



# Genetyczna modyfikacja drobnoustrojów do produkcji etanolu z hydrolizatów hemicelulozowych

*Jacek Nowak*  
Instytut Technologii Żywności  
Pochodzenia Roślinnego  
Akademia Rolnicza  
Poznań

## 1. Wstęp

Surowce lignocelulozowe są uważane za najtańszy i najbardziej dostępny substrat do produkcji bioetanolu paliwowego, jednakże konieczna jest znaczna redukcja kosztów, aby taki etanol mógł stać się alternatywą dla ropy naftowej. Podstawowym problemem technicznym pozostaje wydajna fermentacja etanolowa frakcji hemicelulozowej. Hemicelulozy stanowią aż 10-50% suchej substancji materiałów lignocelulozowych; przykładowo, powszechnie występująca słoma pszenna zawiera 24-30% hemiceluloz.

Hemicelulozy można stosunkowo łatwo hydrolizować do heksoz (D-glukozy, D-galaktozy i D-mannozy) i pentoz (D-ksylozy, L-arabinozy). Większość obecnie stosowanych technologii hydrolizy materiałów lignocelulozowych prowadzi do wytworzenia hydro-



lizatu hemicelulozowego, który może być oddzielony i fermentowany niezależnie od komponentów glukozowo-celulozowych (1). Warunki hydrolizy kwasowej muszą być na tyle łagodne aby nie doprowadzić do degradacji cukrów do furfuralu i innych produktów obniżających wydajność cukrów i inhibujących proces fermentacji (2). Stąd hydrolizę kwasową prowadzi się przy użyciu rozcieńczonych roztworów kwasu siarkowego. Z uwagi na drogą aparaturę i uciążliwość dla środowiska naturalnego metody oparte na hydrolizie kwasowej są wycofywane z użycia (3). W najnowszych rozwiązaniach preferuje się metody enzymatyczne, w których hemicelulozy są hydrolizowane w łagodnych warunkach do cukrów prostych, a następnie prowadzi się hydrolizę celulozy przy użyciu celulaz. Należy jednak wyraźnie stwierdzić, że hydroliza enzymatyczna jest ciągle mało wydajna i relatywnie wolna. Wynika to głównie z braku odpowiednio aktywnych preparatów enzymatycznych.

Duże nadzieje na efektywne wykorzystanie substratów lignocelulozowych jako źródła do bezpośredniej produkcji etanolu pokłada się w zastosowaniu metod inżynierii genetycznej do konstrukcji nowych szczepów mikroorganizmów zdolnych do równoległej produkcji enzymów hemicelulolitycznych i fermentacji etanolowej.

Istnieje co prawda cały szereg mikroorganizmów, jak *Candida shehatae*, *Paschysolen tannophilus* czy *Pichia stipitis*, które fermentują ksylozę z zadowalającą wydajnością, jednak ich hodowla wymaga bardzo precyzyjnej kontroli parametrów technologicznych, w tym także utrzymania podłoża hodowlanego w stanie lekkiego natlenienia by uzyskać optymalne wydajności. Ponadto organizmy te wytwarzają często mieszaninę etanolu z ksylitolem i są zdecydowanie mniej odporne na inhibitory zawarte w hydrolizatach (1,2,4-6).

Analizując literaturę przedmiotu z tego zakresu można stwierdzić, że większość prowadzonych prac z zakresu inżynierii genetycznej koncentruje się wokół rozszerzenia możliwości fermentacyjnych najbardziej znanych producentów etanolu, a mianowicie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i bakterii *Zymomonas mobilis*, oraz modyfikacji metabolizmu bakterii *Escherichia coli*, tak aby etanol stał się głównym metabolitem końcowym.

