



FI000119997B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 119997 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

29.05.2009

(51) Kv.lk. - Int.kl.

SUOMI – FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C07H 15/12 (2006.01)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

934087

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag

17.09.1993

(24) Alkupaivä - Löpdag

18.03.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

02.11.1993

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US92/01807

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

18.03.1991 US 670821 P

06.03.1992 US 846344 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •University of Florida, 223 Grinter Hall, Gainesville, FL 32611, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Bioenergy International, L.C., 1901 N.W. 67th Place, Suite E, Gainesville, FL 32601, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Ingram, Lonnie O., 3132 N.W. 57th Terrace, Gainesville, FL 32606, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Beall, David S., 1101 S.W. 20th Place, Gainesville, FL 32601, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Burchhardt, Gerhard F. H., 2701 N.W. 23rd Boulevard, Apt. 78, Gainesville, FL 32605, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Guinjaraes, Walter V., 223 Grinter Hall, Gainesville, FL 32611, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Ohta, Kazuyoshi, 223 Grinter Hall, Gainesville, FL 32611, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

6 •Wood, Brent E., 301 N.W. 13 Avenue, Apt. 5, Gainesville, FL 32601, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

7 •Shanmugam, Keelnatham T., 3215 N.W. 47th Place, Gainesville, FL 32605, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

8 •Fowler, David E., 1708 S.W. 56th Lane, Gainesville, FL 32608, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

9 •Ben-Bassat, Arie, 1901 N.W. 67th Place, Gainesville, FL 32606, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Etanolin tuottaminen rekombinantti-isännillä

Etanolframställning med rekombinatvärdar

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism

67983 ATCC

68240 ATCC

68237 ATCC

68484 ATCC

68238 ATCC

68564 ATCC

68239 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US 4493893 A, US 4612287 A, US 4839286 A, WO 90/02193 A1, WO 92/10561 A1, Archives of Microbiology 144, 1986, Bäu, B. et al., p. 296-301, Applied and Environmental Microbiology 53(2), 1987, Conway, T. et al., p. 235-241, Applied and Environmental Microbiology 53(9), 1987, Tolan, J.S. et al., p. 2033-2038, Applied and Environmental Microbiology 53(9), 1987, Tolan, J.S. et al., p. 2039-2044, Applied and Environmental Microbiology 53(10), 1987, Ingram, L.G. et al., p. 2420-2425, Journal of Bacteriology 169(6), 1987, Conway, T., et al., p. 2591-2597, Nucleic Acids Research 15(4), 1987, Neale, A.D., et al., p. 1753-1761

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena ovat uudenlaiset plasmidit, jotka sisältävät alkoholidehydrogenaasia ja pyruvaattidekarboksylaasia koodaavia geenejä. Kohteena ovat myös rekombinantti-isännät, jotka on transformoitu alkoholidehydrogenaasia ja pyruvaattidekarboksylaasia koodaavilla geeneillä. Tämän geenitransformoinnin ansiosta isännät pystyvät tuottamaan huomattavia määriä etanolia fermentointituotteena. Kohteena ovat myös menetelmät, joilla rekombinantti-isäntien kasvua lisätään ja menetelmät, joilla vähennetään ei-toivottujen metaboliatuotteiden akkumuloituminen näiden isäntien kasvatusvälineessä. Kohteena on myös rekombinantti-isäntä, joka pystyy tuottamaan huomattavia määriä etanolia fermentointituotteena oligosakkarideista sekä plasmidit, jotka sisältävät polysakkaraseja koodavia geenejä yllä kuvattujen alkoholidehydrogenaasia ja pyruvaattidekarboksylaasia koodaavien geenien lisäksi. Kohteena on lisäksi menetelmiä, joilla saadaan edistettyä funktionaalisten proteiinien tuottoa rekombinantti-isännässä, jossa on isännässä yliekspressoiva adhB-geeni. Kohteena on myös prosessikonstruktioita oligosakkarideja sisältävän biomassan fermentoimiseksi etanoliksi.

Uppfinningen avser nya plasmider innehållande gener kodande för alkoholdehydrogenas och pyruvatdekarboxylas. Vidare avser uppfinningen rekombinatvärdar transformerade med gener kodande för alkoholdehydrogenas och pyruvatdekarboxylas. Tack vare denna gentransformation kan dessa värdar producera avsevärda mängder av etanol. Vidare avser uppfinningen förfaranden med vilka förökas rekombinatvärdarnas tillväxt samt förfaranden för förminskning av ackumulering av icke-önskvärda metabolismprodukter i värdarnas odlingsmedium. Uppfinningen avser också en rekombinatvärd som kan producera avsevärda mängder etanol som jäsningsprodukt av oligosackarider samt plasmider innehållande gener kodande för polysackaras utöver de beskrivna gener kodande för alkoholdehydrogenas och pyruvatdekarboxylas. Vidare avser uppfinningen förfaranden som befrämjar produktionen av funktionella proteiner i en rekombinatvärd innehållande en överexpresserande adhB-gen i värden. Uppfinningen avser även processkonstruktioner för jäsnings av oligosackarider innehållande biomassa till etanol.

Etanolin tuottaminen rekombinantti-isännillä - Etanolframställning med rekombinatvärdar

5 Tämä keksintö on tehty valtion tuella Florida Agricultural Experiment Station -laitoksessa USDA Alcohol Fuels Program määrärahoilla 86CRCR12134, 88-37233-3987 ja 90-37233-5372 sekä DOE Office of Basic Energy määrärahalla FG05-86ER13574. Liit-

10

Tämä on osajatkkoa hakemuksille 07/846344, jätetty 6.3.1992, 07/670821, jätetty 18.3.1991 ja 07/624277. jätetty 7.12.1990, jotka ovat osajatkkoa hakemukselle 07/352062, joka on jätetty 15.5.1989 (nyt US-patentti numero 5 000 000), joka puolestaan
15 on osajatkkoa hakemukselle 07/239099, jätetty 31.8.1988 (nyt hylätty). Näihin patentteihin liittyvät asiakirjat on oheen liitetty.

Glykolyysin aikana solut konvertoivat glukoosin kaltaisia yk-
20 sinkertaisia sokereita palorypälehapoksi, lopputuotteina ATP:tä ja NADH:ta. Hapettavan fosforyloinnin toimivan elektronikuljetussysteemin puutteessa vähintään 95 % palorypälehaposta kuluu
:.. lyhyissä reaktioreiteissä, jotka luovat NAD⁺:ia, jatkuvan glyko-
:.. lyysin ja ATP-tuoton ehdoton edellytys. Näiden NAD⁺-regeneroin-
:.. 25 tisysteemien jätetuotteita kutsutaan tavallisesti käymis- l.
:.. fermentointituotteiksi.

:..
:..
:..

Hyvin monet erilaiset mikro-organismilajit tuottavat erilaisia fermentointotuotteita. Tällaisia tuotteita ovat muun muassa
:.. 30 orgaaniset hapot kuten laktaatti, asetaatti, sukkinatti ja
:.. butyraatti, samoin kuin neutraalit tuotteet kuten etanoli, bu-
:.. tanoli, asetoni ja butaanidioli. Bakteereista saatavien fer-
:.. mentointituotteiden laaja-alaisuus on johtanut niiden käyttöön
:.. primaarisina determinantteina taksonomian alalla. Katso esi-
:.. 35 merkiksi Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams &

:..
:..
:..

Wilkins Co., Baltimore, 1984 (tästä eteenpäin käytetään nimitystä "Bergey's Manual").

Fermentointilopputuotteilla on monia yhteisiä peruspiirteitä.

5 Ne ovat suhteellisen ei-toksisia olosuhteissa, joissa niitä alunperin muodostuu, mutta toksisempia akkumuloitumisen myötä. Ne ovat pelkistyneempiä kuin pyruvaatti, koska niiden välittömät prekursorit ovat toimineet terminaalielektroniakseptoreina glykolyysin aikana. Näiden fermentointituotteiden mikrobi-

10 tuotanto muodostaa perustan vanhimmille ja taloudellisesti kannattavimmille bioteknologiasovelluksillemme, joista voidaan mainita meijerituotteet, liha, juomat ja polttoaineet. Viime aikoina bioteknologian alalla on edistytty usealla taholla kun apuna on ollut uusia tekniikoita, joilla tutkijat ovat pysty-

15 neet selektiivisesti muuttamaan joidenkin mikro-organismien geneettistä rakennetta.

Escherichia coli -bakteeri on eräs tärkeä väline geenien kloonauksessa ja modifioinnissa bioteknologian alalla, ja se on

20 eräs tärkeimmistä rekombinanttituotteiden valmistamisessa käytetyistä rekombinantti-isännistä. Viime aikoina yhdistelmä-DNA-tutkimuksessa käytettävien isäntäorganismien (isäntien) valkoima on laajentunut käsittämään myös erilaisia bakteereja, hiivoja, sieniä ja eukaryoottisoluja. Tässä kuvattu keksintö

25 liittyy yhdistelmä-DNA-tekniikan käyttöön hyödyllisten tuotteiden valmistuksen aikaan saamiseksi modifoiduilla isännillä.

Tässä keksinnössä isännän modifiointiin käytettävä DNA voidaan eristää *Zymomonas mobiliksesta*, joka on yleinen bakteeri kasvi-

30 en nesteissä ja hunajassa. *Z. mobilista* on pitkään käytetty inokulaattina palmuviineissä ja fermentoitaessa agaaven mehua pulquen, meksikolaisen alkoholijuoman, valmistamiseksi. Tätä mikrobia käytetään myös etanolipolttoaineen tuottamiseen, ja julkaistujen raporttien mukaan sillä päästään etanolintuotomääriin, jotka ovat olennaisesti hiivoilla saavutettavia suurempia.

35

Vaikka *Z. mobilis* on ravinnollisesti yksinkertainen ja pystyy syntetisoimaan aminohappoja, nukleotidejä ja vitamiineja, tämän organismin metaboloimien sokereiden valikoima on hyvin pieni, ja normaalisti kattaa vain glukoosin, fruktoosin ja sukroosin.

- 5 Näiden sokereiden fermentoinnin fosforylaatio substraattitasolla on biosynteesin ja homeostaasin kannalta ainoa energialähde. *Zymomonas mobilis* ei pysty kasvamaan ravintorikkaassakaan elatusaineessa kuten ravintolihaliemessä ilman käymiskykyistä sokeria.

10

Z. mobilis on ehdottomasti fermentatiivinen bakteeri, jolla ei ole funktionaalista systeemiä oksidatiivista fosforylaatiota varten. Kuten *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva *Z. mobilis* tuottaa pääasiallisina fermentointituotteinaan etanolia ja hiilidioksidia. *Z. mobilis* tuottaa etanolia lyhyellä reaktioreitillä, johon tarvitaan vain kahdenlaista entsymaattista aktiiviteettia: pyruvaattidekarboksylaasia ja alkoholidehydrogenaasia. Pyruvaattidekarboksylaasi on avainentsyymi tässä reaktiosarjassa, joka muuttaa pyruvaattivirran etanoliksi. Pyruvaattidekarboksylaasi katalysoi pyruvaatin ei-oksidatiivisen dekarboksyloitumisen, niin että muodostuu asetaldehydiä ja hiilidioksidia. Tässä organismissa on läsnä kahta alkoholidehydrogenaasi-isotsyymiä, ja ne katalysoivat asetaldehydin pelkistymisen etanoliksi fermentoinnin aikana, lisänä NADH:n hapettuminen NAD⁺:ksi. Vaikka bakteerien alkoholidehydrogenaasit ovat tavallisia useissa organismeissa, vain harvoissa bakteereissa on pyruvaattidekarboksylaasia. Yritykset modifioida *Z. mobilis* sen kaupallisen käyttökelpoisuuden parantamiseksi etanolin tuottajana ovat onnistuneet vain rajoitetusti.

30

Suurin osa polttoaine-etanolista tuotetaan nykyisin heksoosisokereista maissitärkkelyksessä tai sokeriruokosiirapissa apuna *S. cerevisiae* tai *Z. mobilis*. Mutta tällaiset sokerit ovat suhteellisen kalliita biomassalähteitä ja niillä on kompetitiivinen arvo ravintona. Tärkkelys ja sokerit edustavat vain murto-osaa kasvien kaikista hiilihydraateista. Tärkeimmät kasvien

35

hiilihydraatit varsissa, lehdistä, paloissa, kuorissa, tähtikissä ja vastaavissa ovat rakenteelliset seinämäpolymeerit, selluloosa ja hemiselluloosa. Näiden polymeerien hydrolyysissä vapautuu seos neutraaleja sokereita, joita ovat muun muassa glukosi, ksyloosi, mannoosi, galaktoosi ja arabinoosi. Luonnosta ei ole löydetty ainoatakaan organismia, joka nopeasti ja tehokkaasti metaboloisi kaikkia näitä sokereita etanoliksi tai miksi tahansa muuksi yksittäiseksi jonkin arvoiseksi tuotteeksi.

10 Alkoholidehydrogenaasi II:ta ja pyruvaattidekarboksylaasia *Z. mobilis* koodaavat geenit on erikseen kloonattu, karakterisoitu ja ekspressoitu *E. coli*ssa. Katso Bräu & Sahm, Arch. Microbiol. 144:296-301, 1986a, Arch. Microbiol. 146:105-10, 1986b, Conway et al, J. Bacteriol. 169:949-54, 1987a, Conway
15 et al, J. Bacteriol. 169:2591-97, 1987b, Neale et al, Nucleic Acid. Res. 15:1753-61, 1987, Ingram & Conway, Appl. Environ. Microbiol. 54:397-404, 1988, Ingram et al, Appl. Environ. Microbiol. 53:2420-25, 1987.

20 Bräu & Sahm (supra, 1986a) osoittivat ensimmäisinä, että etanolituottoa voitiin lisätä rekombinantissa *E. coli*ssa *Z. mobilis*in pyruvaattidekarboksylaasin yliekspressoitumisella, vaikka tuotetut etanolimäärät olivatkin hyvin pieniä. Myöhemmissä kokeissa tätä tutkimusta laajennettiin ja käytettiin kahta muuta enteristä bakteeria, *Erwinia chrysanthemia* ja *Klebsiella planticola*aa, ja saatiin suurempia etanolimääriä heksooseista, pentooseista ja sokeriseoksista. Katso Tolan & Finn, Appl. Environ. Microbiol. 53:2033-38, 2039-44, 1987.

30 Kun lähtöaineena on käytettävissä yksinkertaisia sokereita edellä mainitut mikrobit ovat yleensä käyttökelpoisia. Suurin osa maailman halvoista, uusiutuvista biomassalähteistä ei kuitenkaan ole monosakkaridien muodossa, vaan lähinnä lignoselluloosan muodossa, joka on pääasiallisesti selluloosan, hemiselluloosan ja ligniinin seosta. Selluloosa on glukosihomopolymeeri, hemiselluloosa puolestaan on monimutkaisempi heteropoly-

meeri, jossa on sekä ksyloosia, joka on sen pääasiallisin aine-
osa, että myös huomattavia määriä arabinoosia, mannoosia, glu-
koosia ja galaktoosia. On arvioitu, että konvertoimalla mikro-
bien avulla sokerijäämät, joita on jättepapereissa ja laitospä-
5 tetäytömaissa USA:ssa, voitaisiin saada jopa noin neljäkymmen-
tätuhatta miljoonaa litraa etanolia. Edellä esiin tuodun kal-
taiset mikro-organismit pystyvät kyllä fermentoimaan tehokkaas-
ti monomeerisiä sokereita, joista lignoselluloosassa läsnä ole-
vat selluloosa- ja hemiselluloosapolymeerit muodostuvat, mutta
10 lignoselluloosan sakkarifiointi on edelleen laajan tutkimuksen
kohteena.

Nykyisin käytettäviä menetelmiä lignoselluloosan sakkarifioimi-
seksi ovat muun muassa happamat ja entsymaattiset hydrolyysit.
15 Happohydrolyysi edellyttää tavallisesti kuumuutta ja sillä on
useita haittapuolia, muun muassa energiantarve, happamien jät-
teiden muodostuminen ja myöhempiä mikrobialaisia fermentointeja
estävien toksisten yhdisteiden muodostuminen. Entsymaattinen
hydrolyysi edustaa siis haluttua vaihtoehtoa. Entsyymit voi-
20 daan esimerkiksi lisätä lignoselluloosamateriaalia sisältävään
väliaineeseen suoraan.

Geeniteknologian lähestymistapa sakkarifiointiin liittyvien
piirteiden antamiseksi mikro-organismeille etanolin tai maito-
25 hapon tuottamiseksi on ollut keskittynyt suurten entsyymipitoi-
suuksien erittymiseen väliaineeseen. Toisin sanoen alalla on
vain modifioitu mikro-organismeja, joissa jo on proteiineja,
jotka tarvitaan kuljettamaan sellulaarisesti tuotetut entsyymit
fermentointiväliaineeseen, jossa entsyymit sitten voivat toimia
30 polysakkaridisubstraatilla mono- ja oligosakkaridien tuottami-
seksi. Tämä lähestymistapa on valittu siksi, että alalla on
huomattu kuinka vaikeaa on onnistuneesti modifioida organisme-
ja, joilla ei ole tarpeellista kykyä kuljettaa tällaisia protei-
iineja.

35

Sen vuoksi tämän keksinnön kohteena on mikro-organismeja, jotka pystyvät tehokkaasti muuttamaan pyruvaatin etanoliksi kasvun aikana sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa.

- 5 Keksinnön kohteena on myös lisätä rekombinantti-isäntien kasvua ja vähentää ei-toivottujen metaboliatuotteiden akkumuloitumista näiden isäntien elatusaineessa.

Lisäksi keksinnön kohteena ovat rekombinantti-isännät, jotka
10 tuottavat riittävästi intrasellulaarisesti polysakkaraasient-syymiä (entsyymejä), niin että glukoo- tai ksyloolioligomeerit hajoavat tuotteiksi, joita samat isännät voivat fermentoida etanoliksi.

- 15 Tämän ja muiden kohteiden saavuttamiseksi esiin tuodaan tämän keksinnön ensimmäisen pääalueen mukaisesti yhdistelmäisäntä, muu kuin *Escherichia coli*, joka sisältää heterologista DNA:ta, joka koodaa alkoholidehydrogenaasin ja pyruvaattidekarboksylaasin tuottamista isännässä. Isäntä ekspressoii DNA:ta riittävä-
20 lä funktionaalisella tasolla, niin että saadaan edistettyä etanolituottoa isännän primaarisena fermentointituotteena.

Eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa käytetään *Z. mobilis*-geenejä, jotka koodaavat alkoholidehydrogenaasia ja pyruvaattidekarboksylaasia rekombinantti-isännissä. Muita ensimmäisen
25 pääalueen puolia ovat plasmidit, jotka sisältävät alkoholidehydrogenaasia ja pyruvaattidekarboksylaasia koodaavia geenejä ja joita voidaan käyttää muodostamaan keksinnön mukaisia rekombinantti-isäntiä.

30 Toisella tämän keksinnön pääalueella rekombinantti-isäntä sisältää alkoholidehydrogenaasia ja pyruvaattidekarboksylaasia koodaavan DNA:n lisäksi DNA:ta, joka koodaa proteiineja, joiden avulla isäntä pystyy kuljettamaan ja metaboloimaan oligosakka-
35 ridia. Isäntä ekspressoii DNA:ta sellaisia määriä, että isäntä tuottaa etanolia primaarisena fermentointituotteena oligosakka-

ridimetaboliassa. Tämän alueen suositeltavia isäntiä ovat muun muassa sellaiset enteeriset bakteerit kuten Erwinia ja Klebsiella. Muita suositeltavia isäntiä ovat sellaiset, jotka metaboloivat di- ja/tai trisakkaridia, joka sisältää C₅- ja/tai C₆ sokerimonomeerejä, esimerkiksi glukooseja, ksylooseja ja maltooseja.

Kolmannella tämän keksinnön pääalueella kuvatun kaltainen rekombinantti-isäntä sisältää lisäksi DNA:ta, joka tarvitaan tuottamaan yhtä tai useampaa polysakkaraasia. Isännän polysakkaraasituotto ja myöhempi tämän polysakkaraasin vapautuminen väliaineeseen vähentää tarvittavaa kaupallisen entsyymin määrää lähtöaineen hajottamiseksi fermentoituviksi monosakkarideiksi ja oligosakkarideiksi.

15

DNA-polysakkaraasi voi olla luontaista isännälle, vaikka useimmiten DNA on vierasperäistä, ts. heterologista. Edullisia polysakkaraaseja ovat sellulolyyttiset, ksylanolyyttiset ja tärkkelystä hajottavat entsyymit. Polysakkaraasi voi olla ainakin osittain isännän erittämää, tai se voi akkumuloitua olennaisesti intrasellulaarisesti ja vapautua myöhemmin. Edullisesti intrasellulaarisesti akkumuloituneet entsyymit, jotka ovat lämpöstabileja, voidaan vapauttaa haluttaessa kuumaaindusoidun liukenemisen avulla. Entsyymiyhdistelmiä voidaan koodata heterologisella DNA:lla osan erittyessä ja osan akkumuloituessa.

On mahdollista tehdä muita muunnelmia edellä kuvattujen isäntien etanolituoton parantamiseksi. Isäntä voi esimerkiksi sisältää vielä ylimääräisen heterologisen DNA-segmentin, jonka ekspressiotuote on proteiini, joka osallistuu mono- ja/tai oligosakkaridien kuljetukseen rekombinantti-isäntään. Voidaan myös lisätä isäntään ylimääräisiä geenejä glykolyttisestä reaktioreitistä. Näin voidaan päästä parempaan etanolintuotonopeuteen.

35

Esiin tuodaan myös etanolintuottomenetelmiä, joissa käytetään kaikkia edellä mainittuja isäntiä. Edelleen esiin tuodaan menetelmiä, joilla oligosakkridilähtöainetta käsitellään oligosakkaridin konvertoimiseksi etanoliksi ja yksinkertaisemmiksi oligosakkarideiksi ja/tai sakkaridimonomeereiksi. Eräs keksinnön kohde on menetelmä vähentää happamien metaboliatuotteiden akkumuloitumista elatusväliaineessa käyttämällä keksinnön mukaisia transformoituja isäntiä etanolin tuottamiseen väliaineessa. Eräs keksinnön kohde on menetelmä edistää funktionaalisten proteiinien tuottoa rekombinantti-isännässä, yliekspressoimalla esimerkiksi *Z. mobilis*estä löytyvää adhB-geeniä isännässä. Tämän keksinnön kohteita ovat myös menetelmät, joilla fermentoidaan oligosakkaridipitoisia biomassoja etanoliksi.

Muita tämän keksinnön kohteita, piirteitä ja etuja tulee esiin seuraavasta yksityiskohtaisemmasta kuvauksesta. Huomautettakoon, että yksityiskohtainen kuvaus ja spesifiset esimerkit vain kuvaavat keksinnön suositeltavia toteutusmuotoja, sillä alaan perehtyneelle selviää tästä yksityiskohtaisesta kuvauksesta monia mahdollisia muutoksia ja modifiointeja, jotka sisältyvät tämän keksinnön ajatukseen ja suojapiiriin.

Kuvio 1 kuvaa *Z. mobilis*en pyruvaattidekarboksylaattia ja alkoholidehydrogenaasia II koodaavat geenit sisältävän pLOI295:n kokoamista.

Lyhenteet

RI: EcoRI

H: HindIII

B: BamHI

t: terminaattori

adh: *Z. mobilis* -alkoholidehydrogenaasi II

pdc: *Z. mobilis* -pyruvaattidekarboksylaasi

cat: kloramfenikoliasyyliitransferaasi

Ap: β -laktamaasi

Zm Pro frags: *Z. mobilis* -DNA:n fragmentit, jotka osoittavat promoottoriaktiiviteettia

oriV: RSF1010:sta johdettu replikaatioalku

oriV: RSF1010:sta johdettu replikaatioalku

P_{lac}: lac-promoottori

P_{Zm}: promoottori Z. mobiliksesta

5 P₇: kryptinen promoottori vektorissa

Kb: kiloemästä,

kuvio 2 kuvaa useita plasmideja, jotka sisältävät Z. mobiliksen pyruvaattidekarboksylaattia ja alkoholidehydrogenaasia II koo-

10 daavat geenit,

kuvio 3 kuvaa kasvua ja happotuottoa kannalla TC4 ja rekombinantteilla, jotka sisältävät plasmideja, jotka koodaavat etanologeenisiä entsyymejä,

15

kuvio 4 kuvaa rekombinanttien pyruvaattidekarboksylaasiaktiiviteetin ja kasvun määrän suhdetta. Solumassa 24 kasvutunnin jälkeen on ilmoitettu optisen tiheyden ollessa 550 nm (OD 550),

20 kuvio 5 kuvaa pLOI510:n kokoamista,

kuvio 6 kuvaa etanolipitoisuutta tuotettuna sellobioosi-fermentoinnilla etanologeenisillä Erwinia- ja Klebsiella-rekombinantteilla,

25

kuviot 7A, 7B ja 7C kuvaavat xynZ:n ja xylB:n sisältävien rekombinanttiplasmidien kokoamista,

kuvioissa 8A ja 8B nähdään ohutkerroskromatografia-analyysi

ksyylaanihydrolyysistä *E. coli* -kannalla KO11(pLOI2003) inkuboi-
tuna 45 °C:ssa (kuvio 8A) tai 60°C:ssa (kuvio 8B) Luria-liha-
liemessä (pH 6,0), joka sisälsi 4 % koivuksyylaania,

kuviot 9A ja 9B kuvaavat ksylo-oligosakkaridien käyttöä kasvatukseen *E. coli*lla KO11 (kuvio 9A) ja *K. oxytoca* M5A1:llä (kuvio 9B),

35

kuviot 10A ja 10B kuvaavat ksyloosin ja ksylaanihydrolysaatin konvertoitumista etanoliksi rekombinantilla *K. oxytoca* M5A1:llä. Kuvio 10A kuvaa kasvua ja kuvio 10B kuvaa etanolituottoa,

5 kuviot 11A ja 11B kuvaavat etanolituottoa rekombinanteilla *K. oxytoca* M5A1-kannoilla. Kuvio 11A kuvaa etanolituottoa glukoo-
sista (100 g/litra) kannalla M5A1, kanta P2 sisältää integroi-
tuja pet-geenejä, ja kanta B1 sisältää integroituja pet-geene-
jä. Kuvio 11B kuvaa etanolituottoa sellobioosista (100 g/lit-
10 ra) fermentoinnilla kannalla P2,

kuvio 12 kuvaa kaupallisten sellullaasien lisäyksen vaikutusta etanolisaantoon, 50 g SOLKA FLOC SW40/litra 120 tunnin kulut-
tua,

15

kuvioissa 13A, B ja C nähdään ohutkerroskromatografia-analyysin tulokset selluloosahydrolyysistä ja fermentoinnista P2-
(pCT603T):llä happamalla turvonneella selluloosalla (kuvio 13A), emäksisellä turvonneella selluloosalla (kuvio 13B) ja
20 kiteisellä selluloosalla (kuvio 13C),

kuvio 14 kuvaa etanolituoton paranemista esikäsitteilyllä celD-
geenituotteella ja käytettäessä 1% sellulaasia, etanolisaanto
vastaa 5 % CYTOLASE:lla saavutettua,

25

kuvio 15 kuvaa kuinka kootaan plasmidit pLOI140 ja pLOI141,
jotka sisältävät α -amylaasigeenin *Bacillus stearothermophilus*-
sesta ja pullulanaasigeenin *Thermoanaerobium brockii*stä,

kuvio 16A ja 16B kuvaavat etanolituottoa ja solumassaa fermen-
toitaessa glukosia ja maltoosia KO11:llä,

30

kuvio 17 kuvaa tuloksia tärkkelysfermentoinnista *E. coli* -kan-
noilla KO11(pLOI140) ja KO11(pLOI141). (Koska tulokset molem-
35 millä kannoilla olivat olennaisesti identtiset, vain tiedot
KO11(pLOI141):stä on esitetty),

40

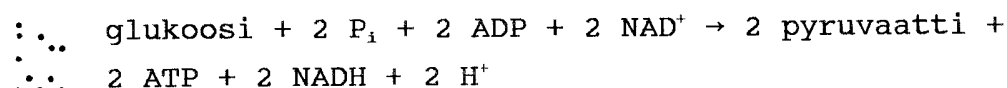
kuviossa 18 on ohutkerroskromatografia-analyysin tulokset mais-sitärkkelysfermentoinnista KO11(pLOI141):llä, fermentoinnin aikana (72 tuntia),

5 kuvio 19 on kaavamainen kuvaus keksinnön mukaisesta fermentointiprosessista.

Seuraavaksi yksityiskohtaisempi kuvaus keksinnöstä.

10 I. Tavanomainen hiilihydraattimetabolia

Useimmissa eläimissä ja kasveissa samoin kuin bakteereissa, hiivoissa ja sienissä, glukoosi hajoaa alunperin anaerobista reaktioreittiä ennen joko oksidatiivista tai fermentatiivista metaboliaa. Kaikkein tavallisin tällainen reaktioreitti, jonka
15 nimitys on glykolyysi, tarkoittaa sarjaa entsymaattisia vaiheita, joissa kuusihiilinen glukoosimolekyyli hajoaa, monien väli-
tuotteiden kautta, kahdeksi kolmen hiilen yhdisteen molekyyliksi, pyruvaatiksi. Tämän prosessin aikana kaksi NAD^+ -molekyyliä pelkistyy NADH :ksi. Kokonaisreaktio tässä glukoosin muuttumi-
20 sessä pyruvaatiksi on:



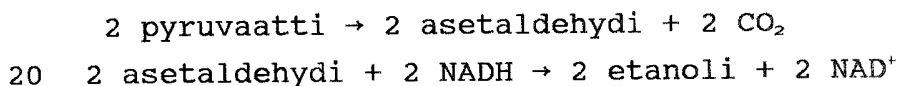
25 Jotta glykolyysi voisi jatkua glykoslyysissä kuluneen NAD^+ :n täytyy regeneroitua NADH :n hapettumisessa. Oksidatiivisessa metaboliassa NADH hapettuu tyypillisesti luovuttamalla vetyekvivalentteja vaihesarjan kautta hapeksi ja muodostaa vettä.

Useimmissa organismeissa on kuitenkin lisäksi anaerobisia reaktioreittejä, joiden ansiosta glykolyysi voi jatkua ilman hapen kaltaisten yhdisteiden läsnäoloa. Tällaisia anaerobisia prosesseja kutsutaan käymiseksi, fermentaatioksi, ja homolaktinen happokäyminen lienee eräs yleisimmistä tällaisista reaktioreiteistä, joita esiintyy monissa bakteereissa ja eläimissä. Ho-
35 molaktisessa käymisessä glukoosi konvertoituu lopuksi kahdeksi kolmen hiilihapon molekyyliksi, maitohapoksi. NADH hapettuu

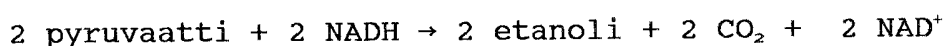
luovuttaessaan vetyekvivalentteja pyruvaatille ja tuottaa näin maitohappoa. Kokonaisreaktio NAD^+ :n regeneroitumiseen maitohappokäymisessä on:



Kuten aiemmin jo mainittiin etanologeeniset organismit kuten *Z. mobilis* ja *S. cerevisiae* kykenevät toisen- (alkoholi-) tyyppiin käymiseen, jossa glukoosi metaboloituu kahdeksi etanolimolekyyliksi ja kahdeksi CO_2 -molekyyliksi. Alkoholikäyminen eroaa maitohappokäymisestä NAD^+ -regeneroimiseen käytetyissä vaiheissa. Alkoholikäymiseen tarvitaan kaksi erilaista entsymaattista vaihetta. Pyruvaattidekarboksylaasi pilkkoo pyruvaatin asetaldehydiksi ja hiilidioksidiksi. Alkoholidehydrogenaasi edistää NAD^+ -regenerointia siirtämällä vetyekvivalentteja NADH :sta asetaldehydiin ja tuottaa näin etanolia. NAD -regeneroinnissa alkoholikäymisessä reaktiot ovat:



Kokonaisreaktio alkoholikäymisessä on:



Näitä molempia entsyymejä koodaava DNA on kloonattu ja *Z. mobilis* -pyruvaattidekarboksylaasi on ekspressoitu rekombinantisti. Katso esimerkiksi Bräu & Sahm (supra, 1986a). Oli kuitenkin erittäin epävarmaa olisiko mahdollista muuttaa glykolyyttistä reaktioreittiä organismeissa, jotka eivät tuota etanolia primarisena metaboliittina (ei-etanologeeniset organismit) ekstensiivisesti pyruvaattivaiheessa, vaikka tällaiset organismit saataisiin modifioitua jollain tavalla ekspressoimaan molempia alkoholikäymiseen tarvittavia lisäentsyymejä.

Päinvastoin, alalla on oletettu, että tällainen suuntaaminen jättäisi rekombinantti-isännän ilman pyruvaattia ja sen normaali tuotteita. Katso Bräu & Sahm (supra, 1986a, 1986b). Oli myös odotettavissa, että glykolyysihiilen suuntaaminen etanolituot-
 5 tuottoon muutoin ei-etanologeenisissä organismeissa sekoittaisi toisiinsa läheisessä suhteessa olevien energiantuotto- ja biosynteesireaktioreiteille ratkaisevan tärkeät NAD/NADH-suhteet.

II. Fermentointi tässä keksinnössä

10 On kuitenkin keksitty, että organismit, joissa tapahtuu glykolyysiä tai jotain sen muunnelmia voidaan tämän keksinnön mukaan ohjata suuntaamaan jopa 95 % glykolyysin hiilivirrasta pyruvaattivaiheessa olennaisesti synteettiseen reaktiosarjaan, johon kuuluvat heterologisten pyruvaattidekarboksylaasin (pdc) ja
 15 alkoholidehydrogenaasin (adh) geenien koodaavat entsyymit. Tuloksena on käsitelty organismi, joka tuottaa etanolia primaarisena käymistuotteenaan. Toisin sanoen tuotettua etanolia on yli 50 % kokonaiskäymistuotteesta.

20 On myös keksitty, että tällaiseen heterologiseen ekspressioon voidaan valita isäntiä, joilla on luontainen kyky kuljettaa ja metaboloida oligosakkarideja ja jotka sen vuoksi pystyvät fermentoimaan monimutkaisempia lähtöaineita. (Tässä yhteydessä "oligosakkaridilla" tarkoitetaan molekyyliä, joka muodostuu
 25 kahdesta tai useammasta sakkaridimonomeeristä, joihin kuuluvat niihin rajoittumatta muun muassa disakkaridit sellobioosi, maltobioosi ja ksylobioosi, trisakkaridit kuten sellotrioosi ja ksylotrioosi sekä pitkäketjuiset polysakkaridit kuten selluloosa, hemiselluloosa, tärkkelys, glykogeeni, pektiini ja inuliini.) Näin valitun ja transformoidun isännän kykyjä voidaan
 30 vielä lisätä ekspressoimalla samassa isännässä yhtä tai useampaa geeniä, joka koodaa polysakkaraasia, entsyymiä joka katalysoi suurempien oligosakkaridikompleksien hajoamisen pienemmiksi oligosakkarideiksi ja/tai sakkaridimonomeereiksi.

35

**(A) KEINOTEKOISEN ETANOLOGEENISEN REAKTIOREITIN LUOMINEN GEE-
NITEKNOLOGIAN AVULLA:**

Eräs tärkeä tämän keksinnön puoli on operoni, joka ohjaa solut
tuottamaan etanolia. Eräs esimerkki tällaisesta operonista on
5 tämän keksinnön mukainen rakenne, "pet-operoni", joka sisältää
Z. mobiliksen geenit, jotka koodaavat alkoholidehydrogenaasi
II:n ja pyruvaattidekarboksylaasin aktiviteetteja, sekä lisäksi
sopivia säätelysekvenssejä kuten promoottoreita, kiihdyttämiä,
operaattoreita, ribosomaalisia sitoutumiskohtia ja transkrip-
10 tiotermiinaattoreita. Näin ollen riippuvuus luontaisesta alko-
holidehydrogenaasiaktiviteetista etanolituotossa aiemmissa re-
kombinanttisysteemeissä saadaan poistettua yhdistämällä Z. mo-
biliksen geenit, jotka koodaavat alkoholidehydrogenaasi II:ta
ja pyruvaattidekarboksylaasia pet-operoniksi. Lisäksi saadaan
15 tuotettua huomattavia etanolimääriä rekombinanteissa, jotka
sisältävät pet-operonin, sekä aerobisissa että anaerobisissa
olosuhteissa.

Jotta mikro-organismille saadaan annettua kyky tuottaa polysak-
20 karaaseja kuten ksylanaaseja ja sellulaaseja keksinnön mukainen
etanologeeninen operoni voidaan modifoida lisäämällä geeni (tai
geenejä), joka koodaa haluttua entsyymiä (entsyymejä). Vaihtoehtoisesti yhtä tai useampaa polysakkaraasia koodaava geeni
voidaan panna plasmidiin, jota käytetään transformoimaan isän-
25 täorganismi, joka jo on käsitelty operonilla, joka johtaa eta-
nolituottoa edellä kuvattuun tapaan. (Keksinnön tätä puolta
kuvataan yksityiskohtaisemmin osassa II(E) jäljempänä). Eräs
vaihtoehtoinen lähestymistapa on valita etanologisella ope-
ronilla transformoitava isäntä luontaisen polysakkaraasieks-
30 pression perusteella. Vielä eräs vaihtoehtoinen lähestymistapa
on lisätä polysakkaraasigeenejä kromosomiin integroimalla.

Tapa, jossa yhdistetään yhteen rakenteeseen geenit, jotka koo-
daavat metabolista reaktioreittiä voidaan yleistää helposti
35 monenlaisiin tilanteisiin, joissa eri kohdista tulevat geenit
voidaan panna yhteen ja näin luoda keinotekoinen operoni. Näin

luotu pet-operoni on vain yksi esimerkki tämän keksinnön mahdollisista sovellutuksista. Voidaan esimerkiksi yhdistää eri organismeista peräisin olevia alkoholidehydrogenaasia koodavia geenejä muihin geeneihin, jotka koodaavat pyruvaattidekarboksylaasiaktiiviteettia, niin että saadaan luotua operoni, joka koodaa haluttua reaktioreittia. On myös mahdollista luoda muita reaktioreittejä koodaavia operoneja. On myös selvää, että edellä käsitellyssä etanologisessa reaktioreitissä ei ole välttämätöntä, että alkoholidehydrogenaasi- ja pyruvaattidekarboksylaasiaktiiviteettia koodaavat geenit olisivat saman säätelyn alaisia, vaan ne voivat olla eri säätelyn alaisia, jopa eri plasmideissa tai eri paikoissa kromosomissa. Samoin polysakkariaasia koodaava geeni (geenit) voi olla yhteisessä tai eri säätelyssä tai sijaita eri plasmideissa tai eri kohdissa kromosomia.

Eräs tämän keksinnön kohteista on etanolia tuottavien rekombinantti-isäntien käyttö tehokkaaseen yhdistelmäpeptidien tai -proteiinien tuottamiseen. Toisin sanoen rekombinanttisolut voidaan transformoida edelleen geeneillä, jotka koodaavat muita hyödyllisiä tuotteita kuin polysakkaraseja. (Nämä lisägeenit voivat olla plasmidiperäisiä tai kromosomeihin lisättyjä.) Tarkemmin sanoen geenit, jotka koodaavat tarpeellisia etanologeenisiä entsyymejä ekspressoituvat tavallisesti suurina määrinä ja hallitsevat hiilivirtaa pyruvaatista ja NADH-hapetuksesta anaerobisen kasvun aikana. Näissä olosuhteissa pyruvaattihiihlorankojen virta voidaan kääntää orgaanisten happojen tuottamisesta etanolin tuottamiseen pääasiallisena käymistuotteena.

Näin hapottumismäärä per soluproteiiniyksikkö minimoituu tuottaessa etanolia orgaanisten happojen asemesta. Hapen siirtyminen on usein suuri haitta tiheissä mikro-organismiviljelmissä, ja juuri tämä rajoitus saa aikaan happotuoton ja pH:n muuttumisen elatusaineessa. Sen sijaan rekombinanteissa, jotka ekspressoivat etanologeenista operonia tämän keksinnön mukaisesti heterologiset, etanologeeniset entsyymit erottavat osan

glykolyysipyruvaatista asetaldehydiksi ja uudellenhapettavat NADH:n tuottamaan etanolia, vähemmän vahingollista metabolia-tuotetta. Näin ollen kantoja, jotka sisältävät sekä funktio-naaliset respiratoriset ketjut oksidatiivista fosforylointia
 5 varten että etanolituottoentsyymejä, voidaan kasvattaa vielä suuremmissa solutiheyksissä, koska molemmat systeemit ovat toiminnessa NAD⁺-regeneroinnin aikana ja happamia jätetuotteita muodostuu vähemmän. Tällaisen luontaisen joustavuuden ansiosta prosessin kontrolloinnin ei tarvitse olla niin tiukkaa, ja re-
 10 kombinanttituotteiden volumetrinen saanto on suurempi.

Orgaanisten happojen kertymistä, joka muutoin tapahtuu, pidetään seurauksena käymisestä anaerobisessa kasvatuksessa. Mutta huomattavia määriä asetaattia saattaa muodostua myös aerobisissa olosuhteissa, ts. nopean sekoittamisen aikana. Asetaattituotto voi siis olla progressiivista kasvatuksen alkuvaiheista, eikä rajoittua myöhempiin vaiheisiin, jolloin solutiheys on suuri ja vallitsevana ovat anaerobiset olosuhteet. Happotuotto glukoosista, aerobisissa olosuhteissakin, auttaa rajoittamaan
 20 kasvua lihaliemessä ja kiinteässä väliaineessa, kuten osoittaa lisääntynyt lopullinen solutiheys väliaineessa, johon on lisätty fosfaattipuskuria.

