross D. C., Dale B. E., Dai S. Y.: *Green Chem.* **18**, 5536 (2016).
- García-Hidalgo J., Ravi K., Kuré L.-L., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.: *AMB Express* **9**, 34 (2019).
- Anthony W. E., Carr R. R., DeLorenzo D. M., Campbell T. P., Shang Z., Foston M., Moon T. S., Dantas G.: *Biotechnol. Biofuels* **12**, 192 (2019).
- Kumar M., You S., Beiyuan J., Luo G., Gupta J., Kumar S., Singh L., Zhang S., Tsang D. C. W.: *Bioresour. Technol.* **320**, 124412 (2021).

**D. Maršík** (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*):  
**Lignin and Its Bioconversion to Polyhydroxyalkanoates by the Bacterium *Pseudomonas putida***

Plant biomass is a very promising source of raw materials to produce sustainable fuels and chemicals otherwise derived from petroleum-based products. Part of plant biomass is lignin, which is one of the main natural sources of aromatic compounds. Although it is a large industrial by-product and a renewable carbon source, further processing into value-added products is currently limited. One of many applications of lignin under consideration is its bioconversion to polyhydroxyalkanoates, i.e., biodegradable polymers, which, due to their properties, could find their use in the fabrication of everyday products or in medicine and replace petroleum-based plastics in the future. They are produced by various bacteria in the form of intracellular granules but their industrial implementation is hindered by high production costs, which depend mainly on the price of the carbon source used for cultivation.

Through the efficient bioconversion of lignin to polyhydroxyalkanoates, we could obtain environment-friendly and cost-effective biorefineries. However, to successfully bring the technology to an industrial scale, it is necessary to prepare a biological agent that will quickly and efficiently assimilate the aromatic components of lignin. The metabolically versatile bacterium *Pseudomonas putida* represents a promising candidate. Although it is a bacterium with lignolytic activity, the commercialization of the process requires further research on genetic and metabolic regulation and the preparation of a quality substrate, which depends on the source and the isolation process itself, and the success is unlikely to be achieved without good characterization and pretreatment of lignin.

**Keywords:** lignin, polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas putida*, bioplastics

*Acknowledgements*

*This work was supported from the grant of Specific university research – grant No A2\_FPBT\_2023\_036.*