## 2. Modyfikacje genetyczne *Zymomonas mobilis*

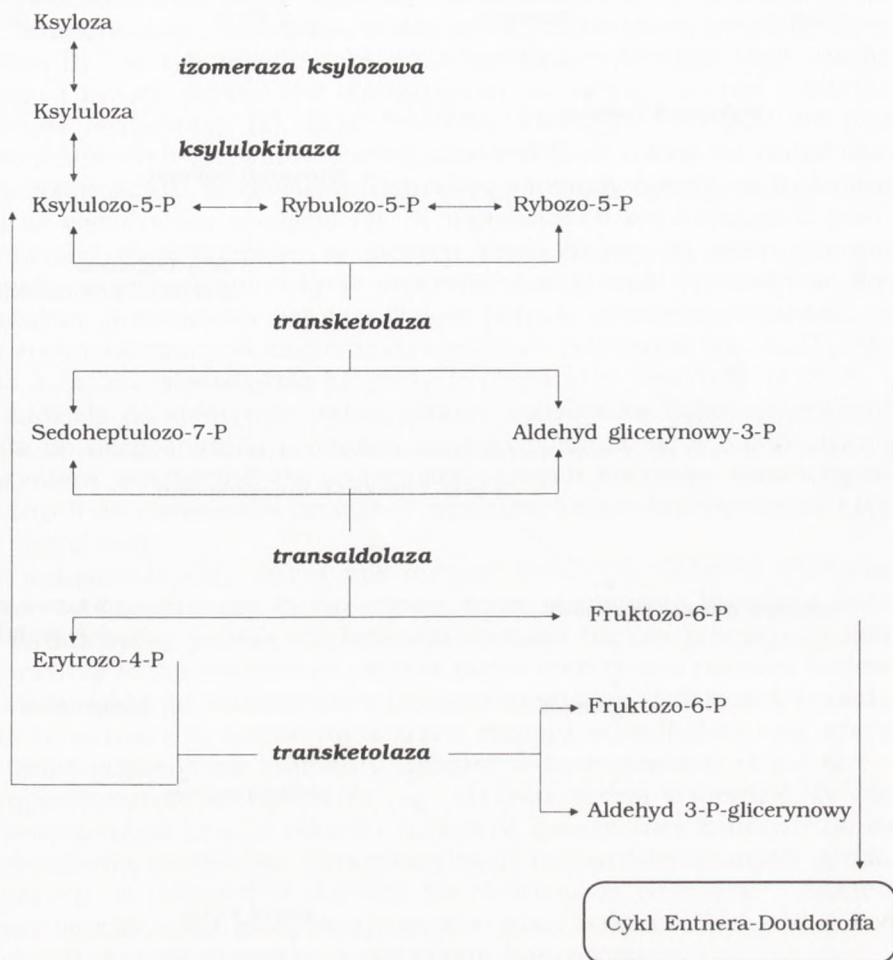
Bakterie *Z. mobilis*, obok drożdży *S. cerevisiae*, są uważane za organizmy najbardziej wydajne w fermentacji etanolowej i w ostatnich latach są szeroko wprowadzane do produkcji przemysłowej (7). Ciekawie przedstawiają się właściwości technologiczne bakterii *Z. mobilis* na tle drożdży. Korzyści wynikające z zastosowania bakterii *Z. mobilis* do biosyntezy etanolu polegają na znacznie wyższej produktywności etanolu w ciągłych systemach fermentacji i większej wydajności etanolu z jednostki zużytego cukru, przy mniejszej wydajności biomasy (8). Dzięki mniejszej koncentracji biomasy w fermentorze, na procesy anaboliczne zużywana jest mniejsza ilość energii, co prowadzi do oszczędności substratu niezbędnego do wzrostu biomasy komórkowej. Na podkreślenie zasługuje także 3-5-krotnie wyższa szybkość przyswajania cu-



Rys. 1. Ogólny schemat przemian w cyklu Entnera-Doudoroffa.

krów przez kultury *Z. mobilis* niż drożdże. Bakterie wykazują także możliwość wzrostu w środowisku całkowicie beztlenowym, co różni je od drożdży, które wymagają kontrolowanych dawek tlenu do budowy własnych komórek. Tolerancja na etanol w przypadku bakterii jest porównywalna z drożdżami, a niektórzy autorzy twierdzą, że wyższa (9). Ilość produktów ubocznych metabolitów tworzonych przez *Z. mobilis* w czasie fermentacji etanolowej, jest niższa niż w przypadku drożdży (10). Podstawową cechą ograniczającą zakres surowców węglowodanowych jest możliwość wykorzystywania przez bakterie tylko trzech cukrów: glukozy, fruktozy i sacharozy. *Z. mobilis* nie fermentują pentoz, natomiast galaktoza jest wykorzystywana przez nie w niskim stopniu. Heksozy fermentowane są według cyklu Entnera-Doudoroffa (rys. 1).