Näin ollen tämän keksinnön mukaiset etanolia tuottavat transformantit ovat parempia isäntiä rekombinanttituotteiden tuottamiseen anaerobisissakin olosuhteissa, minimaalisella happotuotolla. Monet yhdistelmäproteiinit ja -peptidit sisältävät kysteiini- tai disulfidisiltoja, ja oikeanlainen laskostuminen tai näiden reaktiot ovat olennainen piirre aktiivisen entsyymin
 30 muodostamisessa. Koska happi edistää disulfidisiltojen muodostumista tällaisten proteiinien tuottaminen anaerobisissa olosuhteissa tarjoaa pienemmät mahdollisuudet vääränlaiselle laskostumiselle ennen eristämistä ja laskostumista kontrolloidussa olosuhteissa, jolloin talteen saadaan biologisesti aktiivista tuotetta enemmän. AdhB:n käyttäminen näissä rakenteissa
 35 saattaa olla erityisen edullista. AdhB koodaa stressiproteiini-

nia (An et al, FEBS LETTERS 282:205-208, 1991). Stressiproteiinin on havaittu auttavan heterologisten proteiinien oikeanlaista laskostumista ja biologisen funktion säilymistä. Lee et al, J. Biol. Chem. 267:2849-2852, 1992. Tämän mukaan adhB:n
 5 käyttäminen edistää funktionaalisten proteiinien tuottoa rekombinanttiorganismeissa.

Aerobisissa olosuhteissa E. colissa glykolyysipyruvaatti metaboloituu primaarisesti pyruvaattidehydrogenaasikompleksin ja
 10 laktaattidehydrogenaasin vaikutuksesta liian asetyylikoentsyymien A konvertoituessa asetaatiksi. Katso Gottschalk, BACTERIAL METABOLISM, pp. 210-80, Springer Verlag, 1986. Näiden kahden entsyymin näennäiset K_m -arvot ovat 0,4 ja 7,2 mM. Näennäinen K_m Z. mobilis -pyruvaattidekarboksylaasilla on yhtä suuri kuin
 15 (pyruvaattidehydrogenaasi) tai pienempi kuin (laktaattidehydrogenaasi) näillä kahdella E. coli -entsyymillä, mikä helpottaa asetaldehydimuodostusta. NAD^+ -regenerointi aerobisissa olosuhteissa johtuu pääasiallisesti biosynteesistä ja NADH-oksidaasista (liitettynä elektronikuljetussysteemiin), näennäis- K_m 50
 20 μM . Z. mobilis -alkoholidehydrogenaasi II:n näennäis- K_m on yli neljä kertaa pienempi kuin E. coli NAD^+ -oksidaasilla, ja sen ansiosta Z. mobilis -entsyymi voi kilpailla tehokkaasti endogeenisesta NADH-yhtymästä asetaldehydin pelkistämiseksi etanoliksi. Näin ollen Z. mobilis etanologeeniset entsyymit ja niiden
 25 suhteellisen suuret ekspressiomäärät sopivat hyvin muuttamaan hiilivirta etanoliksi aerobisissa olosuhteissa.

Anaerobisissa olosuhteissa E. colissa pyruvaatti glykolyysistä metaboloituu pääasiallisesti laktaattidehydrogenaasin ja pyruvaattiformaattilyaasin vaikutuksesta. Näiden kahden entsyymin
 30 näennäiset K_m -arvot ovat 18 kertaa ja 5 kertaa suuremmat kuin Z. mobilis -pyruvaattidekarboksylaasilla. Samoin NAD^+ -regenerointiin E. colissa osallistuvien pääentsyymien näennäiset K_m -arvot ovat huomattavasti suuremmat kuin Z. mobilis -alkoholidehydrogenaasi II:lla saavutettavat. Z. mobiliksen etanologeeniset
 35 entsyymit ovat siis erittäin kompetitiivisia suhteessa hiileen

(pyruvaatti) ja pelkistyspotentiaalille (NADH) normaalien fermentatiivisten entsyymien ja oksidatiivisen fosforyloinnin kanssa *E. coli*ssa sallieessaan glykolyyttisten tuotteiden tehokkaan kanavoimisen etanoliksi.

5

On keksitty, että laktoosi ja kaikki selluloosassa ja hemiseluloosassa läsnä olevat tärkeimmät sokerit (nimittäin glukoosi, ksyloosi, arabinoosi, galaktoosi ja mannoosi) voidaan konvertoida etanoliksi tämän keksinnön mukaisesti käyttämällä rekombinantti-isäntiä, jotka ekspressoivat etanologeenisiä entsyymejä koodaavia geenejä, esimerkiksi yllä mainitun kaltaisia etanolireaktioreittejä *Z. mobilis*ksessa omaavia.

Kun valitaan sopivia isäntäkantoja tämän keksinnön mukaiseen etanolituottoon on otettava huomioon useita tekijöitä. Näitä tekijöitä ovat substraattivalikoima ja ympäristön sieto, esimerkiksi sokerin sieto, suolan sieto, etanolin sieto, matalan pH:n sieto ja lämmön sieto. Kuten jäljempänä kuvataan, esimerkiksi *E. coli* -kanta ATCC 9637 (Waksman kanta W) ominaisuuksia on erittäin hyvä ympäristön sieto, vaikka etanolituotto glukosista olikin pienempi kuin muilla kannoilla. Kanta ATCC 9637 valittiin ensisijaisesti sen ainutlaatuisen kyvyn vuoksi käyttää sukroosia. Edullisesti tämä ATCC 9637:n ominaisuussaa tästä kannasta käyttökelpoisen fermentoitaessa juurikassokeria, ruokosokeria ja muita sukroosia sisältäviä lähtöaineita. pLOI297:n sisältävät ATCC 11303 (Luria kanta B) ja ATCC 15244 (Kepas kanta ML300) tuottivat suurimmat etanolimäärät ja osoittivat hyväksyttäviä ympäristön sietotasoja. Plasmidit olivat melko stabiileja näissä kahdessa rakenteessa ja ne valittiin parhaimpina ehdokkaina etanolituoton edelleen kehittämiseen. Molemmat rakenteet osoittivat korkeita *Z. mobilis* -pyruvaattidekarboksylaasitasoja, joita vaaditaan tehokkaseen etanolituottoon. Katso Ingram et al, 1987.

Kasvibiomassan kaikki tärkeimmät sokerikomponentit konvertoitiin etanoliksi rekombinantilla *E. coli*lla, joka sisälsi *Z.*

mobiliksen etanolireaktioreitin. Glukoosin ja ksyloosin kon-
 vertoitumistehokkuus etanoliksi oli suurempi kuin aiemmin on
 raportoitu *S. cerevisiaesta*, katso Lovitt et al, *CRC Crit. Rev.*
Biotechnol. 7:107-186, 1988, ja pentoosifermentointihiivasys-
 5 teemeistä. Katso Beck, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17:617-627,
 1989, Jeffries et al, *Biotechnol. Bioeng.* 31:502-506, 1988,
 Skoog et al, *Enzyme Microbiol. Technol.* 10:66-79, 1988, Slinin-
 ger et al, *Biotechnol. Lett.* 7:431-436, 1985. Ksyloosi konver-
 toitui etanoliksi rekombinantilla *E. coli*lla tehokkaammin kuin
 10 glukoosi *S. cerevisiaella* kuten ovat raportoineet Lovitt et al,
 supra. Tavattoman suuret etanolisaannot ksyloosilla (yli 100 %
 teoreettisesta) saattavat johtua etanolista, joka on peräisin
 kompleksisten ravinteiden kataboliasta. Monet aminohapot ja
 moniaineisten elatusaineden komponenteista kataboloituvat gly-
 15 kolyyttisiksi välituotteiksi tai suoraan pyruvaatiksi. Tämä
 pyruvaatti saattaa sitten konvertoitua etanoliksi.

Tämän keksinnön mukaan *pdc*- ja *adh*-geenit voidaan transformoida
 moniin erilaisiin isäntiin ja saada ekspressoitumaan erilaisten
 20 promoottorien avulla. Tähän alaan perehtynyt voi tämän kuvauk-
 sen perusteella tehdä nämä transformoinnit. Esimerkiksi *pdc*-
 ja *adh*-geenit voidaan helposti insertoida plasmideihin, joilla
 on erilaiset isäntävalikoimat. Plasmideja, jotka on koottu
 replikoitumaan *E. coli*ssa ja muissa kohdeorganismeissa, kutsu-
 25 taan tavallisesti "sukkulavektoreiksi", koska ne pystyvät rep-
 likoitumaan kahdessa tai useammassa isännässä. Tällaisia plas-
 mideja on helposti saatavilla ja ne ovat helppokäyttöisiä.
 Tavallisimpia yhdistelmiä ovat sukkulointi *E. coli*n ja muiden
 bakteerien välillä, *E. coli*n ja hiivojen välillä sekä *E. coli*n
 30 ja eläinsolujen välillä. Näitä vektoreita on luetteloissa ja
 alaan perehtynyt tuntee ne.

Z. mobiliksen *pdc*- ja *adh*-geenejä on insertoitu ja ekspressoitu
Xanthomonas-, *Klebsiella*- ja *Erwinia*-lajeissa. Samanlaisiin
 35 hyviin tuloksiin voidaan helposti päästä muissakin organismeis-
 sa. Vaikka joitain yksinkertaisia muutoksia esimerkiksi pro-

moottorissa saatetaan tarvita optimaalisen rakenteen aikaan saamiseksi onnistuminen on hyvin ennustettavissa biokemiallisten ominaisuuksien ja sen perusteella, mitä nykyisin tiedetään liukenevien sytoplasmisten proteiinien ekspressoitumisesta.

- 5 Tämän keksinnön puitteissa on jopa mahdollista insertoida vieraita geenejä, jotka ilmentävät pyruvaattimetabolian uudelleen suuntaamiseen tarvittavaa entsyymaattista aktiviteettia, kromosomiin ja ekspressoida ilman plasmidin apua. Katso osa II(C), infra. Esimerkiksi pet-rakenne, jossa ei ole promootto-
- 10 ria, voidaan integroida E. coli -kromosomiin heti promoottorin taakse pyruvaattiformaattilyaasigeenissä. Samanlainen integrointi pfl:ään tai muihin geeneihin on mahdollista useimmissa organismeissa, tarvitaan vain kohdegeenin fragmenttiohjausta integrointikohtaan homologirekombinaation avulla. Integroin-
- 15 tiin voidaan käyttää muitakin geenejä kuin pfl:iä. Koska pet-geeniä ekspressoivat rakenteet on helppo tunnistaa indikaattorialustoilla tämä lähestymistapa sopii erittäin laajalti muiden etanolituottoon sopivien organismien nopeaan ja tehokkaaseen kokoamiseen.

20

On olemassa paljon teoksia, joissa kuvataan vieraiden geenien ekspressioon käytettäviä menetelmiä. On myös hankintaluettel

25 loita vektoreista, joita voidaan käyttää eri organismeihin. Kloonivektorit gramnegatiivisille bakteereille ja grampositiivisille bakteereille, vektorit, joilla on laaja isäntävalikoi-

30 makyky, sienikloonausvektorit, hyönteiskloonausvektorit, eläinsolukloonausvektorit ja kasvisolukloonausvektorit ovat hyvin tuttuja alaan perehtyneelle. Hankintaluettelot, joiden avulla näitä kloonausvektoreita voi tilata ja joita on helposti saatavilla, ovat nekin alaan perehtyneelle tuttuja. Katso esimerkiksi marino, BioPharm 2:18-33, VECTORS: A SURVEY OF MOLECULAR CLONING VECTORS AND THEIR USES (Butterworths 1988), 1989.

Alaan perehtynyt pystyy myös saamaan vaihtoehtoisia pdc- ja

35 adh-geenejä ja muita tällaisia geenejä, jotka voidaan identifioida käyttämällä edellä mainittuja Z. mobilis -geenejä koetti-

mina, tai, edullisemmin, havainnoimalla aktiviteettia indikaattorialustoilla. Tämän keksinnön kannalta ei ole väliä tuleeko alkoholidehydrogenaasiaktiviteetti geenistä, joka on eristetty hevosesta, hiivasta, ihmisestä, hyönteisestä tai jostain muusta
 5 bakteerigeenistä. Koska alkoholidehydrogenaasiaktiviteetin ilmentyminen voidaan havaita suoraan aldehydi-indikaattorialustoilla, ei tarvita sekvenssitietoja, joilla saataisiin eristettyä uusia geenejä, jotka koodaavat tätä entsymaattista aktiviteettia osoittavia proteiineja. Monet alkoholidehydrogenaasi-
 10 geenit ovatkin jo tuttuja alaan perehtyneelle kuten osoittaa 252 adh-geenin maininta Genbank -tiedostossa maaliskuulta 1991 (IntelliGenetics Inc., 700 E. El Camino Drive, Mountain View, CA 94040).

15 *Z. mobilis* sisältää kaksi geeniä, jotka koodaavat funktionaalisia alkoholidehydrogenaasigeenejä, ja toinen niistä (*adhB*) on kehityksellisesti sukua *Clostridium acetobutylicum* butanolidehydrogenaasille, *E. coli* propaanioksidoreduktaasille ja *Saccharomyces -ADHIV*-alkoholioksidehydrogenaasille. Kaikki nämä on
 20 kloonattu ja sekvensoitu. *Z. mobilis*en toinen alkoholidehydrogenaasigeeni, *adhA*, on sinkkialkoholidehydrogenaasi, joka
 :.. sekin on kloonattu ja sekvensoitu. Kun on vertailtu primaari-
 :.. rakennetta, joka on johdettu helposti saatavilla olevista sek-
 :.. vensseistä *adhA*-geenin on katsottu olevan kehityksellisesti
 :.. 25 sukua tyypilliselle alkoholidehydrogenaasille, jota on kuvattu
 :.. eläimissä, kasveissa sekä hiivojen dominantille *adh*-geenille.
 :.. *AdhA*-geeni ja muut alkoholidehydrogenaasigeenit voidaan korvata
 :.. tässä esimerkkinä esiin tuodulla alkuperäisellä *adhB*-geenillä.

:.. 30 Samalla lailla tässä keksinnössä ei ole väliä tuleeko pyruvaat-
 :.. tidekarboksylaasiaktiviteetti *Z. mobilis* -geenistä vai geenis-
 :.. tä, joka koodaa haluttua entsymaattista aktiviteettia, mutta
 :.. joka on peräisin maissista, hiivasta tai jostain muusta or-
 :.. ganismista. Eliöiden kehittyminen yhteisestä varhaisemmasta
 :.. 35 muodosta on nykyisin yleisesti tunnustettu asia, ja se on voitu
 :.. osoittaa loistavan yksityiskohtaisesti molekyyli-genetiikan kei-

noin. Sen lisäksi, että voidaan järjestää organismit makro-
 ominaisuuksien perusteella fylogeneettisiksi puurakenteiksi,
 varhaismuodon geenit, jotka ovat kehittyneet spesifisiksi funk-
 tioiksi ovat säilyneet kehityksen aikana, niin että niissä on
 5 jäljellä tällaisiin funktioihin tarvittavat piirteet. Tämän
 suuren konservoitumistason avulla alaan perehtynyt pystyy eris-
 tämään funktionaalisesti ekvivalentteja ja geneettisesti sukua
 toisilleen olevia entsyymejä muista organismeista käyttämällä
 primaari-informaatiota yhdestä tai useammasta entsyymiryhmän
 10 jäsenestä. Glykolyysientsyymit ovat eräs parhaita esimerkkejä
 tästä, sillä tällaisia entsyymejä on tutkittu niin paljon.

Juuri tällaista lähestymistapaa onkin käytetty onnistuneesti
 kloonattaessa maissin pyruvaattidekarboksylaasigeeniä käyttä-
 15 mällä hyväksi tietoja *Z. mobilis* -pdc:stä ja *S. cerevisiae* -
 pdc:stä DNA-koettimen valmistamiseksi. Katso Kelly, Plant Mo-
 lecular Biology 13:213-22, 1989. Vaihtoehtoisia menetelytapoja
 olisi käyttää koko geenejä koettimina. Koska pyruvaattidekar-
 boksylaasiaktiviteettia (pyruvaatti konvertoituna asetaldehy-
 20 diksi plus hiilidioksidi) omaavan proteiinin syntetisointumista
 voidaan nähdä suoraan aldehydi-indikaattorialustoilla sekvens-
 sitietoja ei ole tarvittu paikantamaan muita geenejä, vaikka
 sekvenssitietoja onkin voitu käyttää maissigeenin eristämiseen.
 Muista organismeista on eristetty monia muita pyruvaattidekar-
 25 boksylaasigeenejä, joilla saadaan aikaan vastaavat toiminnot.
 Nämä muut geenit sopisivat *Z. mobilis* pdc:n korvaajiksi aivan
 kuten useat alkoholidehydrogenaasit ovat osoittautuneet sopi-
 viksi. Tähän liittyen voidaan mainita, että GenBank tietokan-
 taan oli merkitty ainakin 5 pdc-geeniä maaliskuussa 1991.

30 Lisäparannuksena tämän keksinnön mukainen rekombinantti-isäntä
 voidaan transformoida geeneillä, jotka koodaavat avainkom-
 ponentteja glukosikuljetuksessa *Z. mobilis* -sessa, nimittäin
 geenit, jotka koodaavat *Z. mobilis* -glukokinaasia (glk) ja glu-
 35 kosin edistämää diffuusioproteiinia (glf). Glk ja glf voidaan
 erityisesti yhdistää keinotekoisessa operonissa noudatellen

tapaa, jota kuvattiin edellä etanologeenisen operonin kuten pet:n yhteydessä, ja transformoida rekombinantiksi, joka sisältää jälkimmäisen operonin. Glk/glf-operonin ekspressio johtanee lisääntyneeseen transmembraaniseen glukoosivirtaan ja näin ollen lisääntyneeseen etanolituoton nopeuteen. Samoin geenejä, jotka koodaavat muiden isäntien oligosakkaridien kuljetuksen avainkomponentteja tai geenejä, jotka koodaavat avainkomponentteja glykolyttisessä reaktioreitissä, voidaan käyttää edelleen transformoimaan isäntiä tämän keksinnön mukaisesti. Tällaisten virran nopeutta rajoittavia vaiheita koodaavien transformaatioiden geenien voidaan odottaa lisäävän etanolituoton nopeutta ja edistävän glykolyttisten välituotteiden määrää runkolähteinä biosynteesiin.

15 (B) FERMENTOINTIPARAMETRIT:

Tämän keksinnön mukaan heterologiset etanologeeniset geenit ekspressoituvat tasolla, joka helpottaa etanolituottoa fermentoitutuotteena rekombinantti-isännässä. Insertoitaessa tällaisia geenejä sopivaan ei-etanologeeniseen organismiin kuten edellä kuvattiin transformoitu isäntä kykenee tuottamaan huomattavia määriä etanolia oligosakkarideista kuten sellobioosista, sellotrioosista, ksylobioosista ja ksylotrioosista. Kuten edempänä tulee esiin tämän keksinnön mukaisissa rekombinantti-isännillä voidaan päästä etanolipitoisuuksiin, jotka ovat luokkaa 1 M ja enimmillään 1,5 M.

(C) VIERAIDEN GEENIEN KROMOSOMAALINEN INTREGROINTI:

Vieraiden geenien kromosomaalinen integrointi voi tarjota monia etuja plasmidiperustaisiin rakenteisiin verrattuna, sillä jälkimmäisellä on monia rajoituksia teollisten prosessien kannalta. Plasmidiperustaiset rakenteet ovat luonnostaan vähemmän stabiileja kuin kromosomaaliset geenit ja muodostavat ympäristöuhkan, heterologisten piirteiden siirtymisen lähteen. Epästabiilisuus usein kasvaa lisättäessä useampia plasmideja. Plasmidiperustaiset rakenteet voivat kuitenkin olla käyttökelpoisia alustaviin kokeisiin, joissa tutkitaan heterologisten

geenien ekspressiota, esimerkiksi sellulaaseja koodaavien geenien, sillä niitä voidaan käyttää isäntäsolujen yksinkertaiseen transformointiin. Muodostuvien proteiinien (esim. sellulaasin) esiin saamisen helpottamiseksi on kuitenkin usein toivottavaa, 5 että voitaisiin jättää pois tarve käyttää plasmideja, joissa on tämän keksinnön mukaisella kromosomaalisella integroinnilla saatuja etanolia tuottavia geenejä.

Etanologeenisiä geenejä on integroitu kromosomaalisesti E. coli 10 B:hen, katso Ohta et al, Appl. Environ. Microbiol. 57:893-900, 1991. Yleensä suoritetaan täydentävä käsittely puhdistamalla DNA-fragmentti, joka sisältää (1) halutut geenit ylävirtaan kloramfenikoligeenistä ja (2) fragmentin kohdeorganismien homologisesta DNA:sta. Tämä DNA voidaan ligatoida replikonittomiksi 15 si renkaiksi ja käyttää transformointiin. Siis pfl-geeni voidaan kohdentaa kun kyseessä on E. coli, ja Klebsiella voidaan ligatoida sattumanvaraisia Sau3A-fragmentteja homologirekombinaation edistämiseksi.

20 Rekombinanttien alkuvalinta voidaan tehdä 20 mg kloramfenikoli ("Cm")/litra alustoilla kasvun sallimiseksi yhden kopion integroinnin jälkeen. Tällaisten rakenteiden lukumäärä voi olla hyvin pieni. Etanologeenisiä geenejä saattaa aluksi ekspressoitua hyvin vähäisiä määriä, riittämättömästi tehokkaaseen etanolifermentointiin. Suurempiin ekspressoitumistasoihin voidaan 25 päästä yhdellä vaiheella selektoimalla alustoilta, jotka sisältävät 600-1000 mg Cm/litra. Tällaisten kantojen on todistettu olevan erittäin stabiileja ja on odotettavissa, että samalla lähestymistavalla saadaan onnistuneesti lisää optimaalisia 30 Klebsiella- ja Erwinia-kantoja. Alustavat kokeet muutamilla villeillä kannoilla viittaavat siihen, että elektroporaatio parantaa plasmidijakaantumista ja saattaa vähentää integrointien onnistumiseen tarvittavia ponnistuksia. (Katso esimerkki 16 jäljempänä.)

35 (D) ISÄNNÄN VALITSEMINEN:

Organismeja, jotka sopivat modifiointiin heterologisten pdc- ja adh-geenien ekspressoimiseksi yllä kuvattuun tapaan, ovat esimerkiksi eukaryoottisolut kuten eläinsolut, hyönteissolut, sienisolut ja hiivat, jotka luonnostaan eivät ole etanologeenisia, 5 sekä ei-etanologeeniset bakteerit. E. coliin lisäksi esimerkiksi muut Erwinia-lajin enteriset bakteerit, esimerkiksi E. chrysanthemi, ja Klebsiella-lajin enteriset bakteerit, esimerkiksi K. planticola ja K. oxytoca ovat erityisen houkuttelevia isäntiä, koska ne pystyvät metaboloimaan monenlaisia sokereita, 10 pentoosit mukaan lukien. Edullisia isäntiä voidaan valikoida myös laajemmasta gram-negatiivisten bakteerien joukosta, esimerkiksi Xanthomonas-suvun lajit, tai gram-positiivisista bakteereista, esimerkiksi lajien Bacillus, Clostridium ja Cellulomonas jäsenet. Kaikille eri isäntätyypeille on saatavilla so- 15 pivaa transformointimetodologiaa.

Jotkut organismit yllä mainituista mikrobeistaien täyttävät myös kriteerit, joilla valitaan isäntä fermentoimaan oligosakkaridia (tai oligosakkarideja) etanoliksi tämän keksinnön mu- 20 kaisesti. Tarkemmin sanoen isäntä voidaan valita tässä mielessä koska se tuottaa (1) proteiineja, joita tarvitaan kuljettamaan oligosakkaridi soluun ja (2) intrasellulaarisia (sytoplas- misia) määriä entsyymejä, jotka metaboloivat nuo oligosakkaridit. Aiemmin mainittuja mikrobeja, jotka täyttävät nämä vaatimukset, ovat muun muassa enteriset bakteerit kuten E. chry- 25 santhemi ja muut Erwiniat, sekä Klebsiella-lajit, esimerkiksi K. oxytoca, joka luonnostaan tuottaa β -ksylosidaasia, sekä K. planticola. Myös jotkut E. colit täyttävät vaatimukset, koska ne kuljettavat ja metaboloivat sellobioosia, maltoosia ja/tai 30 maltotrioosia. Katso esim. Hall et al, J. Bacteriol. 169:2713-27, 1987.

Isännät voidaan valita yllä mainittujen kriteerien (1) ja (2) mukaisesti laajemmastakin gramnegatiivisten bakteerien joukos- 35 ta, esimerkiksi Xanthomonas-lajeista, tai grampositiivisista bakteereista, joihin kuuluvat: Bacillus-laji, esimerkiksi B.

pumilus, *B. subtilis* ja *B. coagulans*, *Clostridium*, esimerkiksi *Cl. acetobutylicum*, *Cl. aerotolerans*, *Cl. thermocellum*, *Cl. thermohydrosulfuricum* ja *Cl. thermosaccharolyticum*, *Cellulomonas*-lajit kuten *C. uda*, sekä *butyrivibrio fibrisolvens*. Samoin hyväksyttäviä ovat monet hiivat, joista voidaan mainita *Cryptococcus*-lajit, esimerkiksi *Cr. albidus*, *Monilia*-lajit, *Pichia stipitis* ja *Pullularia pullulans*, samoin kuin muut oligosakkaridia metaboloivat bakteerit, muun muassa, niihin rajoittumatta, *Bacteroides succinogenes*, *Thermoanaerobacter*-lajit, esimerkiksi *T. ethanolicus*, *Thermoanaerobium*-lajit esimerkiksi *T. brockii*, *Thermobacteroides*-lajit, esimerkiksi *T. acetoethylicus* ja lajit suvuista *Ruminococcus* (esim. *R. flavefaciens*), *Thermonospora* (kuten *T. fusca*) ja *Acetivibrio* (esim. *A. cellulolyticus*). Näillekin eri isännille on olemassa sopivia transformointitekniikoita.

Kirjallisuutta, jossa käsitellään mainitut kriteerit täyttäviä mikrobeja, ovat muun muassa Biely, *Trends in Biotechn.* 3:286-90, 1985, Robsen et al, *Enzyme Microb. Technol.* 11:626-44, 1989, ja Béguin, *Ann. Rev. Microbiol.* 44:219-48, 1990, jotka on oheenliitetty viitteinä. Alaan perehtyneelle on selvää, että tässä keksinnössä käytettäväksi sopivia isäntiä on paljon muitakin. Sopivat isännät voidaan siis tunnistaa tutkimalla valikoiden kuljettaako ja metaboloiko tutkittava mikrobi oligosakkarideja. Tällainen seulonta voidaan suorittaa monella eritavalla. Voidaan esimerkiksi etsiä mikro-organismia, joka kasvaa sopivilla oligosakkaridisubstraateilla, ja valita mikroorganismeja, jotka eivät kuljeta vain monomeerejä soluun. Katso esimerkiksi Hall et al, *supra*, 1987. Vaihtoehtoisesti mikro-organismista voidaan kokein etsiä sopivaa intrasellulaarista entsyymiaktiviteettia, esim. β -ksylosidaasiaktiviteettia.

Esimerkkinä valikointitavasta, joka sopii tähän keksintöön voidaan mainita sellainen, jossa käytetään minimaaliväliainetta sisältävää peptidiä eristämään pehmeän lahon *Erwinia*-kantaa hajoavasta kasvimateriaalista. Katso Starr, "The Genus *Erwi*-

nia", Vol. II THE PROKARYOTES 1260-71, Springer-Verlag 1981. Isolaatit, jotka aiheuttavat kuoppaisuutta kalsiumstabiloidussa pektiinissä voidaan karakterisoida edelleen identiteetin vahvistamiseksi. Katso Bergey's Manual. Volume 1, sivut 469-76.

5

Sopivia Klebsiella-kantaehdokkaista, joita esiintyy runsaasti paperimassassa ja paperijätteessä (Huntley et al, J. Water Pollution Control Federation 48:1766-1771, 1976, Knittel et al, Appl. Environ. Microbiol. 34:557-63, 1977), voidaan saada esi-
 10 merkiksi prosessointilaitosten jätevirroista: Perry ja Palatka Floridassa. Tällaisessa jätteessä läsnä oleva runsas Klebsiella-määrä voi auttaa valikoitaessa erityisen käyttökelpoisia kantoja, joilla on optimaaliset ominaisuudet, esimerkiksi toksisten kemikaalien resistenssi ja kyky käyttää oligosakkarideja.
 15 Kannat voidaan aluksi valita kasvattavalla coliform-spesifisessä väliaineessa, katso Seidler, "The Genus Klebsiella (Nonmedical Aspects)", II THE PROKARYOTES 1166-72, ja identifioida edelleen indolituoton kannalta, Voges-Proskauer-reaktio, sitraatti jne. Katso Bergey's Manual, Volume 1, sivut 461-65.

20

Klebsiella- ja Erwinia-isolaatteja voidaan verrata tutkimalla niiden kykyä hajottaa karboksimeetyyliselluloosaa, ksylaani-
 sineä, metyyliumbelliferyyli- β -D-glukopyranosidia, metyyliumbelliferyylisellobiosidia, metyyliumbelliferyyliksylosidia ja
 25 metyyliumbelliferyyliarabinosidia mallisubstraatteina endoglukanaasille, ksylanaasille, β -glukosidaasille, sellobiohydrolaasille, ksylosidaasille ja arabinosidaasille alustoilla, jotka on puskuroitu pH-arvoon 6,0 (30°C). Kannat tulisi myös seuloa
 tutkien niiden kykyä metaboloida monosakkarideja (heksooseja ja
 30 pentooseja) samoin kuin sellobioosia, sellotrioosia, ksylobioosia ja ksylotrioosia. Disakkaridi- ja trisakkariditasot voidaan testata yliyön koeputkiviljelmissä ja ohutkerroskromatografian avulla tutkia yön kestäneen inkuboinnin aikana käytettyjä sakkarideja. Ksylodisaasit voidaan luoda koivuksyalaanista
 35 (Sigma) käsittelemällä C. thermocellum ksylanaasilla.

Lupaavien kantojen kasvua voidaan edelleen tutkia etsien etanolinsietoa, suolansietoa ja lämpötilansietoa olennaisesti samaan tapaan kuin valikoitaessa *E. coli* B. Katso Alterhum et al., Appl. Environ. Microbiol. 55:1943-48, 1989, Beall et al, Bio-technol. & Bioeng. 38:296-303, 1991. Vaikka useimmat isolaatit voidaan jäädyttää nestemäiseen tyypeen varastointia varten, kolme lupaavinta kantaa jokaisesta ryhmästä voidaan valita jatkokokehitystyötä varten. Varastoidut kannat saattavat osoittautua hyödyllisiksi tulevilla kokeilla uusien polysakkaridigeenien lähteinä.

Optimaalisilla kannoilla tulisi säilyä kyky metaboloida tehokkaasti kaikkia lignoselluloosan aineosia (disakkarideja, trisakkarideja ja monosakkarideja), kasvaa suuremmissa etanolipitoisuuksissa kuin 440 g/l, sietää 0,3 molaarisia suolatasoja, sietää 0,2 molaarisia asetaattitasoja ja sietää 40°C:n lämpötiloja sekä tuottaa suuria määriä entsyymejä, jotka ovat käyttökelpoisia selluloosa-, hemiselluloosa- ja pektiinidepolymeroinnissa minimaaliproteaasiaktiviteetilla. Jotkut kannat saattavat sisältää myös luonnon ksylanaaseja tai sellulaaseja. Kun on integroitu vieraita geenejä alkoholituottoa varten optimaalisten rakenteiden tulisi tuottaa etanolia kaikista testatuista sakkarideista yli 90 % teoreettisesta saannosta ja säilyttää samalla yllä mainituut hyödylliset ominaisuudet.

25 Voidaan tehdä lisäkokeita arvioitaessa eritettyjen sellulaasien yleis-pH:ta ja optimilämpötilaa ja määritettäessä lämpöstabiiliutta. Nämä tiedot saattavat olla hyödyllisiä laadittaessa optimaalisia olosuhteita yhdistettyihin hydrolyysi- ja fermentointiprosesseihin.

(E) HETEROLOGISTEN POLYSAKKARIDIEN EKSPRESSIO:

Kuten edellä kuvattiin tämän keksinnön eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa tuotetaan rekombinantteja, jotka ilmentävät heterologisia polysakkaraaseja ja näin vähentävät tarvetta käy-

ttää kaupallisia entsyymejä oligosakkaridien fermentoinnissa. Esimerkkeinä polysakkaraaseista voidaan mainita sellulolyyttiset entsyymit, hemisellulyyttiset entsyymit, ksylanolyyttiset entsyymit ja tärkkelystä hajottavat entsyymit.

5

Eräässä edullisessa toteutusmuodossa polysakkaraasi on lämpöstabiili. Näin esimerkiksi geenit, jotka koodaavat *Clostridium thermocellum*in termofiilisiä proteiineja (celA, B, C ja D) voidaan saada ekspressoitumaan yksin suurina määrinä sytoplasmisina tuotteina. Yhdistelmämenetelmin valmistetut entsyymit otetaan talteen harvestoimalla solut fermentoinnin päätteeksi ja vapauttamalla lämpöstabiilit entsyymit noista soluista kuumentamalla esimerkiksi 60°C:een, joka on lämpötila, jossa niillä on maksimaalinen aktiviteetti ja hyvä stabiilius. Sen jälkeen entsyymien annetaan vaikuttaa polysakkaridikompleksisubstraattiin ennalta määrätyn ajan, esim. noin 12 tuntia. Modifioinnit, joissa poistetaan selektoitujen geenien signaali-osat parantavat suuresti aktiviteetteja, jotka ilmenevät *E. coli*ssa, ja vaikutus voi olla sama *Klebsiella* ja *Erwinia* kohdalla.

20

Tässä yhteydessä erityisen suositeltava on celD-geeni sekä tämän keksinnön mukaisesti celD-transformoidut rekombinantit käytettäväksi fermentointiin substraattilla, joka voi olla esimerkiksi SOLKA-FLOC, hienonnettu selluloosatutuote, joka on saatu hienontamalla mekaanisesti puumassaa. Kuten esimerkki 18 ja kuvio 14 jäljempänä osoittavat esihydrolyysissä substraattilla celD-koodatulla entsyymillä saadaan vähennettyä kaupallisten sellulaasien tarvetta noin 1/5 suhteessa rekombinantteihin, jotka eivät sisällä celD:tä. Tämä tapa käyttää entsyymejä, heterologisesti ekspressoituja ja intrasellulaarisesti akkumuloituneita, "pikastarttaamaan" kompleksisubstraatin sakkarifiointi voidaan tämän keksinnön mukaisesti yleistää mille tahansa etanologeeniselle rekombinantille, jota edelleen transformoidaan polysakkaraasia koodaavalla geenillä, ja jonka ekspressiotuote voidaan ottaa talteen oligosakkaridikompleksien (sel-

luloosa, hemiselluloosa, tärkkelys, glykogeeni, pektiini, inuliini jne) hajottamiseksi. Katso esimerkit 17-19 jäljempänä.

Näin voidaan esimerkiksi käyttää soluja aiemmasta fermentoinnista entsyymilähteenä jokaiseen seuraavaan fermentointiin. Entsyymieritystä ei tarvita, sen sijaan menetelmässä käytetään hyväksi intrasellulaarista akkumuloitumista entsyymien harvennustoiminnan helpottamiseksi. Suurin rekombinanttientsyymitaso on läsnä heti sen sijaan että se akkumuloituisi hitaasti kasvun ja fermentoinnin aikana. Lisäksi on pienempi mikrobikontaminaation vaara, koska oligosakkaridien käyttö on mikro-organismien yhteydessä harvinaista, ja näin ollen on olemassa vähemmän mikrokasvistoa kilpailemassa näistä sokereista.

Eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa yllä kuvattu etanologeeninen rekombinantti ekspressoii polysakkaraasia, jota ainakin osittain erittyy isännästä ja joka katalysoi oligosakkaridikompleksin hydrolyysin ekstrasellulaarisesti. Tällainen geenituote voi tukea yhden tai useamman kaupallisen entsyymin aktiiviteettia, esimerkiksi sellaisten tuotteiden kuin *cenA* (endoglukanaasi) ja *cex* (eksoglukanaasi), joita perinteisesti lisätään sakkarifikaation ja etanolituoton aikana. Esimerkkeinä tähän käyttöön sopivista polysakkaraasia koodaavista geeneistä voidaan mainita *Cellulomonas fimi* -sellulaasigeenit, jotka erittyvät osittain (noin 50-60 %) kun ne transformoidaan *Klebsiella* tai *Erwinia*an. Esimerkiksi *cex*-geenillä transformoidulla *Erwinia*-laboratoriokannalla yli 50 % heterologisesta ekspressiotuotteesta erittyy lihaliemeen.

Tällaisen erittymisen tehokkuutta voidaan parantaa fuusioimalla pullulanaasisignaalisekvenssejä *Klebsiella*an ja pektaattilyaasi *Erwinia*an. Katso Murooka, *Ferment. Technol. Ind. Appl.* 40-45, 1990, Pugsley et al, *Ann. Rev. Genetics* 24:67-90, 1990, He et al, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:1079-83, 1991, Saarilahti et al, *Gene* 90:9-14, 1990,

Eräs erityisen kiinnostuksen kohde on tämän keksinnön mukainen etanologeeninen transformantti, joka ekspressoit sekä lämpöstaabiilia geenituotetta että erittyvää geenituotetta. Tällaisella transformantilla saataisiin (1) hajoamisen myötä entsymaattista

5 aktiviteettia käytettäväksi esikäsittelyssä selluloosan tai muun kompleksisen substraatin pilkkomiseksi yksinkertaisemmiksi oligosakkarideiksi ja monosakkarideiksi, ja (2) erittymisen myötä entsyymejä jatkuvaan depolymerointiin fermentoinnin aikana.

10

Erityisolosuhteissa käyttökelpoisia ovat heterologiset geenit liitettynä mutaatioihin tai geneettisiin modifiointeihin, jotka yliekspressoivat natiiveja piirteitä. Voidaan esimerkiksi suorittaa mutageneesi ja selektio lisäämään luonnon endoglukanaasien ekspressoitumista *Erwinia*-kannoissa. Joissain tapauksissa

15 suuret glukoosipitoisuudet ehkäisevät näitä. Seleктоimalla vaimennettuja mutantteja glukoosi-CMC-alustoilta voidaan saada identifioituja kantoja, joilta tämä säätely puuttuu, joista jotkut saattavat ylituottaa näitä entsyymejä.

20

Alaan perehtyneelle on selvää, että tämän keksinnön tämän piirteen puitteissa voidaan käyttää monia eri polysakkaraaseja.

Samoin on käytettävissä suuri valikoima transformoivia vektoreita käytettäväksi tämän keksinnön tämän piirteen yhteydessä.

25 Saattaa olla tarpeen suorittaa joitain rutiinikokeita optimaalisesti toisiinsa sopivan isännän ja vektorin aikaansaamiseksi. Voidaan koota esimerkiksi RSF1010-perustaisia vektoreita, katso Conway et al, Appl. Environ. Microbiol. 53:235-41, 1987c, ja ne ovat suositeltavien sen vuoksi, että niiden laaja isäntävalikoima antaa mahdollisuuden heterologisten geenien viemiseen

30 moniin gramnegatiivisiin isäntiin, mukaan lukien kaikki *Erwinia*- ja *Klebsiella*-isolaatit, tetrasykliiniresistenssiä selektoiden. Sen sijaan pUC-perustaiset plasmidit saattavat osoittautua epästabiileiksi joissain *Erwinia*-kannoissa, ja sen vuoksi ne ovat vähemmän suositeltavia.

35

Muita polysakkaraasigeenejä, jotka sopivat käytettäväksi tässä keksinnössä ovat sellaiset, jotka koodaavat yhtä alla luetelluista selluloosa-aktiviteeteista:

5

	Substraatti					
	Entsyymityyppi	Kiteinen selluloosa	Karboksi metyyli-selluloosa (CMC)	Amorfinen selluloosa	Sello-tetroosi	Sello-bioosi
10	Endo-gluka-naasi	-	+	+	+	-
	Sellobio-hydro-laasi	+	+/-	+	+	-
15	β -gluko-si-daasi	-	-	-	+	+

Endoglukanaasi hydrolysoi β -1,4-glykosidisiä liitoksia satunnaisesti. Se ei koske sellobioosiin, mutta hydrolysoi sellodekstriinejä, fosforihappoturvonnutta selluloosaa ja substituoituja selluloosia kuten CMC ja HEC (hydroksietyyli-selluloosa). Jotkut endoglukanaasit vaikuttavat myös kiteiseen selluloosaan.

25 Sellobiohydrolaasi sen sijaan vaikuttaa selluloosaan, tarkemmin sanoen pilkkoo sellobioosiyksiköitä ketjun ei-pelkistävästä päästä. Sellobiohydrolaasi hydrolysoi sellodekstriinejä, muttei sellobioosia. β -glukosidaasi hydrolysoi sellobioosia ja sello-oligosakkarideja glukoosiksi, muttei koske selluloosaan tai korkeampiin sellodekstriineihin.

Edellä mainittujen *C. thermocellum* -sellullaasia koodaavien geenien lisäksi on karakterisoitu muitakin selluloottista aktiviteettia koodaavia geenejä. Katso esimerkiksi Béguin, Ann.

35 Rev. Microbiol. 44:219-48, 1990, joka on oheenliitetty. Täl-

laisia geenejä on myös helposti saatavilla esimerkiksi GenBankin tietokannan kautta, jonka luetteloissa on muun muassa 13 endoglukanaasia, 3 sellobiohydraasia ja 3 β -glukosidaasia (maaliskuu 1991).

5

Samaan tapaan geenit, jotka koodaavat ksylanolyttistä entsyymiä voidaan käyttää yllä kuvattuun tapaan tämän keksinnön mukaisesti. Eräs erityisen kiintoisa kohde tässä mielessä ovat geenit, jotka koodaavat ksylanolyttistä entsyymiä, joka valitaan ryhmästä endo-1,4- β -ksylanaasi, β -ksylosidaasi, α -glukuronidaasi, α -L-arabinofuranosidaasi, asetyyliesteraasi ja asetyyliksylaaniesteraasi. Esimerkkeinä tästä ryhmästä voidaan mainita *C. thermocellum* xynZ-geenin ja *Butyrivibrio fibrisolvens* xylB-geenin ekspressiotuotteet, jotka kumpikin ilmentyvät edempänä kuvattavissa etanologeenisissä transformanteissa (katso esimerkki 17). Tässäkin ksylanaasien geenejä on helposti saatavilla, GenBank luettelee 7 endo-1,4- β -ksylanaasia, 5 β -ksylosidaasia ja 1 α -L-arabinofuranosidaasin (maaliskuu 1991).

20 Samoin tässä keksinnössä voidaan käyttää geenejä, jotka koodaavat
tärkkelyksen hajoamiseen osallistuvia entsyymejä. Tällaisia entsyymejä on lueteltu seuraavassa taulukossa, mukaan on
liitetty tiedot biologisesta lähteestä ja muita ominaistietoja.

