

## STRESZCZENIE

W ostatnich dziesięcioleciach zaobserwować można odwrotną korelację między wyczerpującymi się złożami paliw kopalnych a wzrastającym na nie zapotrzebowaniem. Zasadnym staje się więc poszukiwanie alternatywnych źródeł energii, tym bardziej, że ceny paliw z roku na rok wzrastają, a bezpieczeństwo energetyczne z każdym dniem staje się coraz mniejsze. Z uwagi na powyższe zwiększa się zainteresowanie wykorzystaniem surowców naturalnych (w tym biomasy) jako niemalże niewyczerpalnego źródła paliw odnawialnych. Jednak aby biomasa stała się wydajnym źródłem energii należy w maksymalny sposób wykorzystać potencjał cukrów będących jej komponentami. Efektywna alkoholowa fermentacja zarówno pięciocukrów jak i sześciocukrów prowadzona przez drożdże jest niezbędna do osiągnięcia maksymalnej wydajności produkcji etanolu z hydrolizatów lignocelulozowych.

Biomasa roślinna zawiera ok. 75% wielocukrów, a więc stanowi bogate ich źródło. Lignoceluloza składa się z trzech podstawowych komponentów: celulozy, ligniny oraz hemicelulozy. Celuloza jest homopolisacharydem glukozy, lub też bardziej precyzyjnie  $\beta$ -D-glukopiranozy, ułożonym w powtarzające się jednostki celobiozy. Lignina – to aromatyczny heteropolimer syntetyzowany z fenylopropanoidowych prekursorów. Natomiast hemiceluloza stanowi rozgałęzione heteropolisacharydy złożone z heksoz, pentoz oraz kwasów uronowych. Proporcje monosacharydów uzyskiwanych z hydrolizatów hemicelulozowych różnią się w zależności od surowca oraz procedury jego hydrolizy z tym, że głównym cukrem większości hemiceluloz jest pentoza – ksyloza. Wspomnieć jednak należy, iż przekształcenie lignocelulozy do etanolu jest znacznie bardziej skomplikowanym procesem niż produkcja etanolu z surowców takich jak trzcina cukrowa, buraki czy też ziarna pszenicy.

Obecnie w fabrykach pilotażowych, fermentację cukrów pochodzących z surowych materiałów prowadzi się w wykorzystaniu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Jednak negatywną cechą tych mikroorganizmów jest ich naturalna zdolność do fermentacji jedynie heksoz, nie wykorzystują one więc ogromnego bogactwa pentoz zawartego w biomacie. Dlatego też wśród naukowców istnieje zainteresowanie również innymi mikroorganizmami, jak bakterie (*Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*) oraz drożdże (*Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha*). Jednocześnie uczeni skupiający się na tych alternatywnych mikroorganizmach, dokładają starań mających na celu skonstruowanie szczepów, które zdolne byłyby nie tylko do maksymalnego wykorzystania obfitości cukrów zawartego w lignocelulozie, ale jednocześnie prowadziłyby proces ten z dostateczną wydajnością. Na drodze przemian

lignocelulozy do etanolu problematycznym jest proces hydrolizy (z uwagi na niskie koszty, jest to często hydroliza kwasowa), w wyniku której ok. 30% cukrów przekształcanych jest do furfuralu oraz 5-hydroksymetylofurfuralu. Akumulacja tychże cukrów prowadzi do zmniejszenia produkcji etanolu o około 30% oraz znaczącego hamowania procesów fermentacji. Natomiast w przypadku hydrolizy enzymatycznej, jednocukry, będące końcowymi produktami hydrolizy hamują aktywność enzymatyczną celulaz i hemicelulaz, dlatego w celu kompletnej hydrolizy wielocukrów lignocelulozy, uwalniane cukry powinny być bezpośrednio (w tym samym zbiorniku) przekształcane przez organizmy fermentujące do etanolu (tzw. proces jednoczesnego scukrzania i fermentacji, SSF). Jednakże proces ten wymaga prowadzenia w wysokich temperaturach, optymalnych dla aktywności celulaz i hemicelulaz (ok. 50°C), dlatego jedynie organizmy termotolerancyjne mogą wytrzymać taki reżim temperaturowy, należą do nich jedne z najbardziej termotolerancyjnych - drożdże *Hansenula polymorpha*. Kolejnym jednak problemem jest fakt, iż dziki szczep tych drożdży zdolny jest do produkcji jedynie 0,5 g/L etanolu z ksylozy.

Dlatego też, celem niniejszej rozprawy było skonstruowanie z wykorzystaniem metod inżynierii metabolicznej oraz klasycznej selekcji szczepów drożdży *H. polymorpha* zdolnych do zwiększonej produkcji etanolu z ksylozy w podwyższonych temperaturach.