Rys. 2. Metabolizm pentoz w rekombinowanym szczepie *Z. mobilis* (14).

Wolny postęp w pracach genetycznych nad *Z. mobilis* wynika w dużym stopniu stąd, że większość szczepów jest oporna na antybiotyki, co utrudnia monitorowanie transferu plazmidów przy użyciu markerów antybiotykowych. Choć prace mające na celu skonstruowanie bakterii, zdolnych do ekspresji genów kodujących enzymy niezbędne do fermentacji ksylozy, zostały zapoczątkowane już w latach osiemdziesiątych (9,11-13), to doprowadziły one do pierwszych większych sukcesów dopiero w roku 1995. Zhangowi i wsp. (14) udało się uzyskać ekspresję czterech genów: izomerazy ksylozowej, ksylulokinazy, transaldolazy i transketolazy, co pozwoliło zmienić szlak metaboliczny bakterii i fermentować ksylozę w cyklu Entnera-Doudoroffa (rys. 2). Uzyskany rekombinant, nazwany CP4 (pZB5), fermentował ksylozę jako jedyne

źródło węgla z wydajnością 86% w stosunku do teoretycznej (14). Stwierdzono jednak, że rekombinowany szczep wzrastał wolniej na glukozie niż szczep kontrolny. Zmodyfikowany mikroorganizm posiadał zdolność fermentowania pożywki zawierającej 25 g glukozy i 25 g ksylozy w 1 dcm<sup>3</sup> pożywki (14). Rogers i wsp. (15) wykazali ostatnio pełne wykorzystanie przez szczep CP4 (pZB5) obu cukrów z pożywki zawierającej 50 g glukozy i 50 g ksylozy w 1 dcm<sup>3</sup> podłoża fermentacyjnego. Stwierdzili też, że co najmniej jeden z enzymów wytwarzanych przez geny wprowadzone do *Z. mobilis*, jest całkowicie inhibowany przy stężeniu etanolu przekraczającym 55 g w 1 dcm<sup>3</sup> pożywki. Pełne wykorzystanie cukrów uzyskano również w hodowlach ciągłych przy zastosowaniu pożywki zawierającej 40 g glukozy i 40 g ksylozy w 1 dcm<sup>3</sup>, stosując szybkość rozcieńczenia w zakresie od 0,05 do 0,06 (h<sup>-1</sup>) i uzyskując koncentrację etanolu bliską 40 g/dcm<sup>3</sup>.

Deanda i wsp. w 1996 r. uzyskali szczep posiadający pięć dodatkowych genów pozwalających na wykorzystanie arabinozy nawet w obecności glukozy (16). Szczep ten był stabilny w temp. 37°C przez siedem generacji. W następnych pracach skierowano się na poprawę stabilności genetycznej szczepu na drodze polepszenia stabilności plazmidu i jego integracji z chromosomem (17).

Pod koniec 1997 r. doniesiono o skonstruowaniu szczepu *Z. mobilis* fermentującego zarówno ksylozę jak i arabinozę, dzięki klonowaniu siedmiu genów przy użyciu wektora plazmidowego. W mieszaninie z glukozą i ksylozą pobór arabinozy przez transformowany szczep jest jednak bardzo wolny co wydłuża czas fermentacji do 80-100 h w temp. 30°C (1).

Dużo mniejszy postęp obserwuje się w skonstruowaniu szczepów *Z. mobilis* fermentujących mannozę lub galaktozę, choć Weisserowi i wsp. (18) udało się wprowadzić do *Z. mobilis* gen *pmi(manA)* (izomerazy fosforomannozowej) z *E. coli* i uzyskać fermentację mannozy jako jedyne źródła węgla.