Entsyymi	Tyyppi	Lähde	Määrä	Aktiviteetti
α -amylaasi	Nesteyttävä	Bacillus subtilis x)	0,06 paino% tärkkelystä	Vähentää viskositeet- tia (Pilkkoo 1-4, pH 5,5, 70°C)
		B. licheniformis	0,06 paino% tärkkelystä	Vähentää viskositeet- tia (92°C)
		Ohrmallas	0,5-1,0 paino% viljaa	Vähentää viskositeet- tia (60°C)
β -amylaasi	Sakkarifioiva	Ohrmallas xx)	2,0 paino% viljaa	Luo maltoosia (Pilkkoo 1-6, pH 5,5, 60°C)
Glukoamylaasi	Sakkarifioiva	Aspergillus niger xx)	0,18 paino% tärkkelystä (1,7 L/t)	Luo glukoosia (Pilkkoo 1-6 pH 5,0, 60°C)
Pullulanaasi	Sakkarifioiva	B. acidopullulyticus	0,2 paino% tärkkelyksestä (2,0 kg/t)	Pilkkoo 1-6, pH 5,0, 60°C

x) Endoamylaasi

xx) Eksoamylaasi

Tärkkelyksen hajottamiseen osallistuvista entsyymeistä tuodaan jäljempänä esiin B. stearothermophilus α -amylaasi ja T. brockii -pullulanaasi. Tällaisiakin geenejä on helposti saatavilla, GenBankin luetteloissa maaliskuulta 1991 mainitaan 190 α -amylaasia, 3 β -amylaasia, 8 glukoamylaasia ja 3 pullulanaasia. Myös muita polysakkaaraaseja kuten β -glukanaasia, arabinosidaasia, mannanaasia, pektiinihydrolaasia ja peктаattilyaasia on saatavilla helposti GenBankin kautta tai kirjallisuuden avulla, jossa tällaisten geenien kloonamista käsitellään.

Bacillus -polysakkaarasigeenit ekspressoituvat usein hyvin E. colissa ja niiden pitäisi olla sopivia enteerisissä bakteereissa yleisesti käytettäväksi tämän keksinnön mukaisesti. Bacillaceae-jäsenet erittävätkin hyvin monia tällaisia entsyymejä, mukaan lukien amylaasit, β -glukanaasit ja hemisellulaasit, ja

useat lajit erittävät sellulaaseja, mukaan lukien kannat *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis* ja *B. cereus*. Katso Béguin, supra, 1990, ja Robson et al, Enzyme Microb. Technol. 11:626-44, 1989, jotka on oheenliitetty. Jos heterologiseen

5 polysakkaraasigeeniin liittyvä signaalisekvenssi ei toimi valitussa isännässä, esimerkiksi Klebsiellassa tai Erwiniassa, on tavanomaisia keinoja korvata tämä signaali geenifuusiolla isännän signaalisekvenssiin siinä tapauksessa, että kuten yllä heterologisen entsyymin erittyminen on toivottavaa.

10

Bacillus stearothermophilus -kannat ovat lähteitä, joista saadaan geenejä, jotka koodaavan lämpöstabiilia hydrolaasia muita aktiviteetteja, esimerkiksi endoglukonaasia (CMCase- ja nitrofenyyლისellobiosidaasi-aktiviteetit), ja jotka sopivat hyvin

15 käytettäväksi tässä keksinnössä. Monia tämän tyyppisiä geenejä on karakterisoitu, ja niitä voi saada GenBankin kautta tai sopivasta kirjallisuudesta. Katso myös Béguin, supra, 1990.

(F) ISÄNTIEN SELEKTIO JA TRANSFORMOINTI:

20 Valikoitaessa potentiaalistien isäntien kantoja heterologisille polysakkaraasigeeneille tämän keksinnön mukaiset rekombinantti-

kannat, jotka sisältävät alkoholituottoa varten integroitua

geenejä, voidaan testata fermentoimalla SOLKA-FLOK selluuloosa-

substraatilla kaupallisten selluloosaa hydrolysoivien sellulaa-

25 laasien kanssa. Voidaan piirtää annosvastekäyrä etanolituotol-

le ja konvertoitumisnopeudelle suhteessa kaupallisen entsyymin-

valmisteen laimennokseen. Näissä kokeissa voidaan käyttää

teollisia sellulaasivalmisteita (esim. SPEZYME, MULTIFECT ja

CYTOLASE, Genecor) pH-säädelyssä käymisessä 35°C:ssa ja pH-

30 arvossa 6,0.

Heterologisten polysakkaraasien lisääminen voidaan sitten täydentää tavalla, jota kuvaavat esimerkit 17-19. Esimerkiksi

polysakkaraasigeenit, jotka on valittu erityisen edullisina

35 voidaan integroida homologirekombinaation avulla. Tetrasyk-

liiniä (5 mg/l) voidaan käyttää selektoimaan lähtörekombinantit

ja suurempia pitoisuuksia käytetään valikoitaessa mutantteja, joissa on kohonnut hyödyllisten geenien ekspressio. Tetrasykliiniresistenssigeenin (tet) inaktivoimiseksi voidaan käyttää fusariinihapposelektiota, niin että useita entsyymejä voidaan
 5 lisätä peräjälkeen samaan tapaan. Näiden rakenteiden käyttökelpoisuutta voidaan arvioida yhden ja useamman vaiheen selluloosafermentointiprosesseissa.

Eräs suositeltava tie etanologeenisten grampositiivisten organismien, esimerkiksi *B. subtilis*- tai *Cellulomonas*-kanta, kehittämiseksi on käyttää kemiallista mutaatiota yhdessä pesäkkeiden seulonnan kanssa vasta-aineilla, jotka on suunnattu *Z. mobilis* -pyruvaattidekarboksylaasia vastaan ja näin havaita ekspression lisääntyminen. Näin identifioidut suurempaa ekspressiota osoittavat kloonit tutkitaan fenotyypin mekanismin
 15 (mekanismien) selville saamiseksi. Tällaiset mutantit saattavat osoittautua hyödyllisiksi per se ja, lisäksi todennäköisesti sopivat hyvin ekspressoimaan muita heterologisia proteiineja organismissa, jota yleisesti pidetään turvallisena (GRAS).

20

Transformoitaessa etanologeenisiä heterologisia sellulaasi-geenejä suurempien intrasellulaaristen aktiivisten entsyymien pitoisuuden aikaan saamiseksi saatetaan tarvita joitain ylimääräisiä rutiininomaisia geenimanipulointi- tai seulontakeinoja
 25 valitun isännän ja sellulaasin mukaan. Esimerkiksi isännän erittämät proteaasit saattavat olla este tämän keksinnön mukaiselle heterologiselle ekspressiolle. Voidaan käyttää useanlaisia lähestymistapoja, esimerkiksi proteinaasiaktiviteetti-indikaattorialustoja ja suurempien kohde-entsyymipitoisuuksien selektointia sellaisten mutanttien aikaansaamiseksi, joilla nämä ongelmat on minimoitu.

Lisäksi joudutaan usein maksamaan oma hintansa, kasvunopeudessa ja tehokkuudessa, tuotettaessa mitä tahansa heterologista proteiinia, polysakkaraasi mukaan lukien. Tätä "geenitaakkaa"
 35 voidaan pienentää testaamalla erityisen käyttökelpoisten geenien

en multippelirakennetta Integrointikohta voi myös vaikuttaa näennäiseen "geenitaakkaan", ja sen vuoksi olla muuttuja suoritettaessa testejä tämän keksinnön mukaisesti.

5 Tähän tapaan valmistettuja rakenteita voidaan sitten käyttää selluloosafermentointikokeissa kuten jäljempänä esitetään esimerkissä 18, arvioimaan tehokkuutta yhdessä kaupallisten entsyymien kanssa samoin kuin fermentointitehokkuutta. Voidaan siis testata transformoidun isännän erittämien selluulasien
 10 kykyä korvata kaupallisia sellulaaseja yksivaiheisissa prosesseissa, joissa kaupallisia sellulaaseja lisätään vaiheessa, jossa inokuloidaan etanolia tuottavia ja selluulaasia erittäviä rekombinantteja. Termofiilisten sellulaasien käyttökelpoisuutta voidaan testata lisäämällä näitä entsyymejä sisältäviä etanologisia soluja aiemmasta fermentoinnista selluloosasuspensi-
 15 oihin 60°C:ssa. Inkubointia voidaan jatkaa tietyn ajan, esimerkiksi 12 tuntia, kyseisen entsyymin kannalta optimoiduissa olosuhteissa. Lämpötilaa ja pH-arvoa voidaan alentaa useimmissa tapauksissa niin että saadaan optimaaliset olosuhteet kaupalliselle entsyymille, esim. SPEZYME, MULTIFECT ja CYTOLASE,
 20 ja inkubointia jatketaan 12 tuntia. Kun lämpötila on alennettu 35°C:een ja pH 6,0:een liemi voidaan inokuloida rekombinantilla etanologeella. Etanolisaannot ja -nopeudet voidaan määrittää. Tästä lähestymistavasta voidaan muovata useita variaatioita niin että saadaan täytettyä kaikkien eri entsyymien optimaalisen aktiviteetin spesifiset vaatimukset.

Käytettävistä molekyylligenetiikan keinoista on paljon kirjallisuutta. Katso esimerkiksi Maniatis et al, MOLECULAR CLONING: A
 30 LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, Ausubel et al, CURRENT PROTOCOLS AND MOLECULAR GENETICS, John Wiley & Sons, 1987. Fermentointi voidaan toteuttaa kuvatuissa ja esimerkeissä esiin tulevissa pH-arvoissa. Etanoli voidaan mitata kaasunestekromatografian avulla tavalla, jota ovat kuvanneet
 35 Goel et al, Biotechnol. Lett. 3:177-182, 1984, ja Dombek et al, Appl. Environ. Microbiol. 51:197-200, 1985. Monomeerisokerit

voidaan määrittää kolometrisesti ja HPLC-tekniikalla. Katso Ashwell, *Methods Enzymol.* 8:93-95, 1966, ja Wood et al, *Methods Enzymol.* 160, 1988. Oligosakkaridit voidaan analysoida HPLC- ja ohutkerroskromatografian avulla. Viljelmiä voidaan kasvat-
 5 taa joko yhdistelmäväliaineessa kuten Luria-lihaliemessä tai mineraalisuoloissa. Katso Starr, Vol. II THE PROKARYOTES 1166-1172, 1260-1271, Springer Verlag, 1981, ja Mizutani et al, *Bio-technol. Bioeng.* 28:204-09, 1986. Organismeja voidaan pitää yllä kiinteässä väliaineessa, joka sisältää 1,5 % agarua, ja
 10 varastoida glyserolissa -70°C:ssa.

Sellulaasientsyymejä voidaan tutkia olennaisesti tavalla, jota ovat kuvanneet Curry et al, *Appl. Environ. Microbiol.* 54:476-484, 1988, ja Gripenet et al, *J. Bacteriol.* 170:4576-4581,
 15 1988. Eksoglukanaasi-aktiviteettia voidaan tutkia käyttämällä p-nitrofenyyliisellobiosidia mallisubstraattina. Karboksimeyy-
 lisellulaasi- (endoglukanaasi) aktiviteettia voidaan mitata pelkistyvän sokerin vapautumisena. Sellulaasiaktiviteettia voidaan tutkia myös perinteiseen tapaan mittaamalla pelkistyi-
 20 en sokereiden vapautumista suodatinpaperilta. Metyyliumbelli-
 feryyli johdannaisia, CMC:aa ja pektaattia voidaan käyttää val-
 mistettaessa indikaattorialustoja kvalitatiivista vertailua
 varten ja siten saada identifioitua kantoja, jotka tuottavat
 suuria määriä entsyymiä, joka hydrolysoi jotain näistä subst-
 25 raateista.

(G) ALKOHOLITOLERANSSIN JA TRANSFORMANTTITUOTON PARANTAMINEN

Tämän keksinnön mukaisilla etanologeenisillä rekombinanteilla
 tuotetut maksimaaliset etanolimäärät voivat olle esimerkiksi
 30 yli 1 M. Etanolituotto voi olla yli 1,5 M fermentoitaessa lak-
 toosia *E. coli* -transformantilla K011, joka on talletettu ATCC
 55124:na. Tämän keksinnön mukaisten etanologeenisten rekombinanttien parempi alkoholitoleranssi on siis erityisen käyttökelpoista. Kalvolipideihin ja/tai stressiproteiineihin vaikuttavat muutokset ovat todennäköisiä syitä tällaisiin parannuksiin. Myös *Z. mobilis* -adhB, tämän keksinnön mukaisen suosi-

teltavan etanologeenisen operonin (pet) komponentti, on identifioitu lupaavana *Z. mobilis* -stressiproteiinina, joka reagoi sekä lämpötilaan että alkoholiin Katso Haejung et al, J. Bacteriol. 173:5975-82, 1991. Samassa yhteydessä lienee mahdollista käyttää muitakin *Z. mobilis* -geenejä, jotka koodaavat stressiproteiinia. Tällaisten geenien aikaansaamiseksi voidaan esimerkiksi sellaisia geenejä, joita on *E. coli*ssa ja jotka ekspressoivat tärkeimpiä stressiproteiineja kuten ovat raportoineet Johnson et al, J. Bacteriol. 171:1590-96, 1989, Ang et al, J. Bacteriol. 171:2748-55, 1989, Lipinska et al, Nucleic Acids Res. 16:7545-61, 1988 ja Fayet et al, Mol. Gen. Genet. 202:435-45, 1986, käyttää koettimina eristämään vastaavia geenejä *Z. mobilis*ksestä.

15 On ilmeistä, että lipidisynteesigeenitkin osoittautuvat käyttökelpoisiksi etanolitoleranssin suhteen. Muita etanolitoleranssin kannalta käyttökelpoisia geenejä voidaan selektoida transformoimalla kirjastoja suoraan etanologeeneiksi ja rikastamalla sarjakauttakuluilla fermentoiniliemessä, jossa on pidetty yllä
20 sokeriylimäärää edistämään etanoliresistenttien organismien edelleen kasvua sen jälkeen kun etanolimäärät ylittävät alkupe-
räissiirroksen sietokyvyn. Näissä selektioissa erityisen sopivia saattavat olla myös kemostaattiset lähestymistavat.

25 Näissä rikasteissa voidaan testata myös erittäin etanoliresistenttien *Lactobacillus homohiochii* ja *L. heterohiochii* -geenikirjastoja, katso Ingram, Critical Rev. Biotechnol. 9:305-19, 1990. Koska nämä mikrobit aiheuttavat pilaantumista sakessa niiden alkoholisietotasot ovat luokkaa 15 % v/v (yli 2,5 M).

30 Tällä lähestymistavalla voidaan siis kehittää rekombinanttikan-
toja, joilla pitäisi pystyä rutiininomaisesti saamaan aikaan etanolitasoja, jotka ovat vähintään 80 grammaa per litra.

35 Myös *Z. mobilis* glykolyyttisiä entsyymejä voidaan käyttää parantamaan tämän keksinnön mukaisia etanologeenisiä rekombinantteja. Toisin sanoen yhden tai useamman näistä 13:sta glyko-

lyyttisiä entsyymejä koodavista geeneistä tulisi lisätä glykolyyttistä virtaa ja näin ollen etanolituottomäärää.

(H) PROSESSIKONSTRUKTIO:

5 Tämän kuvauksen mukaisesti voidaan suunnitella lukemattomia fermentointiprosesseja tämän keksinnön toteuttamiseksi. Taval-
lisesti tällaisissa prosesseissa on kaksi vaihetta: "sakkari-
fiointi"vaihe, jossa biomassa saatetaan kosketuksiin polysakka-
raasin kanssa oligosakkaridien hajottamiseksi yksinkertaisem-
10 miksi oligosakkarideiksi ja/tai monosakkarideiksi, ja myöhempi
"fermentointi"vaihe, jossa yksinkertaisemmat oligosakkaridit
ja/tai monosakkaridit fermentoidaan etanoliksi. Edullisesti
nämä kaksi vaihetta suoritetaan erikseen, sillä optimiolosuht-
teet näissä kahdessa vaiheessa ovat hyvin erilaiset. Sakkari-
15 fiointivaiheen optimiolosuhteita ovat: lämpötila noin 50°C -
noin 60 °C ja pH noin 4,5 - noin 5,0. Optimaalisia fermentoin-
tivaiheen olosuhteita ovat: lämpötila noin 30°C - noin 35°C ja
pH noin 6,0.

20 Menetelmän tehokkuuden parantamiseksi voidaan kierrättää osa
materiaaleista fermentointivaiheesta sakkarifiointivaiheeseen.
Lisäksi, koska kierrätettävän materiaalin lämpötila fermentoin-
tivaiheessa on noin 30-35°C näitä materiaaleja voidaan edulli-
sesti käyttää lämmönvaihtimina alentamaan sakkarifiointivaiheen
25 poisteen korkeampaa lämpötilaa ennen viemistä fermentointivai-
heeseen. Esimerkkiprosessi tuodaan esiin jäljempänä ja sitä
kuvaavaa kuvio 19.

Kuviossa 19 polysakkaraasi ja esikäsitelty biomassa pannaan
30 entsyymireaktoriin 10, jossa biomassan lähtöoligosakkaridit
hajotetaan yksinkertaisemmiksi oligosakkarideiksi ja monosakka-
rideiksi. Entsyymireaktorin 10 lämpötila pidetään noin 50 -
noin 60 °C:ssa ja pH noin arvossa 4,5 - noin 5,0. Kiinteiden
aineiden ja nesteen seos lasketaan entsyymireaktorista 10 put-
35 ken 12 läpi kiinteiden aineiden/nesteiden erottimeen 14, jossa

kiinteä aine ja neste erottuvat esimerkiksi sentrifugoinnin avulla.

Erottuneet kiinteät aineet palautetaan entsyymireaktoriin 10 putken 16 kautta. Poiste erottimesta kulkeutuu putkea 18 lämmönvaihtimeen 20, jossa se jäähtyy noin 30 - noin 35 °C:een. Sitten poiste kulkeutuu putkea 22 kalvoerottimeen 24, joka erottaa suurimolekyyli­massaiset polysakkaraasit, jotka sitten palautetaan putkea 26 entsyymireaktoriin 10. Kalvoerotin voi olla esimerkiksi ultrasuodatin kuten CARRE-suodatin (valmistaja Du Pont®) jonka erotuskyky on noin 10^{-3} - noin 10^{-4} μm . Vaihtoehtoisesti kalvoerotin 24 voidaan jättää pois ja johtaa poiste suoraan fermentoriin 30. Jäljelle jäävä sokeriliuos, joka sisältää oligosakkarideja ja/tai monosakkarideja siirretään putkea 28 fermentoriin 30. Ennen fermentoriin viemistä sokeriliuoksen pH säädetään hieman korkeammaksi, esimerkiksi lisäämällä emästä.

Hiilidioksidi lasketaan pois fermentorista putkea 32. Poiste lasketaan fermentorista kohdan 34 kautta tislaukolonniin (ei esitetty) etanolin tislausta varten. Mäski lasketaan pois fermentorista ja saatetaan putkea 36 kiinteän aineen erottimeen 40 (esim. sentrifugi). Erottimessa 40 erottuneet mikro-organismit palautetaan fermentoriin putkea 42. Erottimen 40 poiste kulkeutuu lämmönvaihtimeen 20 jäähdyttämään kiinteiden aineiden ja nesteen erottimen 14 poistetta. Lämmönvaihtimesta 20 lähtevän poisteen pH-arvoa alennetaan, esimerkiksi happoa lisäämällä, arvoon noin 4,5 - noin 5,0, ja viedään se sitten entsyymireaktoriin 10. Sekä entsyymireaktorissa 10 että fermentorissa 30 voi olla sekoitin, 48 ja 50, jotka voivat millaisia tahansa tavallisia sekoittimia.

Valinnaisesti jatkuvassa toiminnassa nestettä (olutta), jonka etanolipitoisuus on noin 0,5 - noin 5 %, tavallisesti noin 1-2 %, voidaan poistaa fermentorista 30 putkea 52 ja syöttää haihdutinlaitteeseen 54, jossa etanoli ja vesi haihdutetaan ja vie-

dään pois kohdan 56 kautta toiseen tislausvaiheeseen (ei esitetty). Etanolipitoisuus kohdassa 56 voi olla noin 20 - noin 25 %. Haihduttimesta 54 poistettu ja fermentoriin kohdan 58 kautta palautetun oluen etanolipitoisuus on alle noin 0,5 %, 5 tavallisesti noin 0,3 %. Näin etanolipitoisuus fermentorissa voidaan pitää suhteellisen pienenä samalla kun etanolituotto fermentorissa pysyy korkeana.

Samaan tapaan poisteen, joka palautetaan reaktoriin 10 putkien 10 36, 44 ja 46 kautta, etanolipitoisuus on pienempi ja se haittaa siis vähemmän reaktioita reaktorissa. Tällaista jatkuvaa prosessia voidaan käyttää lisäämällä biomassaa reaktoriin 10. Saattaa kuitenkin olla toivottavaa tyhjentää reaktori 10 ja fermentori 30 tietyin aikaväleihin kerääntyneiden kiinteiden ai- 15 neiden poistamiseksi ja kontaminoitumisen mahdollisuuden vähentämiseksi.

Edellä käsitellyillä fermentointiprosessilla saadaan siis tehokas menetelmä biomassan fermentoimiseksi etanoliksi. Alaan 20 perehtyneelle on selvää, että fermentointiprosessiin on mahdollista monia muita kohtia ja/tai vaiheita. Voidaan esimerkiksi lisätä biomassan esikäsittelevä vaihe, jossa biomassaa esimerkiksi hienonnetaan, hydrolysoidaan (höyryn ja/tai hapon kanssa tai ilman), käsitellään polysakkaraaseilla ja/tai muilla entsyymeillä jne. Lisänä voi myös olla alkuvaihe, jossa rekombinantti-isäntäsolut, jotka ekspressoivat ja intrasellulaarisesti 25 akkumuloivat polysakkaraaseja, kuumennetaan solujen hajottamiseksi ja polysakkaraasin vapauttamiseksi. Voidaan myös lisätä useampia fermentointivaiheita lisäerotuksineen, kiinteiden ai- 30 neiden kierrätyksineen ja poisteineen.

III. Esimerkit

Keksintöä kuvataan nyt edelleen seuraavien kuvaavien esimerkkien avulla, jotka eivät ole mitenkään rajoittavia. Kaikki pro- 35 sentit ovat painoprosentteja ja liuotinsuhteet tilavuuksina

ellei muuta mainita. Muita esimerkkien metodologisia aspektejakin tulee esiin seuraavassa:

Organismit ja kasvuolosuhteet

- 5 Käytettiin *Escherichia coli* TC4:ää, katso Conway et al, 1987a, ja sen plasmidin sisältäviä johdannaisia. Plasmideja, jotka sisältävät *Z. mobilis* -pyruvaattidekarboksylaasigeenin (pLOI276) ja alkoholidehydrogenaasi B -geenin (pLOI284) ovat kuvanneet Conway et al, 1987b.

10

Kannat ja kasvuolosuhteet:

- Plasmideja pUC18 ja pUC19 on kuvattu aiemmin, katso Yanisch-Perron et al, Gene 33:103-19, 1985, samoin plasmideja pLOI204 ja pLOI295. Katso Conway et al, 1987b, Ingram et al, 1987.
- 15 Plasmidien pLOI292, pLOI291, pLOI297, pLOI308, pLOI308-2, pLOI308-5 ja pLOI308-10 rakennetta ja ominaisuuksia on kuvattu jäljempänä.

Viljelmiä kasvatettiin 37°C:ssa Luria-liemessä, katso Luria &

- 20 M. Delbruck, Genetics 28:491-511, 1943, joka sisälsi 50 g glu-

koosia per litra. Soluja entsyymianalyysijä ja inokulointia

varten fermentointikokeisiin kasvatettiin koeputkissa (13 x 100

mm), jotka sisälsivät 3 ml lientä 37°C:ssa koeputkipyörittimestä.

Tuoreeseen väliaineeseen laimennettiin yliyönviljelmiä

25 100 kertaisesti. Aerobisia viljelmiä (50 ml lientä 250 ml:n

pulloissa) ravisteltiin edestakaisin liikkuvassa vesikylvyssä

(120 heilahdusta minuutissa). Anaerobisia viljelmiä kasvatet-

tiin suljettavissa seerumipulloissa (100 ml lientä 130 ml:n

pulloissa) pyörivästi sekoitettuna (150 rpm) 37°C:ssa inkubaat-

30 torissa. Anaerobisia viljelmiä ilmastettiin 25 neulalla kaasumaisten fermentointituotteiden pois päästämiseksi.

Kasvua seurattiin spektrofotometrisesti, Spectronic 70 spektro-

fotometrillä (Bausch & Lomb, Inc. Rochester, NY) 550 nm:ssä.

35 Kertakäyttöisiä viljelykoeputkia (10 x 75 mm) käytettiin kyvet-

teinä. Yksi absorbanssikyky-yksikkö olosuhteissamme sisälsi

noin 0,25 mg soluproteiinia per ml. Kasvun mittauksissa yksikkö oli A_{550} .

Tämän keksinnön mukaisia plasmideja sisältävät *Escherichia coli* -isännät on talletettu: American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA. Viljelmille on annettu tulonumerot säilytyspaikassa:

	<u>Viljelmä</u>	<u>Tulonumero</u>	<u>Talletuspäivä</u>
10	E. coli pLOI308-10	ATCC 67983	15.5.1989
	TC4(pLOI292)	ATCC 68237	23.2.1990
	TC4(pLOI308-11)	ATCC 68238	23.2.1990
	TC4(pLOI297)	ATCC 68239	23.2.1990
	TC4(pLOI295)	ATCC 68240	23.2.1990
15	E. coli pLOI510	ATCC 68484	
	K. oxytoca M5A1 (pLOI555)	ATCC 68564	14.3.1991

Kohteena olevat viljelmät on talletettu ehdoilla, joilla viljelmät ovat saatavilla tämän patenttihakemuksen vireilläolon aikana U.S. Commissioner of Patents and Trademarksin oikeute-
 20 tuksi katsomalle (CFR 1.14 ja 35 USC 122). Talletteet ovat
 saatavilla ulkomaisten patenttilakien mukaisesti maissa, joissa
 kohteena olevan patenttihakemuksen vastinosat tai niiden myö-
 25 hemmät versiot on jätetty. On selvää, ettei talletteiden saa-
 tavuus tarkoita lupaa käyttää kohteena olevaa keksintöä patent-
 tioikeuksien vastaisesti.

Kohteena olevat viljelytalletteet säilytetään ja ne ovat ylei-
 30 sesti saatavilla mikro-organismeista tehdyn sopimuksen mukai-
 sesti (Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms).
 Toisin sanoen niitä säilytetään tarvittavalla huolellisuudella
 niin että ne pysyvät elossa ja kontaminoitumattomina vähintään
 viiden vuoden ajan viimeisimmästä pyynnöstä talletenäytteen
 35 antamiseksi ja joka tapauksessa ainakin kolmenkymmenen vuoden
 ajan tallettamisesta lähtien tai minkä tahansa viljelmiä koske-

van patentin voimassaoloajan. Tallettaja vastaa talletteiden korvaamisesta siinä tapauksessa että talletuspaikka ei pysty antamaan talletetta pyydettyä talletteiden tilan vuoksi. Kaikki kohteena olevan viljelmän yleistä saatavuutta koskevat rajoitukset purkavat peruuttamattomasti niille myönnetyt patentit.

Geenitekniikat:

Transformaatiot, plasmidirakenteet, DNA-hajotukset ja analyysit suoritettiin edellä kuvattuun tapaan. Rekombinantit valittiin kiinteästä väliaineesta (1,5 % agaria), joka sisälsi 2 g glukosia per litra ja sopivia antibiootteja. Toimivia *Z. mobilis* etanologeenisiä geenejä sisältävät rekombinaatit tunnistettiin ylisuurina pesäkkeinä Luria-agaralustoilla, jotka sisälsivät glukosia, ja identifioinnin varmistivat havainnot huonosta kasvusta Luria-agaralustoilla, joissa ei ollut glukosia ja alkoholidehydrogenaasiekspressiosta aldehydi-indikaattoriväliaineessa.

20 Entsyymitutkimukset:

Solut hajotettiin, inaktivoitiin lämpökäsittelyllä ja niistä tutkittiin pyruvaattidekarboksylaasiaktiviteettia (lämpöstabiilisuus) edellä kuvattuun tapaan. Katso Conway et al, 1987b. Solut valmisteltiin ja niistä tutkittiin alkoholidehydrogenaasi II -aktiviteettia etanolihapettamisen suuntaan muutoin edellä kuvattuun tapaan, mutta solut pestiin ja hajotettiin 30 mM kaliumfosfaattipuskurissa, johon oli juuri lisätty kiinteää rauta-ammoniumsulfaattia (lopullinen pitoisuus 0,5 mM) ja natriumaskorbaattia (1 mM). Katso Neale et al, Eur. J. Biochem. 154:119-24, 1986. Tällä muunnelmalla, yhdistettynä välittömään alkoholidehydrogenaasiaktiviteetin testaamiseen ilman varastointivaihetta, päästiin paljon suurempaa spesifiseen aktiviteettiin kuin mitä aiemmin on raportoitu. Etanolituoton tehokkuuden laskemiseksi solumassa mitattiin proteiinimääränä per viljelmä foliinifenolireagenssimenetelmällä, jota ovat kuvanneet Lowry et al, J. Biol. Chem. 193:265-75.

Fermentointituotteiden analysointi:

Fermentointituotteet määritettiin kirkastetusta liemestä Millipore/Waters -HPLC-tekniikalla (Millipore Corporation, Bedford, MA) taittavalla osoitinmonitorilla ja elektronilaskimella.

- 5 Erotuksessa käytettiin Aminex HPX-87H kolonnia (300 x 7,8 mm) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) 65°C:ssa virtausnopeudella 0,25 ml/min (100 µl injektointitilavuus). Huiput tunnistettiin autenttisten vertailukohteiden perusteella. Inokuloimattoman väliaineen komponentteja ovat kaksi huippua ennen glukoosia ja
10 myöhempi tuntematon huippu 45,5 - 45,8 minuutin kuluttua.

Esimerkki 1

Kantojen kokoaminen

- Pyruvaattidekarboksylaasia ja alkoholidehydrogenaasia II koo-
15 daavien strukturaalisten geenien koko on 1,7 ja 1,1 kiloemästä, ja nämä geenit koodaavat proteiineja, joiden molekyylipainot ovat 60 000 ja 40 100. Nämä geenit sijaitsevat pUC18-johdannaisissa lac-promoottorin säätelyn alaisina (kuvio 1). Nämä kaksi geeniä yhdistettiin insertoimalla restriktioendonukleaasien EcoRI ja SalI avulla pLOI284:stä (alkoholidehydrogenaasi) luotu promoottoriton 1,4 kiloemäksen fragmentti pLOI276:n
20 BamHI-kohtaan alavirtaan pyruvaattidekarboksylaasigeenistä. Klooneit valittiin ampisilliiniresistenssinsä ja sen vuoksi, että niissä ilmeni alkoholidehydrogenaasiaktiiviteettia juuri
25 kehitetyllä pararosaniiliini/etanoli-indikaattorialustalla, jolla havainnoidaan aldehydituottoa. Mainitun rakenteen, pLOI295 sisältävät klooneit kasvoivat Luria-agaralustoilla (aerobinen) huonosti kun läsnä ei ollut lisättyä glukoosia, mutta paljon suuremmalla tiheydellä kuin plasmiditon kanta ja kannat, jotka
30 sisälsivät pLOI276:n tai pLOI284:n agaralustoilla, joissa oli 2 % glukoosia.

- Pet-operonin sisältävät rekombinaatit olivat helposti havaittavissa suurempina läpikuultavina pesäkkeinä Luria-agaralustoilla
35 (aerobinen), jotka sisälsivät glukoosia. Tämän pesäkkeiden koon ja opasiteetin eron on havaittu olevan käyttökelpoinen

ilmaisin selllaisten rekombinanttien tunnistamisessa, jotka sisältävät sekä alkoholidehydrogenaasia että pyruvaattidekarboksylaattia ekspressoivia geenejä.

5 pLOI295:n täydellinen emäsekvenssi tunnetaan. Pyruvaattidekarboksylaasia koodaavan geenin avoin lukujakso alkaa 163 emästä alavirtaan lac-promoottorista ja päättyy kahteen lopetus-
doniin 85 emästä ylävirtaan alkoholidehydrogenaasi II:ta koodaavan geenin avoimesta lukujaksosta. Molemmissa geeneissä on
10 sekvenssejä, jotka muistuttavat ribosomisitoutumiskohtia välitömästi ylävirtaan kummastakin avoimesta lukujaksosta. Alkoholidehydrogenaasi II:ta koodaavassa geenissä on yksi lopetus-
doni ja sen perässä 13 emäsparin palindromisekvenssi, joka toimii transkriptioterminaattorina.

15

Esimerkki 2

Z. mobilis -geenien ekspressoituminen E. colissa

Sekä pyruvaattidekarboksylaasi- että alkoholidehydrogenaasi II -geenit ekspressoituvat runsaasti E. colissa lac-promoottorin
20 säätelyn alaisina yksin (pLOI276 ja pLOI284) ja yhdessä. Pyruvaattidekarboksylaasia ei ole läsnä villin tyypin E. colissa, mutta indusoituvaa alkoholidehydrogenaasia on läsnä pieniä pitoisuuksia. E. colin kasvussa glukosin läsnäollessa Z. mobilisen spesifiset aktiviteetit vähenivät noin 50 %, mikä on
25 lac-promoottorin glukosirepression kanssa yhdenmukaista. Pyruvaattidekarboksylaasin spesifinen aktiviteetti, jota koodaa proksimaalinen geeni pet-operonissa, oli kolminkertainen
pLOI295:ssä verrattuna pLOI276:een. Alkoholidehydrogenaasi
II -geenituotteen spesifinen aktiviteetti, pet-operonin distaaligeeni, ekspressoitui pLOI295:ssä kaksi kertaa runsaammin kuin
30 pLOI284:ssä.

Esimerkki 3

Glukoosifermentointi rekombinanttikannoilla

35 Pet-operonin ekspressio E. colissa johti etanolituottoon primaarisena fermentointituotteena anaerobisessa kasvussa. Lähde-

kanta tuotti sukkinaattia (1,5 mM), laktaattia (18 mM) ja ase-
taattia (7 mM) pääasiallisina fermentointituotteinaan (kuvio
3A). Samanlainen fermentointikäyrä oli havaittavissa pLOI248:n
sisältävillä soluilla, jotka sisälsivät alkoholidehydrogenaasi
5 II -geenin (kuvio 3C). Pyruvaattidekarboksylaasia koodaavan
geenin sisältävällä pLOI276:lla on havaittavissa selvä eta-
nolihiippu (18 mM), joka vastaa kolmannelta akkumuloituneista
fermentointituotteista. Tämä suurempi etanolimäärä johtuu yh-
teisvaikutuksesta, joka on *Z. mobilis* pyruvaattidekarboksylaasi-
10 si- ja *E. coli* alkoholidehydrogenaasiaktiiviteeteilla.

pLOI295:n sisältäessä pet-operonin (sekä pyruvaattidekarboksylaasi-
että alkoholidehydrogenaasi II -geenit *Z. mobilis* -kannasta)
E. coli tuotti suuria etanolimääriä (750 mM, 4,3 % til/til),
jotka vastasivat yli 95 prosenttia fermentointituotteista.

15

Pet-operonin sisältävissä soluissa tuotetut suuret alkoholide-
hydrogenaasi- ja pyruvaattidekarboksylaasimäärät dominoivat
NADH-hapettumista *E. coli*ssa. Tämän organismin fermentointi
siis konvertoitui *S. cerevisiae* ja *Z. mobilis* vastaavaksi.

20 Normaalissa käymiskasvussa pyruvaatti konvertoituu asetyyli-

koentsyymiksi A pyruvaattidehydrogenaasikompleksin vaikutukses-
ta, oksaloasetaatiksi (ja edelleen sukkinaatiksi) fosfoenolipy-
ruvaattidekarboksylaasin vaikutuksesta, formaatiksi ja asetyyli-
koentsyymiksi pyruvaattiformaattilyaasin vaikutuksesta ja lak-
25 taatiksi laktaattidehydrogenaasin vaikutuksesta. Tämä viimei-
sin reaktioreitti on dominoiva tie NAD⁺-regeneroinnissa *E. coli*n
modifioimattomissa kannoissa. Bakteriaalisen laktaattidehydro-
genaasin K_s-arvot ovat melko korkeat, alueella 10 - 1000 mM
(Garvie, "Bacterial lactate dehydrogenases", Microbiol. Rev.

30 44:106-139, 1980, Tarmy, E.M., and N.O. Kaplan, "Kinetics of
Escherichia coli B D-lactate dehydrogenase and evidence for py-
ruvate controlled change in conformation", J. Biol. Chem.

243:2587-2596, 1968). *Z. mobilis* -pyruvaattidekarboksylaasin K_a
on 0,4 mM (Bringer-Meyer, S., K.-L.-Schimz, and H. Sahm, "Pyru-
35 vate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*: Isolation and par-
tial characterization", Arch. Microbiol. 146:105-110, 1986).

Tämän entsyymin runsaus, yhdessä pienen K_m -arvon kanssa johtaa tehokkaasti pyruvaattivirran glykolyysistä etanoliksi.

Suuriin solutiheyksiin päästään myös sekoituskasvuolosuhteissa suorittamalla kohtalaista liikuttelua ja sekoitusta viljelyastioissa, joissa kaasujenvaihtoa ei ole rajoitettu. Näissä olosuhteissa havaittiin lopullinen pH 6,3 tai sitä suurempi, riippuen ilmastuksen voimakkuudesta.

Esimerkki 4

Plasmidien kokoaminen ja *Z. mobilis* etanologeenisten entsyymien ekspressio *E. coli*ssa

Plasmidi pLOI295 sisältää *Z. mobilis*in pyruvaattidekarboksylaasia ja alkoholidehydrogenaasia koodaavat geenit saman lac-promoottorin alaisina. Tätä rakennetta kutsutaan pet-operoniksi ja sitä käytetään etanologeenisten geenien lähteenä koottaessa lisäplasmideja vaihtoehtoisin promoottorein. Etanologeenisiä geenejä sisältävän pLOI295:n EcoRI-SalI-fragmenttia käsiteltiin DNA-polymeraasin Klenowin fragmentilla tasaisten päiden aikaan saamiseksi (blunt ends). Tämä tasapäinen DNA-fragmentti insertoitui pUC19:n SmaI-kohtaan pdc-geeni välittömästi alavirtaan lac-promoottorista. Saatu plasmidi, nimitys pLOI293, sisälsi pet-geenit BamHI-kohdat sivuillaan. Plasmidit pLOI291 ja pLOI292 (vastakkaissuuntautuneet) koottiin insertoimalla etanologeenisiä entsyymejä koodavat geenit sisältävä BamHI-fragmentti ekspressiovektoriin pLOI204. BamHI-fragmentti sisältää ribosomisitoutumiskohdan, molempien geenien täydelliset sekvenssit sekä adhB:hen nähden distaalinen transkriptiotermi. pLOI292:ssa nämä kaksi geeniä ekspressoituivat alkuperäisen ekspressiovektorin sisältävän *Z. mobilis* -promoottorin säätelyn alaisena.

Plasmidi pLOI308 koottiin poistamaan pet-geenit lac-promoottorin säätelystä, mutta säilyttämään samalla ylävirran BamHI-kohdan vaihtoehtoisten promoottorien insertointia varten. pLOI293:n osittaista hajottamista BamHI:llä ja Klenowin käsittelyllä käy-

tettiin poistamaan adhB-geenille distaali BamHI-kohta. Etanologeeniset geenit poistettiin tästä plasmidista promoottorittomana BamHI- (välittömästi proksimaalinen pdc:lle) -EcoRI (distaali adhB:lle) -fragmenttia, joka johtaen insertoitui pUC18:n
 5 BamHI- ja EcoRI-kohtiin pLOI308:ksi. Tämä plasmidi ekspressoii pieniä adhB-määriä aldehydi-indikaattorialustoilla, muttei osoittanut suurten pesäkkeiden fenotyyppiä, joka liittyy muihin funktionaalisiin pet-plasmideihin pLOI295, pLOI291 ja pLOI292.

10 Kromosomaalinen DNA *Z. mobilis* hajotettiin osittain Sau3A:lla, niin että suurin osa DNA:sta näytti olevan alle 4 kiloemästä pitkä. Tätä fraktionointia DNA:ta käytettiin promoottorifragmenttilähteenä ja se ligatoitiin defosforyloituun BamHI-kohtaan pLOI308:ssa. Ampisilliiniresistentit rekombinan-
 15 tit, joissa oli hyvin ekspressoituva pet-operoni identifioitiin suurina pesäkkeinä glukoosia sisältävillä Luria-agaralustoilla. Tukittavaksi valittiin kolme rekombinanttikantaa, pLOI308-2, pLOI308-5 ja pLOI308-10. Näissä plasmideissa promoottoriakti-
 20 viteitä ilmentävät *Z. mobilis* -DNA-fragmentit olivat 6, 2 ja 2 kb:n pituisia.

: . . Taulukkoon I on koottu pyruvaattidekarboksylaasi- ja alkoholi-
 : . . dehydrogenaasiaktiviteetit yliyöviljelmissä rekombinantilla *E.*
 : . . coliilla. Pyruvaattidekarboksylaasiaktiviteetit vaihtelivat
 : . . 25 arvosta 0,37 IU/mg soluproteiinia kannassa TC4(pLOI291) arvoon
 : . . 8,23 IU TC4(pLOI295):ssä. Pyruvaattidekarboksylaasiakti-
 : . . viteetin mukaan TC4-rekombinanttikannat voidaan panna seuraavaan
 : . . järjestykseen (suurimmasta pienimpään): pLOI295 > pLOI308-10 >
 : . . pLOI308-2 > pLOI308-5 > pLOI292 > pLOI291.



TAULUKKO 1

Z. mobilis-peräisten etanologeenisten entsyymien ekspressio E. colissa

5

10	Plasmidi	Pyruvaatti- dekarboksylaasi		Alkoholi- dehydrogenaasi	
		Sp act ^a	Solu- prot.% ^b	Sp act ^a	Solu- prot.% ^c
15					
	pLOI291	0,37	0,4	0,21	0,02
	pLOI292	0,48	0,5	0,30	0,03
	pLOI308-2	2,26	2,3	1,54	0,21
20	pLOI308-5	1,11	1,1	0,76	0,10
	pLO308-10	6,5	6,5	2,51	0,34
25	pLOI295	8,2	8,2	9,65	1,4
	ei lainkaan	0	0	0,08	
30					

^a Ilmoitettu mikromolekyyleinä substraattia käytettynä per minuuttia per milligrammaa kokonaissoluproteiini.