Pierwszym etapem badań była nadekspresja genów związanych z metabolizmem ksylozy, a więc genów *XYL1m*, *XYL2*, *XYL3* oraz *PDC1* kodujących kolejno zmodyfikowaną reduktazę ksylozy, dehydrogenazę ksylitolu, kinazę ksylulozy oraz dekarboksylazę pirogronianową. Jako tło genetyczne wybrano otrzymanego w wyniku mutagenyzy promieniowaniem UV mutantu 2EtOH-, charakteryzującego się zwiększoną produkcją etanolu z ksylozy w porównaniu ze szczepem dzikim. Po wprowadzeniu powyższych modyfikacji najlepszy producent etanolu z ksylozy produkował ok. 7,5 g/L z ksylozy, podczas gdy szczep 2EtOH<sup>-</sup> jedynie 2 g/L. Okazało się, że wpływ nadekspresji genu *XYL3* na alkoholową fermentację ksylozy jest większy niż wpływ nadekspresji genu *PDC1*. Nie wykluczone, że nadekspresja genu *PDC1* na tle nadekspresji trzech genów początkowego katabolizmu ksylozy zmniejsza maksymalny poziom ich transkrypcji, zwłaszcza transkrypcji genu *XYL3*, a aktywność produktu tego genu, kodującego enzym ksylulokinazę, może być limitującym etapem w produkcji etanolu.

Jednak otrzymane w ten sposób szczepy w dalszym ciągu nie mogłyby stać się konkurencyjnymi dla szczepów *S. cerevisie* pod względem ilości produkowanego etanolu. Kolejnym więc etapem była selekcja, szczepów, otrzymanych na wcześniejszym etapie prac, opornych na kwas 3-bromopirogronianowy (3-BrPA). Związek ten jest znanym środkiem

przeciwnowotworowym, charakteryzowanym jako inhibitor głównych enzymów szlaku glikolitycznego. W związku z powyższym założono, iż szczepy odporne względem tego związku powinny wykazywać zwiększoną aktywność enzymów glikolitycznych, a tym samym charakteryzować się zwiększoną produkcją etanolu. Maksymalna ilość etanolu produkowanego z ksylozy przez szczepy otrzymane po selekcji na 3-BrPA to ok. 10 g/L w temp. 45°C. Efektywność alkoholowej fermentacji ksylozy w podwyższonej temperaturze w przypadku wykorzystania metod inżynierii metabolicznej oraz klasycznej selekcji wzrosła 25-krotnie w porównaniu do szczepu dzikiego.

Poszukiwano jednak w dalszym ciągu kolejnych dróg polepszenia produkcji etanolu z tego najbardziej obfitego, wśród pentoz zawartych w lignocelulozie, cukru. Wtedy to zdecydowano się na delecję genu *CAT8*, będącego globalnym czynnikiem transkrypcji, odpowiedzialnym równocześnie za transkrypcję genów związanych z glukoneogenezą u drożdży *S. cerevisiae*. Założono, że jeśli rola tego czynnika transkrypcji jest podobna u drożdży *H. polymorpha*, to defekt glukoneogenezy będzie sprzyjał aktywacji odwrotnego procesu – fermentacji alkoholowej. Ustalono, iż ortolog genu *CAT8 H. polymorpha* wykazuje 31% identyczności i 53% podobieństwa do genu *CAT8 S. cerevisiae*. Zdecydowano się na delecję tego genu w tle szczepu dzikiego NCYC 495 *leu 1-1* drożdży *H. polymorpha* oraz najlepszego wyizolowanego wskutek selekcji na 3-BrPA szczepu. Zarówno delecyjny szczep wyizolowany w tle szczepu dzikiego jak i szczepu o już zwiększonej produkcji etanolu, charakteryzowały się zwiększoną produkcją etanolu z ksylozy, wartości te wynosiły 0,78 g/L (dla szczepu NCYC/ $\Delta$ CAT8) oraz 12,5 g/L (dla szczepu 2EtOH/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/ $\Delta$ CAT8), co jednocześnie oznacza, że wartości te są wyższe odpowiednio o 40% i 30% w porównaniu do szczepów wyjściowych. Próbowano określić jakich zmian w genomie drożdży *H. polymorpha* dokonała delecja genu *CAT8*. Okazuje się, że u drożdży *S. cerevisiae* czynnik transkrypcyjny *CAT8* kontroluje ok. 200 genów zaangażowanych w szlaki centralnego metabolizmu w tym kilka czynników transkrypcyjnych. Z przeprowadzonych eksperymentów można wnioskować, że u drożdży *H. polymorpha* regulacja glukoneogenezy odbywa się inaczej, niż u *S. cerevisiae*. Nie można wykluczyć, że u drożdży *H. polymorpha* centralną rolę w regulacji glukoneogenezy odgrywa inny niż *CAT8* gen kodujący aktywator transkrypcji. Odpowiedź na pytanie jaki charakter zmian przyniosła delecja genu *CAT8* mogłaby przynieść całogenomowa analiza transkryptomu, stąd też wciąż pozostaje pole dalszego rozwoju badań.

Wciąż istnieje szereg niezbadanych procesów, szlaków regulatorowych, zależności występujących w komórce, a także ich wzajemnego wpływu na siebie, otwiera to furtkę do kolejnych rozważań.