### 3. Rekombinowane szczepy *Escherichia coli*

Pod koniec lat osiemdziesiątych przeprowadzono wiele prac poświęconych charakterystyce genomu bakterii *Z. mobilis* i izolacji genów związanych z enzymami biorącymi udział w biokonwersji cukrów do etanolu (19-22). Na podstawie uzyskanych wyników Ingram i wsp. (23) zmodyfikowali *E. coli* poprzez transformację genów dekarboksylazy pirogronianowej, katalizującej przemianę pirogronianu do aldehydu octowego i dehydrogenazy alkoholowej, związanej z przemianą aldehydu octowego do etanolu. Autorzy ci skonstruowali plazmid pLOI295 zawierający oba geny i następnie wprowadzili go do szczepu *E. coli* TC4. W rezultacie uzyskano konstrukt, który wytwarzał etanol jako główny produkt fermentacji. Wprowadzone geny *Z. mobilis* wpłynęły na zmianę metabolizmu *E. coli* dzięki wyższemu powinowactwu dekarboksylazy pirogronianowej z *Z. mobilis* do pirogronianu. Taki układ cechował się wystarczająco niskim poziomem pirogronianu chroniącym przed przemianą pirogronianu do mleczanu czy octanu (23).



Kolejnym krokiem w przygotowaniu tego wektora stanowiło wprowadzenie markera oporności na tetracyklinę (pLOI297) (24). W dalszych pracach doprowadzono do uzyskania szczepu ATCC 11303 (pLOI297), który jest już dość dokładnie przebadany z punktu widzenia jego właściwości i zdolności fermentacyjnych (24-29). Całkowite wykorzystanie ksylozy z podłoża zawierających od 40-140 g/dcm<sup>3</sup> nie hamowało efektywnego odfermentowania innych cukrów. Szczep był stosunkowo odporny na furfural, co pozwalało zastosować go do hydrolizatów substratów lignocelulozowych. Jedynym mankamentem uzyskanego rekombinanta była jego wrażliwość na podwyższoną zawartość kwasu octowego, który obniżał produktywność fermentacji (przy zachowaniu wysokiej wydajności etanolu), a w skrajnych przypadkach prawie całkowicie blokował produkcję etanolu.

W pracach przeprowadzonych przez Ohta i wsp. (30) doprowadzono do powstania szczepu KO11, charakteryzującego się wyższą stabilnością genetyczną i wysoką zdolnością do fermentacji glukozy i ksylozy. Stosując hydrolizaty z odpadów kukurydzianych uzyskano wydajności etanolu zbliżone do 100% (25), a na hydrolizatach z drewna sosnowego szczep produkował etanol z wydajnością 91% w stosunku do teoretycznej (31). W ostatnio opublikowanych pracach, dotyczących szczepów ATCC 11303 i KO11, wskazuje się jednak na problemy z utrzymaniem stabilności genetycznej już po 12 generacjach, nawet przy użyciu pożywki z dodatkiem antybiotyku (32,33).

Pewną trudność w badaniach z zastosowaniem rekombinowanych szczepów *E. coli* stanowiło występowanie katabolicznej represji metabolizmu innych cukrów w obecności glukozy. Aby ominąć tę niedogodność spośród wielu mutantów spontanicznych szczepu KO11 wyizolowano 2 szczepy z defektem transportu glukozy. Szczepy te cechują się wyższą wydajnością produkcji etanolu niż szczep wyjściowy (34).

#### 4. Rekombinowane drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

Drożdże *S. cerevisiae* wykazują zdolność fermentowania ksylozy, natomiast nie metabolizują ksylozy. Wybrana strategia działania polegała zatem na takiej modyfikacji genetycznej, aby drobnoustrój mógł przetworzyć ksylozę do ksylozy, co pozwala na jej włączenie w naturalny szlak metaboliczny prowadzący do etanolu.

Pierwszym krokiem w tych pracach było takie zmodyfikowanie szczepu *S. cerevisiae*, ażeby wykazał zdolność produkcji izomerazy ksylozowej (XI). Geny XI (*xylA*), pochodzące z różnych bakterii, transformowano do drożdży i uzyskiwano ekspresję, jednak tworzona przez rekombinowane szczepy izomeraza ksylozowa była nieaktywna (35-37). Dopiero Walfridsson i wsp. (38) uzyskali aktywność izomerazy XI w szczepie transformowanym genem z termofilnych bakterii *Thermus thermophilus*. Wzrost zmodyfikowanego szczepu na ksylozie był jednak słaby.