^b Laskettu olettamalla puhtaan entsyymin spesifiseksi aktiviteetiksi 100.

^c Laskettu olettamalla puhtaan entsyymin aktiviteetiksi 710 natiivin alkoholidehydrogenaasiaktiviteettisubtraktion jälkeen.

Alkoholidehydrogenaasiaktiviteetit rekombinanttikannoissa nousdattelivat samaa kehityssuuntaa eri plasmidien ekspression suhteen kuten pyruvaattidekarboksylaasikin. Mitatut alkoholidehydrogenaasiaktiviteetit edustavat natiivin E. coli -entsyymin ja Z. mobilis entsyymin yhdistelmää. Plasmidittomassa TC4-kannassa havaitut määrät olivat suhteellisen pienet verrattuna arvoihin, joita havaittiin kannoissa, joiden plasmideissa oli

Z. mobilis -geeni. Z. mobilis entsyymien aktiviteetit (korjattuna natiivia E. coli alkoholidehydrogenaasia varten) vaihtelivat arvosta 0,13 IU/mg soluproteiinia kannassa TC4(pLOI291) arvoon 9,6 IU TC4(pLOI295):ssä.

5

Esimerkki 5

Etanologeenisia entsyymejä Z. mobiliksestä sisältävien rekombinanttikantojen kasvu

Glukoosikatabolian muuttaminen etanolituotoksi lisäsi saantoa ja muutti väliaineen pH:ta. Vaikka fermentointituotteet ovat suhteellisen myrkyttämiä ne saattavat akkumuloitua toksisiin pitoisuuksiin fermentoinnin aikana. Anaerobisen kasvun aikana pulloissa, jotka sisälsivät 10 % glukoosia sisältävää Luria-lihalientä, plasmidittomalla kannalla ja pLOI284:n sisältävällä kannalla (alkoholidehydrogenaasi II -geenin sisältävä) lopullinen tiheys oli 0,25 mg soluproteiinia per ml 48 tunnin jälkeen lopullisen pH arvon ollessa 4,4. Solutiheys lisääntyi kaksinkertaiseksi kannalla, joka sisälsi pLOI276:n (pyruvaattidekarboksylaasia koodaavan geenin sisältävä), ja lopullinen pH oli 4,5. Lopullinen solutiheys kannalla, joka sisälsi pLOI295:n (pet-operoni) oli 2,5 mg/ml, 10-kertainen verrattuna verrokkikantaan. Lopullinen pH oli 4,7. Tiheydellä 2,5 mg soluproteiinia per ml magnesium näyttää olevan rajoittava tekijä, ja 1,5-kertainen lisäys solutiheyteen voidaan helposti saavuttaa lisäämällä 0,5 mM magnesiumsulfaattia.

Rekombinanttikantojen kasvua tarkasteltiin sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa (kuviot 3). Aerobisissa olosuhteissa (kuviot 3A ja taulukko 2) kanta TC4 kasvoi lisääntymisnopeudella noin 30 min nopeimman kasvujakson ajan. pLOI308:n johdannaisia sisältävä TC4-kanta osoitti vastaavia maksimaalisia kasvunopeuksia, lisääntymisaika 26 ja 30 minuutin väliltä. Kanta TC4(pLOI295) kasvoi huonosti näissä olosuhteissa (lisääntymisaika 71 min) ja sitä suerasi osittainen hajoaminen. Kanta TC4(pLOI291) ja TC4(pLOI292) kasvoivat keskimukaisesti nopeudella, kummankin lisääntymisaika oli 46 minuuttia.

Taulukko 2

Maksimaaliset lisääntymisajat, lopulliset solutiheydet ja lopulliset pH:t liemessä aerobisen ja anaerobisen kasvun aikana

5

Kasvu pH ^a	Plasmidi	Solutiheys mg/prot./ml)	Lisääntymis- aika (min)	Lopullinen
10	Aerobinen			
	ei lainkaan	0,7	29	4,4
15	pLOI291	0,7	46	5,3
	pLOI292	1,3	46	5,1
20	pLOI295	1,1	71	5,7
	pLOI308-2	1,7	27	5,5
	pLOI308-5	0,8	30	5,0
25	pLOI308-10	2,5	26	5,0
	Anaerobinen			
	ei lainkaan	0,3	32	4,4
30	pLOI291	0,4	40	4,5
	pLOI292	1,1	48	5,0
35	pLOI295	2,1	39	4,7
	pLOI308-2	0,8	42	5,7
	pLOI308-5	0,4	38	4,9
40	pLOI308-10	2,2	41	5,2

^a Mitattuna 24 kasvutunnin jälkeen

Anaerobisissa olosuhteissa (kuvio 3B ja taulukko 2) lisääntymisaika plasmidittomalla TC4-kannalla oli 32 min, huomattavasti lyhyempi kuin etanologeenisiä entsyymejä sisältävillä rekombinanttikannoilla. Kaikilla rekombinanteilla oli samankaltai-

set maksimaaliset kasvunopeudet, lisääntymisajat 38-41 minuuttia, ainoastaan TC4(pLOI292) kasvoi hieman hitaammin, lisääntymisaika 48 minuuttia.

5 Kaikki rekombinantit TC4(pLOI295):ä lukuunottamatta kasvoivat 12 tunnin kuluttua anaerobisissa ja aerobisissa kasvuolosuhteissa solutiheyksillä, jotka vastaavat tai ovat suuremmat kuin plasmidittomalla TC4-kannalla (kuviot 3A ja 3B). Taulukkoon 2 on koottu kaikki kannan TC4 ja rekombinanttien lopulliset solu-
10 tiheydet 24 kasvutunnin jälkeen. Aerobisissa olosuhteissa pLOI308-10:n sisältävä kanta TC4 saavutti suurimman solutiheyden, sitten tulivat TC4-kannat, jotka sisälsivät pLOI308-2:n, pLOI292:n, pLOI295:n (jonkin verran hajoamista) ja pLOI308-5:n.

15 Anaerobisissa olosuhteissa lopulliset solutiheydet TC4-kannoilla, jotka sisälsivät pLOI308-10:n tai pLOI295:n olivat suurin piirtein samat, sen jälkeen tulivat TC4-kannat jotka sisälsivät pLOI292:n, pLOI308-2:n, pLOI308-5:n ja pLOI291:n.

20 Kuviossa 4 nähdään mikä suhde on pyruvaattidekarboksylaasiaktiiviteetilla soluissa ja lopullisella solutiheydellä 24 kasvutunnin jälkeen. Koska pyruvaattidekarboksylaasisynteesi liittyy
alkoholidehydrogenaasin II syntetointiin näissä rekombinanteissa tässä piirroksessa näkyy vaihtoehtoisen Z. mobilis -systeemin vaikutus NAD⁺-regenerointiin lopullisella solutiheydellä.
25 Nämä tiedot osoittavat selvästi, että Z. mobilis reaktioreitti etanolituotossa lisää lopullista solutiheyttä sekä anaerobisissa että aerobisissa olosuhteissa. Kannassa TC4(pLOI308-10) pyruvaattidekarboksylaasin (6,5 IU) ja alkoholidehydrogenaasin
30 (2,5 IU) ekspressiotasot olivat lähes optimaaliset sekä anaerobisessa että aerobisessa kasvussa. Etanologeenisten entsyymien ekspressiotasot kannassa TC4(pLOI295) näyttävät eksessiivisiltä, seurauksena on vähentynyt solukasvu ja osittainen hajoaminen aerobisissa olosuhteissa ja jonkin verran heikentynyt kasvu
35 anaerobisissa olosuhteissa.

Kannan TC4(pLOI295) lisääntynyt kasvu anaerobisissa olosuhteissa vähäisine hajoamisineen vasten huonoa kasvua ja hajoamista kasvun aikana nopeasti heilutetuissa pulloissa viittaa siihen, että erittäin aerobiset olosuhteet saattavat olla vahingollisia tälle rakenteelle. Hajoaminen tässä rekombinantissa väheni erittäin selvästi ja lopullinen solutiheys lisääntyi kasvun aikana ravistuspulloissa kun oskillointinopeutta vähennettiin yhteen kolmannekseen.

10 Esimerkki 6

Etanologeenisten entsyymien vaikutus lihaliemen hapottumiseen kasvun aikana

Kuvion 3C piirros tuo esiin pH-muutokset lihaliemessä (anaerobisen kasvun aikana pH pienentyi nopeasti ensimmäisen 6 kasvutunnin aikana plasmidittomalla TC4-kannalla, mutta se pienentyi hitaammin johdannaisilla, jotka sisälsivät etanologeenisiä entsyymejä. Hapottuminen ensimmäisten 12 tunnin aikana väheni eniten kannassa TC4, joka sisälsi pLOI295:n, sitten tulivat järjestyksessä TC4-kannat jotka sisälsivät pLOI308-10:n, pLOI308-2:n ja pLOI308-5:n. Tietoja kannoista TC4(pLOI291) ja TC4(pLOI292) ei ole näytetty, mutta ne sijoittuvat TC4(pLOI308-5):n alapuolelle ja yläpuolelle. Vaikka rekombinantit ylsivät korkeampiin lopullisiin solutiheyksiin lihaliemen 24 tuntia anaerobisissa tai aerobisissa olosuhteissa kasvatettujen rekombinanttien pH oli vähemmän hapan kuin lihaliemessä TC4-kannalla, joka ei sisältänyt etanologeenisiä entsyymejä (taulukko 2).

Happamoitumisnopeuden ja määrän vähentyminen rekombinanteissa lisääntyneen solukasvun myötä viittasivat siihen, että pH:n aleneminen oli tärkein kasvua rajoittava tekijä myös erittäin aerobisissa olosuhteissa. Tätä oletusta tuki 85-prosenttinen lisäys lopullisessa solutiheydessä kannalla TC4 (plasmiditon), joka oli kasvatettu väliaineessa, johon on lisätty 1/10 tilavuutta 1 M natriumfosfaattipuskuria (pH 7,0). Pienemmät puskurilisäysmäärät johtivat keskinkertaisiin kasvutasoihin.

Esimerkki 7

Etanologeenisten entsyymien vaikutus fermentointituotteisiin

Taulukkoon 3 on koottu tiedot analyysistä TC4-kannalla valmistetuista fermentointituotteista ja rekombinanteista 24 tunnin kasvatuksen jälkeen aerobisissa tai anaerobisissa olosuhteissa. Aerobisissa olosuhteissa asetaatti ole primaarinen fermentointituote, joka akkumuloitu plasmidittoman TC4-kannan kasvun aikana ravintorikkaassa väliaineessa, jossa ei ollut havaittavaa etanolia. Tuotetun asetaatin määrä väheni erittäin selvästi

10 kannoissa, jotka sisälsivät *Z. mobilikasen* etanologeenisiä entsyymejä, ja etanoli oli tärkein fermentointituote. pLOI308-10:n sisältävä TC4-kanta tuotti eniten etanolia, seuraavina tulivat TC4-kannat, jotka sisälsivät pLOI295:n, pLOI308-2:n, pLOI292:n, pLOI308-5:n ja pLOI291:n. Näissä aerobisissa olo-

15 suhteissa muodostui myös vähäisiä määriä laktaattia (0,6 - 1,2 mM) kaikissa kannoissa. Vain TC4-kannassa, joka sisälsi pLOI308-10:n akkumuloitui havaittavia määriä sukkinaattia, vaikka tämä tuote edusti silti vain 1 % kaikista fermentointituotteista, 94 % oli etanolia.



Taulukko 3

Fermentointituotteiden vertailu aerobisessa ja anaerobisessa kasvussa

5

Kasvu- olo- suhteet	Plasmidi	Sukkinaatti	Fermentointituote [mM (SD)]		
			Laktaatti	Asetaatti	Etanoli
10					
Aerobinen					
	ei lainkaan	0,2 (0,1)	0,6 (0,2)	55 (2)	Tr
15	pLOI308-2	Tr	1,2 (0,3)	22 (2)	98 (3)
	pLOI308-5	Tr	0,9 (0,2)	43 (3)	15 (2)
	pLOI308-10	4,9 (0,5)	1,0 (0,2)	17 (2)	337 (21)
20	pLOI295	Tr	1,1 (0,4)	13 (1)	114 (10)
	pLOI291	Tr	0,6 (0,2)	34 (3)	7 (1)
25	pLOI292	Tr	1,3 (0,2)	30 (1,5)	24 (1)
Anaerobinen					
30	ei lainkaan	0,9 (0,1)	22 (1)	7 (0,3)	0,4
	pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)
	pLOI308-5	0,3 (0,1)	18 (2)	6 (1)	16 (2)
	pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,1 (0,2)	482 (23)
	pLOI295	2,2 (0,20)	6 (1)	3 (0,3)	90 (2)
	pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)
	pLOI292	2,3 (0,2)	9 (0,7)	7,2 (0,3)	21 (1)

45

Anaerobisissa olosuhteissa laktaatti oli pääasiallisin fermentointituote, joka akkumuloitui 24 kasvutunnissa plasmidittomasta TC4-kannasta glukosia sisältävässä ravintorikkaassa väliaineessa, läsnä vähäisempiä määriä asetaattia, sukkinaattia ja

50

etanolia. Laktaattituotto väheni huomattavasti kannoissa, jotka sisälsivät etanologeeniä entsyymejä ja siihen liittyi olennaisten etanolimäärien tuottaminen. Kanta TC4-(pLOI308-10) tuotti suurimman etanolimäärän, ja tämä tuote edusti yksin 97 %
 5 kaikista liukenevista fermentointituotteista. Etanolituoton kehityskaava testatuissa organismeissa oli samanlainen kuin aerobisessa kasvussa. Kaikki organismit TC4(pLOI308-10):tä lukuunottamatta tuottivat itse asiassa vähemmän kokonaisetanolia 24 tunnin jälkeen anaerobisissa olosuhteissa kuin aerobisissa olosuhteissa. On todennäköistä, että tämä pienempi
 10 akkumuloituneen etanolin määrä johtui näissä anaerobisissa olosuhteissa tuotetun kokonaissolumassan vähenemisestä, mikä johti etanolituoton pienempään volumetriseen määrään.

15 Anaerobisissa ja aerobisissa olosuhteissa tuotetun etanolin määrä (taulukko 3) oli suoraan suhteessa *Z. mobiliksen* etanologeenisten geenien ekspressiotasoon (taulukko 1). Etanolituotto näytti olevan optimaalista kannassa TC4(pLOI308-10), pyruvaattidekarboksylaasiaktiviteetti oli 6 IU ja alkoholidehydrogenaasi II
 20 -aktiviteetti 2,5 IU.

3. E. coliin TC-4-johdannaiset, jotka sisälsivät *Z. mobiliksestä* peräisin olevia etanologeenistä entsyymiä ekspressoivia plasmideja, kasvoivat suurempiin solutiheyksiin kuin emo-organismit,
 25 joissa ei plasmidia ollut. Lopullisen solutiheyden lisääntyminen, etanolin akkumuloitumismäärä väliaineessa ja viljelylihaliemen hapopamoitumisnopeuden hidastuminen kasvun aikana korreloivat kaikki *Z. mobilis* -etanologeenisten entsyymien ekspressiotason kanssa. Geenien ekspressoimiseen käytettiin heterologisia prmoottoreita kaikissa muissa rakenteissa paitsi
 30 pLOI295:ssä (lac) minimoimaan mahdollisia transkriptiosäätelyyn liittyviä ongelmia. Lähimmäksi optimaalista ekspressoitumistasoa kasvun ja etanolituoton kannalta päästiin pLOI308-10:llä (pyruvaattidekarboksylaasin IU 6,5 ja alkoholidehydrogenaasi
 35 II:n IU 2,5 per mg kokonaissoluproteiinit). Tämä ekspressoitumismäärä *E. colissa* on huomattavasti korkeampi kuin *Z. mobilis*

CP4:ssä, joka sisältää vain etanolireaktioreitin NAD⁺-regenerointiin.

Etanologeenisten entsyymien ekspressiotaso näytti olevan ylem-
 5 määräinen kannassa TC4(pLOI295) (noin 17% liukenevasta solupro-
 teiinista). Tätä korkeaa ekspressoitumistasoa seurasi osittai-
 nen soluhajoaminen, hitaampi kasvu ja etanolituoton väheneminen
 aerobisissa olosuhteissa. Nämä vaikutukset vähenivät hitaam-
 massa sekoituksessa ja kasvatuksessa anaerobisissa olosuhteis-
 10 sa. Ilmenevät vauriot ja osittainen hajoaminen erittäin aero-
 bisisessa kasvatuksessa on saattanut liittyä NADH-depleetioon
 korkeiden *Z. mobilis* -alkoholidehydrogenaasi II:n ja natiivin
 NADH-oksidaasin (elektronikuljetussysteemiin liittyvä) yhdis-
 telmän vaikutuksesta.

15

Etanolin tuottaminen päätuotteena ei näytä vaikuttavan epäedul-
 lisesti *E. coli* TC4:n kasvunopeuteen. Kannat, jotka sisälsivät
 pet-operonia ekspressoivia ja etanolia tuottavia pLOI308-joh-
 dannaissia (ColE1-replikoni), kasvoivat yhtä nopeasti kuin emo-
 20 organismi aerobisissa olosuhteissa glukoosin kera, ja saavutti-
 vat suuremman lopullisen solutiheyden kuin emo-organismit.

3. Kannat, jotka sisälsivät pLOI291:n tai pLOI292:n RSF10101-rep-
 likonin kera kasvoivat hitaammin aerobisissa olosuhteissa.
 Koska nämä kaksi rakennetta ekspressoivat pieniä etanologeenis-
 25 ten entsyymien määriä ja tuottivat vähemmän etanolia kuin
 pLOI308-10 syynä hitaampaan kasvuun saattaa olla pikemminkin
 vektorin ominaisuudet kuin pet-operonin ekspressoituminen.

Esimerkki 8

30 Lisäkantojen valmistaminen

Testattiin muita *E. coli* -kantoja sellaisten bakteerien identi-
 fioimiseksi, joilla on paremmat ominaisuudet etanolia tuottavi-
 na mikrobeina. Kokeeseen otettiin seuraavat *E. coli* -kannat:
 ATCC 8677, ATCC 8739, ATCC 9637, ATCC 11303, ATCC 11775, ATCC
 35 14948, ATCC 15244 ja ATCC 23227. Näitä kasvatettiin heiluvassa
 vesihauteessa 30°C:ssa Luria-lihaliemessä (Luria, S.E., and M.

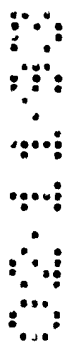
Delbruck, Genetics 28:491-511, 1943), joka sisälsi tryptonia (10 g/l), hiiuvautetta (5 g/l), natriumkloridia (5 g/l) ja fermentoituvaa sokeria. Glukoosia ja laktoosia lisättiin pitoisuuksilla 100 g/litra ja ksyloosia pitoisuudella 80 g/l ellei muuta ole mainittu. Sokerit autoklavoitiin erikseen (121°C, 15 min), kaksinkertainen vahvuus tislatussa vedessä. Ksyloosiliuokset (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) olivat happamia ja ne neutraloitiin natriumhydroksidilla ennen autoklavointia. Ellei neutralointia suoritettu tuloksena olla laajaa ruskettumista ja hajoamista. Samanlaisia fermentointituloksia saatiin sokereilla, jotka autoklavoitiin tai suodatussteriloitiin. Etanolireaktioreitin entsyymejä koodavia geenejä sisältävien yhdistelmäkantojen elossa pysyminen liemessä ja alustoilla vaati fermentoituvan sokerin läsnäoloa. Osoitetuissa kohdissa tetrasykliiniä lisättiin lopulliseen pitoisuuteen 10 mg/litra.

Esimerkki 9

Lisäkantojen ympäristönsieto

Ennen plasmidien viemistä etanolituottoon edellä identifioitujen 8 eri E. coli -kannan kasvua verrattiin ympäristönsietoon nähden. Testattiin, kuinka kannat sietävät natriumkloridia, sokereita, matalaa pH:ta ja etanolia. Natriumkloridin ja sokereiden pitoisuudet taulukossa 4 sisältävät alkuperäisessä väliaineessa mukana olleet. Väliaineen alku-pH oli 6,8. Se säädettiin osoitetuissa kohdissa pienemmäksi HCl:lla. Hapotettu väliaine steriloitiin suodattamalla. Etanolia lisättiin autoklavoituun väliaineeseen jäädyttämisen jälkeen. Sokerit autoklavoitiin erikseen. Eri sokereissa ilman testiainetta kasvatettuja yliyön viljelmiä laimennettiin 60-kertaisesti 13 x 75 mm:n viljelykoeputkiin, jotka sisälsivät 3 ml testiainetta. Kasvu mitattiin optisessa tiheydessä (OD) 550 nm 48 tunnin jälkeen. OD-arvo 1,0 vastaa 0,25 mg/ml soluproteiinia ja 0,33 mg solukuivapainoa. Ympäristönsietokokeissa alle arvon 0,2 jäävä lopullinen OD kuvasti alle kahta kahdentumista ja katsottiin merkityksettömäksi.

Taulukkoon 4 on koottu tulokset väliaineessa, joka sisälsi glu-
koosia. Samanlaisia tuloksia saatiin väliaineissa, jotka si-
sälsivät laktoosia tai ksyloosia. Kannat ATCC 8677, ATCC 8739
ja ATCC 11775 olivat erityisen herkkiä inhibitiolle matalilla
5 etanolipitoisuuksilla. ATCC-kannat 9637 ja 11775 sietivät
parhaiten matalaa pH:ta, vaikka kaikki kannat kasvoivat vähin-
tään 2-4 kahdentumista pH:n ollessa 4,0 lukuunottamatta kantaa
ATCC 23227. Kaikki kannat kasvoivat 45°C:ssa kasvun rajoit-
tuessa suuremmissa lämpötiloissa, yhtään ei saatu jatkoviljel-
10 tyä yli 45°C:ssa. Kaikki kannat kasvoivat väliaineessa, joka
sisälsi 20 % glukoosia, 20 % laktoosia tai 12 % ksyloosia.



Taulukko 4

E. coli kasvu Luria-lihaliemessä, joka sisältää 100 g/l glukosia kemiallisen ja fysikaalisen rasituksen alaisena

5

Rasite E. coli-kantojen kasvu (ATCC-numerot)

8677 8739 9637 11303 11775 14948 15244 23227

NaCl (g/l)

10	50	+	++	++	++	++	++	++	++
	60	0	+	++	++	+	++	+	++
	70	0	0	+	+	0	+	+	+

Etanoli (til%)

15	3,8	++	++	++	++	++	++	++	++
	5,0	++	++	+	+	+	+	+	+
	6,3	0	++	+	+	+	+	+	0
	7,5	0	+	+	0	0	+	0	0
	8,8	0	0	0	0	0	0	0	0

20

Happamuus

10	pH 4,50	++	++	++	++	++	++	++	++
20	pH 4,25	++	++	++	+	++	++	++	+
30	pH 4,00	+	+	++	+	++	+	+	0
40	pH 3,75	0	0	+	0	+	0	0	0

Lämpötila (°C)

10	45	++	++	++	++	+	++	++	++
20	47	+	+	+	+	+	+	+	+
30	49	0	0	+	+	0	0	+	+

0 = vähemmän kuin kaksi kahdentumista OD-arvossa 550 nm

+

++ = yli neljä kahdentumista

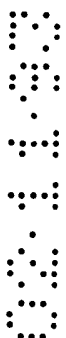
Esimerkki 10**Sokerin käyttö lisäkantoihin**

Sokerin käyttöä testattiin kahdella tavalla. Kannat, jotka kehittivät punaisia pesäkkeitä MacConkey-agarilla, johon oli lisätty 2 % hiilihydraattia katsottiin positiivisiksi sokerin käytön suhteen (Silhavy, T.J. and J.R. Beckwith, Microbiol. Rev. 49:398-418, 1985). Solut testattiin myös käyttämällä Biolog EC-alustoja (Biolog, Inc. Hayward, CA) valmistajan ohjeiden mukaisesti.) Biolog-alustat olivat nopeita ja helppokäyttöisiä, niillä saatiin havaittua NADH-tuotto (tetratsoliumsuo-

10 konvertoituminen liukenemattomaksi formatsaaniksi) substraatin käytön mittana. Molemmat menetelmät olivat yhtäpitäviä kaikkien 13 tutkitun sokerin osalta.

15 Kaikkia kantoja tutkittiin käyttämällä glukoosia, fruktoosia, galaktoosia, mannoosia, arabinoosia, laktoosia, glukuronihappoa ja galakturonihappoa. Kanta 11775 ei käyttänyt ksyloosia. ATCC 11303 ja ATCC 23227 eivät käyttäneet maltoosia ja maltotrioosia. Kaikki kannat reagoivat heikon positiivisesti sello-

20 bioosiin. Vain yksi kanta, ATCC 9637 käytti sukroosia. Tulokset sokerinkäyttökokeista on koottu taulukkoon 5.



Taulukko 5

pLOI297:n ja pLOI308-11:n sisältävän E. coli -kannan kasvu

Sokeri		Plasmidi		Lopullinen OD 550 nm E. coli -kannoilla (ATCC-numerot)						
5			8677	8739	9637	11303	11775	14948	15244	23227
	Glukoosi	ei lainkaan	4,0	3,7	6,1	6,0	4,7	5,6	7,0	6,6
10	Glukoosi	pLOI297	10,0	10,5	10,5	10,0	9,5	-	9,5	10,2
	Glukoosi	pLOI308-11	9,8	9,5	11,4	11,2	-	9,3	10,8	11,4
15	Laktoosi	ei lainkaan	4,3	3,8	7,5	6,0	4,5	6,1	7,0	6,4
	Laktoosi	pLOI297	13,0	6,8	11,6	10,8	7,6	-	10,5	7,0
	Laktoosi	pLOI308-11	10,0	10,0	11,5	11,0	-	7,3	10,0	10,0
20	Ksyloosi	ei lainkaan	4,1	3,7	7,7	7,3	4,9	5,9	7,2	7,0
	Ksyloosi	pLOI297	8,1	10,6	10,8	10,6	4,7	-	11,0	11,0
25	Ksyloosi	pLOI308-11	10,0	6,8	11,4	8,5	-	11,4	10,6	12,0

Vaakaviiva tarkoittaa, ettei tietoja ollut saatavilla

30

Esimerkki 11Lisäkantojen geneettinen muuntelu

Koottiin standardimenetelmin (Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982), kaksi uutta plasmidia, jotka sisälsivät ampicilliini- ja tetrasykliiniresistenssigeenit selektiomarkkereina. Etanolituotto-operoni (pet-operoni), joka sisälsi kryptisen Z. mobilis -promootorin, pyruvaattidekarboksylaasin, alkoholidehydrogenaasin ja transkriptioterminaattorin otettiin 5,2 kb:n EcoRI-fragmenttina pLOI308-10:stä (Ingram and Conway, supra, 1988), insertoituiin pBR322:n EcoRI-kohtaan ja saatiin pLOI308-11. Plasmidi pLOI297 koottiin insertoimalla 2,6 kb:n EcoRI-fragmentti tetrasykliiniresistenssigeenin sisältävästä pCOS2EMBL:stä (Poustka, A., H.R. Rackwitz, A.-M. Firschauf, and H. Lehrach, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4129-4133, 1984) pLOI295:n SalI-kohtaan (Ingram et al, supra, 1987). Kohesiiviset päät poistettiin käsittelyllä

E. coli -DNA-polymeraasin Klenow-fragmentilla (Maniatis et al, supra) ennen ligatointia.

Plasmidit vietiin eri E. coli -kantoihin transformoimalla Mandelin ja Higan kalsiumkloridimenetelmällä (Mandel, M. and A. Higa, J. Mol. Biol. 53:159-162, 1970). Selektiot tehtiin kiinteällä väliaineella, joka sisälsi 2 % glukoosia ja terasykliiniä. Plasmidistabiilisuus on ilmoitettu prosentteina soluja, jotka säilyttävät antibioottimarkkerit 25 kasvusukupolven jälkeen ilman antibioottista selektiota.

Rekombinanttikannat, joissa oli etanolituottogeenit sisältävät plasmidit, kasvattivat epätavallisen suuria pesäkkeitä, jotka muuttuivat fermentoitavaa sokeria sisältävissä kiinteissä väliaineissa keltaisiksi 24 - 48 tunnin kuluttua. Nestemäisissä väliaineissa näiden rekombinanttien lopulliset solutiheydet olivat kahdesta kolmeen kertaan suurempia kuin plasmidittomalla verrokillä. Yhtään transformaattia ei saatu usean yrityksen jälkeen ATCC 14948:lla käytettäessä pLOI297:ää eikä ATCC 11775:llä käytettäessä pLOI308-1:tä. Kanta ATCC 11775 ei käyttänyt ksyloosia, eivätkä tämän kannan rekombinantit kasvaneet suurempiin solutiheyksiin kuin verrokkit ksyloosi fermentoituvana sokerina, vaikka lisääntyntä kasvua olikin havaittavissa laktoosilla ja glukoosilla.

Plasmidistabiiliutta tarkasteltiin glukoosia sisältävässä väliaineessa 25 sukupolven ajan suoritetun kasvatuksen jälkeen (taulukko 6). Molemmat plasmidit sisälsivät samat replikonit ja ne pysyivät hyvin kaikissa muissa kannoissa paitsi kannoissa ATCC 8677 ja ATCC 8739.

Taulukko 6.

pLOI297:n ja pLOI308-11:n stabiilisuus glukoosia sisältävässä väliaineessa 25 sukupolven ajan suoritettun kasvatuksen jälkeen ilman antibioottiselektiota

5

ATCC-kanta	Plasmidin säilyttävät solut (%)	
	pLOI297	pLOI308-11
10 8677	75	85
8739	44	47
9637	100	90
11303	98	98
15 11775	100	-
14948	-	97
15244	99	100
23227	91	100

20

Vaakaviivat tarkoittavat, ettei tietoja ole saatavilla.

Esimerkki 12

25 **Pyruvaattidekarboksylaasiaktiviteetti geneettisesti muunnet-**
luissa kannoissa

30 Pyruvaattidekarboksylaasiaktiviteettia mitattiin edellä kuvat-
tuun tapaan (Conway et al, supra, 1987, Neale et al, supra,
1987) muutoin, mutta solut harvestoitiin OD 4,0:ssa noin puo-
lessa maksimaalisesta kasvusta.

35 Z. mobilis -pyruvaattidekarboksylaasiaktiviteetin ekspressiota
tarkasteltiin kasvun jälkeen tetrasykliinin läsnäollessa (tau-
lukko 7). pLOI297:llä Z. mobilis -geenit ekspressoituvat E.

40 coli -lac-promoottorin säätelyssä, pLOI308-11 käyttää kryptistä
Z. mobilis -promoottoria pet-operonin ekspressioon. Kannat

ATCC 11303(pLOI297), ATCC 11775(pLOI297) ja ATCC 15224(pLOI297) sisälsivät suurimmat aktiviteettimäärät.

Taulukko 7

5 *Z. mobilis* -pyruvaattidekarboksylaasin ekspressio *E. coli* kannoissa, jotka sisälsivät pLOI297:n ja pLOI308-11:n kasvussa glukoosin kanssa

10 ATCC-kanta	<u>Pyruvaattidekarboksylaasiaktiviteetti ^{a)}</u>	
	pLOI297	pLOI308-11
8677	5,7	6,0
8739	0,8	1,4
15 9637	1,1	1,4
11303	16,7	2,1
11775	17,1	- ^{b)}
14948	- ^{b)}	2,5
15244	16,3	1,8
20 23227	2,3	1,7

^{a)} Aktiviteetti IU/mg soluproteiinia

^{b)} Vaakaviivat tarkoittavat, ettei tietoja ollut saatavilla.

Esimerkki 13

Etanolituotto geneettisesti muunnelluissa kannoissa

Luria-lihalientä muutettiin fermentointikokeisiin lisäämällä kaliumfosfaattipuskuria (pH 7,0) lopulliseen pitoisuuteen 0,2

30 M. Fosfaattipuskuri, kompleksiväliainekomponentit ja sokerit autoklavoitiin erikseen ja sekoitettiin jäähdyttämisen jälkeen.

Tetrasykliiniä lisättiin pitoisuuteen 10 mg/l. Inokulaatteja kasvatettiin juuri eristetyistä kannoista 24 tuntia, pestiin testattavassa fermentointiväliaineessa ja lisättiin lähtö-OD:n

35 550 nm:ssa ollessa noin 1,0. Fermentoinnit toteutettiin

30°C:ssa tai 37°C:ssa 100 ml:n volumetrisissa pulloissa, jotka

sisälsivät 80 ml lihalientä, kumivälikerrokset ja 25 neulaa kaasun pois pääsemiseksi. Fermentointipullot upotettiin lämpötilasäädelyyn vesikylpyyn ja sekoittamiseen käytettiin magneettisekoitinta nopeudella 100 rpm.

5

Etanolipitoisuus mitattiin aiemmin kuvattuun tapaan kaasukromatografian avulla (Dombek, K.M. and L.O. Ingram, Appl. Environ. Microbiol. 51:197-200, 1985) ja on ilmoitettu tilavuusprosentteina. Konvertointitehokkuus laskettiin lisättyyn sokeriin perustuen oletuksena, että 100 % tehokkuus saavutetaan tuotettaessa 12,75 ml etanolia (10,2 g) per 20 g glukosia tai ksyloosia ja 13,5 ml etanolia (10,8 g) per 20 g laktoosia.

Kaikki geneettisesti käsitellyt E. coli -kannat tuottivat huomattavia määriä etanolia sokereista (taulukko 8). Alustavissa kokeissa kannalla ATCC 15244(pLOI297) ilmeni, että suurempia etanolimääriä saatiin tuotettua elatusaineessa, joka sisälsi 0,2 M kaliumfosfaattipuskuria (pH 7,0). On oletettavissa, että samanlaisia tai parempia tuloksia saavutettaisiin käyttämällä automaattista pH-säätelyä tämän puskuriaineen asemesta. Kun glukosia oli 15 % suurempia etanolimääriä saatiin tuotettua 30°C:ssa kuin 37°C:ssa 48 tunnin kuluttua. Laktoosi- ja ksyloosifermentointeja tarkasteltiin vain alemmassa lämpötilassa, 30°C:ssa. Yleisesti ottaen saatiin tuotettua suurempia etanolimääriä kannoilla, jotka sisälsivät pLOI297:n kuin kannoilla, joissa oli pLOI308-11. Kannat ATCC 11303(pLOI297), ATCC 11775-(pLOI297) ja ATCC 15224(pLOI297) tuottivat suurimmat etanolimäärät 48 tunnin kuluttua 15 % glukosista, 5,8 - 6,9 tilavuus%. Useimmat kannat sietivät huonommin ksyloosia lähtökokeissa, ja fermentointivertailut tehtiin käyttämällä 8 % ksyloosia. Kannat ATCC 9637(pLOI297), ATCC 11303(pLOI297) ja ATCC 15224(pLOI297) tuottivat suurimmat etanolimäärät (4,8 - 5,2 %) 8 prosenttista ksyloosia 72 tunnin jälkeen. Kaikki kannat kasvoivat hyvin 15-prosenttisessä laktoosissa. Kannat ATCC 11303(pLOI297) ja ATCC 15224(pLOI297) tuottivat suurimmat etanolimäärät laktoosista 48 tunnin kuluttua, 6,1% ja 5,6 %.

Taulukko 8

Tuotettua etanolia eräfermentoinnissa glukoosista (48 tuntia), ksyloosista (72 tuntia) ja laktoosista (48 tuntia) E. coli - kannoissa, jotka sisälsivät plasmidit pLOI297 ja pLOI308-11

	Hiilihydraatti	Plasmidi	E. coli -kantojen tuottama etanoli (til/til%) (ATCC-numerot)							
			8677	8739	9637	11303	11775	14948	15244	23227
10	15% glukoosia	pLOI297 x)	2,4	4,7	4,2	4,3	4,8	-	4,8	0,9
15	15 % glukoosia	pLOI308-11 x)	3,6	1,4	2,1	1,3	-	3,4	2,8	1,3
	15 % glukoosia	pLOI297 xx)	3,2	4,7	4,1	5,8	6,9	-	6,1	3,1
	15 % glukoosia	pLOI308-11 xx)	5,8	5,0	3,5	1,5	-	3,8	3,0	3,2
20	15 % laktoosia	pLOI297 xx)	2,3	4,4	5,3	6,1	4,5	-	5,6	3,7
	15 % laktoosia	pLOI308-11 xx)	2,3	2,1	3,4	0,9	-	2,9	2,7	3,0
25	8 % ksyloosia	pLOI297 xx)	0,9	4,1	4,8	5,2	-	-	4,8	1,2
	8 % ksyloosia	pLOI308-11 xx)	2,0	2,8	2,8	1,2	-	2,0	3,5	1,0

30 Vaakaviivat osoittavat, ettei tietoja ollut saatavilla

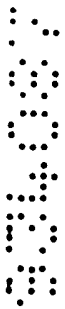
x) Inkubointi 37°C:ssa

xx) Inkubointi 30°C:ssa

35 Näissä vertailevissa kokeissa kannat ATCC 11303(pLOI297) ja
 40 ATCC 15224(pLOI297) näyttivät olevan parhaat rakenteet etanolituottoon. Kasvuaikaa ja etanolituottoa tarkasteltiin kannoilla
 12-prosenttisessä glukoosissa, 12-prosenttisessä laktoosissa ja
 8-prosenttisessä ksyloosissa (kuvio 1). Solumassa lisääntyi
 noin 10-kertaiseksi ja ylsi lopulliseen tiheyteen 3,6 g kuivapaino/litra. Ksyloosilla solumassa lisääntyi puolet määrästä, joka havaittiin glukoosilla tai laktoosilla. Etanolituotto ja kasvu olivat suurin piirtein lineaariset kaikilla kolmella sokerilla kunnes etanolipitoisuus nousi 5 prosenttiin.

45 Sokerin etanoliksi konvertoitumisen tehokkuuden laskemisessa
 lopulliset etanolipitoisuudet 120 tunnin jälkeen laskettiin kolmen koesarjan keskiarvo (taulukko 6). Etanolin lopullinen pitoisuus viljelmissä, jotka kasvatettiin 12-prosenttisessä

- glukoosissa oli 7,2 % (tilavuus%), joka edustaa 94 prosenttia teoreettisesta saannosta glukoosista. Kun glukoosia oli 12 % lopullinen etanolipitoisuus oli 6,5 %, 80 % teoreettisesta saannosta laktoosista. Kun ksyloosia oli 8 % tuloksena oli
- 5 jatkuvasti 100-prosenttinen saanto tai sitä suurempi. Nämä suuret saannot hitaamassa kasvussa ksyloosin kanssa saattavat heijastaa pyruvaattikonversiota kompleksisten ravintoaineiden kataboliasta glukoosin pyruvaatin lisäksi.
- 10 Etanolituoton nopeus laskettiin kuvion 1 graafisesta esityksestä ja ne on koottu taulukkoon 9. Etanolituoton volumetrinen produktiviteetti vaihteli arvosta 1,4 g/litra per tunti glukoosilla arvoon 0,64 g/litra per tunti ksyloosilla. Etanolin spesifinen produktiviteetti oli suurin kaikkien näiden kolmen
- 15 sokerin lähtökasvuvaiheen aikana. Suurin tuottavuus saavutettiin glukoosilla, 2,1 g etanolia/g solun kuivapaino per tunti. Suurin etanolisaanto per g sokeria saavutettiin ksyloosilla, saanto oli suurempi kuin maksimaalinen teoreettinen saanto pelkälle sokerille.



Taulukko 9

Lasketut keskimääräiset kineettiset parametrit etanolituotossa ATCC 11303(pLOI297):llä ja ATCC 15224(pLOI297):llä.

5	Sokeri	Volumetrinen tuotto ^a	Spesifinen tuotto ^b	Saanto ^c	Tehokkuus ^d	Etanoli ^e
10	12 % glu- koosia	1,4	2,1	0,48	95%	58
	12% lak- toosia	1,3	2,0	0,43	80%	52
15	8% ksy- loosia	0,6	1,3	0,52	102%	42
20						

^a grammaa etanolia/litra per tunti

^b grammaa etanolia/g solukuivapaino per tunti

^c grammaa etanolia/g sokeria

^d tuotettua etanolia/teoreettinen maksimiarvo sokerisubstraa-

25 tista x 100

^e lopullinen etanolipitoisuus g/litra

Suoritettiin ATCC 11303(pLOI297):llä kokeet, joissa tutkittiin etanolituottoa arabinoosista, galaktoosista ja mannoosista.

Etanolituotot 3-4 % saatiin 48 tunnin jälkeen 30°C:ssa, mutta niitä ei tutkittu sen enempää. Nämä sokerit metaboloituivat samanlaisissa reaktioreiteissä kuin glukooosi ja ksyloosi, ja niiden voidaan odottaa tuottavan vastaavat saannot (Lin,

E.C.C., "Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates", F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, and M. Schaechter, eds., Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Vol 1, pp. 244-248, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987).

Esimerkki 14**Etanolituotto muista isännistä kuin *E. coli***

Suuri reaktioreittien samankaltaisuus eri organismien välillä antoi aiheen olettaa, että monet isännä voidaan transformoida geeneillä, jotka sitten antavat transformoidulle isännälle ky-
 5 vyn tuottaa etanolia fermentointituotteena. Kun isäntiä transformoidaan kuvattuun tapaan *adh-* ja *pdc-*geeneillä on ilmeistä, että sopivilla ekspressiovektoreilla voidaan saada aikaan ilmentyminen. Kun ekspressio on saatu aikaan etanolituotto on
 10 erittäin todennäköinen, koska tämä reaktioreitti on niin samankaltainen erilaisilla potentiaalisilla isännillä.

Esimerkki 15**Etanolituotto transformoidulla *Klebsiella*lla**

15 Tässä kokeessa käytetty *Klebsiella*-kanta on aiemmin kuvattu *Klebsiella pneumoniae* -kanta M5A1 (Mahl, M.C., Wilson, M.A. Fife, W.H. Ewing, J. Bacteriol. 89:1482-1487, 1965). Tämä kanta, dityypikiinnittävä organismi, identifioitiin alunperin lajiksi *Aerobacter aerogenes*, mutta se nimitettiin uudestaan
 20 tigeenisten ominaisuuksiensa perusteella. Uudet taksonomiset kriteerit *Klebsiella pneumoniae*lle on identifioitu Bergey's Manual -teoksen 8. painoksessa, ja tämän uuden kannan lajinmuodostusta tutkittiin tarkemmin. Kanta M5A1 kasvoi 10°C:ssa glukosiminimaalielatusaineessa, muttei tuottanut kaasuja laktoosista 44,5 °C:ssa. Tämä kanta oli indolipositiivinen ja se
 25 käytti sekä *m*-hydroksibentsoaattia että gentisaattia ainoana hiililähteenä kasvua varten sekä 30°C:ssa että 37°C:ssa. Näiden kokeiden perusteella M5A1 oli nimitettiin *K. oxytoca*ksi. Kantoja subviljeltiin Luria-agaralustoilla, joihin ei ollut
 30 lisätty sokeria elleivät ne sisältäneet *Z. mobilis* -geenejä koodaavia plasmideja. *AdhB*:tä ja *pdc*:tä sisältävät rekombinantit vaativat fermentoituvaa hiilihydraattia elossa pysymiseen, ja niitä ylläpidettiin 2 % glukosia tai ksyloosia sisältävillä alustoilla. Antibioottipitoisuudet olivat: ampisilliini 50
 35 µg/ml, kloramfenikoli 40 µl/ml ja tetrasykliini 12,5 µg/ml. *Z. mobilis*en *adhII*:n ekspressiota rekombinanteissa etsittiin jär-

jestemällisesti käyttämällä aldehydi-indikaattorialustoja. *Escherichia coli* -kantaa TC4 käytettiin isäntänä kaikille plasmidirakenteille.

5 Koska M5A1 on suhteellisen resistentti penisilliinille ja sen johdannaisille olemme koonneet *E. coli* -sukulavektoreita, joissa on cat (Cm^r)- tai tet (Tc^r)-geenit. Tet-geeni lisättiin pLOI276:een, joka sisälsi *Z. mobilis* -pdc:n, insertoimalla parin 2,6 kb:n EcoRI-fragmentteja pcos2EMBL:stä (Poustka, A. H.R. Rackwitz, A.-M. Frischauf, B. Hohn, H. Lehrach, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4129-4133, 1984) pLOI276:n SalI-kohtaan. Kohesiiviset päät poistettiin käsittelemällä *E. coli* n DNA-polymeraasin Klenowin fragmentilla ennen ligatointia. Saatava rakenne vahvistettiin restriktioanalyysillä ja nimitettiin

15 pLOI560:ksi.

Alustavat kokeet viittaavat siihen, että *E. coli* B (ATCC 11303) sisälsi kryptisiä vähän kopioituvia plasmideja. Uusi ja käyttökelpoinen vektori koottiin in vivo integroimalla *Z. mobilis* -pdc ja -adhB cat:n kanssa näihin plasmideihin. Tämä tehtiin

20 eristämällä 4,6 kb:n pari, promoottoriton PstI-fragmentti, joka sisälsi pdc:n, adhB:n ja cat:n pLOI510:stä. Tässä fragmentissa ei ole läsnä replikointifunktioita. Kierrättämisen jälkeen itseligaation avulla nämä fragmentit transformoitiin *E. coli*

25 B:hen selektoimalla Cm^r 24-% glukoosia sisältävillä Luria-agar-alustoilla. Transformantit testattiin aldehydi-indikaattorialustoilla ja tumman punaiset klooneit valittiin suuren adhB-geenin ekspression perusteella. Plasmidivalmisteet näistä kannoista testattiin tutkien niiden kykyä siirtää antibiootti-

30 resistenssiä ja *Z. mobilis* -geenejä *E. coli* TC4:ään transformoimalla. Kaikki rekombinantit olivat ampicilliiniherkkiä, mikä osoitti, että niistä puuttui bla:ta ja colE1-replikonin sisältävä pUC18-geeni-fragmentti. Eräs näistä, pLOI555 (8,4 kb-pari), tuotti eniten punaisia pesäkkeitä aldehydi-indi-

35 kaattorilevyille, antoi *E. coli* n erinomaisen etanolituottokyvyn ja näytti olevan läsnä vähäisinä kopioina suhteessa saan-

toihin pienimittakaavaisista plasmidieristyksistä. Tätä plasmidia, samoin kuin pLOI297:ää ja pLOI560:tta käytettiin transformoimaan *K. oxytoca* M5A1 Cm^r:ää selektoiden.

5 Kolme PDC:tä koodaavan *Z. mobilis* -geenin sisältävää plasmidirakennetta transformoitiin M5A1:een (taulukko 10). PDC-tasot olivat 8 kertaa korkeammat kahdella pUC-perustaisella rakenteella (pLOI297 ja pLOI560) kuin pLOI555:llä. Oletettaessa puhtaan PDC:n maksimaaliseksi spesifiseksi aktiviteetiksi 100 U
10 tämä entsyymi sisältää yli 25 % sytoplasmisesta proteiinista M5A1(pLOI297):ssä ja 3,6 % M5A1(pLOI555):ssä.

Taulukko 10

Plasmidistabiilisuus ja pdc-ekspressio M5A1-rekombinanttikannoissa
15 noissa

20	Plasmidi	PDS-aktiviteetti 24 h kuluttua (U/mg proteiinia)	Pysyvyysspiirre ^{a,b} (sukupolvilukumäärä)	
25	pLOI555	3,6	100(38,5)	98(68,5)
	pLOI297	28	52(38,6)	10(68,6)
	pLOI560	27	97(32,9)	0(62,9)

^a Soluista otettiin näytteet kaksi kertaa viljelyn aikana

^b Sekä aldehydipiirre että antibioottiresistenssi hävisivät konkurrentisti

35 *Z. mobilis* -geenien ekspressio M5A1:ssä vahvistettiin vielä SDS-PAGE-geeleillä. Vyöhykkeet, jotka sisälsivät PDC:tä ja ADHII:ta saatiin tunnistettua helposti vertaamalla natiiviin
40 kantaan. PDC:tä sisältävä vyöhyke on paljon leveämpi pUC-perustaisissa rekombinanteissa kuin M5A1(pLOI555):ssä yhtäpitävästi entsymaattisen aktiiviteetin mittausten kanssa. Vaikka

ADHII:ta ei ole niin runsaasti kuin PDC:tä tämän *Z. mobilis* -geenin ekspressio on suurempaa myös M5A1(pLOI297):ssä kuin M5A1(pLOI555):ssä. ADHII:ta vastaavaa vyöhykettä ei ollut havaittavissa M5A1(pLOI560):ssä, joka sisältää vain *Z. mobilis* -
 5 pdc-geenin.

pLOI555:n kopioiden määrän arvoitiin olevan alle 1/10 kahdesta muusta rakenteesta perustana saannot pienimuotoisista plasmidi-valmisteista. Vaikka tämä arvio on vain likimääräinen on sel-
 10 vää, että suuret PDC-tasot pUC-perustaisissa rakenteissa johtuvat osittain suuresta kopiomäärästä.

Solut, jotka sisälsivät pLOI555:n, pLOI297:n tai pLOI560:n sarjasiirrettiin Luria-liemeen, joka sisälsi 10 % glukoosia ilman
 15 antibiootteja yli 60 sukupolven ajan 30°C:ssa. Sopivia viljelylaimennoksia pantiin Luria-agaralustoille, jotka sisälsivät 2 % glukoosia ilman antibiootteja. Pesäkkeistä testattiin aldehydi-indikaattorialustoilla kuinka hyvin ne olivat saaneet pysymään *Z. mobilis* -etanolituottogeenit ja minkälainen oli niiden
 20 antibioottiresistenssi.

Z. mobilis -geenien ylenmääräinen epästabiilisuus pBR322-perustaisissa vektoreissa on raportoitu aiemmin Klebsiella planticola kohdalla (Tolan, J.S., R.K. Finn, Appl. Environ. Microbiol.
 25 53:2039-2044, 1987), se ei kelpaisi teollisiin prosesseihin. pLOI555:n sisältävät rekombinantit olivat erittäin stabiileja, 98% populaatiosta saivat pysymään itsessään sekä antibioottiresistenssigeenin että *Z. mobilis* -peräisin olevat geenit. Vaikka vain adhB-ekspressio näkyy aldehydi-indikaattorialus-
 30 toilla nämä rekombinantit säilyttivät myös suuren pesäkkeen fenotyypin, joka kertoo sekä pdc:n että adhB:n ekspressiosta.

Fermentoinneissa käytettiin Luria-lientä, joka sisälsi 10 % (paino/tilavuus) glukoosia tai ksyloosia 30°C:ssa, pH 6,0, se-
 35 koitusnopeus 100 rpm. Inokulaatteja kasvatettiin yli yön 30°C:ssa eristetyistä pesäkkeistä pulloista, joita ei ravistel-

5 Etanolipitoisuus määritettiin kaasu-nestekromatografian avulla. Konvertoitumistehokkuudet korjattiin emäslisäyksen aiheuttama tilavuusmuutos huomioonottaen ja olettaen, että kaikki sokerit olivat metaboloituneet. Maksimaalisen teoreettisen etanoli-
saannon ksyloosista ja glukoosista laskettiin olevan 0,51 g
10 etanolia per grammaa sokeria balanssi hiilidioksina. Volumet-
riset tuottavuudet arvioitiin aktiivisimmista jaksoista ja ne
edustavat maksimiarvoja. Kaikki femrentointitiedot taulukoissa
ja kuvioissa ovat keskiarvoja kahdesta tai useammasta eräfer-
mentoinnista.

Taulukko 11 tuo esiin Z. mobilis PDC+ADHII-etanolituoton gluukoosista ja ksyloosista vaikutuksia suhteessa natiiviin M5A1-kantaan. M5A1(pLOI555) oli selvästi paras rakenne etanolituoton kannalta maksimaalisella volumetrisella tuotolla 2,1 g/litra per tunti sekä glukoosista etää ksyloosista. Kummallakin sokerilla tämä rekombinantti tuotti noin 37 g etanolia/litra 30 tunnissa. Näiden sokereiden fermentoituminen oli olennaisesti täydellistä 48 tunnin kuluttua, 45 g etanolia/litra.

Taulukko 11. Etanolituotto glukoosista ja ksyloosista M5A1-rekombinanttikannoista^a

Plasmidi	Geenit ^b	Enäs (mmol/g sokeria) ^c	Aika ^d (h)	Etanolisaanto g/l	Teoreettinen saanto (%)	VP (g/l per h) ^e	30 h etanoli (g/litra)	Solusaanto (g/g sokeria)	
Glukoosi									
ei plasmidia		1,0	48	15	0,16	31	1,1	15	0,044
pLOI560 pdc		0,8	72	44	0,46	90	1,1	15	0,018
pLOI297 pdc adhB		0,7	72	50	0,52	102	1,3	24	0,020
10 pLOI555 pdc adhB		1,0	48	48	0,50	98	2,1	43	0,040
Ksyloosi									
ei plasmidia		1,9	96	14	0,16	31	0,5	7	0,044
pLOI560 pdc		0,7	96	37	0,38	75	1,2	5	0,025
15 pLOI297 pdc adhB		0,9	96	37	0,39	76	1,0	12	0,024
pLOI555 pdc adhB		1,1	48	46	0,48	94	2,0	37	0,054

^a Laskelmat perustuvat aluperin lisättyyn kokonaissokeriin

^b Osoitetut geenit ovat 2. mobiliksesta

20 ^c Kulunut emäsmäärä pH:n säilyttämiseksi 6,0:ssa fermentoinnin aikana

^d Maksimietanolipitoisuus aika

^e VP, maksimaalinen volumetrinen tuotto eräfermentoinnin aikana

Kuten etanolituotossa M5A1(pLOI555):n kasvu oli selvästi suurinta. Tämän rekombinantin kasvu oli lähes samaa tasoa kuin emokannalla. Kuitenkin toisin kuin emokannassa solutiheys pieneni asteittain saavutettuaan maksimin 15 tunnissa. Tämä vähentymisen saattaa heijastaa refraktiliteetin vähenemistä, koska etanoliakkumuloitui sen jälkeen kun hajoamista ei enää ilmennyt. Jos ei lisätty emästä pH:n säätelyä pdc+adhB:n sisältävä rekombinantti kasvoivat yli kaksinkertaiseen tiheyteen emo-organismiin nähden vähentyneen happotuoton ansiosta (suurempi osuus neutraaleja käymistuotteita) kuten aiemmin on havaittu E. colilla.

Maksimaaliset volumetriset tuotot (2,1 g etanolia/litra per h) ovat lähes kaksinkertaiset E. coli -rekombinantteihin verrattuna suuren tehokkuuden ja lopullisten etanolipitoisuuksien säilyessä samanlaisina. Toisin kuin E. coli M5A1(pLOI555) fermentoi ksyloosia ja glukosia vastaavilla nopeuksilla. Plasmidi pLOI555 pysyi stabiilisti M5A1:ssä ilman antibioottiselektiota. Koska M5A1:n substraattivalikoima on samanlainen kuin E. colilla M5A1-rekombinantit tarjoavat erikoisen ja odottamattoman edullisen etanolituottotavan.

Esimerkki 16

Sellobioosin fermentointi etanoliksi etanologeenisillä Erwinia- ja Klebsiella-rekombinanteilla

Tämä esimerkki kuvaa erään oligosakkaridin, sellobioosin fermentointia etanologeenisten Erwinia- ja Klebsiella-rekombinanttien avulla.

Tässä esimerkissä käytetty Erwinia oli tyypillinen Erwinia carotovora -kanta. Erwinia transformoitiin käyttämällä plasmidia pLOI555 esimerkissä 15 kuvattuun tapaan. Plasmidi pLOI555 insertoitiin Erwiniaan käyttämällä Biorad- elektroporaatiolaitetta ja menetelmää, jota ovat kuvanneet Ito et al, Ag. and Biol. Chem. 52(1):293-4, 1988 (jännite = 2,0 kV, kapasitanssi = 25 μ F

ja resistanssi = 100 ohmia). Saatiin koottua suuri transformanttimäärä, yli 100 000 per μg plasmidi-DNA:ta.

Tässä esimerkissä käytetty Klebsiella oli Klebsiella oxytoca
5 M5A1-kanta P2, joka saatiin myöhemmin esimerkissä 18 kuvattavalla tavalla.

Fermentoinnit suoritettiin esimerkin 15 tapaan käyttämällä 10 %
sellobioosia Luria-liemessä (pH 6, 30°C) ja sekoitusnopeutta
10 100 rpm. Etanolipitoisuudet, jotka Erwinialla ja Klebsiella
oxytocalle saatiin olivat 1,113 molaarista ja 1.065 molaarista.
Tulokset on koottu kuvioon 6, yksikkönä g/L tuotettua etanolia.
Symbolit: ■ = Erwinia, □ = Klebsiella.

15 Esimerkki 17

Polymeeristen lähtöaineiden fermentointi etanoliksi yhdellä geneettisesti käsitellyllä mikro-organismilla

Esimerkin lyhenelmä: Tämä esimerkki kuvaa kaksivaiheista menetelmää fermentoida polymeerisiä lähtöaineita etanoliksi yhdellä
20 ainoalla mikro-organismilla, jota on geneettisesti käsitelty tuottamaan etanolia primaarisena fermentointituotteenaan ja tuottamaan ksylanaasia intrasellulaarisesti. Tarkemmin sanoen katkaistu ksylanaasigeeni (xynZ) termofiilisestä bakteerista C. thermocellum yhdistettiin lacZ:n N-terminaaliin erityssignaalin poistamiseksi. Tämä hybridigeeni ekspressoitui runsain mää-
25 rin E. coli K011:ssä ja K. oxytoca M5A1(pLOI555):ssä, josta edellä puhuttiin. Suuria ksylanaasimääriä akkumuloitui intrasellulaarituotteena etanolituoton aikana. Ksylanaasia sisältävät solut harvestoitiin fermentoinnin lopuksi ja lisättiin
30 ksylaaniliuokseen korkeassa lämpötilassa vapauttamalla näin ksylanaasin sakkarifiointia varten. Jäähdyttämisen jälkeen hydrolysaatti fermentoitiin etanoliksi samalla organismilla ja lisättiin ksylanaasivarastoa myöhempään sakkarifiointiin.

35 **Organismit ja kasvuolosuhteet:** Tässä esimerkissä käytetyt bakteerikannat ja plasmidit on lueteltu taulukossa 12.

Taulukko 12

Käytetyt bakteerikannat ja plasmidit

	Bakteeri/ 5 plasmidi	Ominaispiirteet	Referenssilähde
10	E. coli DH5α	lacZM15, recA	Bethesda Rsrch Lab
	E. coli K011	frd, Cm ^r , Ipet ^a	Ohta et al ^c
15	K. oxytoca M5A1 (pLOI555)	Cm ^r , pet ^b	Esimerkki 15, supra
	pCT1202	Ap ^r , xynZ ⁺	Grepinet et al ^d
	pLOI1001	Ap ^r , xylB ⁺	Utt et al ^e
20	pLOI2000	Ap ^r , xylB ⁺	tämä esimerkki
	pLOI2001	Ap ^r , lacZ::xynZ ⁺	tämä esimerkki
	pLOI2002	Ap ^r , lacZ::xynZ ⁺	tämä esimerkki
25	pLOI2003	Ap ^r , lacZ::xynZ ⁺ , xylB ⁺	tämä esimerkki

30 ^a Ipet tarkoittaa Z. mobilis pdc- ja adhB-geenien integrointia kromosomiin

35 ^b pet tarkoittaa Z. mobilis pdc- ja adhB-geenien läsnäoloa plasmidissa pLOI555

^c Ohta et al, Appl. Environ. Microbiol. 57:893-900

^d Grepinet et al, J. Bacteriol. 170:4582-4588

^e Utt et al, Appl. Environ. Microbiol. 57:1227-1234

40 Kantoja kasvatettiin Luria-liemessä, johon oli lisätty 50 g ksyloosia/litra. E. coli -transformaatit valikoitiin Luria-agaralustoilta, jotka sisälsivät 50 mg ampisilliinia/litra tai 40 mg kloramfenikolia/litra. K. oxytoca M5A1 -transformantit valikoitiin Luria-agaralustoilta, jotka sisälsivät 1000 mg ampisilliinia/litra tai 40 mg kloramfenikolia/litra.

45

Rekombinanttikloonit tutkittiin ksylanaasiaktiviteettia hakien käyttämällä mikrotitterialustoja, jotka sisälsivät 4-metyyliumbelliferyyli- β -D-sellobiopyranosidia (100 mg/litra) (Millet, FEMS Microbiol. Lett. 29:145-149 1985). Samaan tapaan etsittiin sekä ksylosidaasi- että arabinosidaasiaktiviteettia koodaavan *Butyrivibrio fibrisolvens* xylB -geenin ekspressoitumista lisäämällä kiinteään elatusaineeseen 4-metyyliumbelliferyyli- α -L-arabinofuranosidia (20 mg/litra) (Utt et al, Appl. Environ. Microbiol. 57: 1227-1234, 1991). Näiden substraattien hydrolyysi positiivisilla klooneilla tuotti fluoresoivaa tuotetta (umbelliferoni), joka voitiin helposti havaita 340 nm:n ultraviolettivalossa.

Geneettiset menetelmät ja yhdistelmätekniikat: Plasmidien valmistaminen, hajotus restriktioentsyymeillä, ligaatio, transformointi ja geelielektroforeesi suoritettiin standardimenetelmin. *E. coli* -kantaa DH5 α käytettiin isäntänä kaikissa plasmidirekenteissa. Polymeraasiketjureaktioissa välineinä olivat TempCycler Model 50 (Coy Laboratory Product. Inc., Ann Arbor, MI) ja GeneAmp -pakkaus (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT), joka sisälsi Taq-polymeraasia. Monistusreaktioissa käytettiin 2 mM jokaista dNTP:tä, 100 pmol jokaista aluketta, 20 ng templaattia ja 2,5 U Taq-polymeraasia 100 μ l:n kokonaistilavuudessa. Tuotteet eristettiin 30 monistussyklin jälkeen (1 minuutti 94°C:ssa, 2 minuuttia 47°C:ssa ja 1 minuutti 72°C:ssa, lopuksi vielä 3 minuuttia 72°C:ssa).

Entsyyttisten aktiviteettien määrittäminen: Ksylanasaasi-, ksylanopyranosidaasi- ja arabinofuranosidaasiaktiviteetit mitattiin rekombinanteista, joita oli kasvatettu yli yön 30°C:ssa. Solut harvestoitiin sentrifugoimalla (7000 x g, 10 minuuttia) ja pestiin kahdesti fosfositraattipuskurilla (50 mM kaliumfosfaattia ja 12,5 mM sitruunahappoa, pH 6,3) ksylanasaasiaktiviteetin määrittämiseksi tai fosfaattipuskurilla (5mM natriumfosfaattipuskuria, joka sisältää 10 mM 2-merkapi-

toetanolia, pH 6,8) ksylosidaasi- ja arabinosidaasiaktiviteettien määrittämiseksi.

Solut hajotettiin saattamalla ne kahdesti läpi painepuristimen
5 (French pressure cell), 20 000 psi. Saatua lysaattia sentrifugoitiin (13 000 x g 30 minuutin ajan, 4°C) solujätteiden poistamiseksi.

Ksylosidaasi- ja arabinofuranosidaasiaktiviteetteja tutkittiin
10 aiemmin kuvattuun tapaan (Utt, supra). Ksylanaasi mitattiin samalla menetelmällä, mutta käyttämällä substraattina p-nitro- β -D-sellobiosidia. Ksylanaasiaktiviteetti arvioitiin myös mitaamalla pelkistävien sokereden vapautumista (Bergmeyer (ed),
Methods of enzymatic analysis, Vol. II, 3rd edition, p. 151-2,
15 Verlag Chemie, Weinheim. Germany, 1983) koivuksylaanista hydrolysoimalla (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Kaikki aktiviteetit on ilmoitettu millimikromoolleina vapautunutta tuotetta per minuutti. Proteiinipitoisuus määritettiin Bradfordin menetelmällä (Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254, 1976).

20

Ksylo-oligosakkaridien erottaminen ohutkerroskromatografian avulla:

Valmistettiin ksylo-oligosakkaridien seos 0,5 % koivuksylaanin osittaisella hydrolysoimisella trifluorietikkahapolla (Domer, Meth. Enzymol. 160:176-180, 1988). Liuos väke-
25 vöitiin 10-kertaiseksi tyhjiössä huoneen lämmössä 1 μ litran näytteet vertailukohteena. Ksylo-oligosakkaridit erotettiin huoneen lämmössä yhtenä kehityksenä aktivoimattomilla Whatmanin silikageeli 150 A -alustoilla (Whatman Inc., Clifton, New Jersey) liuottimena asetonia, etyyliasetaattia ja etikkahappoa
30 (2:1:1). Kuivattamisen jälkeen oligosakkarit visualisoitiin naftyylietyleenidiamiinireagenssilla tavalla, jota on kuvannut Bounias (Bounias, Anal. Biochem. 106:291-295, 1980).

Fermentointikokeet: Fermentointi-inokulaatit valmistettiin juu-
35 ri eristetyistä pesäkkeistä yli yön kasvatuksella ravistelemattomissa pulloissa (30°C). Fermentaatteja inokuloitiin lähtö-

OD:n 550 nm:ssa ollessa joko 0,1 tai 0,3, ja inkuboitiin 30°C:ssa sekoitetuissa pH-staateissa (350 ml työskentelytilavuus, pH 6,0). (Beall et al, Biotechnol. Bioengin. 38:296-303, 1991, Ohta et al, Appl. Environ. Microbiol. 57:893-900, 1991, ja Ohta et al, Appl. Environ. Microbiol. 57:2810-2815, 1991.) Kloramfenikoli tai kloramfenikoli ja ampisilliin lisättiin fermentointiliemiin.

Ksylaani fermentoitiin kaksivaiheisella menetelmällä, jossa ksylaani hajotettiin korkeassa lämpötilassa ja fermentoitiin sitten 30°C:ssa. Ksylaanihajotuksessa solut 350 ml:n fermentaateista harvestoitiin sentrifugoimalla (7000 x g, 10 minuuttia) 48 tunnin jälkeen, uudelleensuspensiointi vastaavaan tilavuuteen tuoretta Luria-lientä, joka sisälsi 4 % ksylaania (pH 6,0), ja inkuboimalla 60°C:ssa 65 tuntia. Kun hydrolysaatit oli jäädytetty 30°C:een ne inokuloitiin rekombinanttiorganismien kanssa lähtö-OD:lla 0,3 550 nm:ssa.

Näytteitä otettiin eri aikoina tutkittaessa ksylo-oligosakkari-
deja (ohutkerroskomatografia), solukasvua (OD 550 nm:ssa) ja etanolia. Etanoli mitattiin kaasunestekromatografian avulla (Dombek et al, Appl. Environ. Microbiol. 51:197-200, 1985).

Rekombinanttiplasmidien kokoaminen ksylaanihydrolyysiä varten:

Substituoimattoman ksylaenin hydrolyysiin tarvitaan vähintään kahta aktiviteettia, endolyyttistä ksylanaasia ja ksylosidaasia. Koottiin kolme plasmidia ksylaani fermentointia varten, xynZ-geeni (ksylanaasi) termofiilisestä *Clostridium thermocellumista* (Grepinet et al, J. Bacteriol. 170:4582-4588, 1988), ja xylB-geeni (ksylosidaasi ja arabinosidaasi) *Butyrivibrio fibrisolvensista* (Utt, supra) ekspressoituna erikseen ja yhdessä operonina (kuviot 7A, 7B ja 7C).

Kuviot 7A, 7B ja 7C kuvaavat kuinka kootaan rekombinanttiplasmidit, jotka sisältävät xynZ:n ja xylB:n. Koodausalueet on rajattu. *C. thermocellum* ja *B. fibrisolvens* DNA:t on esitetty

ohuin viivoin. Paksu viiva tarkoittaa vektori-DNA:ta. Tasa-pääligaatiokohdat on merkitty "X":llä. "F" tarkoittaa koodausaluetta kehyksen sisäisessä lacZ::xynZ-fuusiossa.

5 XylB-geeni subkloonattiin polylinkkeriin pUC18:aan XbaI:n ja PstI:n väliselle alueelle insertoimalla kaksi fragmenttia pLOI1001:stä, 0,3 kb-parin (kbp) XbaI-PstI-fragmentti, joka sisälsi ribosomaalisen sitoutumiskohdan sisältävän aminoterminaalin, ja 2,4 kbp:n PstI-fragmentti, joka sisälsi loput koodausalueesta ja translaatioterminaattorin. Saatu plasmidi, 10 pLOI2000 ekspressoii xylB-geeniä lac-promoottorista.

Aikaisemmissa kokeissa (Grepinet et al, supra), on osoitettu, että ksylanaasiekspressio oli kohonnut lacZ-fuusioissa, joissa 15 oli deletoitu suuri segmentti, joka koodaa prosessoidun ksylanaasin signaanisekvenssieritystä ja aminoterminaalia. Hyvin samantapainen lacZ::xynZ-fuusio koottiin tasapääligatoimalla Klenow-käsiteltyä pCT1202:n 2,4 kbp:n StyI-fragmentista, joka sisälsi aminokatkaistun xynZ-geenin, Klenow-käsiteltyyn PstI- 20 kohtaan pUC18:aan. Molemmat lukukehykset reunustettiin saadulla plasmidilla pLOI2001.

25 Oli tarpeen poistaa otaksuttu transkriptionaaliterminaattori 30 emäsparia alavirtaan lacZ::xynZ:n koodausalueelta ja lisätä uusi SstI-kohta fuusiogeenin 3'-päähän ennen kuin koottiin plasmidi, josta sekä ksylanaasia että ksylosidaasia koodavat geenit ekspressoituivat. Modifioinneissa käytettiin polyme- raasiketjureaktiota (PCR). Plasmidia pLOI2001 käytettiin temp- laattina 5'-GAATTCGACGTCGGTAC-3' alukkeena 5'-päälle ja 5'- 30 GGGAGCTCCGGCATCATTATCTG-3' alukkeena 3'-päälle (sisältää uuden SstI-kohdan). SstI-hajotuksen jälkeen tämä fragmentti inser- toitiin SstI-polylinkkerikohtiin pUC18:ssa ja pLOI2000:ssa ja saatiin kootuksi pLOI2001 ja pLOI2003.

35 **Ksylaanihajotukseen osallistuvien entsyymien ekspressio:** Ksylaasi-, ksylosidaasi- ja arabinosidaasiaktiviteetit tutkit-

tiin alun perin kokoamiseen käytettävän isäntäorganismin stationaarifaasisoluissa, kanta DH5 α (taulukko 13). Ksylanaasi-aktiviteetti (xynZ) väheni 60 % klooneissa, jotka sisälsivät xylB:n alavirtaan sisältävän pLOI2003:n verrattuna pLOI2001:

5 een, joka sisälsi pelkän xynZ:n. Ksylosidaasi- ja arabinosidaasiaktiviteetit (xylB) olivat kuitenkin samanlaiset klooneissa, jotka sisälsivät joko xylB:n yksin sisältävän pLOI2000:n tai xynZ-geenin ylävirtaan sisältävän pLOI2003:n.

10 Taulukko 13

Rekombinanttientsyymien spesifiset aktiviteetit ksylaanihajo-
tuksessa

15	Kanta ja plasmidi	Spesifinen aktiviteetti (nU/mg)			
		ksylosidaasi	arabinosidaasi	ksylanaasi ^a	ksylanaasi ^b
20	E. coli DH5 α	0	0	0	0
	pLOI2000	1,2	2,2	0	0
	pLOI2001	0	0	1,4	124
	pLOI2003	1,5	2,5	0,5	48
25	E. coli K011	0	0	0	0
	pLOI2001	0	0	0,4	38
	pLOI2003	1,3	2,4	0,3	25
	pLOI2003 ^c	1,1	1,9	0,3	47
30	pLOI2003 ^{c,d}	nd	nd	0,8	93
	K. oxytoca M5A1(pLOI555)	53	0	0	0
	& pLOI2001	49	0	0,4	39
	pLOI2003	56	2,6	0,2	24
35	pLOI2001 ^c	30	0	0,7	0
	pLOI2001 ^{c,d}	nd	nd	1,8	144
	pLOI2003 ^c	38	2,9	0,4	58
	pLOI2003 ^{c,d}	nd	nd	0,8	144

Ellei muuta mainita: solut kasvatettiin ravistuspulloissa, jotka sisälsivät Luria-lihalientä, jossa oli 5 % ksyloosia, ja harvestoititiin 20 tunnin kuluttua (stationaarifaasi); ksylosidaasi- ja arabinosidaasiaktiiviteetit määritettiin 30°C:ssa; ksylanaasiaktiiviteetit mitattiin 45°C:ssa.

5 ^a ksylanaasiaktiiviteetit mitattiin p-nitrofenyyli-β-D-sellobiosidi substraattina.

^b ksylanaasiaktiiviteetit mitattiin 0,5-prosenttinen koivuksylaani substraattina.

^c Solut harvestoititiin pH-staateista (8% ksyloosia Luria-lihaliemessä, pH 6,0) fermentoinnin lopuksi

10

^d ksylanaasiaktiiviteetit mitattiin 60°C:ssa.

Plasmidit pLOI2001 ja pLOI2003 transformoitiin etanologeeniseen
 15 E. coli KO11 -kantaan, jossa etanolituottogeenit on insertoitu kromosomiin. Ekspressiota verrattiin stationaarifaasin soluihin ravistuspulloista ja soluista pH-staatissa fermentoinnin lopuksi (taulukko 13). Ksylosidaasi-, arabinosidaasi- ja ksylanaasiaktiiviteetit olivat samanlaiset kuin havaittiin DH5α:
 20 lla. Taaskin ksylanaasiaktiiviteetti väheni pLOI2003:ssa, jossa xylB oli läsnä alavirtaan.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

Ekspressiota tutkittiin myös K. oxytoca kannalla M5A1, jossa oli geenejä Z. mobilis -etanolioreaktiivista sisältävä
 25 pLOI555. Vaikka pLOI555:ssä läsnä oleva replikonityyppi on tuntematon se näyttää melko stabiililta kun läsnä on toinen pUC18:sta koottu plasmidi. Arabinosidaasi- ja ksylosidaasiaktiiviteettien ekspressio oli karkeasti ottaen samanlainen kuin E. colissa havaittu. M5A1:ssä havaittiin runsaasti natiivia
 30 ksylosidaasia. Ksylosidaasiaktiiviteetit olivat jonkin verran suuremmat ravistuspullosoluissa verrattuina pH-staattien soluihin ksylanaasiaktiiviteettien seuraillessa vastakkaista suuntausta.

35 Käytetyissä koeolosuhteissa arabinosidaasiaktiiviteetti oli 1,5 - 1,7 kertaa suurempi kuin aiemmin raportoitu ksylosi-

daasiaktiviteetti (Utt et al, supra). 47°C:ssa mitattu ksy-
lanaasiaktiviteetti oli noin puolet 60°C:ssa mitatusta (natiiv-
vin entsyymien optimilämpötila) (Grepinet et al, supra). Esi-
tettyjen tietojen perusteella ksylanaasifuusion pelkistyvän
5 sokerin kokeista lasketut spesifiset aktiviteetit olivat noin
100 kertaa suuremmat kuin estimaatit, jotka perustuivat p-nit-
rofenyyli-β-D-sellobiosidihydrolyysiin, joka indikoi suurta
natiivin substraatin preferenssiä.

10 **Rekombinanttikloonien ksylaanihydrolyysi korkeissa lämpötilois-
sa:** Kantaa KO11(pLOI2003) kasvatettiin pH-staatissa, joka si-
sälsi 8 % ksyloosia, ja testattiin entsyymilähteenä ksylaani-
hydrolyysille. Solut uudellensuspensoitiin vastaavaan määrään
tuoretta Luria-lientä, joka sisälsi 4 % ksylaania, ja inkuboi-
15 tiin 45°C:ssa, maksimilämpötilassa, jossa *B. fibrisolvens* -ksy-
losidaasi on stabiilia, ja 60°C:ssa, *C. thermocellum* -ksylanaa-
sin optimilämpötilassa. Vaikka ksylanaasia ja ksylosidaasia
muodostui intrasellulaarisina tuotteina, alustavat kokeet viit-
tasivat siihen, että näitä entsyymejä vapautui helposti väliai-
20 neeseen inkuboinnissa 45°C:ssa ja 60°C:ssa. Näytteet otettiin
eri aikoina, ja hajoamistuotteita analysoitiin ohutkerroskroma-
tografian avulla (kuviot 8A ja 8B).

Kuvioissa 8A ja 8B nähdään ohutkerroskromatografia-analyysi
25 ksylaanihydrolyysistä *E. coli* -kannalla KO11(pLOI2003) inkuboi-
tuna 45°C:ssa (kuvio 8A) tai 60°C:ssa (kuvio 8B) Luria-liemessä
(pH 6,0), joka sisälsi 4 % koivuksylaania. Jokaisessa raidassa
on käytetty 1 µliträn näytteitä. Inkubointiaika on ilmoitettu
tunteina jokaisen raidan alapuolella. Vertailukohteena ensim-
30 mäisessä raidassa (S) on käytetty ksylaanihappohydrolystaattia.

Ksyloosi, ksylobioosi, ksylotrioosi ja ksylotetroosi erottuivat
selvästi ksylobioosi päätuotteena. Monomeerinen ksyloosi akku-
muloitui hitaasti. Kun vertaillaan hajoamismäärää 24 ja 48
35 tunnin välillä nähdään selvästi, että 45°C:ssa hydrolysoitumi-

nen oli vähäisempää kuin 60°C:ssa huolimatta ksylosidaasin epästabiiliudesta 60°C:ssa.

Vaikka ksylaanihajotus oli epätäydellistä vielä 65 tunnin kulu-
 5 luttua 60°C:ssa ksykanaasi pysyi melko aktiivisena ja oli helposti havaittavissa 4-metyyliumbelliferyyli- β -D-sellobiosidi substraattina. Ksylosidaasi inaktivoitui nopeasti tässä lämpötilassa. Enempää muutoksia ksylaanihydrolysaattien ohutkerrosprofiileissa ei ollut havaittavissa sen jälkeen kun lisättiin
 10 solulysaattia, joka sisälsi molempia entsyymejä, ja inkuboitessa vielä 24 tuntia. Ksylo-oligosakkaridituotteet näyttävät siis olevan lähellä Sigma-koivuksykanin hajotusrajaa. Oksidaatiotuotteet tai substituuotit voivat estää tämän kaupallisen valmisteen täydellisen hajoamisen.

15

Ksylaanihydrolyysituotteiden käyttäminen E. coliin ja K. oxytoca rekombinanttikannoilla: Suoritettiin pienimuotoisia kokeita arvioitaessa missä määrin E. coli K011(pLOI2003) ja K. oxytoca kanta M5A1(pLOI555) pystyivät metaboloimaan ksylo-oligosakkarideja. Näitä kantoja inokuloitiin 1ml:ssa ksylaanihydrolysaattia (60°C 65 tuntia, supernatantti solujätteen sentrifugipoiston jälkeen) ja inkuboitui 48 tuntia 30°C:ssa sekoittamatta. Otettiin näytteet ja analysoitiin ohutkerroskromatografian avulla (kuviot 9A ja 9B).

25

Kuvioissa 9A ja 9B nähdään ksylo-oligosakkaridien käyttöä kasvatettaessa E. coli K011:n (kuvio 9A) ja K. oxytoca M5A1:n (kuvio 9B) rekombinantteja. Ksykanaa (4%) hydrolysoitiin 65 tuntia inkuboimalla E. coli -kanta K011(pLOI2003) Luria-liemessä
 30 (pH 6,0), sentrifugoitiin ja suodatussteriloitiin. Näytteet inokuloitiin ja inkuboitui 30°C:ssa kasvatusta varten. Näytteet otettiin 24 tunnin välein kuten raitojen alapuolella osoitetaan ja analysoitiin ohutkerroskromatografian avulla. Vertailukohteena käytettiin ensimmäisen raidan (S) ksylo-oligosakkaridien seosta.
 35

Vain ksyloosi metaboloitui rekombinantilla *E. coli*lla, vaikka läsnä oli aktiivista *B. fibrisolvens* -ksylosidaasia. Ksayloosi, ksylobioosi ja ksylotrioosi kuluivat kaikki täydellisesti etnologueenisella *K. oxytoca*lla. Näiden tulosten perusteella *K. oxytoca* valittiin parempana vaihtoehtona jatkotutkimuksiin ksylaanin konvertoimiseksi etanoliksi.

Ksyloosin ja ksylaanin fermentointi *K. oxytoca* kannan M5A1 johdannaisilla: Ksylaanin fermentointi suoritettiin kaksivaiheisessa prosessissa, jossa aiemmista fermentaatioista harvestoidut solut uudelleensuspensioitiin Luria-liemeen, joka sisälsi 4 % ksylaania sakkarifikaatiota varten (60°C 65 tunnin ajan). Sakkarifioitunut ksylaani inokuloitiin ja fermentoitiin 30°C:ssa (pH 6,0). Tehtiin rinnakkaiskokeet, joissa solujäte oli sentrifugoimalla poistettu ennen inokulointia. Vertailun vuoksi suoritettiin myös fermentoinnit käyttämällä 4,47 % ksyloosia (vastaa ksyloosin 4 % ksylaania) (kuviot 10A ja 10B). Näiden fermentaatioiden tiedot ilmenevät seuraavasta taulukosta 14.

20

Kuvioissa 10A ja 10B nähdään ksyloosin ja ksylaanihydrolysaatin konvertoituminen etanoliksi rekombinantilla *K. oxytoca* M5A1:llä. Ksylaania hydrolysoitiin 65 tuntia 60°C:ssa käyttämällä entsyymilähteenä soluja aiemmista fermentaatioista. Kuvio 10A tuo esiin solumassan kasvun ja kuvio 10B etanolituoton.

25

Symbolit: ▲ : 4,47 % ksyloosin fermentointi M5A1(pLOI555):llä, ○ : 4,47 % ksyloosin fermentointi M5A1(pLOI555 ja pLOI2001):llä, ■: sakkarifioinnista muodostunutta solujätettä sisältävän 4 % ksylaanihydrolysaatin fermentointi M5A1(pLOI555 ja pLOI2001):llä, □ : fermentointi 4 % ksylaanihydrolysaatilla kun solujäte oli poistettu sentrifugoimalla käyttämällä M5A1(pLOI555 ja pLOI2001):ä.

30

35

Taulukko 14

Etanolituotto ksyloosista ja ksylaanista *K. oxytoca*
M5A1(pLOI555):n rekombinanttikannoilla^a

5	Substraatti ja toinen plasmidi	Emäs (mM/g sokeria) ^b	Aika ^c (h)	Etanolisaanto		Teoreettinen saanto (%) ^d	VP (g/l/h) ^e	Solusaanto (g/g sokeria)
				g/litra	g/g			
				substraattia				
<u>Ksyloosi (4,47 %)</u>								
10	pLOI555 yksin	1,2	36	22,6	0,51	99	1,29	0,07
	pLOI2001:n kanssa	1,5	48	21,7	0,49	95	1,02	0,08
	pLOI2003:n kanssa	1,3	36	20,6	0,47	91	0,83	0,07
<u>Ksylaani (4,0 %)</u>								
15	pLOI2001:n kanssa ^f	0,7	24	7,7	0,19	34	0,37	0,04
	pLOI2003:n kanssa ^f	1,3	36	7,7	0,19	34	0,31	0,04
	pLOI2001:n kanssa ^g	1,3	60	7,8	0,20	34	0,28	nd
	pLOI2003:n kanssa ^g	1,1	60	7,9	0,20	35	0,30	nd

20

^a Laskelmat perustuvat lisätyn substraatin kokonaismäärään

^b Kulunut enäsmäärä pH:n pitämiseksi 6,0:ssa fermentoinnin aikana

^c Maksimaaliseen etanolipitoisuuteen pääsemiseen tarvittu aika

^d Teoreettinen saanto painon perusteella on ksyloosilla 0,51 ja ksylaanilla 0,56

^e VP, maksimaalinen volumetrinen tuottavuus eräfermentoinnin aikana

^f Hydrolysaatti kun solujäte sakkarifikaatiosta oli poistettu sentrifugoimalla

^g Sakkarifikaatiojätettä sisältävä hydrolysaatti

30

Nähdään, että M5A1(pLOI555) tuotti etanolia erittäin tehokkaasti. Ksyloosifermentointi oli olennaisesti täydellistä 24 tunnin jälkeen, 93 % maksimaalisesta teoreettisesta saannosta.