Inna strategia, stosowana do modyfikacji genetycznej drożdży *S. cerevisiae*, polegała na przeniesieniu do *S. cerevisiae* drogi metabolicznej wyko-



rzywania ksylozy występującej normalnie w *Pichia stipitis*. Ten cykl metaboliczny zapoczątkowany jest przemianami, w których reduktaza ksylozowa (XR) i dehydrogenaza ksylitolowa (XDH) przetwarza ksylozę do ksylulozy (3). Skonstruowano kilka szczepów *S. cerevisiae* zawierających geny reduktazy ksylozowej (*XYL1*) i dehydrogenazy ksylitolowej (*XYL2*) pochodzące z *P. stipitis*. Produkcja etanolu przez tak zmodyfikowane szczepy *S. cerevisiae* była jednak niska, a produktem wytwarzanym w największej ilości okazał się ksylitol. Taki przebieg procesu fermentacji wiązał się częściowo z brakiem równowagi redukcyjno-oksydacyjnej w komórce zmodyfikowanego mikroorganizmu. Niższe powinowactwo XR do NADH niż do NADPH, powodowało bowiem nagromadzenie się NADH w komórce (39,40).

Lepsze rezultaty w modyfikacjach genetycznych drożdży uzyskali Chen i Ho (41), którzy skonstruowali szczep *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* 1400) zawierający plazmid z genami *XYL1* i *XYL2* z *P. stipitis* i dodatkową kopię genu ksylulokinazy z *S. cerevisiae*. Szczep ten był zdolny do wykorzystania ksylozy jako jedyne źródła węgla z wydajnością około 70% (42).

## 5. Wnioski końcowe

Możliwości uzyskiwania etanolu na drodze fermentowania hydrolizatów surowców uzyskanych przez szczepy mikroorganizmów otrzymane na drodze modyfikacji genetycznej są wysoce zachęcające. Co prawda, takie parametry jak: stabilność genetyczna, odporność na etanol, niska szybkość fermentacji i wreszcie występowanie represji katabolicznej wymagają przeprowadzenia dalszych intensywnych prac. Należy jednak stwierdzić, że istnieją realne przesłanki do skonstruowania mikroorganizmów, które pozwolą na znacznie lepsze wykorzystanie wszystkich węglowodanowych składników biomasy roślinnej i umożliwią ekonomicznie opłacalną produkcję etanolu, konkurencyjną do paliw ropopochodnych. Postęp naukowy jaki dokonał się od roku 1995 jest tak szybki, że otrzymanie wkrótce szczepu nadającego się do przemysłowej produkcji etanolu z hydrolizatów hemicelulozowych, jak się wydaje, jest pewne.

## Literatura

1. Dumsday G. J., Jones K., Stanley G. A., Pamment N. B., (1997), Australian Biotechnol., 7, 285-295.
2. Clark T. A., Mackie K. E., (1984), J. Chem. Tech. Biotech., 34B, 101-107.
3. Hahn-Hägerdal B., Jeppsson H., Olsson L., Mohagheghi A., (1994), Appl. Microbiol. Biotechnol., 41, 62-72.
4. Hahn-Hägerdal B., Jeppsson H., Skoog K., Prior B. A., (1994), Enzyme Microb. Technol., 16, 933-943.
5. Olsson L., Linden T., Hahn-Hägerdal B., (1992), Appl. Biochem. Biotechnol., 34/35, 359-368.
6. Prior B. A., Kilian S. G., du Preez J. C., (1989), Process Biochem., 24, 21-32.
7. Nowak J., Roszyk H., (1997), Polish J. Food Nutr. Sci., 6/47, 65-70.