35

Sekä kasvu että etanolituotto ksyloosista vähenivät samanaikaisesti kun läsnä oli toinen plasmidi, joko pLOI2001 tai pLOI2003. Vaaditut fermentointiajat pLOI2001:llä lisääntyivät noin 36 tuntiin, 91 % teoreettisesta saannosta. Tämä etanoli-

tuoton väheneminen monomeerisessä sokerissa heijastaa lisätaakkaa, jonka rekombinanttientsyymit aiheuttavat.

Ksylaanihydrolyysi (60°C 65 tuntia) toteutettiin

5 M5A1(pLOI555):llä, joka sisälsi joko hybridiksylanaasigeenin (pLOI2001) tai ksylosidaasi- ja hybridiksylanaasigeenin (pLOI2003). Näiden hydrolysaattien ohutkerrosprofiilit näyttivät identtisiltä K011(pLOI2003):n vastaavien kanssa, kuviot 9A ja 9B. Näiden kahden M5A1-johdannaisen ksylaanihydrolyysissä
10 ei ollut havaittavissa eroja.

Kasvu ja etanolituotto mitattiin näissä hydrolysaateissa inokuloinnin jälkeen vastaavalla sakkarifioinnissa käytetyllä organismilla (kuviot 10A ja 10B). Kasvu kirkastetussa hydro-
15 lysaatissa oli vain puolet siitä, mitä havaittiin vastaavilla määrillä ksyloosimonomeeriä. Käyminen oli olennaisesti täydellistä 24 tunnin kuluttua ja näytti olevan hieman nopeampaa kirkastetuissa hydrolysaateissa. Etanolisaannot ksylaanista olivat noin 1/3 maksimaalisista teoreettisista arvoista, 7,7 - 7,9
20 g/litra.

10 Käymisliemen ksylo-oligosakkarideja tarksteltiin ohutkerroskromatografian avulla. Profiilit fermentoinnin lopuksi olivat samanlaisia kuin kuviossa 9B (48 tuntia). Ksyloosi, ksylobioosi ja ksylootrioosi metaboloituivat täydellisesti ksylootetroosin
25 jäädessä jäljelle pitempien oligomeerien kanssa.

30 **Pohdintaa:** Tässä on nyt tullut esiin, että pitkälle käsiteltyjä K. oxytoca M5A1-kantoja voidaan käyttää sekä polymeerihydrolyysin entsyymilähteenä että etanolituottoon ksylaanista. Natii-
vin intrasellulaarisen ksylosidaasin läsnäoloa ja kykyä kuljettaa ja metaboloida ksylo-oligosakkarideja ei ole tähän asti
35 raportoitu tämän organismin yhteydessä. Aiemmin on kuvattu luonnon E. coli -isolaatteja, jotka käyttävät fosfotransferaasisysteemiä sellobioosiin ja intrasellulaariseen fosfosello-
biaasiin (Hall et al, J. Bacteriol. 169:2713-2717, 1987,

Kricker et al, Genetics 115:419-429. 1987). Analogiset systeemit voivat toimia *K. oxytoca* M5A1:ssä ksylobioosi- ja ksylootrioosimetaboliassa. Kuljetussysteemien ja ksyloosimonomeerien, -dimeerien ja -trimeerien metaboliaentsyymien läsnäolo

5 *K. oxytoca* M5A1:ssä tarjoaa huomattavan edun *E. coli* -perustaisen tai *S. cerevisiae*-perustaisiin systeemeihin biomassan edelleen käsittelyyn etanoliprosesseissa.

Monet aiemmin yhden organismin geneettiseen ohjailuun polymeerihajotusta ja etanolituottoa varten liittyneet ongelmat on saatu eliminoidua käyttämällä kaksivaiheista prosessia, jossa lämpöstabiileja entsyymejä tuotetaan intrasellulaarisina tuotteina fermentoinnin aikana. Suurina määrinä erittyväksi tarkoitettujen proteiinien syntetointi vaikuttaa usein epäedullisesti normaaleihin soluprosesseihin. Tämä ongelma täytyisi

15 minimoida käyttämällä N-katkaistuja entsyymejä, joissa erityysignaali on deletoitu intrasellulaarista ekspressiota varten. Koska hydrolyysi on rajoittava tekijä konvertoitumisessa suuret hydrolyyttisten entsyymien määrät olisivat erittäin edullisia

20 heti konvertointiprosessin alussa maksimoimaan sokereiden aikaista vapautumista nopeaan fermentointiin. Eritysperustaisissa prosesseissa entsyymitasot ovat aluksi pienet ja akkumuloituvat sitten maksimaalisiin tasoihin fermentoinnin lopulla. Mutta käyttämällä soluja aiemmista fermentoinneista entsyymilähteenä päästään lähes maksimaalisiin arvoihin välittömästi.

25 Vaikka lämpöstabiilien entsyymien käyttö hydrolyysissä tarjoaa lisää prosessietuja kontaminoitumisen minimoimiseen ja sillä voidaan päästä suurempiin hydrolyysinopeuksiin tärkein etu on se, kuinka yksinkertaista on intrasellulaaristen entsyymien

30 vapauttaminen harvestoiduista soluista.

Etanolitoleranssion usein ongelma natiiveissa organismeissa, jotka hajottavat selluloosaa ja ksylaania. Tällaiset organismit tuottavat tavallisesti alle 20 grammaa etanolia per litra.

35 (Katso Taillez et al, Appl. Environ. Microbiol. 55:203-06, 1989). Vaikka suuria etanolituottomääriä ksylaanista ei tähän

asti ole saatu, M5A1(pLOI555) pystyy tuottamaan vähintään 48 g etanolia/litra 100g/litra ksyloosista (noin 95 % maksimaalisesta teoreettisesta saannosta).

5 Kokonaisetanolisaanto koivuksylaaniin oli pienempi kuin odotettiin, ja sen uskotaan johtuvan ennen kaikkea epätäydellisestä ksyylaanihydrolyysistä. Hajoamattomia ksylo-oligosakkarideja jäi vielä 65 tunnin sakkarifikaatiojakson jälkeen. Vaikka meidän rakenteillamme tuotetut ksyланааситасот olivat pienemmät
10 kuin optimaalisilla ksyланаасифуусiorakenteilla, joista ovat raportoineet Grepinet et al, supra, entsyymimäärä per se ei tuntunut olevan rajoittava tekijä. Ksylaani (40 g/litra, noin 0,3 mol anhydroksyloosia) täytyisi hajota täydellisesti ksylobioosiekvivalenteiksi 24 tunnin hydrolyysin jälkeen nopeudella
15 105 $\mu\text{mol/min}$, kokonaisaktiiviteetti 648 $\mu\text{mol/min}$. Solusaannot fermentaatiosta olivat noin 4,5 g soluproteiinia/litra ksyланаасиaktiiviteetillä 144 $\mu\text{mol/min}$. Ksylo-oligosakkarideja jäi kuitenkin vielä 65 tunnin jälkeenkin aktiivin ksyланаасин sitkeydestä huolimatta. Nämä ksylo-oligosakkaridimäärät pysyivät
20 muuttumattomina tuoreen entsyymin lisäyksen ja ylimääräisen 24 tunnin fermentoinnin jälkeen. Ksylo-oligosakkaridien kompetitiivinen hydrolyysi-inhibitio saattaa johtua epätäydellisestä hajoamisesta, ja sitä testattiin, osittain, hydrolyysillä
45°C:ssa, lämpötilassa, jossa ksyланааси pysyi aktiivisena kuten natiivit entsyymit M5A1:ssä, joka metaboloii ksyloosia, ksylobioosia ja ksylotrioosia. Näissä olosuhteissa oligosakkaridiprofiili oli samanlainen kuin oli havaittu fermentoinnin jälkeen M5A1-kannoilla, joilla oli vastaavat ksylotetroosimäärät ja pitempiä oligosakkarideja jäi hajottamatta (tuloksia ei esitetty).
30 Nämä oligosakkaridit näyttävät olevan rajahajoitus-
35 tuotteita, vaikka hajotusta rajoittavien substituenttien luonne jää tuntemattomaksi.

Valmistajan mukaan koivuksylaani on 99-prosenttisesti ksyloosia. Haluamatta sitoutua mihinkään erityiseen teoriaan tämän keksinnön tekijät arvelevat, että tämä tuote saattaa sisältää

hapettuneita jäämiä, jotka ovat muodostuneet varastoinnin aikana tai substituutioista, jotka ovat säilyneet emäsuuton ja puhdistamisen jälkeenkin (Chesson et al, J. Sci. Food Agric. 34: 1330-1340, 1983).

5

Fermentatiivinen etanolituotto on Yhdysvalloissa noin 3,8 miljardia litraa vuodessa (Lynd et al, Science 251:1318-1323). Sellaisia mikro-organismeja kuin geneettisesti muunnellut *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. cerevisiae* tai *Z. mobilis* voitaisiin käyttää tuottamaan monenlaisia entsyymejä sivutuotteina etanolin kanssa. Minimaalisella solusaannolla 2 grammaa proteiini/lit-
 10 raa olutta 5% soluproteiininuutos tuottaisi vähintään 3 800 000 kg entsyymejä sivutuotteena. Näiden entsyymien ei tarvitse rajoittua substraattien depolymerointiin fermentointia varten,
 15 vaan ne voisivat olla muita laajoille markkinoille suuntautuvia entsyymejä, esimerkiksi pesuaineteollisuudelle, ruokateollisuudelle, puun sulppuamiseen ja uusien kemikaalien kehittämiseen uusilla biokatalysaattoriperustaisilla aloilla. Suurilla kehittyvillä markkinoilla tällaisten entsyymien arvo kohoaisi
 20 selvästi etanolin itsensä tämänhetkisiä arvoja suuremmiksi.

Esimerkki 18

Etanolituotto sellobioosista, amorfisesta selluloosasta ja kiteisestä selluloosasta rekombinantilla *Klebsiella oxytoca*lla,
 25 joka sisältää kromosomaalisesti integroituja *Z. mobilis* -geenejä etanolituottoa varten ja plasmideja, jotka ekspressoivat lämpöstabiileja sellulaasigeenejä *Clostridium thermocellumista*

Esimerkin lyhennelmä: Tässä kokeessa etanolituoton *Z. mobilis* -
 30 geenit oli integroitu *Klebsiella oxytoca* kannan M5A1 kromosomiin. Paras näistä rakenteista, kanta P2, tuotti etanolia tehokkaasti sellobioosista monomeeristen sokereiden lisäksi. Tämän kannan sellobioosi- ja sellotrioosikäyttö poistivat eksternaalisen β -glukosidaasin tarpeen ja vähensivät kaupallisen
 35 sellulaasin määrää, joka tarvittiin fermentoimaan SOLKA FLOC SW40:ää (primaarisesti kiteinen selluloosa). Kun lisättiin

plasmideja, jotka koodaavat endoglukanaaseja *Clostridium thermocellum*ista alkoi intrasellulaarinen lämpöstabiilien entsyymien akkumuloituminen sivutuotteina etanolin kanssa fermentoinnin aikana. Parasta näistä, kantaa P2(pCT603T), joka sisälsi
 5 celD:n, käytettiin hydrolysoimaan amorfista selluloosaa sellobioosiksi ja tuottamaan etanolia kaksivaiheisessa prosessissa. Kantaa P2(pCT603T) kokeiltiin myös yhdessä kaupallisten sellulaasien kanssa. Kun SOLKA FLOC SW40:ää esikäsiteltiin 60°C:ssa endoglukanaasi D:llä SOLCA FLOCin fermentoimiseen tarvittava
 10 kaupallisen sellulaasin määrä väheni jopa 80 %. Endoglukanaasi-D-esikäsitteilyn stimuloiva vaikutus saattaa johtua amorfisten alueiden hydrolyysistä, joka saa paljastumaan sienisellulaasien hyökkäykselle alttiita lisäalueita. Koska endoglukanaasi D toimii osana kompleksia *C. thermocellum*issa on mahdollista, että tämä entsyymi voi kompleksoitua sienientsyymien
 15 kanssa tai sitoa selluloosaa ja muodostaa avoimemman rakenteen hydrolyysiin.

Esimerkki 17 osoitti edut, joita saadaan kun *Clostridium thermocellum* -ksylanaasi akkumuloituu intrasellulaarisesti *K. oxytoca* M5A1:ssä etanolin sivutuotteena. Tässä esimerkissä tämän
 20 keksinnön tekijät ovat integroineet etanolituottogeenejä *K. oxytoca* kantaan M5A1 ja osoittaneet, että saatava organismi tehokkaasti konvertoi sellobioosia etanoliksi. Tämä organismi näyttää kykenevän kuljettamaan ja metaboloimaan sekä sellobioosia että sellotrioosia, jolloin heterologista β -glukosidaasia ei tarvita. Tähän integroituun rakenteeseen lisätyt plasmidit mahdollistivat lämpöstabiilien endoglukanaasien tuoton sivutuotteena etanolin kanssa, jolloin tarve käyttää kaupallisia
 25 sellulaaseja selluloosan fermentoinnissa väheni.

Organismit ja kasvuolosuhteet: Taulukko 15 luettelee uudet organismit ja plasmidit, joita tässä kokeessa käytettiin. Etanologeenisiä kantoja sisältävät geenit pidettiin Luria-agarissa,
 30 joka sisälsi 2 % glukosia (3), muut kannat pidettiin Luria-agarissa, johon ei ollut lisätty sokeria. Ellei muuta mainita,

selektoinnissa käytettiin kloramfenikolia (20 µg/ml), tetrasykliiniä (6 µg/ml) ja ampisilliinia (50 µg/ml). Tavalliseseen tapaan *E. coli* -kantoja kasvatettiin 37°C:ssa ja *K. oxytoca* -kantoja 30°C:ssa. *Z. mobiliksen* etanologeenisen operonin ekspressiota seurattiin värimuodostuksen nopeudesta aldehydi-indikaattorialustalla (Conway et al, J. Bacteriol. 169:2591-2597, 1987). Pesäkkeistä etsittiin sellulaasiaktiviteettia inkuboimalla 1-2 tuntia 55°C:ssa Luria-agarilla, joka sisälsi karboksimeytyyliselluloosaa ja värjäämällä sitten Congo Red -värillä

5

10 (Wood et al, Meth. Enzymol. 160:59-74, 1988).



Taulukko 15

Tässä kokeessa käytetyt bakteerikannat ja plasmidit

5	Bakteerikanta/ plasmidi	Ominaispiirteet	Referenssilähde
10	<u>kannat</u>		
	K. Oxytoca M5A1 (pLOI555)	Cm ^r , pet ^b	Esimerkki 15
15	S1	Cm ^r , Ipet ^a	tämä esimerkki
	S2	Cm ^r , Ipet ^a	tämä esimerkki
	S3	Cm ^r , Ipet ^a	tämä esimerkki
20	P1	Cm ^r , Ipet ^a	tämä esimerkki
	P2	Cm ^r , Ipet ^a	tämä esimerkki
25	P3	Cm ^r , Ipet ^a	tämä esimerkki
	<u>plasmidit</u>		
30	pCOS2EMBL	Tc ^r	Poustka et al ^c
	pLOI510	Cm ^r pet ^b	Ohta et al ^d
35	pCT105	Ap ^r celA ⁺	Cornet et al ^e
	pCT207	Ap ^r celB ⁺	Jeffries ^f
	pCT301	Ap ^r Tc ^r celC ⁺	Petre et al ^g
40	pCT603	Ap ^r Tc ^r celD ⁺	Joliff et al ^h
	pCT105T	Apr Tc ^r celA ⁺	tämä esimerkki
45	pCT207T	Apr Tc ^r celB ⁺	tämä esimerkki
	pCT603T	Apr Tc ^r celD ⁺	tämä esimerkki
50			

^a Ipet tarkoittaa *Z. mobilis* pdc- ja adhB-geenien integrointia kromosomiin

^b pet tarkoittaa *Z. mobilis* pdc- ja adhB-geenien läsnäoloa plasmidissa pLOI555

^c Poustka et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4129-4133, 1984

10 ^d Ohta et al, Appl. Environ. Microbiol. 57:2810-2815, 1991

^e Cornet et al, Bio/Technology 1:589-594

15 ^f Jeffries: J. F. Kennedy et al, (ed), Wood and Cellulosics: Industrial utilization, biotechnology, structure and properties. John Wiley & Sons, New York, 1988

^g Petre et al, Biochimie 68:687-695, 1986

20

^h Joliff et al, Bio/Technology 4:896-900, 1983

Geneettiset menetelmät ja plasmidin kokoaminen:

25 Käytettiin standardinomaisia geneettisiä menetelmiä. Pet-geenien integrointi kantaan M5A1 tehtiin transformoimalla soluja rengasmaiseksi tehdyllä DNA:lla (jossa ei ollut lainkaan replikaatiofunktioita), joka sisälsi kolme pääelementtiä: 1) *E. coli* pfl -geeni tai M5A1-DNA, 2) *Z. mobilis* -pet-geenit, 3) cat-geenin selektiota varten. Rekombinantit valittiin alunperin käyttämällä 20 µg kloramfenikolia/ml ja ne ekspressoivat pieniä määriä *Z. mobilis* -entsyymejä. Kuten *E. coli*lla (Ohta et al, Appl. Environ. Microbiol. 57:893-900, 1991) ekspressoitumista kiihdytettiin selektoimalla suoraan mutantteja, joiden resistenssi oli 600 µg kloramfenikolia/ml. Jokaista erillistä integrointitapahtumaa varten säilytettiin yksi suurta resistensitasoa ilmentävä kloni.

Lisättiin tetrasykliiniresistenssi plasmideille, jotka sisälsivät celA:n (pCT105), celB:n (pCT207) ja celD:n (pCT603). Plasmidit pCT105 ja pCT207 hajotettiin BamHI:lla ja käsiteltiin sitten *E. coli*in DNA-polymeraasin Klenowin fragmentilla tasaisen päiden aikaan saamiseksi. Plasmidi pBR322 hajotettiin Eco-

RI:lla ja käsiteltiin samaan tapaan tasaisten päiden aikaan saamiseksi. Sitten kaikki kolme plasmidia hajotettiin SalI:-llä. Saatu pieni fragmentti pBR322:sta, joka sisälsi tet:n 5'-pään ligatoitiin suurempiin fragmentteihin pCT105:stä ja

5 pCT207:stä funktionaalisen tet-geenin reformoimiseksi (aiemmin inaktivoitu insertoimalla *C. thermocellum* -DNA), nimitykset pCT105T ja pCT207T. Täydellisen geenin sisältävä 2,5 kbp:n EcoRI-fragmentti pCOS2EMBL:stä (Poustka et al, supra) insertoitiin uniikkiin EcoRI:iin pCT603:ssa ja saatiin pCT603T.

10 pCT301:tä ei jouduttu modifioimaan, koska tämä plasmidi sisälsi funktionaaliset tet-geenin *celC*:n lisäksi. Kaikki sellulaasin sisältävät plasmidit transformoitiin rekombinanttiin *K. oxytoca*an tetrasykliiniresistenssiä selektoiden.

15 **Sellulaasiaktiviteetti:** Endoglukanaasiaktiviteetti määritettiin soluista plus liemenstä sekä liemestä yksin 60 °C:ssa p-nitrofenyyli-β-D-sellobiosidi substraattina (Petre et al, supra). Arvioitiin myös endoglukanaasi D -aktiviteetti amorfisesta selluloosasta vapautuvina pelkistyvinä sokereina. Amorfinen sel-

20 luloosa (happoturvonnut ja emästurvonnut) valmistettiin SOLKA FLOC SW40:stä kuten aiemmin on kuvannut Avicel (Wood, Meth.

Enzymol. 160:19-25, 1988). Pelkistyneet sokerit mitattiin Nelson-Somogyi -menetelmällä (Bergmeyer et al, pp. 151-152, Bergmeyer H.U. (ed), Methods of enzymatic analysis, vol. II, 3rd edition, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1983). Amorfisen selluloosan lähtöpitoisuudet arvioitiin kokonaishiilihydraattina fenolirikkihappomenetelmällä (Wood, Meth. Enzymol. 160:87-116, 1988).

30 Endoglukanaasiaktiviteetteja verrattiin myös etanologeenisten *cel*⁺-rekombinanttien kesken panemalla 18 mm x 150 mm viljelykoeputkiin, jotka sisälsivät noin 15 ml Luria-lientä vahvistetuna 10 % matalaviskoottista karboksimeetyyliselluloosaa (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.) 2 ml stationaarifaasiviljelmää. Kun oli inkuboitu 48 tuntia 55 °C:ssa nesteytymistä arvioitiin inversiolla.

Selluloosahajotustuotteita analysoitiin ohutkerroskromatografian avulla aiemmin ksylosidien ja ksylaanin hajotuksen yhteydessä kuvattuun tapaan (Domer et al, Meth. Enzymol. 160:355-362, 1988). Glukoosi, sellobioosi ja sellotrioosi erotettiin oligo-
5 meereistä. Sellobioosi ja glukoosi toimivat vertailukohteina.

Fermentointikokeet: Fermentoinnit toteutettiin 500 ml:n Fleaker-astioissa, jotka toimivat pH-staatteina (350 ml työskentelytilavuus), olennaisesti tavalla, jota on aiemmin kuvattu
10 (Beall et al, supra). Luria-lientä, joka sisälsi 10 % glukosia tai 10 % sellobioosia testattiin 30 °C:ssa, pH 6,0, 100 rpm. Fermentoinni-inokulaatteja kasvatettiin 30°C:ssa ravistelemattomissa 250 ml:n pulloissa, jotka sisälsivät 50 ml Luria-lientä (4 % glukosia). Sekoittamisen jälkeen solutiheydet
15 mitattiin 550 nm:ssa ja käytettiin laskettaessa tilavuus, joka tarvittiin lähtötiheyteen 0,32 mg solukuivapaino/ml (OD 550 nm:ssa 1,0). Solut harvestoitiin tästä tilavuudesta sentrifugoimalla ja uudelleensuspensoitiin osaan lientä jokaisesta pH-staatista fermentoinnin aloittamiseksi.

20

2 Selluloosafermentoinnit sisälsivät 50 g/litra SOLKA FLOC SW40:ää (James River Corporation, Saddle Brook, NJ) ja ne suoritettiin 35°C:ssa. Selluloosa steriloidtiin autoklavoimalla kuivana jauheena. Tutkittaessa selluloosafermentointia kaupallisilla entsyymeillä inokulointiaikaan lisättiin SYTOLASEa tai
25 MULTIFECTia.

Näytteet otettiin solumassan (OD 550 nm) ja etanolin (kaasunestekromatografia, Beall et al, supra) määrittämiseksi. Etanolipitoisuudet on ilmoitettu g/litra. Etanolisaannot korjattiin
30 fermentoinnin aikana lisätyn emäksen laimennoksella ja laskettiin alunperin läsnä olleen sokerin tai selluloosan kokonaismäärän perusteella. Jäämähiilihydraattien vuoksi ei korjauksia tehty. Maksimaaliset teoreettiset saannot glykolyysistä ja
35 fermentoinnista ovat 0,51 g etanolia/g glukosia, 0,536 g etanolia/g sellobioosia ja 0,56 g etanolia/ g selluloosaa. Ellei

muuta mainita, tulokset on ilmoitettu keskimääränä 2 tai useammasta fermentoinnista.

Kaupalliset sellulaasit:

Tutkittiin kahta kaupallista sellulaasia, CYTOPLASE M104 ja MULTIFECT CL (Genecor International, Rolling Meadows, IL).

Molemmat toimitetaan nesteinä, oletettavasti ominaisuuksiltaan parannetun *Trichoderma longibranchiatum* -mutantin lihalie mistä. Molemmat kuvataan seokseksi, joka sisältää pektinaaseja, sellulaaseja ja hemisellulaaseja. Näitä entsyymivalmisteita optimoidaan yleisesti ruoan prosessointiin.

10 Z. mobiliksen pet-geenien kromosomaalinen integrointi M5A1:een:

Pet-geenien kromosomaalisessa integroinnissa M5A1:een käytettiin kolmea lähestymistapaa (Orsov, p. 461-465 teoksessa N.R. Kreig and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 1984) Koska *K. oxytoca* ja *E. coli* ovat läheisesti sukua toisilleen *E. coli* n pfl-geeniä käytettiin potentiaalisena homologisen DNA:n lähteenä edistämään rekombinaatiota, joka suoritettiin samaan tapaan kuin *E. coli* lla (Ohta et al, *Appl. Environ. Microbiol.* 57:893-900). Puhdistettiin 8,6 kbp:n

Sall-fragmentit pLOI510:stä, joka sisälsi pet-geenit ja cat:n *E. coli* n pfl-geenissä. Tämä fragmentti (jossa ei ollut replikointiin osallistuvia geenejä) muovattiin renkaaksi ligatoimalla ja transformoitiin M5A1:een suoran integrointiselektion mahdollistamiseksi. Lyhyempää 5 kbp:n PstI-fragmenttia, joka sisälsi vain pienen määrän sivuavaa *E. coli* pfl:ää käytettiin samaan tapaan. Kolmannessa lähestymistavassa homologinen *K.*

oxytoca M5A1 DNA (2 kbp:n satunnais-Sau3A-fragmentit) ligatoitiin 4,6 kbp:n BamHI-fragmenttiin, joka sisälsi vain pet-geenit cat:ssa (ei *E. coli* -DNA:ta) ja käytettiin transformointiin.

Integroituja kantoja otettiin kaikista kolmesta lähestymistavasta selektoimalla Luria-liemialustoille, jotka sisälsivät 2 % glukoosia ja 20 µg Cm/ml. Kolme integroitua kloonia otettiin talteen Sall-fragmentilla, kaksi PStI-fragmentilla ja yksi BamHI-fragmentilla.

Yli yön jatkuneen kasvatuksen jälkeen nestevijelyssä lisättiin 0,1 ml stationaarifaasisoluja alustoille, jotka sisälsivät 600 μg Cm/ml ja 2 % glukoosia selektoimaan korkean tason ekspressoitumista. Säilytettiin yksittäisiä suuria pesäkkeitä jokai-

5 sesta itsenäisestä integraatiotapahtumasta ja nimitettiin kokoa-

miseen käytetyn restriktiokohdan mukaisesti: S1, S2, S3, P1, P2, P3. Näistä pesäkkeistä tutkittiin plasmidien läsnäoloa miniseulonta-DNA-transformaatiolla ja pet-geenien ekspressiota aldehydi-indikaattorialustoilla (taulukko 16). Otaksutut in-

10 tegroidut kannat, joiden havaittiin sisältävän plasmidisyntyi-

siä cat-geenejä heitettiin pois miniseulonta-DNA-hajotuksen jälkeen, jolla vahvistettiin pLOI510:n läsnäolo (oletettavasti geelipuhdistettujen fragmenttien matalan tason kontaminantti) Emo-organismi ja M5A1(pLOI555), erinomainen etanolituottaja,

15 lisättiin negatiivisina ja positiivisina verrokkeina. Kaksi klooneista ekspressoi etanoligeenejä tasolla, joka oli lähes sama kuin M5A1(pLOI555):llä, kannat B1 ja P2.



Taulukko 16

Fermentointi 10 % glukoosilla (48 tuntia) M5A1-kannoilla, jotka sisälsivät integroituja pet-geenejä

5

10	Kanta ^a	Emäs (mM/l)	Solumassa ^b (g/l)	Etanoli (g/l)	Aldehydi- alustat ^c	Plasmidi ^d
15	M5A1	108	3,2	15	-	-
	M5A1(pLOI555)	91	5,1	45	++++	+
20	S1	120	2,9	37	+	-
	S2	171	3,2	44	++	-
25	S3	97	2,4	37	++	-
	P1	120	2,0	38	++	-
	P2	91	3,7	44	+++	-
30	B1	63	4,0	47	++++	-

35 ^aIlmoitetut arvot ovat yhdestä kokeesta, vaikka monet suoritettiin uudestaan ja arvioitiin keskimäärin myöhemmissä tutkimuksissa

40 ^bSolumassa laskettiin maksimaalisesta OD:sta 550 nm:ssa (noin 0,32 g kuivapaino/litraa per OD-yksikkö)

45 ^cPet-operonin ekspression suhteellisena mittana käytettiin komparatiivista värikehitystä aldehydi-indikaattorialustoilla 30°C:ssa

^dPienimuotisia DNA-preparaatteja tutkittiin agaroosiuppogeeleillä ja testattiin niiden kykyä siirtää antibioottiresistenssiä E. coli DHα:aan transformoinnin aikana

Glukoosifermentoinnin vertailu M5A1(pLOI555):een integroiduilla kannoilla: 48 tunnin kuluttua suuria määriä etanolielkvivalenttia M5A1(pLOI555):lle tuotettiin 4 kannalla, joissa oli pet-integroinnit (taulukko 16). Ne kaksi, jotka tuottivat pienim-
 5 mät määrät happamia sivutuotteita kasvoivat myös suurimpaan tiheyteen. Nämä kannat, P2 ja B1, valittiin edelleen tutkittaviksi.

Glukoosi- ja sellobioosifermentointi kannoilla P2 ja B1:

- 10 Kannoista P2 ja B1 tutkittiin niiden kykyä fermentoida 10 % glukoosia ja 10 % sellobioosia (taulukko 17). Glukoosifermentoinnin aikana (kuvio 11A) molemmat integroidut kannat tuottivat 3 kertaa enemmän etanolia kuin emo-organismi, M5A1, mutta saanto ja volumetrinen tuottavuus olivat hieman pienemmät kuin
 15 M5A1(pLOI555):llä (plasmidisyntyyiset pet-geenit). Odottamattomasti integrointia ja korkean tason pet-geeniekspressiota kannassa B1 seurasi sellobioosifermentointikyvyn menetys. Kanta P2 kasvoi kuitenkin hyvin ja tuotti etnolia sellobioosista (kuvio 11B) 96 % maksimaalisesta teoreettisesta saannosta. Kanta
 20 P2 talletettiin 11.3.1992 numerolla ATCC 55307.

Kuviot 11A ja 11B kuvaavat siis etanolituottoa *K. oxytoca* M5A1 -rekombinanttikannoilla. Kuvio 11A kuvaa tuottoa glukoo-
 25 sista (100 g/l). Symbolit: ● kanta M5A1(pLOI555), ▲ integroi-
 tuja pet-geenejä sisältävä kanta P2, ■ integroituja pet-geenejä sisältävä kanta B1, ○ M5A1-verrokki. Kuvio 11B kuvaa tuottoa sellobioosista (100 g/l) fermentaatiosta kannalla P2. Symbo-
 lit: ▲ etanoli, Δ solumassa.

Taulukko 17

Etanolituotto *K. oxytoca* M5A1- ja *E. coli* KO11- rekombinantti-
kannoilla.

5	Organismi ^a	Substraatti	Lisäaineet ^b	Volumetrinen tuotto (g/litra/h)	Maks EtOH (g/litra)	Saanto (g/g S)	% teoreett. saannosta
	M5A1	10% glukoosia	ei lainkaan	0,72	16,2	0,17	33
	M5A1(pLOI555)	"	"	2,1	48,0	0,50	99
	P2	"		1,6	46,4	0,46	90
	B1	"	"	1,5	47,6	0,49	96
10	P2	10% sellobi- oosia	"	1,5	45,2	0,49	96
	B1	"	"	0,1	1,2	0,01	2
	P2(pCT1057)	10% glukoosia	"	0,13	16,0	0,17	33
	P2(pCT301)	"	"	0,58	19,4	0,20	40
	P2(pCT603T)	"	"	0,83	30,0	0,32	62
1,5	P2	ei lainkaan	"	0,04	1,0	-	-
	P2	ei lainkaan	10% CYTOLASE	0,12	4,7	-	-
	P2	ei lainkaan	10% MULTIFECT	0,06	5,2	-	-
	P2	5% SOLKA FLOC SW40	ei entsyymiä	0,05	2,0	0,04	8
	P2(pCT603T) ^f	"	1,0% CYTOLASE	0,09	17,4	0,36	65
20	P2(pCT603T) ^f	"	1,0% MULTIF.	0,16	17,4	0,36	65
	P2	5% SOLKA FLOC SW40	0,1% CYTOLASE	0,08	2,3	0,07	12
	P2	"	0,5% CYTOLASE	0,13	7,0	0,14	26

5	P2	"	1,0% CYTOLASE	0,18	8,7	0,18	32
	P2	"	5,0% CYTOLASE	0,52	16,9	0,36	64
	P2	"	10% CYTOLASE	0,50	16,3	0,35	62
	P2	5% SOLKA FLOC SW40	0,1% MULTIF.	0,08	3,3	0,07	12
	P2	"	0,5% MULTIF.	0,18	5,9	0,13	23
10	P2	"	1,0% MULTIF.	0,36	10,4	0,23	41
	P2	"	5,0 MULTIF.	0,76	23,8	0,51	92
	P2	"	10% MULTIFECT	0,86	32,5	0,69	123
	K011	5% SOLKA FLOC SW40	0,1% CYTOLASE	0,05	1,8	0,04	7
	K011	"	0,5% CYTOLASE	0,08	5,1	0,11	19
15	K011	"	1,0% CYTOLASE	0,13	6,2	0,13	23
	K011	"	5,0% CYTOLASE	0,51	14,7	0,31	56
	K011	"	10% CYTOLASE	0,32	8,0	0,17	30
	K011	5% SOLKA FLOC SW40	0,1% MULTIF.	0,06	2,2	0,05	8
	K011	"	0,5% MULTIF.	0,08	2,7	0,06	10
20	K011	"	1,0% MULTIF.	0,18	5,6	0,12	21
	K011	"	5,0% MULTIF.	0,43	20,6	0,43	76
	K011	"	10% MULTIF.	0,84	30,7	0,63	112

^aGlukoosi- ja sellobioosifermentointi suoritettiin 30°C:ssa, muut fermentoinnit 35°C:ssa.

^bEntsyymit lisättiin inokuloinnin aikaan.

^cLaskettu aikavälille 6-24 tuntia.

^d Korjattu lainennusta varten enäslisäyksellä fermentoinnin aikana. S (substraatti) tarkoittaa glukoosia, seloobioosia tai SOLKA FLOC SW40:ää.

^e Perustuu maksimaaliseen teoreettiseen saantoon 51 g etanolia/100 g glukoosia, 53,5 g etanolia/100 g sellobioosia ja 28 g etanolia/50 g selluloosaa. Arvoja ei korjattu jäämasubstraatin suhteen.

- 5 ^f SOLKA FLOC SW40 hajotettiin etukäteen 60°C:ssa 12 h soluilla, jotka oli harvestoitu aiemmista fermentoinneista lähteenä *C. thermocellum* celd. Kun liemi oli jäähdytetty 35°C:een se inokuloitiin ja fermentoinnin aloittamiseksi lisättiin 1 ml kaupallista sellulaasia/100 ml fermentaatiotilavuus.

10 Kiteisen selluloosan fermentoinnin (SOLKA FLOC SW40) rekombinantilla *K. oxytoca* M5A1:llä vertaaminen *E. coli*in kun läsnä on erilaisia pitoisuuksia kaupallisia sellulaaseja:

Toisin kuin etanologeeninen *E. coli*, joka käyttää vain glukosia, rekombinantti *K. oxytoca* P2 pystyy fermentoimaan sellobio-

- 15 oosia, eikä se tarvitse eksogeenistä β -glukosidaasia selluloosafermentoinnin aikana. Tutkittaessa missä määrin sellobioosin käyttö parantaa etanolituotta selluloosasta kaupallisten entsyymien avulla fermentoinnit suoritettiin käyttämällä 50 g SOLKA FLOC SW40:ää substraattina kun läsnä oli joko CYTOLASEa
20 tai MULTIFECTia pitoisuuksilla 0-10 % (kuvio 12, taulukko 17).

30 Nämä valmisteet sisältävät seoksen sienientsyymejä, endoglukanaaseja, eksoglukanaaseja ja β -glukosidaaseja.

Kuvio 12 kuvaa siis kaupallisten sellulaasien lisäyksen vaikutusta etanolisaantoon käytettäessä 50 g SOLKA FLOC SW40:ää, 120
25 tunnin kuluttua. Katkoviiva osoittaa maksimimäärää etanolia, joka voidaan saada vain lisäystä selluloosasta. Suuremmat etanolimäärät johtuvat lähinnä lisäsubstraatista, jota lisättiin MULTIFECT CL -preparaatin ominaisuuksia parantamaan. Sym-
30 bolit: Δ fermentoitu *K. oxytoca* P2:lla ja MULTIFECTillä, ■ fermentoitu kannalla *E. coli* KO11 ja MULTIFECTillä, Δ fermentoitu *K. oxytoca* P2:lla ja CYTOLASElla, □ fermentoitu *E. coli* KO11:llä ja CYTOLASElla.

35 Pienillä pitoisuuksilla CYTOLASE näytti tehokkaammalta, vaikka tämän entsyymivalmisteen suurempiin pitoisuuksiin liittyikin

jonkin verran toksisuutta. Kaikissa tapauksissa oli intergoidun *K. oxytoca* -kannan suoritus parempi kuin *E. coli* KO11:llä huolimatta β -glukosidaasin läsnäolosta kaupallisissa sellullaasivalmismisteissa. Yhdessä nämä tulokset viittaavat siihen, että 225-glukosidaasiaktiviteetti kaupallisissa sellulaasivalmisteissa ei ehkä ole tyydyttävä suhteessa muihin sellulaasiaktiviteetteihin.

Suurimmilla MULTIFECT-pitoisuuksissa oli havaittavissa teoreettista maksimiarvoa 50 g selluloosaa/l suurempia saantoja. Tämä lisäetanolin lähde tutkittiin suorittamalla fermentointeja Luria-lihaliemessä ilman lisättyä hiilihydraattia tai entsyymejä sekä Luria-lihaliemessä, joka sisälsi 10 % CYTOLASEa tai 10 % MULTIFECTia, mutta ei lisättyä hiilihydraattia. Noin 1 g etanolia/litra muodostui pelkästä Luria-liemestä ja 5 g etanolia/litra Luria-liemestä, joka sisälsi 10 % lisättyä sellulaasia. Näin ollen 10 % MULTIFECTia sisältävistä fermentaatioista noin 4 g etanolia/litra voidaan katsoa johtuvan kaupallisten lisäaineiden tai entsyymien stabiloivien aineiden fermentaatiosta. On todennäköistä, että suhteellisia etanolimääriä muodostui myös pienemmistä sellulaasipitoisuuksista. Kun on tehty korjaukset etanolista, joka saattaa olla syntynyt Luria-liemen aineosista ja 10 % MULTIFECTista etanolisaannot selluloosasta ovat noin 94 % teoreettisesta maksimista.

***C. thermocellum* -sellulaasien ekspressio kannassa P2:** Sellobi-
oosia voidaan fermentoida kannalla P2 ja se on dominoiva tuote selluloosahajotuksesta endoglukanaaseilla ja eksoglukanaaseilla. Vaikka kumpaakaan entsyymia ei muodostu meidän organismisamme pet-geenien integraatio kromosomiin edesauttaa heterologisia geenejä koodaavien plasmidien integrointia näiden entsyymien tuottamiseksi sivutuotteina fermentoinnin aikana. Neljän endoglukanaasin ekspressiota termofiilisessä *Clostridium thermocellum*issa tutkittiin kun oli lisätty tetrasykliiniresistenssi selektiota varten (taulukko 18). *CelD*-geeni oli ekspressoitunut erittäin korkealla tasolla *E. coli*ssa ja korkealla tasolla kan-

nassa P2. Suurin osa näissä geeneissä tuotetuista endoglukanaasiaktiiviteeteista pysyivät näissä soluissa, vaikka Klebsiella-kannoissa tiedetään olevan proteiinierityssysteemejä ja mahdollisuus osittaiseen erittymiseen ei ollut eliminoitu.

5

Kvalitatiivinen tehokkuusvertailu CMC-nesteytyksessä suoritettiin viljelykoeputkissa 48 tunnin inkuboinnilla 55°C:ssa. Samoin kuin aktiiviteettimittauksissa tehokkaimpia olivat rekombinantit solut, joissa oli celD (pCT603T), sitten sellaiset, joissa oli celC (pCT301). Kanta P2, jossa oli celB (pCT207T), kasvoi erittäin huonosti eikä sitä testattu enempää. CelA (pCT105T) -rekombinantit saivat vähän nesteyttämistä aikaan.

Tutkittiin myös heterologisten geenituotteiden tuottamisen vaikutusta fermentointikykyyn. Kun lisättiin plasmideja, jotka ekspressoivat mitä tahansa cel-geeniä vähensivät lopullinen solutiheys 10-prosenttiseissa glukoosifermentoinneissa väheni 10-30 % ja etanolisaatio pieneni (taulukko 18). CelD-geenin ekspressio oli vähiten vahingollinen kun etanolisaatio oli 0,32 g etanolia per g glukoosia, 62 % teoreettisesta maksimista.

Koeet suoritettiin 60°C:ssa p-nitrofenyyli-β-D-sellobiosidi substraattina. Yksiköt ovat hydrolysoituneita μmooleja per min per ml fermentointilientä, joka sisältää soluja tai lientä, josta solut on poistettu sentrifugoimalla.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Taulukko 18

C. thermocellum -endoglukanaasigeenien ekspressio kannassa P2

5	Geeni	Plasmidi	aktiviteetti (U/ml)		
			solut+liemi	liemi	% soluliitt.
	verrokki	ei	0,2	-	-
10	celA	pCT105T	2,3	0,4	83
	celB	pCT207T	17	0,8	95
	celC	pCT301	41	6,2	85
	celD	pCT603T	49	13	73

15

Amorfisen selluloosan hydrolyysi ja fermentointi celD:tä ekspressoivalla kannalla P2: Vaikka celD-geenituote ei hydrolysoitu kiteisessä selluloosassa, tämän entsyymin on aiemmin osoitettu hydrolysoivan amorfista selluloosaa (Bèguin et, Joliff et al, supra). Tätä geeniä ekspressoivasta kannasta P2(pCT603T) tutkittiin kuinka se konvertoi amorfista selluloosaa etanoliksi. Fosforihappo- ja emästurvonnutta (natriumhydroksidi) SOLKA FLOC SW42:ää testattiin kaksivaiheisella eräprosessilla käyttämällä P2(pCT603T)-soluja aiemmista fermentoinneista endoglukanaasi D -lähteenä ja samaa organisia etanolituottoon.

Ensimmäisessä vaiheessa inkuboitiin 3 ml Luria-lientä, joka sisälsi 76 mg/ml happoturvonnutta selluloosaa tai 32 mg/ml emästurvonnutta selluloosaa 60°C:ssa (pH 6,0) 72 tuntia soluja, jotka oli harvestoitu ekvivalentista tilavuudesta aiemmasta glukosifermentoinnista. Kuumennus 60°C:een inaktivoi solut vapauttamaan endoglukanaasia D ja saa aikaan lähes optimaalisen lämpötilan aktiviteettia ajatellen. Pelkistyvien sokereiden vapautumista mitattiin hydrolyysin aikana. Vaikka substraat-

tipitoisuudet olivat erilaiset happoturvonnut selluloosaa hydrolysoitui kaksinkertaisella nopeudella emästurvonneeseen selluloosaan verrattuna, 240 μ molaarista ja 60 μ molaarista sellobioosiekvivalenttia 24 tunnin kuluttua. Happoturvonnut selluloosa tuli melko viskoottiseksi, mikä vaikeutti näytteiden ottoa. 72 tunnin kuluttua läsnä oli 110 μ molaarista sellobioosiekvivalenttia emästurvonneen selluloosan hajotukseksessa. Nämä saannot kertovat lähes täydellisestä hydrolyysistä sekä happo-

10

Kuvioissa 13A, B ja C verrataan ohutkerroskromatografia-analyysien tuloksia selluloosahydrolyysistä ja fermentaatiosta P2(pCT603T):llä. Testattiin happoturvonnutta selluloosaa (13A), emästurvonnutta selluloosaa (kuvio 13B) ja kiteistä selluloosaa (kuvio 13C ; SOLKA FLOC SW40). Sellobioosia ja glukosia käytettiin vertailukohteena kromatogrammien vyöhykkeillä 1. Kuvioissa 13A ja B vyöhykkeet 2-6 edustavat näytteitä, jotka on otettu eri aikoina amorfisen selluloosan hydrolyysin aikana (0, 6, 12, 24, 48 ja 72 tuntia). Vyöhyke 7 on vyöhykkeessä 6 analysoitu liemi 24 tunnin fermentoinnin jälkeen

30°C:ssa kannalla P2(pCT603T).

Kuviossa 13C on ohutkerroskromatografia-analyysi kiteisen selluloosan (SOLKA FLOC SW40) fermentoinnista 1 % MULTIFECTin ja C. thermocellum celd:tä ekspressoivan P2(pCT603T):n kanssa. Vyöhykkeiden koostumukset ovat: 2, SOLKA FLOC -suspensio juuri ennen hajottamista, 3, liemi 24 tuntia hajotuksen jälkeen 60°C:ssa endoglukanaasi D:llä, johon oli lisätty P2(pCT603T) aiemmasta fermentoinnista, 4, vyöhykkeen 3 liemi 24 tunnin fermentoinnin jälkeen 35°C:ssa P2(pCT603T):llä, 5, vielä 24 tunnin fermentoinnin jälkeen P2(pCT603T):llä 35°C:ssa (kokonaisfermentointi 48 tuntia).

Vyöhykkeet 2-6 kuvioissa 13A ja 13B kertovat selluloosahajotustuotteista eri aikoina happoturvonneesta ja emästurvonneesta selluloosasta. Sellobioosi on päätuote molemmissa, glukosi-

määrä oli pieni. Happoturvoneen selluloosan hajotuksissa oli läsnä myös pieniä määriä sellotrioosia. Kun oli suoritettu jäähdytys 35°C:een liemiä inokuloitiin 50 µlitralla P2- (pCT603T):tä ja annettiin fermentoitua sekoittamatta ja ilman pH-säätelyä 24 tuntia. Tämän jakson aikana glukoosi, sellobi-
 5 oosi ja sellotrioosi poistuivat täydellisesti (kuvio 13A & B, vyöhyke 7) tuoton ollessa noin 5 g etanolia/litra. Emästurvo-
 neesta selluloosasta saatiin 0,16 g etanolia/g selluloosaa. Vaikka pH:n aleneminen todennäköisesti rajoitti etanolituotto-
 10 määriä tämä etanolisaanto on 27 % teoreettisesta maksimista.

Kaupallisen sellulaasin osittainen korvaaminen endogeenisellä C. thermocellum -endoglukanaasin tuottamisella: Vaikka P2- (pCT603T) ei tarvitse eksternaalisesti lisättyä β-glukosidaasia
 15 ja se pystyy saamaan aikaan endoglukanaasi D:tä, joka hydro-
 lysoi amorfista selluloosaa, kiteisen selluloosan hydrolysoin-
 tiin tarvitaan lisäaktiviteetteja. Tämän kannan kykyä ositain
 korvata kaupallisen sellulaasin tarvetta kokeiltiin kaksivai-
 heisella fermentointiprosessilla. Aiemmistä glukoosifermen-
 20 toinneista harvestoituja soluja uudelleensuspensioitiin ekviva-
 :.. lenttiin tilavuuteen Luria-lientä, joka sisälsi 50 g SOLKA FLOC
 :.. SW40/litra ja inkuboitiin 60°C:ssa 24 tuntia. Kun oli suori-
 :.. tettu jäähdytys 35°C:een fermentaatiot inokuloitiin samalla or-
 :.. ganismilla 1-prosenttisen kaupallisen sellulaasin kanssa. Sa-
 :.. 25 manlaisia tuloksia saatiin sekä CYTOLASElla että MULTIFECTil-
 :.. lä, 17,4 g etanolia/litra, 65 % maksimaalisesta teoreettisesta
 :.. saannosta (taulukko 17).

:.. Kuten kuvio 14 kuvaa CYTOLASEn kohdalla esikäsittely celD-gee-
 :.. 30 nituotteella paransi huomattavasti etanolituottoa käytettäessä
 :.. 1-prosenttista sellulaasia etanolisaannon ollessa vastaava kuin
 :.. 5-prosenttisella CYTOLASElla. Kuviossa 14 selluloosa (50 g
 :.. SOLKA FLOC SW40/litra) sakkarifioitui epätäydellisesti CYTOLA-
 :.. Sella ja endoglukaanasilla D ja fermentoituna kannoilla P2 ja
 :.. 35 P2(pCT603T). Symbolit: Δ 5 ml CYTOLASEa lisätty per 100 ml
 :.. lientä inokuloinnin ja P2-fermentoinnin aikana, □ 1 ml CYTO-

LASEa lisätty per 100 ml lientä inokuloinnin ja P2-fermentoinnin aikana, O 0,1 ml CYTOLASEa lisätty per 100 ml lientä inokuloinnin ja P2-fermentoinnin aikana, ■ SOLKA FLOC esihajotettu 60°C:ssa 12 tuntia aiemmasta fermentoinnista saadut P2-

5 (pCT603T)-solut *C. thermocellum* -endoglukanaasi D -lähteenä ja fermentoitu. Kun liemi oli jäähdytetty 35°C:een se inokuloitiin ja fermentoinnin aloittamiseksi lisättiin 1 ml kaupallista sellulaasia/100 ml fermentaatiolientä ja P2(pCT603T):tä.

10 Kuviossa 13 nähdään ohutkerroskromatografianäytteet eri vaiheissa rinnakkaisesta kaksivaiheisesta fermentoinnista MULTIFECTillä. Taaskin glukoosi, sellobioosi ja sellotrioosi metaboloituivat täydellisesti. Näin sakkarifikaatioon tarvittavan kaupallisen sellulaasin määrä väheni 80 % kun oli suoritettu
15 esikäsitteily rekombinantilla endoglukanaasi D:llä, joka oli muodostunut sivutuotteena etanolin kanssa aiemmassa fermentoinnissa.

Pohdintaa: On tunnettua, että sellobioosin hydrolyysi monomee-

20 riseksi sokeriksi β -glukosidaasilla usein rajoittaa selluloosahajotusta sieniliemillä. β -glukosidaasin aktiviteetti on tavallisesti määrältään vähäisintä ja vähiten stabiilia tehokkaaseen selluloosahydrolyysiin tarvittavista entsyymeistä. Sellobioosin akkumuloituminen sellulaasivaikutuksen tuotteena
25 toimii kompetitiivisena myöhemmän depolymeroinnin inhibiittorina (Eriksson et al, Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, New York, 1990, Jeffries, supra). *K. oxytoca* P2 on ensimmäinen organismi,
jonka on raportoitu nopeasti ja tehokkaasti konvertoivan sellobioosia suuriksi etanolimääriksi.
30

Tämä organismi näyttää kykenevän aktiivisesti kuljettamaan sellobioosia ja sellotrioosia, minimoimaan sellobioosiakkumuloitumisen ja poistamaan tarpeen käyttää eksternaalisia entsyymejä
35 myöhemmässä depolymeroinnissa. Vaikka sellobioosin kuljetus-systeemejä *K. oxytocassa* ei ole tutkittu (Al, J. Biotechnol.

12:79-86, 1989) sille läheistä sukua oleva *E. coli* sisältää geenejä, jotka koodaavat fosfotransferaasikomponentteja ja fosfoglukosidaaseja sellobioosimetabolialla varten, jotka ovat tuntemattomia useimmissa laboratorioikannoissa, mutta toimivat luonnossa (Hall et al, J. Bacteriol. 169:2713-2717, Krickler et al, Genetics 115:419-429, 1987). On todennäköistä, että samantapaiset geenit toimivat *K. oxytocassa* (Al, supra).

Pet-geenien integrointi etanolituottoa varten kromosomiin edisti plasmidisyntyyisten rekombinanttien proteiinien tuottoa etanolin sivutuotteena. Vaikka *C. thermocellum*in sellulaasigeenejä käytettiin esimerkkinä, on mahdollista valmistaa muita arvokkaampiakin rekombinanttituotteita kuten lipaaseja, proteinaaseja, glykohydrolaaseja, eläinhormoneja ja biolääke-
 tuotteita. *C. thermocellum* -sellulaasien tuottamiseen sivutuotteena kannalla P2 liittyi odottamatonta fermentointitehokkuuden vähenemistä. Tämän vähentyneen tehokkuuden syy on tuntematon, vaikka tämän keksinnön tekijät ovat tehneet samantapaisia huomioita etanologeenisesta *E. coli*sta, joka sisältää
*Thermoanaerobium brockii*in pullulanaasigeenin, sekä moniplasmidisista *C. thermocellum* -ksylanaasigeeniä ekspressoivista etanologeenisista *K. oxytocan* rakenteista.

Edellä esiin tuotu esimerkki *K. oxytocasta* on siis perusta entistä paremmalle menetelmälle konvertoida selluloosaa etanoliksi. On tunnettua, että sellobioosi ja sellotrioosi ovat endoglukanaasin ja eksoglukanaasin inhibiittoreita, ja että β -glukosidaasi vastaa näiden oligomeerien konvertoimisesta glukoosimonomeereiksi. Etanologeeniset rekombinantit kuten kanta P2 eivät kuitenkaan vaadi sokerien depolymerointia metabolialla varten, jolloin tarvetta β -glukosidaasille ei ole ja sellulaasien lopputuoteinhibitio sellobioosilla ja sellotrioosilla vähenee. Vielä eräs etu on potentiaalisten kontaminanttien väheneminen, sillä harvemmat organismit pystyvät metaboloimaan sellobioosia tai sellotrioosia verrattuna monomeerisiin glukooseihin. Vertailukohteena *E. coli* K011, jolla ei ole sellobioosikäyttöä *K.*

oxytoca P2:n sellobioosin kuljetus ja metabolointi vähensi kaupallisten entsyymien tarvetta selluloosafermentoinnin aikana.

Kaupallisten sellulaasien tarve väheni vielä käytettäessä lisäendoglukanaaseja, joita muodostuu sivutuotteena fermentoinnin aikana. Tässä suhteessa lämpöstabiilit entsyymit näyttävät erityisen käyttökelpoisilta, sillä ne voidaan helposti harvennoida soluista fermentoinnin jälkeen ja vapauttaa aktiivisessa muodossa yksinkertaisesti nostamalla lämpötila sellaiseen as-
 10 temäärään, jossa ne toimivat parhaiten. SOLKA FLOC SW40:n esikäsittely endoglukanaasi D:llä aiemmasta fermentoinnista vähensi erittäin huomattavasti Genecor-sellulaasien tehokkuutta. Koska endoglukanaasi D on aktiivinen vain selluloosan amorfi-
 15 silla alueilla (Bèguin et al, supra) tämän esikäsittelyn edullinen vaikutus saattaa johtua siitä, että muodostuu uusia hyö-
 käyskohteita kaupallisille sellulaaseille. C. thermocellumissa endoglukanaasi D on osa sellulaasikompleksia (Bèguin et al, supra). On mahdollista, että tämän entsyymin kompleksoituu myös sienientsyymien kanssa tai sitoo selluloosaa ja edesauttaa sel-
 20 luloosarakenteen avautumista hydrolyysissä.

Paras rakenne selluloosan fermentoinnissa etanoliksi, p2(pCT603T), ei ole yhtä tehokas kuin natiivi C. thermocellum (Tailliez et al, Appl. Environ. Microbiol. 55:203-211, 1989).
 25 Toisin kuin C. thermocellumilla K. oxytoca p2(pCT603T):lla ei ole täydellistä sellulaasisysteemiä. Kuitenkin yhdessä 1-prosenttisen kaupallisen CYTOLASEn tai MULTIFECTin kanssa p2-(pCT603T) antoi paremmat saannot ja lopulliset etanolipitoisuudet 35°C:ssa kuin etanolitolerantit C. thermocellum -mutantit 65°C:ssa. Geneettiset parantelut tai prosessien parannukset saattavat olla toivottuja.

Esimerkki 19

Etanolin tuottaminen tärkkelyksestä rekombinantilla Escherichia
 35 colilla, joka sisältää kromosomaalisesti integroituja Z. mobi-

lis -geenejä etanolituottoa varten ja lämpöstabiileja geenejä
ekspressoivia plasmideja sakkarififikaatiota varten

Esimerkin tiivistelmä: On kehitetty *E. coli*n etanologeenisiä
5 kantoja, jotka pystyvät ekspressoimaan lämpöstabiileja entsyymejä
tärkkelyksen sakkarifioimiseksi intrasellulaarisina tuotteina.
Nämä entsyymit voidaan harvestoida soluista fermentoinnin
lopuksi ja vapauttaa kuumentamalla lämpötilaan, jossa ne
osoittavat maksimaalista aktiviteettia (60-70°C). Tällaisia
10 organismeja voitaisiin käyttää tuottamaan entsyymejä hiivaperustaisiin
fermentoiteihin samalla kun saadaan tuotettua pieniä määriä
etanolia sivutuotteena.

Tässä esimerkissä käytetään hyväksi proteiinierityssysteemin
15 puuttumista *E. coli*ssa kehitettäessä etanologeenisiä kantoja,
jotka ekspressoivat geenejä, jotka koodaavat lämpöstabiilia α -
amylaasia ja pullulanaasia intrasellulaarisina tuotteina. Lämpö-
stabiilit entsyymit harvestoidaan soluista fermentoinnin
lopuksi ja ne vapautetaan tärkkelyksen sakkarifiointiin yksin-
20 kertaaisesti kuumennuksella lämpötilaan, jossa näiden entsyymien
aktiviteetti on lähinnä optimaalinen.

Organismit ja kasvuolosuhteet: Kaikki etanolifermentoinnit
suoritettiin Luria-lihaliemessä, johon oli lisätty hiilihydraatteja,
25 *E. coli* -kannalla KO11 (Ohta et al, 1991). Plasmidit
lisättiin tähän kantaan esiin tuodulla tavalla.

Plasmidirakenteet: Koottiin kaksi plasmidia, pLOI140 ja pLOI141
(kuviot 15A ja B), jotka sisälsivät α -amylaasigeenin *Bacillus*
30 *stearothermophilus* (Mielenz et al, US-patentti 4493893,
1985) ja pullulanaasigeenin *Thermoanaerobium brockii* (Coleman et al,
US-patentti 4612287, 1986, Coleman et al, J. Bacteriol. 169:4302-4307,
1987) standardimenetelmin. Insertoitiin
5,4 kiloemäsparin HindIII-fragmentti amylaasigeenin sisältä-
35 västä pWL625Amy:stä (ATCC 31791) (Coleman et al, supra, 1986)
insertoitiin pCPC902:n HindIII-kohtaan osittaisen hajottamisen

jälkeen. Vertailtaessa rakenteita Luria-agarilla, joka sisälsi tärkkelystä ja pullulaanipunaista voitiin huomata, että vain yhteen kohtaan tehty insertio sai aikaan molempien geenien korkean tason ekspressoitumisen pysymisen, pLOI568. pLOI568:-
 5 aan lisättiin tetrasykliinigeenin sisältävä 2,5 kbp:n EcoRI-fragmentti pCOS2EMBL:stä (Poustka et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4129-4133, 1984) kun oli suoritettu osittainen hajotus EcoRI:lla pLOI140:n ja pLOI141:n luomiseksi. Lopulliset plasmidit sisälsivät pBR322-replikonin ja olivat melko stabiileja
 10 kannassa KO11, ne säilyivät 96 % soluista 48 sukupolvea ilman antibioottiselektiota.

Kuviossa 15A ja 15B on seuraavia lyhenteitä:

15 amy: Bacillus stearothermophiluksen α -amylaasia koodaava geeni
 pul: Thermoanaerobium brockiiin pullulanaasia koodaava geeni
 tet: tetrasykliiniresistenssigeeni
 amp: ampicilliiniresistenssigeeni
 ori: colE1-replikoni.

20

Fermentointi ja analyysit: Fermentoinnit tehtiin 500 ml:n Fleakers-astioissa, jotka toimivat pH-staatteina (350 ml:n työskentelytilavuus) olennaisesti jo aiemmin kuvatulla tavalla (Beall et al, supra). Fermentoinneissa käytettiin Luria-lientä, joka
 25 sisälsi 10 % glukoosia, 5 % glukoosia, 10 % maltoosia, 5 % maltoosia tai 4,5 % tärkkelystä (30°C, pH 6,0, 100 rpm). Fermentaattit inokuloitiin lähtösolutiheydellä 0,03 mg kuivapaino/ml. Sokerit steriloiitiin erikseen suodattamalla. Tärkkelystä ei steriloitu.

30

Solumassa mitattiin optisessa tiheydessä 550 nm (noin 0,32 solukuivapainoa/litra OD-arvossa 1). Sakkarifiointikokonaisaktiiviteetti mitattiin 60°C:ssa pelkistyniden sokereiden vapautumisena (Bergmeyer et al, supra). Etanoli määritettiin kaasunestekromatografian avulla (Dombek et al, supra). Etanolipitoisuudet on ilmoitettu g/litra. Etanolisaannot korjattiin

35

emäslisäyslaimennosta ajatellen fermentointien aikana ja laskettiin kokonaissokerina tai -tärkkelyksenä tekemättä korjausta käyttämättömistä hiilihydraateista. Maksimaaliset teoreettiset saannot fermentaatiosta ovat noin 0,51 g etanolia/g glukoosia, 5 0,53 g etanolia/g maltoosia ja 0,56 g etanolia/g tärkkelystä. Tulokset perustuvat keskiarvoon 2 tai useammasta fermentaatiosta.

Tärkkelysfermentointi: Tärkkelysfermentointia varten harvestoitiin KO11(Plo1140)- ja KO11(pLOI141)-solut aiemmasta 10 % glukoosifermentoinnista 72 tunnin kuluttua ja varastoitiin jäädytettyinä. Solut uudelleensuspensioitiin 25 ml:aan Luria-lientä, jonka pH oli säädetty 6,0:aan. Tärkkelys (15,75 g) suspensioitiin 325 ml:aan Luria-lientä, jonka pH oli säädetty 6,0:aan. 15 Puolet solususpensiosta lisättiin tärkkelyssuspensioon, inkuboitiin kiehuavassa vesikylvyssä samalla sekoittaen kunnes saavutettiin 70°C ja pidettiin 70°C:ssa 5 minuuttia. Tämä seos jäähdytettiin 60°C:een. Jäljelle jäävät solut lisättiin ja inkubointia jatkettiin 24 tuntia 60°C:ssa. Kuumuus inaktivoi 20 rekombinantin E. colin ja vapautti lämpöstabiilit entsyymit tärkkelyshydrolyysiä varten. Sakkarifioitu tärkkelys jäähdytettiin 30°C:een ja säädettiin 350 ml:n tilavuuteen steriilillä tislattulla vedellä.

25 Inokulaattia kasvatettiin yli yön 5-prosenttisessa glukoosissa, harvestoitiin sentrifugoimalla ja käytettiin aloittamaan fermentointi (0,03 g solukuivapaino eläviä soluja/litra). Otettiin näytteet etanolimääritystä ja ohutkerroskromatografia-analyysiä varten.

30 Glukoosi, maltoosi, maltotrioosi ja maltotetroosi erotettiin käyttämällä aktivoimatonta Whatman silikageeliä 150 A -alustoilla (Whatman Inc. Clifton, New Jersey). Otettiin 1 µl:n näytteet, jotka sisälsivät 5-50 µg sakkaridia ja erotettiin 35 huoneen lämmössä yksinkertaisella kehityksellä asetonissa, etyyliasetaatissa ja etikkahapossa (2:1:1), johon oli lisätty

2 % vettä juuri ennen käyttöä. Kuivatut alustat värjättiin tavalla, jota on kuvannut Bounias, Anal. Biochem. 106:291-295, 1980. Tärkkelys ja sokerit saatiin Sigma Chemical Company -yhtiöltä, St. Louis MO.

5

Glukoosin ja maltoosin fermentointi E. coli -rekombinanttikannoilla: Tutkittiin glukoosin ja maltoosin fermentointia KO11:llä. Tulokset on koottu graafisesti kuvioihin 16A ja B, jotka kuvaavat etanolituottoa ja solumassaa. Kuvioissa käytetyt symbolit ovat: ● kanta KO11 + 10 % glukoosia, ▲ kanta KO11(pLOI140) + 10 % glukoosia, □ kanta KO11(pLOI141) + 10 % glukoosia, ○ kanta KO11 + 5 % maltoosia (tulokset 5 % ja 10 % maltoosia olivat identtiset).

15 Vaikka E. coli maltoosinkäyttöä on tutkittu aerobisissa viljelmissä paljonkin kasvu ja etanolituotto maltoosista olivat paljon hitaammat kuin glukoosilla, ne saavuttivat vain 25 % maksimaalisesta teoreettisesta saannosta (53,5 g etanolia/litra) 10 % maltoosilla ja 50 % maksimaalisesta teoreettisesta saannosta (26,8 g etanolia/litra) 5 % maltoosilla. Koska samankaltaisia tuloksia oli havaittavissa molemmilla maltoosipitoisuuksilla on epätodennäköistä, että hitaampi kasvu ja fermentoituminen johtuisivat suoraan maltoositoksisuudesta. Hitaampi maltoosifermentaatio glukoosiin verrattuna saattaa johtua muista rajoituksista kuten sakkridikuljetuksesta, glukoosikoosifosforylaatiosta jne.

25 Kuten kuvioista 16A ja B nähdään α -amylaasia ja pullulanaasia koodaavien plasmidien pLOI140 ja pLOI141 lisääminen E. coli kantaan KO11 vähensi kasvunopeutta ja etanolintuottonopeutta glukoosista. Lopulliset solusaannot ja etanolisaannot 72 tunnin kuluttua vähenivät noin 1/3.

30 Kuten kuvioista 16A ja B nähdään α -amylaasia ja pullulanaasia koodaavien plasmidien pLOI140 ja pLOI141 lisääminen E. coli kantaan KO11 vähensi kasvunopeutta ja etanolintuottonopeutta glukoosista. Lopulliset solusaannot ja etanolisaannot 72 tunnin kuluttua vähenivät noin 1/3.

35 **Entsyymien ekspressio sakkarifikaatiota varten:** KO11(pLOI140):n ja KO11(pLOI141):n tuottamat kokonaissakkarifikaatioaktiiviteetit mitattiin fermentoinnin lopuksi (72 tuntia) pelkistyvien

sokereiden vapautumisena perunatärkkelyssuspensio Luria-liemessä (pH 6,0) substraattina (70°C). Samanlaista aktiviteettia oli havaittavissa molemmilla kannoilla, 30 µmoolia pelkistävää sokeria/ml viljelmä per minuutti. Yli 90 % tästä aktiviteetista oli intrasellulaarista, mutta vapautui helposti kuumentamalla 70°C:een.

Tärkkelysfermentointi: KO11(pLOI140) ja KO11(pLOI141) testattiin kaksivaiheisella prosessilla, jossa entsyymit sakkarifiointia ja etanolituottoa varten olivat yhdessä ainoassa organismissa. Solut harvestoitiin aiemmasta fermentaatiosta 10 % glukooseja, uudelleensuspensioitiin ja käytettiin entsyymilähteenä hydrolyysille vastaavassa määrässä kylmää 4,5 % tärkkelyssuspensiota (Luria-liemi, pH 6,0). Puolet harvestoiduista soluista lisättiin ja seos kuumennettiin nopeasti 70°C:een vesihauteessa noin 5 minuutiksi. Tämä seos muutettiin 60°C:een ja loput solut lisättiin edistämään hydrolyysiä. Testattiin maissi-, peruna-, riisi- ja vehnätärkkelystä ja kaikki käytetyivät samalla tavalla. Tärkkelyssuspensio pysyi neste-
mäisenä koko kuumennuksen ja hydrolyysin ajan toisin kuin tärkkelysgeeniä sisältämättömät KO11-verrokkit, jotka muuttuivat täysin kiinteiksi 3 minuutin kuumennuksen jälkeen.

Kun oli inkuboitu 24 h 60 °C:ssa hydrolysoidun tärkkelyksen sisältävä Luria-liemi jäähdytettiin 30°C:een ja inokuloitiin fermentoinnin aloittamiseksi (pH 6,0, 100 rpm, siirrote 0,03 g solukuivapaino/litra) tavalla, jota on aiemmin kuvattu (Beall et al, supra, 1991). Etanolia muodostui yhtä nopeasti kaikista tärkkelystyypeistä, 0,26 - 0,28 g etanolia/litra ensimmäisten 24 tunnin aikana. Lopulliset saannot olivat 0,35 - 0,37 g etanolia/grammaa tärkkelystä verrattuna teoreettiseen maksimiin 0,56 g etanolia/g tärkkelystä. Tulokset tärkkelysfermentoinnista on koottu kuvioon 17.

Koska tiedot sekä KO11(pLOI140):stä ja KO11(pLOI141):stä olivat samanlaiset vain tiedot KO11(pLOI141):stä on näytetty kuviossa

17. Kuviossa 17 käytetyt symbolit ovat: Δ maissitärkkelys (S-4126), $\square$ perunatarkkelys (S-2004), $\circ$ riisitärkkelys (S-7260), Δ vehnätärkkelys (S-5127), $\blacksquare$ maissitärkkelys + 2 mM CaCl_2 , $\bullet$ KO11 + 5% glukoosia verrokkina.

5

Näytteet otettiin tämän tärkkelyksellä suoritettun kaksivaiheisen prosessin eri aikoina ja analysoitiin ohutkerroskromatografian avulla (kuvio 18). 24 tunnin kuluttua glukoosi, maltoosi, maltotriooosi, maltotetroosi ja pidemmät oligosakkaridit
 10 erottuvat selvinä hydrolyysituotteina. Glukoosia, maltoosia ja maltotriooosia käytettiin KO11(pLOI141):llä fermentointiin (72 tuntia).

Kuviossa 18 nähdään tulokset maissitärkkelysfermentaation
 15 ohutkerroskromatografia-analyysistä. Vertailukohteina käytettiin maltoosia ja glukoosia. Glukoosi - maltotetroosi on merkitty G1 - G4. Vyöhykkeet ovat: 1, glukoosi ja maltoosi verrokkeina, 2, liemi 24 sakkarifioinnin jälkeen 60°C:ssa, 3, vyöhykkeen 2 liemi 72 tunnin fermentoinnin jälkeen.

20

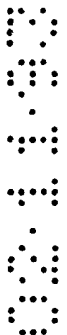
Tärkkelystä hajottavat entsyymit stabiloidaan usein kalsiumionien läsnäololla. Fermentointikokeissa, joissa käytettiin
 :.. maissitärkkelystä Luria-liemessä, joka sisälsi 2 mM kalsium-
 :.. kloridia, päästiin hieman nopeampaan fermentaatioon ja suurem-
 :.. paan saantoon, 0,29 g etanolia/litra per tunti ja 0,40 eta-
 :25 nolia/g tärkkelystä. Verrattuna perinteisiin tärkkelysfermen-
 :.. tointeihin hiivoilla ja entsyymeillä E. coli -rekombinantti oli
 :.. hitaampi ja tuotti pienemmän etanolipitoisuuden. Kokonaiseta-
 :.. nolisaanto tärkkelyksestä tällä kaksivaiheisella prosessilla
 :30 yhdellä ainoalla organismilla oli 85 % siitä, mihin päästään
 :.. nyt käytössä olevilla kaupallisilla menetelmillä, joissa käy-
 :.. tetään hiivoja ja lisäentsyymejä (noin 0,47 g etanolia/g tärk-
 :.. kelystä).

35

Päätelmät: Edelleen kehittelyn ollessa ehkä tarpeen tämä esimerkki osoittaa kuitenkin, että etanologeenisia fermentointeja rekombinantilla *E. coli*lla on mahdollista käyttää osana entsyymejä, jotka tarvitaan tärkkelyksen sakkarifiointiin. Ent-

5 syymien tuottaminen olisi melko yksinkertaista, koska ilmastusta ei tarvita. Lämpöstabiilit bakteerientsyymit toimivat optimaalisesti samalla pH:lla (noin 6,0) kuin *E. coli* -perustainen fermentointi. Näillä organismeilla jäämätärkkelystä vähä-

10 arvoisista materiaaleista kuten maissinkuorista voitaisiin käyttää substraattina ja maissiliotusnestettä kompleksisten ravinteiden lähteinä. Tämänkaltaisen menetelmä voi vähentää sakkarifioinnin entsyymikustannuksia ja lisätä etanolisaantoa maissista.



Patenttivaatimukset

1. Rekombinantti-isäntä, joka sisältää heterologista DNA:ta, joka koodaa:

- (a) alkoholidehydrogenaasia; ja
- 5 (b) pyruvaattidehydrogenaasia; ja
- (c) polysakkaraasia tai erilaisten polysakkaraasien yhdistelmää;

jolloin mainittu isäntä ilmentää mainittua heterologista DNA:ta riittävällä tasolla niin, että etanolin tuottaminen
10 mainitun isännän primäärisenä fermentointituotteena helpottuu.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen rekombinantti-isäntä, joka lisäksi sisältää proteiineja koodaavaa heterologista DNA:ta, jotka proteiinit ovat osallisena mono- ja/tai oligosakkari-
15 dienkuljetuksessa isäntään.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen rekombinantti-isäntä, joka lisäksi sisältää proteiineja koodaavaa heterologista DNA:ta, jotka proteiinit sallivat isännän kuljettaa ja metaboloida oligosakkaridia.

20 4. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen isäntä, joka mainittu isäntä on valittu bakteereista, sienistä ja eukaryoottisista soluista.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen isäntä, joka on bakteeri ja valittu mistä tahansa seuraavista:

- 25 (a) Gram-negatiivisista bakteerit;
- (b) enteriset bakteerit;
- (c) *Erwinia* spp.;
- (d) *Klebsiella* spp.;
- (e) *Xanthomonas* spp.

30 6. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen isäntä, jossa polysakkaraasi(t) on valittu mistä tahansa seuraavista:

- (a) sellulolyyttisistä entsyymeistä (esim. endoglukanaasi, sellobiohydraasi tai β -glukosidaasi);
- (b) hemisellulyyttisistä entsyymeistä;
- (c) ksylanolyyttisistä entsyymeistä (esim. endo-1,4- β -ksylanaasi, β -ksylosidaasi, α -glukoronidaasi, α -L-arabinofuranosidaasi, asetyyliesteri- tai asetyyliksylaani-esteri-
5 esteraasi);
- (d) tärkkelystä hajottavista entsyymeistä (esim. α -amylaasi (johdettu esim. *Bacillus stearothermophilus*ista), β -amylaasi, glukoamylaasi tai pullulanaasi (johdettu
10 esim. *Thermoanaerobium brockii*ista));
- (e) β -glukanaasista, arabinosidaasista, mannanaasista, pektiinihydraasista tai pektiattiyliaasista;
- (f) celD:stä (johdettu esim. *Clostridium thermocellum*ista),
15 xynZ:stä (johdettu esim. *Clostridium thermocellum*ista),
xylB:stä (johdettu esim. *Butyrivibrio fibrosolvens*ista)
ja *Cellulomonas fimi*:n sellulaasigeenistä valitun geenin ilmentymistuotteesta.

7. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen
20 isäntä, jossa polysakkaraasi(t) on (ovat):

- (a) lämpöstabiileja, ja/tai
(b) ainakin osittain eritettyjä isännästä tai olennaisesti
akkumuloitunut mainittuun isäntään.

8. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen
25 isäntä, jossa alkoholidehydrogenaasia ja pyruvaattidehydroge-
naasia koodaava heterologinen DNA sisältää alkoholidehydro-
genaasia ja pyruvaattidehydrogenaasia koodaavat Zymomonas mo-
bilis-geenit.

9. Menetelmä etanolin tuottamiseksi, joka sisältää fermentaation soluviljelmän avulla, jossa menetelmässä isäntä on minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen niin, että isäntä tuottaa etanolia primäärisenä käymistuosotteenaan.

10. Plasmidi, joka sisältää geenit:

- (a) alkoholidehydrogenaasin; ja
- (b) pyruvaattidehydrogenaasin; ja
- (c) polysakkaraasin tai erilaisten polysakkaraasien yhdis-
5 telmän;

koodaamiseen, jolloin mainittu plasmidi on kykenevä ohjaamaan isäntää tuottamaan alkoholidehydrogenaasia, pyruvaattidehydrogenaasia ja polysakkaraasia riittävällä tasolla mainitun isännän etanolin tuottamisen helpottamiseksi primäärisenä
10 käymistuotteena.

11. Menetelmä oligosakkaridien syötteen käsittelemiseksi, johon menetelmään sisältyy vaiheet:

- (a) lähtöoligosakkaridin sisältävän syötteen saaminen;
- (b) mainitun syötteen saattaminen kontaktiin entsyymin
15 kanssa (esim. missä tahansa patenttivaatimuksessa 1-8 määritetty polysakkaraasi), joka entsyymi on kehittynyt minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-8 mukaisen rekombinantti-isännän soluissa niin, että mainittu entsyymi vaikuttaa mainittuun lähtöoligosakkaridiin.

20 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, jossa mainittu lähtöoligosakkaridi fermentoituu etanoliksi.

13. Patenttivaatimuksen 11 tai 12 mukainen menetelmä, jossa mainittu lähtöoligosakkaridi:

- (a) sisältää disakkaridin tai trisakkaridin;
- (b) on liukenematon oligosakkaridi, joka on valittu sellu-
25 loosasta, hemiselluloosasta ja tärkkelyksestä.

14. Minkä tahansa patenttivaatimusten 11-13 mukainen menetelmä, jossa vaihe (b) sisältää mainittujen solujen lämmit-
tämisen lyysin aikaansaamiseksi ja mainitun entsyymin (esim.
30 polysakkaraasin) vapauttamiseksi.

Patentkrav

1. Rekombinant värd omfattande heterologt DNA som kodar för:

- (a) alkoholdehydrogenas; och
- (b) pyruvatdehydrogenas; och
- 5 (c) ett polysackaras eller en kombination av olika polysackaraser;

vari nämnda värd uttrycker nämnda heterologa DNA på en tillräcklig nivå för att underlätta produktionen av etanol som en primär fermenteringsprodukt av nämnda värd.

- 10 2. Rekombinant värd enligt patentkrav 1, vilken vidare omfattar heterologt DNA som kodar för proteiner som är inbegripna i transporten av mono- och/eller oligosackarider in i värden.

- 15 3. Rekombinant värd enligt patentkrav 1 eller 2, vilken vidare omfattar heterologt DNA som kodar för proteiner som gör det möjligt för värden att transportera och metabolisera en oligosackarid.

- 20 4. Värd enligt något av de föregående patentkraven, vari nämnda värd är vald bland bakterier, svampar och eukaryota celler.

5. Värd enligt patentkrav 4, vilken är en bakterie vald bland någon av:

- (a) gram-negativa bakterier;
- (b) enteriska bakterier;
- 25 (c) *Erwinia* spp.;
- (d) *Klebsiella* spp.;
- (e) *Xanthomonas* spp..

6. Värd enligt något av de föregående patentkraven, vari polysackaraset (polysackaraserna) är valda bland något av:

- 30 (a) cellulolytiska enzymer (t. ex. endoglukanas, cellobiohydrolas eller β -glukosidas);

- (b) hemicellulytiska enzymer;
- (c) xylanolytiska enzymer (t. ex. endo-1,4- β -xylanas, β -xylosidas, α -glukoronidas, α -L-arabinofuranosidas, acetylesteras eller acetylxylanesteras);
- 5 (d) stärkelsenedbrytande enzymer (t. ex. α -amylas (t.ex. från *Bacillus stearothermophilus*), β -amylas, glukoamylas eller pullulanas (t. ex. från *Thermoanaerobium brockii*));
- (e) β -glukanas, arabinosidas, mannanas, pektinhydrolas eller pektatlyas;
- 10 (f) expressionsproduktion av en gen vald bland celd (t.ex. från *Clostridium thermocellum*), xynZ (t. ex. från *Clostridium thermocellum*), xylB (t. ex. från *Butyrivibrio fibrosolvens*) och en cellulasegen från *Cellulomonas fimi*.
- 15

7. Vård enligt något av de föregående patentkraven, vari polysackaraset (polysackaraserna) är:

- (a) termostabila och/eller
- (b) åtminstone partiellt utsöndrade från värden eller huvudsakligen ackumulerade i nämnda vård.
- 20

8. Vård enligt något av de föregående patentkraven, vari det heterologa DNA:t som kodar för alkoholdehydrogenaset och pyruvatdehydrogenaset omfattar *Zymomonas mobilis* -generna som kodar för alkoholdehydrogenas och pyruvatdehydrogenas.

- 25 9. Förfarande för produktion av etanol omfattande fermentering med en kultur av celler som omfattar värden enligt något av de föregående kraven, så att etanol produceras av värden som den primära fermenteringsproduktion.

10. Plasmid omfattande gener som kodar för:

- 30 (a) alkoholdehydrogenas; och
- (b) pyruvatdehydrogenas; och
- (c) ett polysackaras eller en kombination av olika polysackaras;

varvid nämnda plasmid kan styra en värd till att producera alkoholdehydrogenas, pyruvatdehydrogenas och polysackaras(er) på en tillräcklig nivå för att underlätta produktionen av etanol som den primära fermenteringsprodukten av nämnda värd.

- 5 11. Förfarande för behandling av ett oligosackaridråmaterial, omfattande stegen:

(a) åstadkommande av ett råmaterial som innehåller en start-oligosackarid;

- 10 (b) bringande av nämnda råmaterial i kontakt med ett enzym (t. ex. ett polysackaras såsom definieras i något av kraven 1-8) utvecklat av celler av en rekombinant värd enligt något av kraven 1-8, så att nämnda enzym verkar på nämnda start oligosackarid.

- 15 12. Förfarande enligt patentkrav 11, varvid nämnda startoligosackarid fermenteras till etanol.

13. Förfarande enligt patentkrav 11 eller 12, varvid nämnda startoligosackarid:

(a) omfattar en disackarid eller trisackarid;

- 20 (b) är en olöslig oligosackarid vald bland cellulosa, hemicellulosa och stärkelse.

14. Förfarande enligt något av patentkraven 11-13, varvid steg (b) omfattar värmning av nämnda celler för att inducera lys och frisättning av nämnda enzym (t. ex. polysackaras).

001193 33603

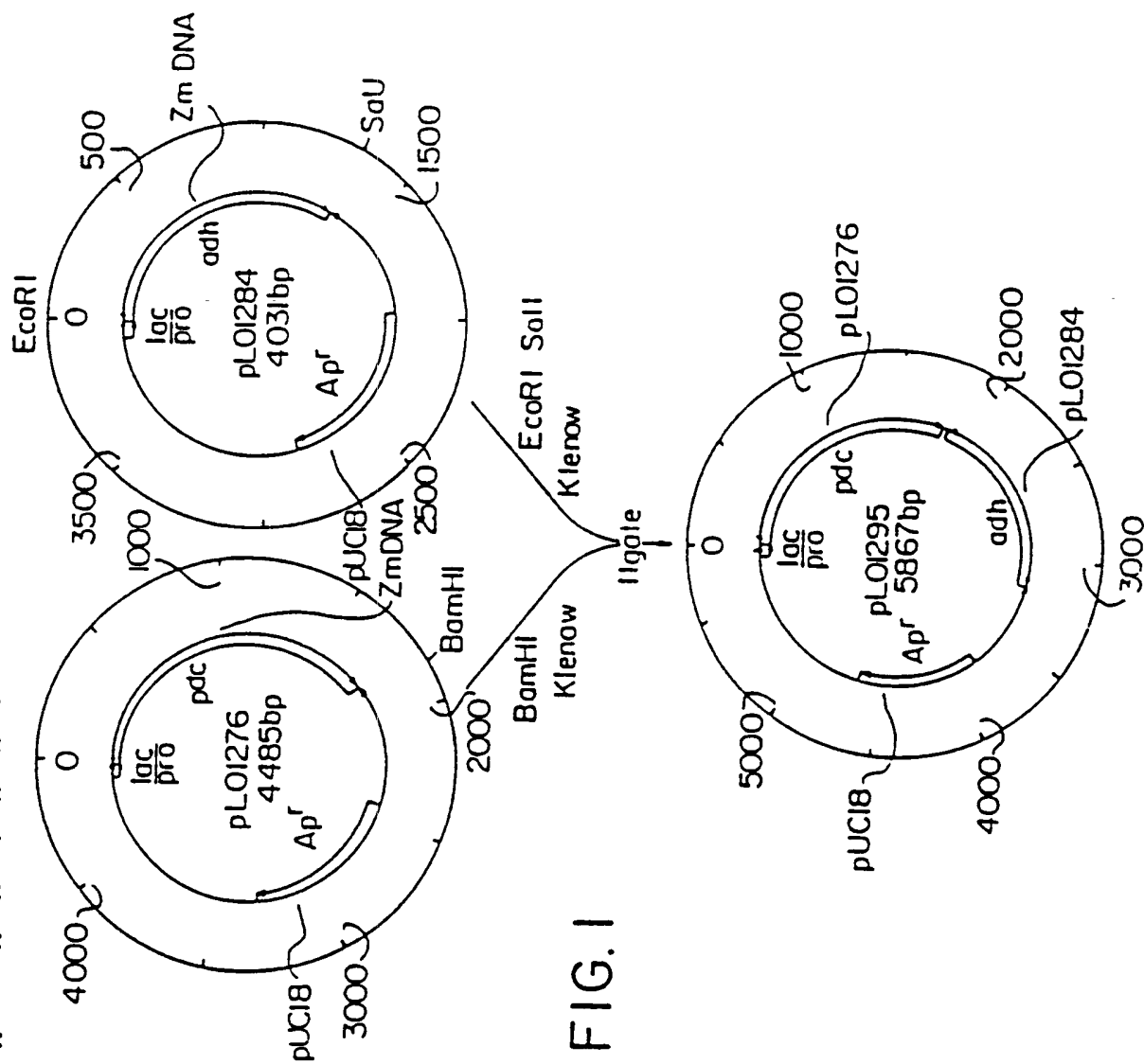


FIG.1

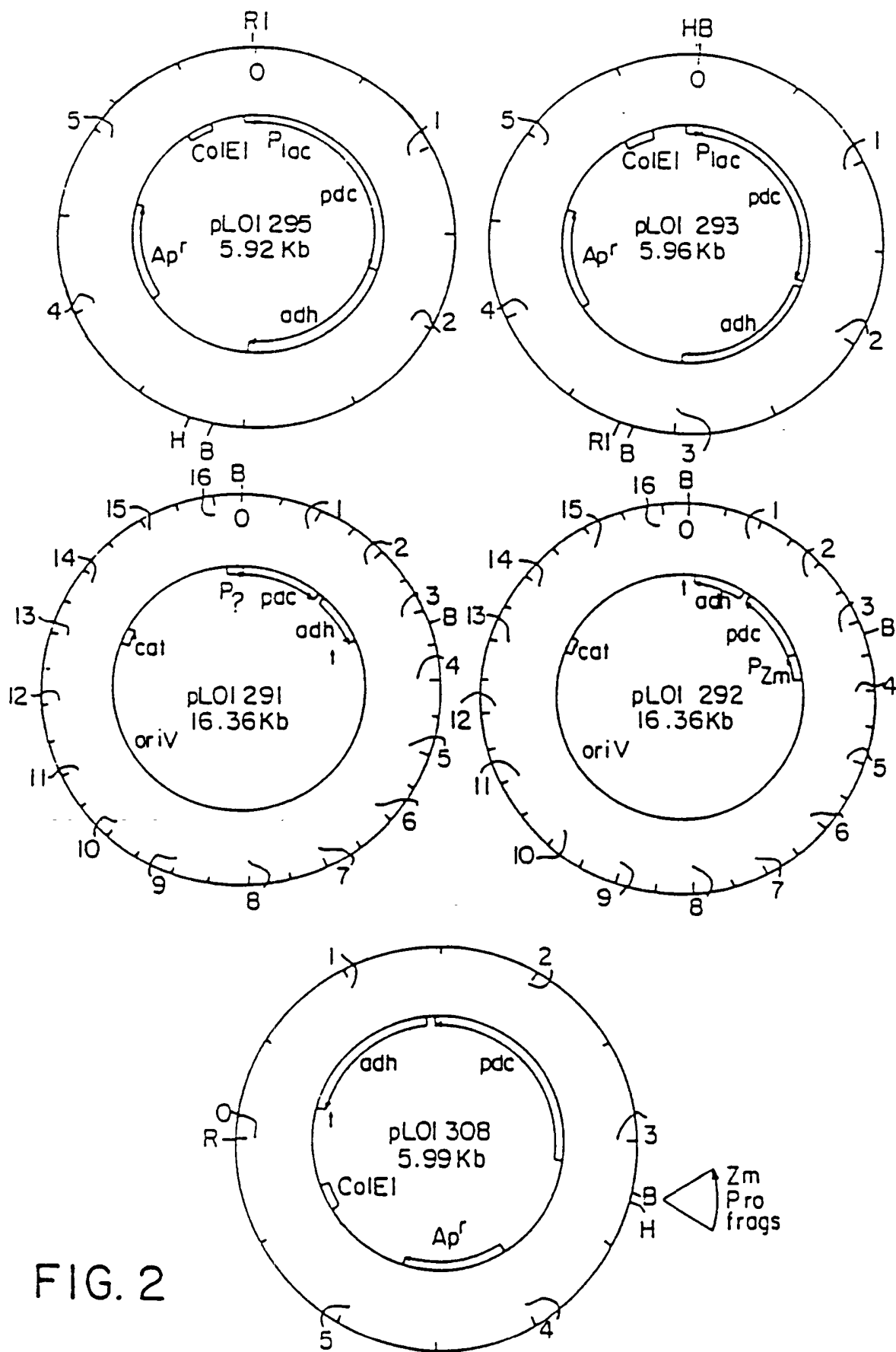


FIG. 2

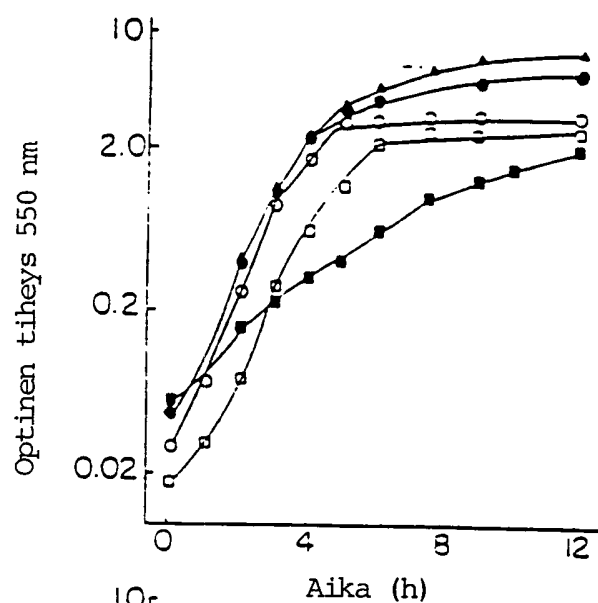


FIG. 3A

FIG. 3B

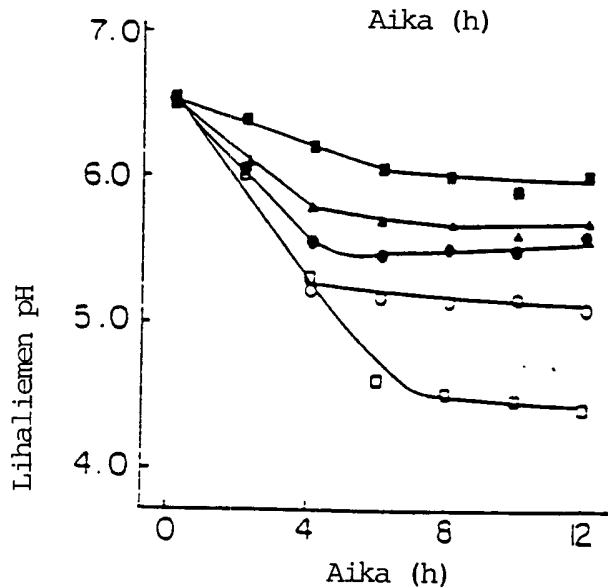
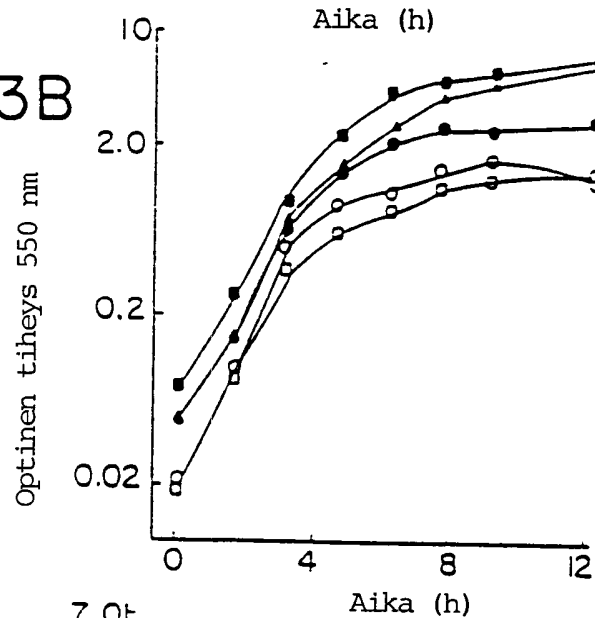


FIG. 3C

Symbolit: ■, pLO1295; ●, pLO1308-2; ○, pLO1308-5,
▲, pLO1308-10; □, plasmiditon TC4-kanta

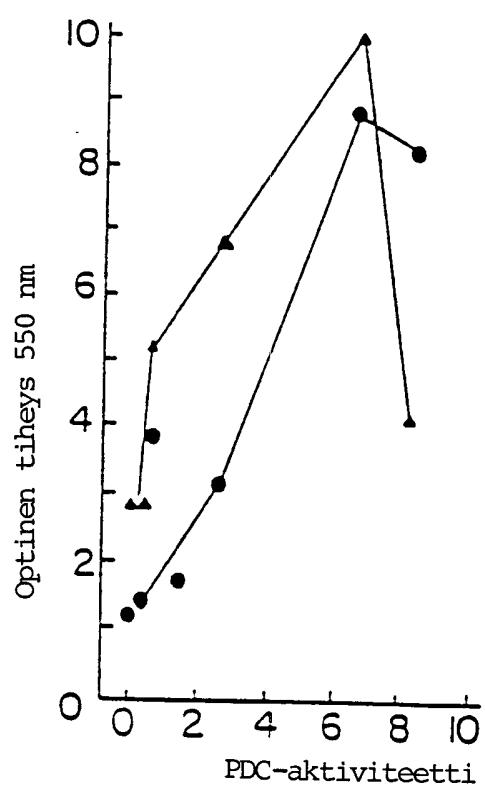


FIG. 4

Symbolit: ▲, aerobiset kasvuolosuhteet
●, anaerobiset kasvuolosuhteet

FIG. 5

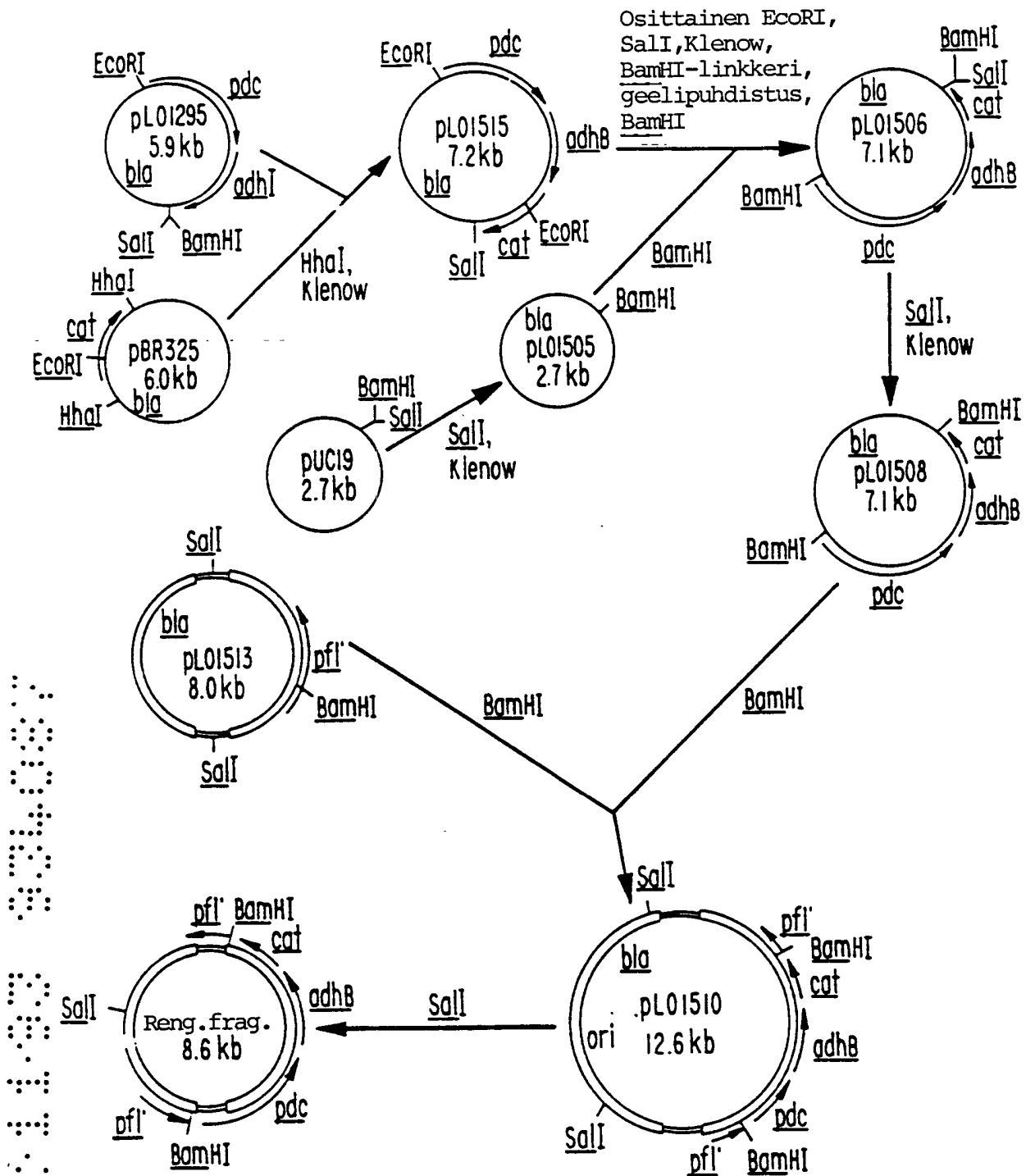


FIG. 6

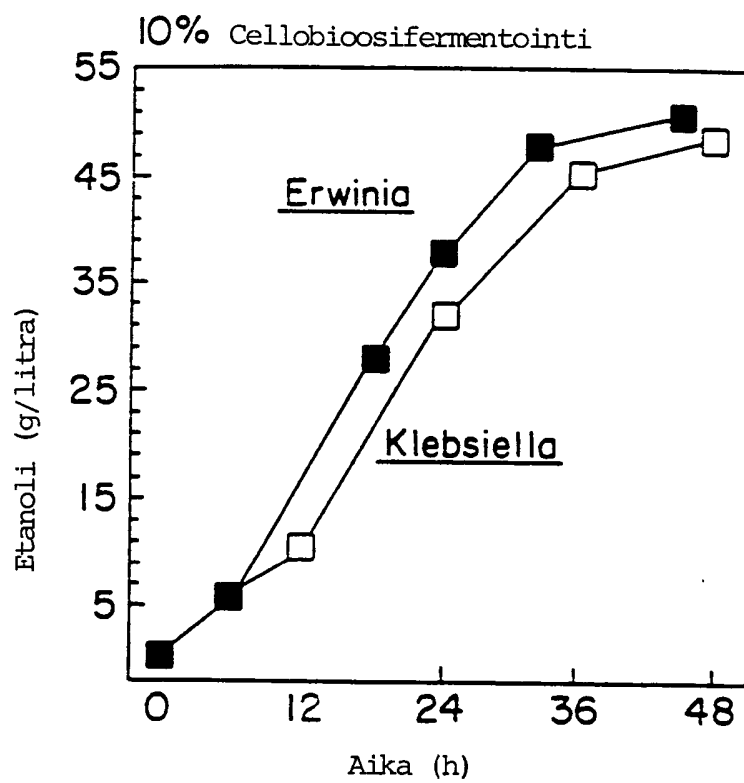


FIG. 7A

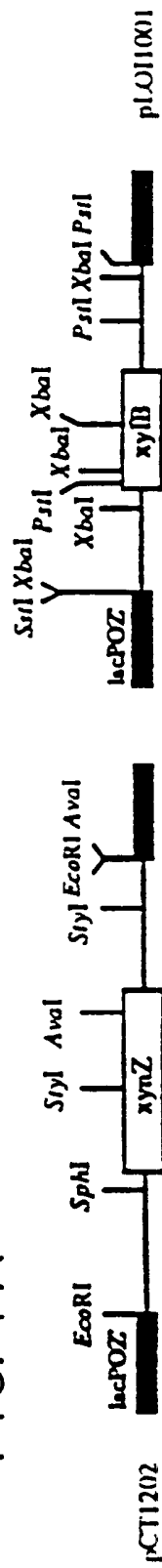
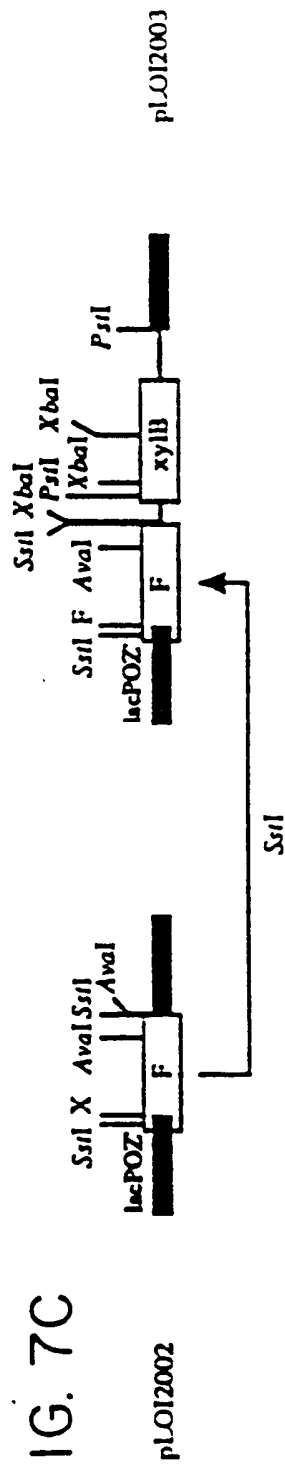


FIG. 7B



FIG. 7C



001193 036003

X1▶

X1▶

X2▶

X2▶

X3▶

X3▶

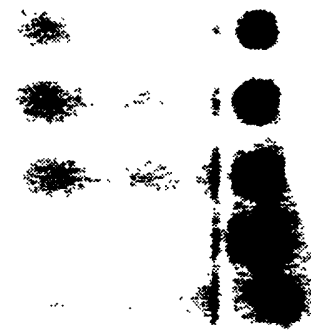
X4▶

X4▶



S 0 24 48 65

FIG. 8A



S 0 24 48 65

FIG. 8B

03.11.93 93.093

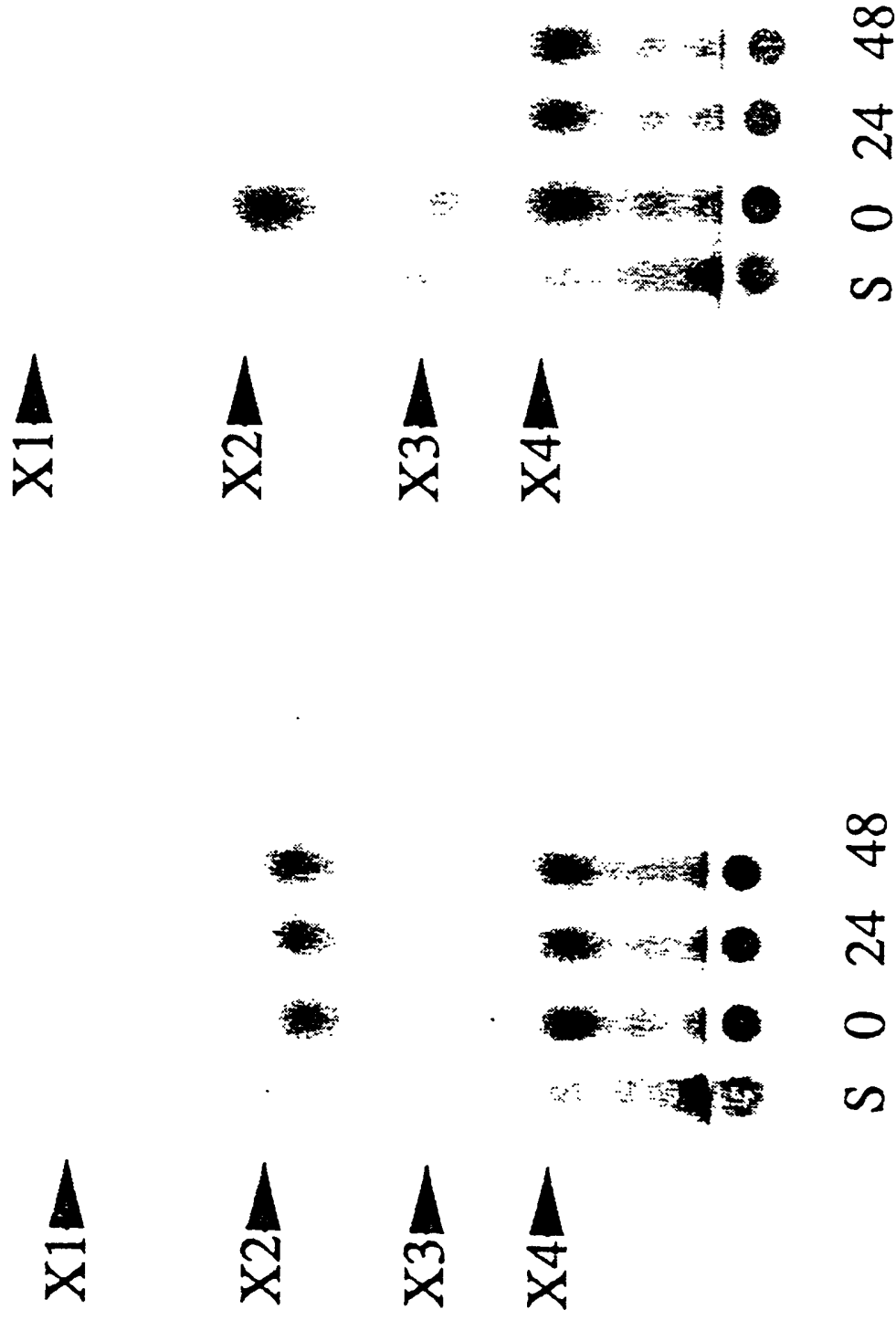


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 10A

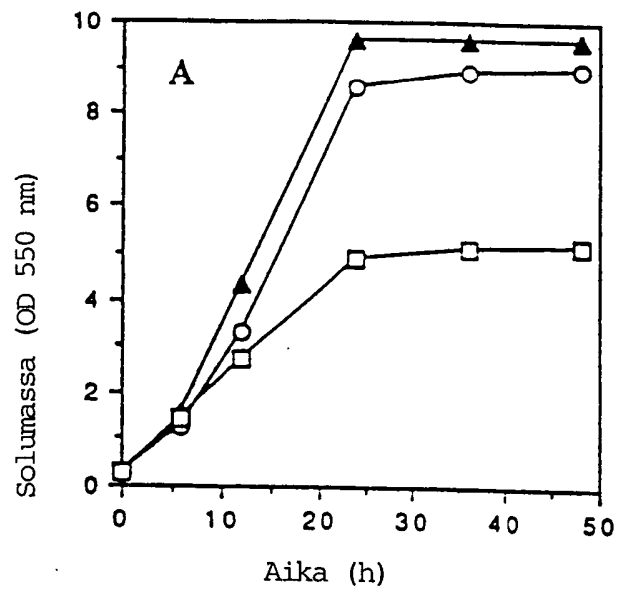


FIG. 10B

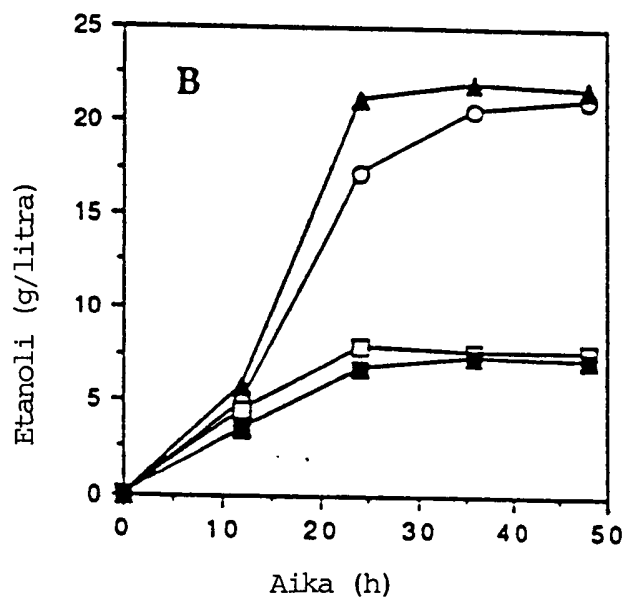


FIG. IIA

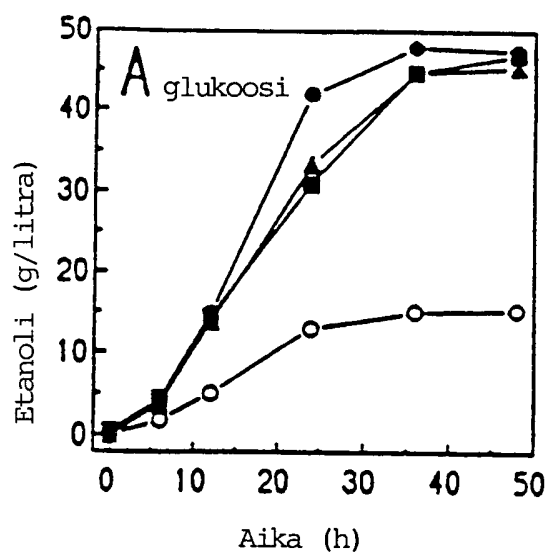
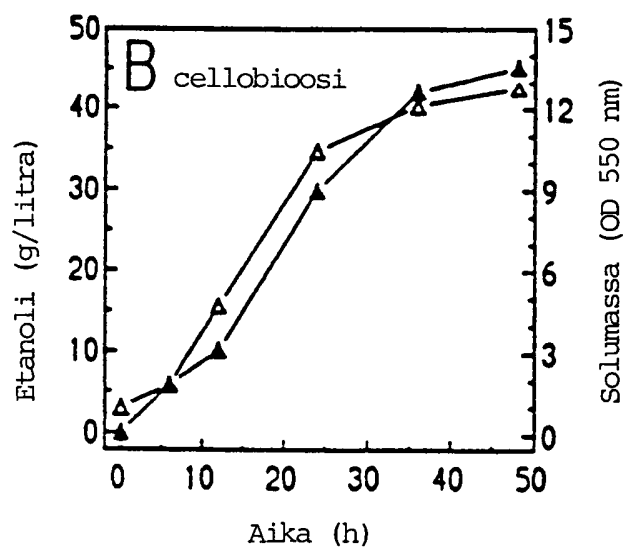


FIG. IIB



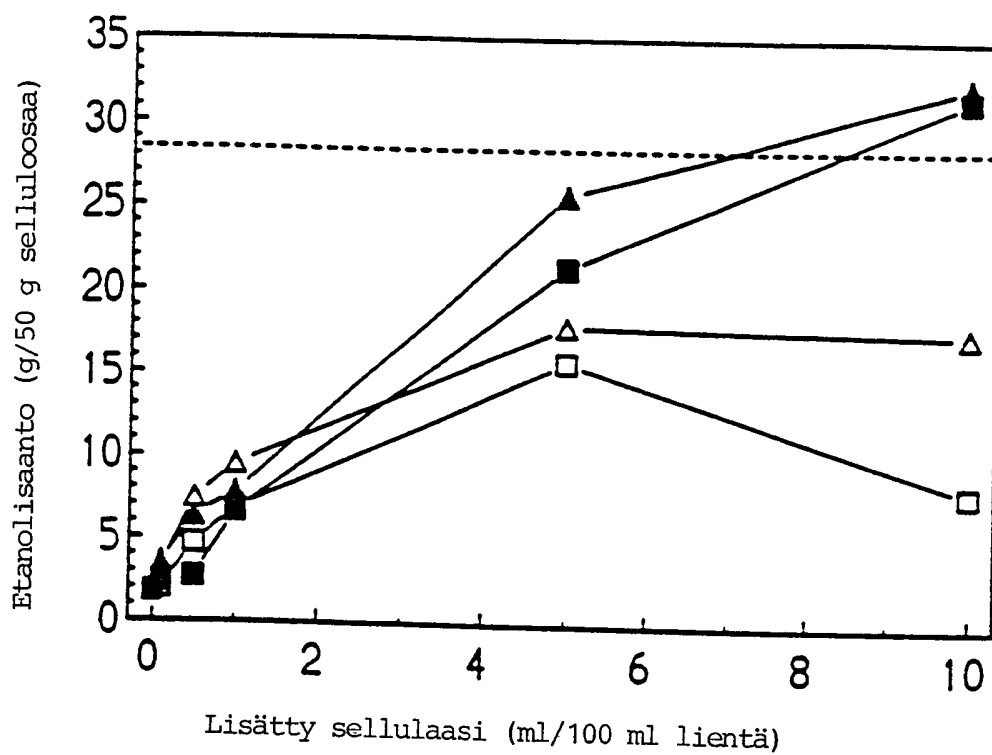


FIG. 12

03.11.03 03.03.03

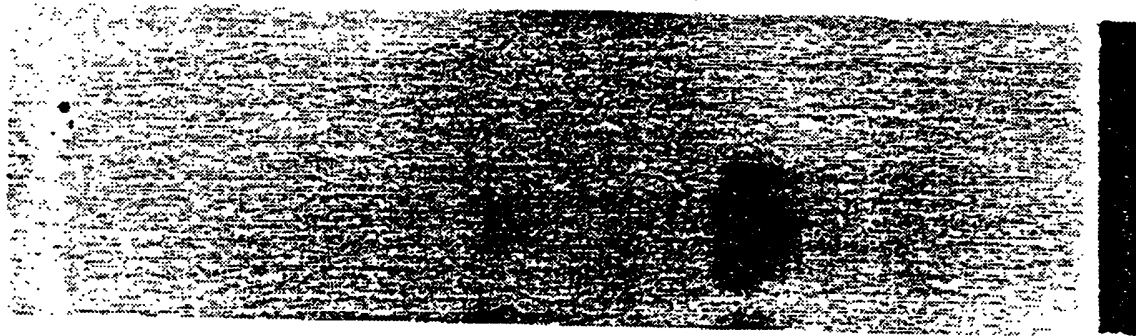


FIG. 13A

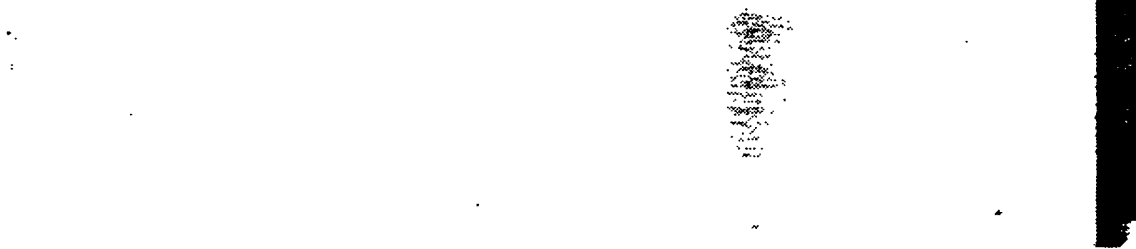


FIG. 13B

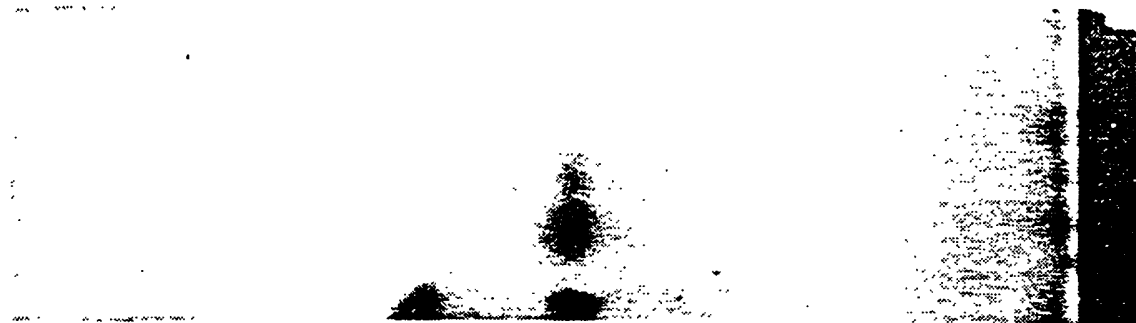


FIG. 13C

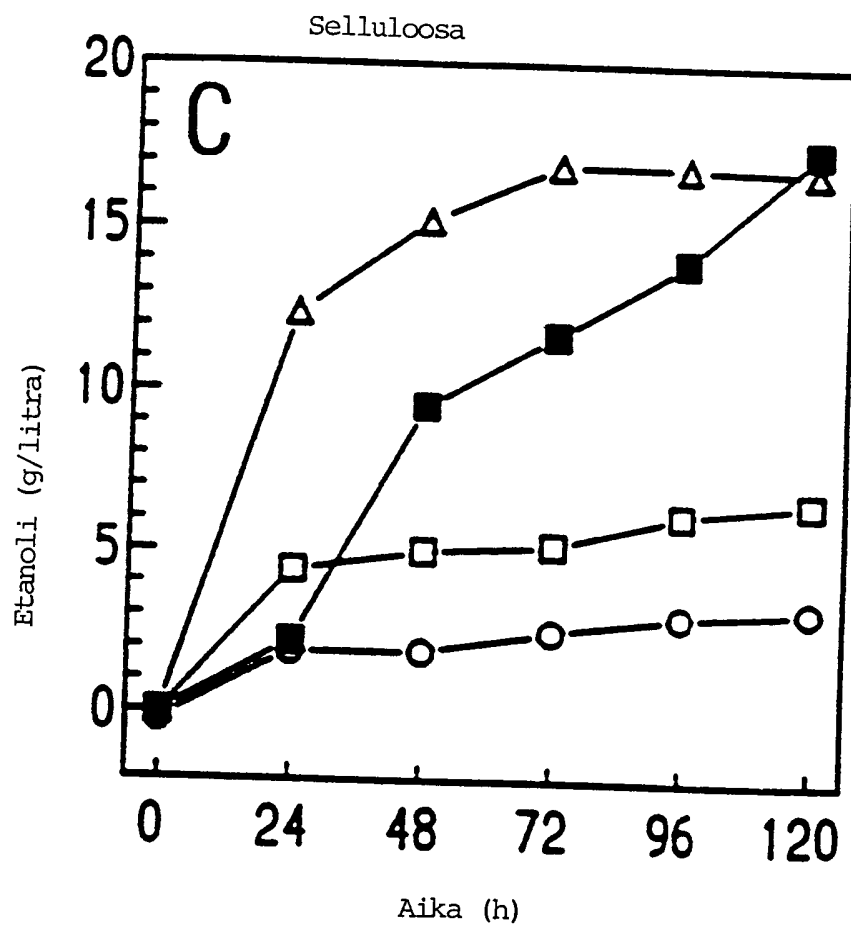


FIG.14

FIG. 15A

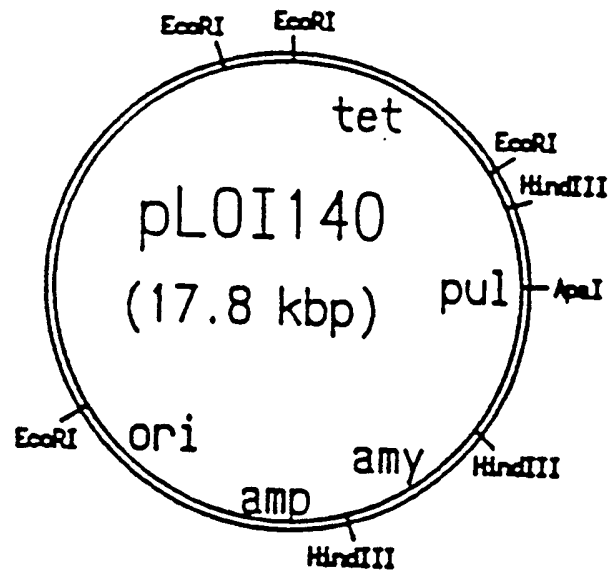


FIG. 15B

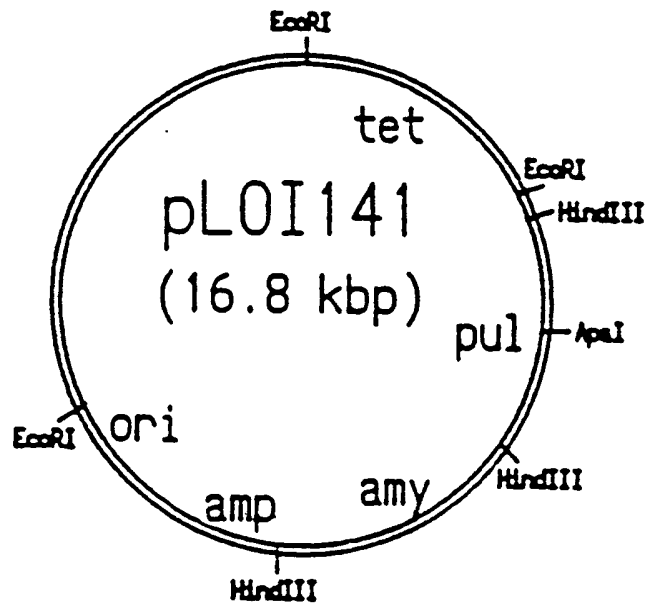


FIG. 16A

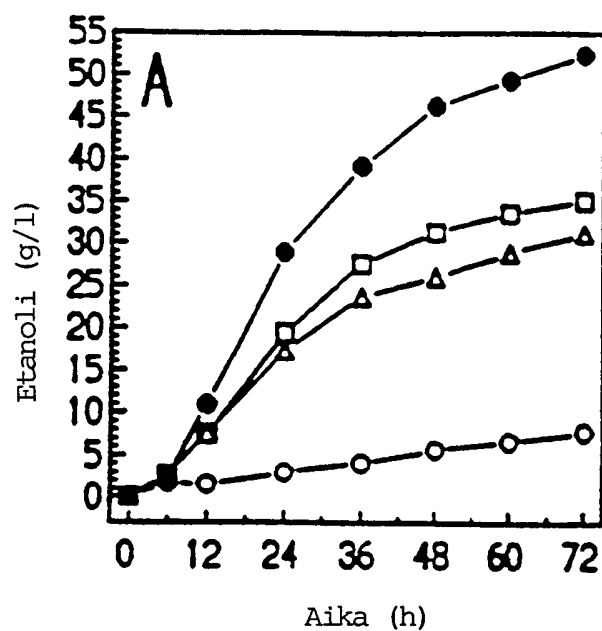
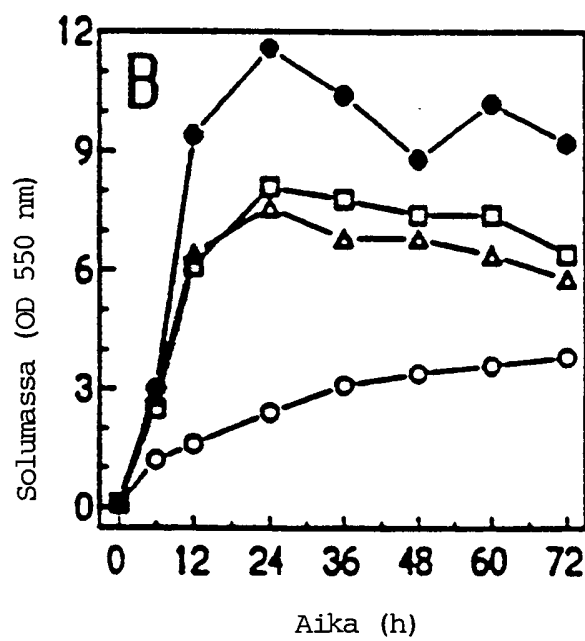


FIG. 16B



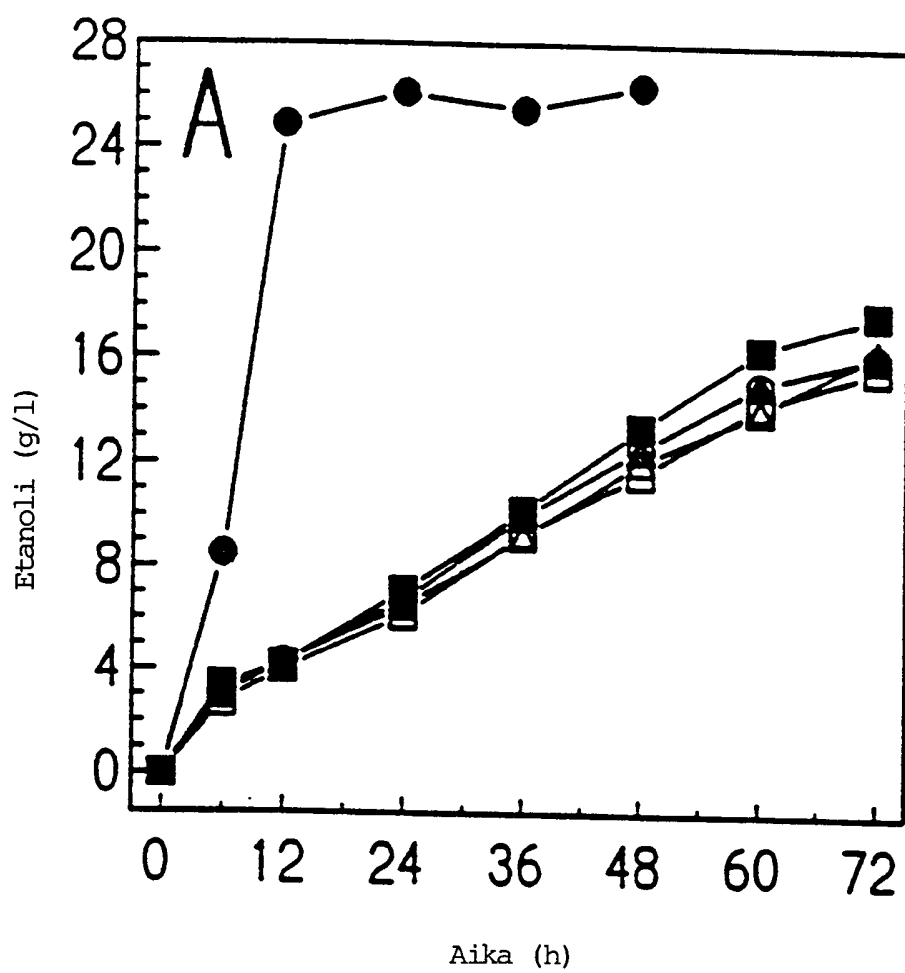


FIG. 17.



FIG. 18

001193 336083

FIG. 19