8. Rogers P. L., Joachimsthal E. L., Hagget K. D., (1997), *Australian Biotechnol.*, 7, 304-309.
9. Bucholz S. E., Eveleigh D. E., (1990), *Biotech. Adv.*, 8, 547-581.
10. Nowak J., Czarniecki Z., Kamiński E., (1997), *Proc. 1<sup>st</sup> Symp. In Vino Analytica Scientia*, Bordeaux, 431-434.
11. Park S. C., Kademi A., Baratti J. C., (1993), *Biotechn. Letts.*, 15, 1179-1184.
12. Sprenger G. A., (1993), *J. Biotechnol.*, 27, 225-237.
13. Strzelecki A. T., Goodman A. E., Watson J. M., Rogers P. L., (1993), *Biotechn. Letts.*, 15, 679-684.
14. Zhang M., Eddy C., Deanda K., Finkelstein M., Picataggio S., (1995), *Science*, 276, 240-243.
15. Rogers P. L., Lee K. J., Lee J. H., Skotnicki M. L., (1984), *CRC Crit. Revs. Biotechnol.*, 1, 273-288.
16. Deanda K., Zhang M., Eddy C., Picataggio S., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4465-4470.
17. Zhang M., Chou Y.-C., Mohagheghi A., Evans K., Finkelstein M., (1997), *Proc. 19<sup>th</sup> Symp. Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Colorado Springs, May 4-8.
18. Weisser P., Kramer R., Sprenger G. A., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4155-4161.
19. Brau B., Sahm H., (1986), *Arch. Microbiol.*, 144, 296-301.
20. Conway T., Osman Y. A., Konnan J. I., Hoffmann E. M., Ingram L. O., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 949-954.
21. Conway T., Sewell G. W., Osman Y. A., Ingram L. O., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 2591-2597.
22. Neale A. D., Scopes R. K., Wettenhall R. E. H., Hoogenraad N. J., (1987), *Nucleic Acid Res.*, 15, 1753-1761.
23. Ingram L. O., Conway T., Clark D. P., Sewell G. W., Preston J. F., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2420-2425.
24. Alterthum F., Ingram L. O., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1943-1948.
25. Beall D. S., Ingram L. O., (1992), *Biotechnol. Letts.*, 14, 857-862.
26. Lawford H. G., Rousseau J. D., (1991), *Biotechnol. Letts.*, 13, 191-196.
27. Lawford H. G., Rousseau J. D., (1992), *Biotechnol. Letts.*, 14, 421-426.
28. Lawford H. G., Rousseau J. D., (1993), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 39/40, 667-685.
29. Lawford H. G., Rousseau J. D., (1994), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 45/46, 367-381.
30. Ohta K., Beall D. S., Mejia J. P., Shanmugam K. T., Ingram L. O., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 893-900.
31. Barbosa M., Beck M. J., Fein J. E., Potts D., Ingram L. O., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1382-1384.
32. Lawford H. G., Rousseau J. D., (1995), *Biotechnol. Letts.*, 17, 751-756.
33. Lawford H. G., Rousseau J. D., (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57/58, 293-305.
34. Lindsay S. E., Bothast R. J., Ingram L. O., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 70-75.
35. Ho N. W. Y., Stevis P., Rosenfeld S., Huang J. J., Tsao G. T., (1983), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 13, 245-250.
36. Moes C. J., Pretorius I. S., van Zyl W. H., (1996), *Biotechn. Letts.*, 18, 269-274.
37. Sarthy A. V., McConaughty B. L., Lobo Z., Sundstom J. A., Furlong C. L., Hall B. D., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1996-2000.
38. Walfridsson M., Bao X., Anderlund M., Lilius G., Bulow L., Hahn-Hägerdal B., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4648-4651.
39. Kotter P., Ciriacy M., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 776-783.
40. Walfridsson M., Hallborn J., Penttila M., Keranen S., Hahn-Hägerdal B., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4184-4190.
41. Chen Z. D., Ho N. W. Y., (1993), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 39/40, 135-147.
42. Moniruzzaman M., Dien B. S., Skory C. D., Chen Z. D., Hespell R. B., Ho N. W. Y., Dale B. E., Bothast R. J., (1997), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 341-346.



## Genetic modification of microorganisms for ethanol production from hemicellulosic hydrolyzates

### Summary

The efficient and complete conversion of lignocellulosic hydrolysates to ethanol as a result of fermentation processes makes possible the production of a bio-fuel competitive with petroleum. Traditional organisms used in ethanol fermentation, e.g. *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*, are unable to ferment pentose sugars. To overcome this problem genetic modifications of *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* and *E. coli* were performed in order to produce ethanol directly from xylose and arabinose. The performance of the recombinant strains is encouraging: especially over the last 3 years the progress has been rapid. There is a possibility that strains of these three species may find a separate application in the fermentation of specific plant biomasses.

### Key words:

hemicellulosic hydrolyzates, pentose sugars, genetic modification, fermentation, ethanol.

### Adres do korespondencji:

Jacek Nowak, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Akademia Rolnicza, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań.