



(12) PATENT

(19) NO

(11) 315567

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 1/21, 1/19, 15/63, C 12 P 7/06

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19933178	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1992.03.18, PCT/US92/01807
(22) Inng. dag	1993.09.07	(85) Videreføringsdag	1993.09.07
(24) Løpedag	1992.03.18	(30) Prioritet	1991.03.18, US, 670821
(41) Alm. tilgj.	1993.11.08		1992.03.06, US, 846344
(45) Meddelt dato	2003.09.22		

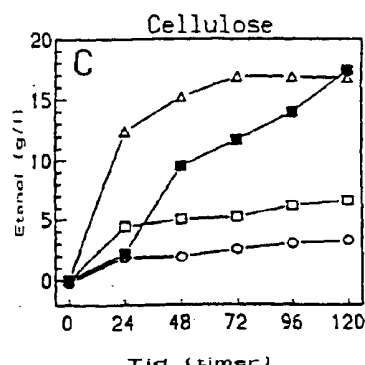
(71) Patenthaver	University of Florida Research Foundation Inc, 223 Grinter Hall, Gainesville, FL 32611, US BC International Corp, 990 Washington Street, Suite 104, Dedham, MA 02026, US
(72) Oppfinner	Lonnie O. Ingram, Gainesville, FL 32606, US David S. Beall, Gainesville, FL 32601, US Gerhard F. H. Burchhardt, Gainesville, FL 32605, US Walter V. Guimjaraes, Gainesville, FL 32611, US Kazuyoshi Ohta, Gainesville, FL 32601, US Brent E. Wood, Gainesville, FL 32601, US Keelnatham T. Shanmugam, Gainesville, FL 32605, US David A. Fowler, Gainesville, FL 32608, US Arie Ben-Bassat, Gainesville, FL 32606, US
(74) Fullmektig	Actio-Lassen AS, 5817 Bergen

(54) Benevnelse	Plasmider og rekombinante verter som koder for a) alkohol dehydrogenase, b) pyruvat dehydrogenase og en polysakkarase eller kombinasjon av ulike polysakkaraser, samt fremgangsmåter for å produsere etanol
-----------------	--

(56) Anførte publikasjoner	Ingram et al., oct. 1987, Appl. Environ. Microbiol., vol 53., no. 10 (2420-2450) Tolan et al., sept. 1987., Appl. Environ. Microbiol., vol 53., no. 9 (2033-2038) Alan, D.N et al., feb 1987., Nucleic Acid Res., vol.15,no.4 (1753-1761) Brau et al., 1986. Arch. Microbiol., vol 144 (296-301) Curry et al., feb. 1988. Appl. Environ. Microbiol., vol 54., no. 2 (476-484) Tolan et al., sept. 1987. Appl. Environ. Microbiol., vol 53., no. 9 (2039-2044) Joliff et al., oct 1986. Bio/Technology, vol. 4 (896-900) Grepinet et al., oct.1988., J.Bacteriol., vol. 170, no. 10 (4576-4581)
----------------------------	---

(57) Sammendrag

Nye plasmider som omfatter gener som koder for alkoholdehydrogenase og pyruvatdekarboksylase beskrives. Det beskrives også rekombinantverter som er transformert med gener som koder for alkoholdehydrogenase og pyruvat. I kraft av deres transformasjon med disse gener, er rekombinantvertene i stand til å produsere vesentlige mengder etanol som et fermenteringsprodukt. Det omtales også fremgangsmåter for øking av veksten av rekombinantverter og fremgangsmåter for reduksjon av akkumuleringen av uønskede metaboliseringsprodukter i disse verters dyrkningsmedium. Det omtales også rekombinantverter som er i stand til å produsere vesentlige mengder etanol som et fermenteringsprodukt fra oligosakkarider og plasmider som omfatter gener som innkoder polysakkaraser, i tillegg til de ovenfor beskrevne gener som koder for alkoholdehydrogenase og pyruvatdekarboksylase. Videre beskrives metoder for produksjon av etanol fra oligomert råmateriale ved anvendelse av de rekombinantverter som er beskrevet i det foregående. Videre presenteres en fremgangsmåte for å muliggjøre produksjonen av funksjonelle proteiner i en rekombinantvert ved at et adhB-gen i verten overuttrykkes. Videre presenteres utforminger av prosesser for fermentering av oligosakkarid-holdig biomasse til etanol.



Den foreliggende oppfinnelse vedrører en rekombinant vert og et plasmid, samt fremgangsmåter for å produsere alkohol og for å behandle et oligosakkarid-råstoff.

Den foreliggende oppfinnelse er realisert ved hjelp av statsstøtte gjennom Florrida

5 Agricultural Experiment Station, under USDA Alcohol Fuels Program bevilgningsnummer 86CRCR12134, 88-37233-3987 og 90-37233-5372 og under DOE Office of Basic Energy bevilgningsnummer FG05-86ER13574. Den føderale regjering har visse rettigheter i den foreliggende oppfinnelse.

10 Dette er en delvis videreføring av US-patentsøknader nr. 07/846.344, 07/670.821 og 07/624.277, som alle er delvise videreføringer av US-patentsøknad nr. 07/352.062 (nå US-patent nr. 5.000.000, som i seg selv er en delvis videreføring av US-patentsøknad nr. 07/239.099 (nå oppgitt). De respektive innhold av disse patentdokumenter medtas heri under hevisning.

15

Under glykolyse omdanner celler enkle sukkerarter som glykose til pyrodruesyre, med en nettoproduksjon av ATP og NADH. I fraværet av et fungerende elektrontransportsystem for oksydativ fosforylering, forbrukes minst 95 % av pyrodruesyren i korte reaksjonsveier som regenererer NAD⁺, hvilket er et absolutt krav for fortsatt glykolyse og ATP-produksjon.

20 Avfallsproduktene fra disse NAD⁺ regenereringssystemer har fellesbetegnelsen fermenteringsprodukter.

Mikroorganismer er spesielt mangeartede i den rekke fermenteringsprodukter som produseres av forskjellige slekter. Disse produkter inkluderer organiske syrer, slik som laktat, acetat, 25 succetat og butyrat, så vel som nøytrale produkter slik som etanol, butanol, aceton og butandiol. Faktisk har mangfoldigheten i fermenteringsprodukter fra bakterier ført til deres anvendelse som en primær determinant i taksionomi. Se eksempelvis **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, Williams & Wilkins Co., Baltimore (1984) (heretter kalt "Bergey's Manual").

30

Sluttprodukter fra fermentering har flere fundamentale trekk til felles. De er relativt ugiftige under de betingelser hvori de innledningsvis er produsert, men blir mer giftige etter akumulering. De er mer reduserte enn pyruvat fordi deres umiddelbare forløpere har

tjenestegjort som terminale elektronakseptorer under glykolyse. Den mikrobielle produksjon av disse fermenteringsprodukter danner grunnlaget for våre eldste og økonomisk mest fremgangsrrike anvendelser av bioteknologi og inkluderer meieriprodukter, kjøtt, drikkevarer og brensel. I de senere år er det gjort mange fremskritt innen feltet bioteknologi som et resultat av nye teknologier som gir forskere muligheten til selektivt å endre noen mikroorganismenes genetiske sammensetning.

Bakterien Escherichia coli er en viktig vehikkel for kloningen og modifikasjonen av gener for bioteknologi, og er en av de viktigste verter for produksjonen av rekombinante produkter. I de senere år har variasjonen av verter som anvendes til rekombinant DNA-forskning blitt utvidet til å inkludere et utvalg bakterier, gjær, sopp og eukaryote celler. Det beskrives heri anvendelse av rekombinant DNA-teknologi til fremkalling av produksjonen av spesifikke nyttige produkter ved hjelp av en modifisert vert.

Det DNA som anvendes til modifikasjon av verten kan isoleres fra Zymomonas mobilis, en bakterie som vanligvis finnes i plantesaft og i honning. Z. mobilis har lenge tjent som et inokulum for palmeviner og til fermentering av Agave-saft til frembringelse av pulque, en alkoholholdig meksikansk drikk. Mikroben anvendes dessuten ved produksjon av etanol-brensel, og er kjent for etanolproduksjonshastigheter som er vesentlig høyere enn for gjær.

Selv om Z. mobilis foringsmessig sett er enkel, og den er i stand til å syntetisere aminosyrer, nukleotider og vitaminer, er spennvidden av sukkerarter som metaboliseres ved denne organisme meget begrenset og består normalt av glykose, fruktose og sukrose. Fosforylering på substratnivå fra fermenteringen av disse sukkere er den eneste energikilde for biosyntese og homeostase. Zymomonas mobilis er ikke i stand til å vokse selv i rike medier slik som næringskraft uten et fermenterbart sukker.

Z. mobilis er en obligatorisk fermentativ bakterie som mangler et funksjonelt system for oksydativ fosforylering. I likhet med gjæren Saccharomyces cerevisiae, produserer Z. mobilis etanol og karbondioksid som dominerende fermenteringsprodukter. Z. mobilis produserer etanol ved en kort reaksjonsvei som utelukkende krever to enzymatiske aktiviteter: pyruvatdekarboksylase og alkohol dehydrogenase. I denne reaksjonsvei er nøkkelenzymet pyruvatdekarboksylase, som avleder pyruvatstrømmen til etanol. Pyruvatdekarboksylase

katalyserer den ikke-oksidative dekarboksyrering av pyruvat til frembringelse av acetaldehyd og karbondioksid. To alkoholdehydrogenase-isozymer foreligger i denne organisme og katalyserer reduksjonen av acetaldehyd til etanol under fermentering, fulgt av oksydasjonen av NADH til NAD⁺. Selv om bakterielle alkoholdehydrogenaser er vanlig i mange
 5 organismer, har få bakterier pyruvatdekarboksylase. Forsøk på å modifisere Z. mobilis for å forbedre dens kommersielle nytte som etanolprodusent har bare ført til meget begrenset suksess.

Det meste av brenseletanol produseres for tiden fra heksosesukkeret i maisstivelse eller
 10 sukkerrørsirup ved anvendelse av S. cerevisiae eller Z. mobilis. Men slike sukkere er relativt kostbare kilder for biomassesukker og de har utmerket verdi som næringsmidler. Stivelse og sukkeret representerer utelukkende en fraksjon av de samlede karbohydrater i planter. De dominante former av plantekarbohydrater i stilker, blad, skall, kapsler, maiskolber og liknende er strukturveggs polymerer, cellulose og hemicellulose. Hydrolyse av disse
 15 polymerer frigjør en blanding av nøytrale sukkere som inkluderer glykose, xylose, mannose, galaktose og arabinose. I naturen er det ikke funnet noen enkeltorganisme som raskt og effektivt kan metabolisere alle disse sukkere til etanol eller noe annet enkeltprodukt av verdi.

De gener som koder for alkoholdehydrogenase II og pyruvatdekarboksylase i Z. mobilis har
 20 hver for seg vært klonet, karakterisert og uttrykt i E. coli. Se Bräu & Sahm (1986a) Arch. Microbiol. 144: 296-301, (1986b) Arch. Microbiol. 146: 105-10; Conway et al. (1987a) J. Bacteriol. 169: 949-54; Conway et al. (1987b) Acid. Res. 15: 1753-61; Ingram & Conway (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 397-404; Ingram et al. (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53:2420-25.

25 Bräu og Sahm (1986a), supra, demonstrerte først at etanolproduksjonen kunne økes i rekombinant E. coli ved overekspresjon av Z. mobilis pyruvatdekarboksylase selv om meget lave etanolkonsentrasjoner ble frembrakt. Påfølgende studier utvidet dette arbeid ved anvendelse av to andre tarmbakterier, Erwinia chrysanthemi og Klebsiella planticola, og
 30 oppnådde derved høyere etanolnivåer fra heksosier, pentosier og sukkerblandinger. Se Tolan & Finn (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53: 2033-38, 2039-44.

Når den næringsforråd av enkle sukkere er dosponibel, er derfor de førnevnte mikrober

generelt nyttige. Ikke desto mindre foreligger majoriteten av verdens billige, fornybare biomassekilde ikke som monosakkarider men tvert i mot i form av lignocellulose, som primært er en blanding av cellulose, hemicellulose og lignin. Cellulose er en homopolymer av glukose, mens hemicellulose er en mer kompleks hetopolymer som ikke bare består av
5 xylose, som er dens primære bestanddel, men også av vesentlige mengder arabinose, mannose, glukose og galaktose. Det har vært anslått at mikrobiell konvertering av de sukkerrester som foreligger i avfallspapir og hageavfall fra søppelfyllinger i USA kunne frembringe over 37 milliarder liter etanol. Mens mikroorganismer lik de som er diskutert i det foregående effektivt kan fermentere de monomere sukkere som danner de cellulose- og
10 hemicellulosepolymerer som foreligger i lignocellulose, gjenstår utviklingen av forbedrede metoder til forsukring av lignocellulose som et vesentlig forskningsmål.

Gjeldende metoder til forsukring av lignocellulose inkluderer sur og enzymatisk hydrolyse. Sur hydrolyse krever imidlertid varme og fremviser flere ulemper, inklusive anvendelsen av
15 energi, produksjon av surt avfall og dannelsen av giftige forbindelser som kan hindre påfølgende mikrobielle fermenteringer. Enzymatisk hydrolyse fremstår dermed som et ønskelig alternativ. Eksempelvis kan enzymer tilsettes direkte til det medium som inneholder det lignocelluloseholdige materialet.

20 Tilnærminger med genetisk engineering med sikte på å tillegge forsukringstrekk til mikroorganismer for produksjon av etanol eller melkesyre har vært rettet mot utskillelse av høye nivåer av enzym til mediet. D.v.s. at fagfolkene har vært opptatt å modifisere mikroorganismer som allerede innehar de nødvendige proteiner for transport av cellulært produserte enzymer inn i fermenteringsmediet, hvor disse enzymer da kan virke på
25 polysakkaridsubstratet for å gi mono- og oligosakkarider. Denne tilnærmingsmåte har vært valgt fordi fagfolkene har opplevd vanskelighet i å fremgangsrik organisere organismer som mangler den påkrevde evne til å transportere slike proteiner.

For den foreliggende oppfinnelse er det derfor et formål å frembringe mikroorganismer som
30 er i stand til effektivt å avlede pyruvat til etanol under vekst under både aerobiske og anaerobiske betingelser.

For den foreliggende oppfinnelse er det også et formål å øke veksten av rekombinantverter,

og redusert akkumulering av uønskede metaboliske produkter i disse verters dyrkningsmedium har blitt oppdaget.

- 5 For den foreliggende oppfinnelse er det et annet formål å frembringe rekombinante verter som produserer tilstrekkelige intracellulære nivåer av polysakkaraseenzym(er) til å oppnå nedbrytning av glukose- eller xyloseoligomerer til produkter som de samme verter kan fermentere til alkohol.

Det foreliggende oppfinnelse vedrører således i et første aspekt en rekombinant vert som er kjennetegnet ved at

den omfatter hetrologt DNA som koder for:

(a) alkohol-dehydrogenase; og

(b) pyruvat-dehydrogenase; og

© en polysakkarase eller en kombinasjon av ulike polysakkaraser;

hvor verten uttrykker det hetrologe DNA ved et nivå som er tilstrekkelig for å lette produksjonen av etanol som et primært fermenteringsprodukt ved hjelp av verten.

- 10 Mer spesifiserte utførelser av den rekombinante vert er angitt i underkravene 2-8.

Et andre aspekt av oppfinnelsen vedrører et plasmid som er kjennetegnet ved at

det omfatter gener som koder for:

(a) alkohol dehydrogenase; og

(b) pyruvat dehydrogenase; og

(c) en polysakkarase eller en kombinasjon av ulike polysakkaraser;

hvor plasmidet er i stand til å lede en vert til å produsere alkohol dehydrogenase, pyruvat dehydrogenase og polysakkarasen(e) i et nivå som er tilstrekkelig til å lette produksjonen av etanol som det primære fermenteringsprodukt ved hjelp av verten.

- 15 Et tredje aspekt av oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for å produsere alkohol, kjennetegnet ved at at det fermenteres med en kultur av celler som omfatter en vert ifølge et av de foregående krav slik at verten produserer etanol som det primære fermenteringsprodukt.

Et siste aspekt av oppfinnelsen vedører en fremgangsmåte for å behandle et oligosakkarid-råstoff kjennetegnet ved at

fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

(a) frembringelse av et råstoff som inneholder et start-oligosakkarid;

- (b) bringe råmaterialet i kontakt med et enzym (eksempelvis en polysakkarase som definert i et av kravene 1-8) som bibringes ved hjelp av celler av en rekombinant vert ifølge et av kravene 1-8, slik at enzymet virker på start-oligosakkaridet.

Mer spesifiserte utførelser av fremgangsmåten er angitt i underkravene 12-14.

Andre formål, trekk og fordeler ifølge den foreliggende oppfinnelse vil fremkomme av den påfølgende detaljerte beskrivelse. Det skal imidlertid bemerkes at den detaljerte beskrivelse og de spesifikke eksempler, selv om de indikerer foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen, utelukkende gis som illustrasjon, siden forskjellige endringer og modifikasjoner innen ideen og rekkevidden ifølge oppfinnelsen for fagfolk vil være selvsagte utfra denne detaljerte beskrivelse.

Figur 1 viser konstruksjonen av pLOI295-holdige gener fra Z. mobilis som koder for pyruvat dekarboksylase og alkohol dehydrogenase II. Forkortelser: RI = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI, t = terminator, adh = Z. mobilis alkoholdehydrogenase II, pdc = Z. mobilis pyruvatdekarboksylase, cat = chloramphenicol-acyltransferase, Ap = β -laktamase, Zm Pro frags = fragmenter av Z. mobilis-DNA som fremviser promotoraktivitet, ColE1 = replikasjonsopprinnelse som er avledet fra pBR322, oriV = replikasjonsopprinnelse som er avledet fra RSF1010, Plac = lac-promotor, Pzm = promotor fra Z. mobilis, P? = kryptisk promotor og vektor, Kb = kilobaser.

Figur 2 viser flere plasmider som inneholder de gener fra Z. mobilis som koder for pyruvat dekarboksylase og alkohol dehydrogenase II.

Figur 3 viser vekst og syreproduksjon av stammen TC4 og rekombinanter som inneholder plasmider som koder for etanologene enzymer.

Figur 4 viser relasjonen mellom pyruvat dekarboksylase aktivitet i rekombinanter og graden av vekst. Cellemasse etter 24 timers vekst er uttrykt som optisk tetthet

ved 550 nm (O.D. 550).

Figur 5 viser konstruksjonen av pLOI510.

5 **Figur 6** viser konsentrasjonen av etanol som produseres ved fermentering av cellobiose ved hjelp av etanologene rekombinanter av Erwinia og av Klebsiella.

Figurene 7A, 7B og 7C

10 viser konstruksjonen av rekombinante plasmider som inneholder xynZ og xylB.

Figurene 8A og 8B

15 viser tynnskiktkromatografiske analyser av xylanhydrolyse ved anvendelse av E. coli stamme KO11 (pLOI2003) som ble innkubert ved 45 °C (figur 8A) eller 60 °C (figur 8B) i luriabuljong (pH 6,0) som inneholdt 4 % xylan fra bjørketre.

Figurene 9A og 9B

20 viser anvendelsen av xylooligosakkarider for dyrking ved hjelp av rekombinant E. coli KO11 (figur 9A) og K. oxytoca M5A1 (figur 9B).

Figurene 10A og 10B

25 viser omdanningen av xylose- og xylanhydrolysat til etanol ved hjelp at rekombinant K. oxytoca M5A1. Figur 10A viser veksten, og figur 10B viser etanolproduksjonen.

Figurene 11A og 11B

30 viser etanolproduksjonen fra rekombinante stammer av K. oxytoca M5A1. Figur 11A viser etanolproduksjonen fra glykose (100 g/liter) ved hjelp av stammen M5A1 (pLOI555), stammen P2 som inneholder integrerte pet-gener

og stammen B1 som inneholder intergrerte pet-gener. Figur 11 B illustrerer etanolproduksjonen fra cellobiose (100 g/liter) -fermentering ved hjelp av stammen P2.

- 5 **Figur 12** viser effekten av tilsatser av kommersiell cellulase på etanolutbyttet fra 50 g SOLKA FLOC SW40/liter etter 120 timer.

Figurene 13A, 13B og 13C

- 10 viser de tynnskiktkromatografiske analyser av cellulasehydrolyse og fermentering ved hjelp av P2 (pCT603T) av syresvulmet, cellulose (figur 13A), basesvulmet cellulose (figur 13B) og krystallinsk cellulose (figur 13C).

- 15 **Figur 14** viser den forbedrende effekt på etanolproduksjonen av forbehandling med celD-genproduktet og anvendelse av 1 % cellulase, hvilket frembringer et etanolutbytte tilsvarende det for 5 % CYTOLASE.

- 20 **Figur 15** viser konstruksjonen av plasmidene pLOI140 og pLOI141, som omfatter a-amylasegenet fra Bacillus stearothermophilus og pullulanasegenet fra Thermoanaerobium brockii.

Figur 16A og 16B

viser hhv. etanolproduksjonen og cellemassen fra fermentering av glykose og maltose ved hjelp av KO11.

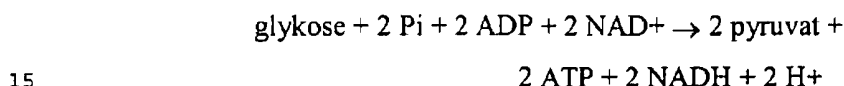
- 25 **Figur 17** viser resultatene av stivelsesfermentering ved hjelp av de rekombinante E. coli-stammene KO11 (pLOI140) og KO11 (pLOI141). (Siden resultatene for begge stammer i det vesentlige var identiske, er utelukkene data for KO11 (pLOI141) vist.)

- 30 **Figur 18** viser den tynnskiktkromatografiske analyse av maisstivelses-fermentering ved hjelp av KO11 (pLOI141) i løpet av fermenteringen (72 timer).

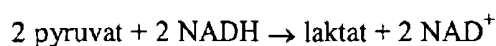
Figur 19 viser en skjematisk illustrasjon av en fermenteringsprosess ifølge oppfinnelsen.

5 **I. Vanlig karbohydratmetabolisering**

I de fleste dyr og planter så vel som i bakterier, gjær og sopp, degraderes glykose innledningsvis ved hjelp av en anaer reaksjonsvei forut for enten oksydativ eller fermentativ metabolisering. Den mest vanlige reaksjonsvei, kalt glykolyse, henviser til den serie enzymatiske trinn hvorved det seks-karbons glykosemolekyl nedbrytes, via multiple
10 mellomprodukter, til to molekyler av den tre karbons forbindelse pyruvat. I løpet av denne prosess reduseres to molekyler NAD⁺ til dannelsen av NADH. Nettoreaksjonen i denne omdanning av glykose til pyruvat er:



For at glykolysen skal fortsette, må det NAD⁺ som forbrukes ved glykolysen regenereres ved oksydasjon av NADH. Under oksydativ metabolisering oksyderes NADH vanligvis ved donering av hydrogenekvivalenter via en serie trinn til oksygen, og derved dannes vann. De
20 fleste organismer inneholder imidlertid ytterligere anaere reaksjonsveier, hvilket tillater at glykolysen kan fortsette i fravær av forbindelser som oksygen. Slike anaere prosesser betegnes fermentering, og homomelkesyrefermentering er kanskje en av de mest kjente av disse reaksjonsveier som opptrer i mange bakterier og i dyr. I homomelkesyrefermentering, omdannes glykose endelig til to molekyler av trekarbonssyren, melkesyre. NADH oksyderes
25 ved donering av hydrogenekvivalenter til pyruvat og således produseres melkesyre. Nettoreaksjonen for regenereringen av NAD⁺ ved hjelp av melkesyrefermentering er:



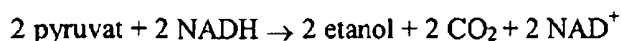
30 Som tidligere nevnt er etanologene organismer lik Z. mobilis og S. cerevisiae i stand til å utføre en andre (alkoholisk) fermenteringstype hvorved glykose metaboliseres til to etanolmolekyler og to CO₂-molekyler. Alkoholisk fermentering adskiller seg fra

melkesyrefermentering ved de trinn som anvendes for regenerering av NAD^+ . To forskjellige enzymatiske trinn kreves for alkoholisk fermentering. Pyruvatdekarboksylase splitter pyruvat i acetaldehyd og karbondioksid. Alkoholdehydrogenase tjener til å regenerere NAD^+ ved overføring av hydrogenekvivalenter fra NADH til acetaldehyd, slik at det produseres etanol.

5 Reaksjonene for regenereringen av NAD^+ ved hjelp av alkoholisk fermentering er:



10 Nettoreaksjonen for alkoholisk fermentering er:



DNA som koder for hvert av disse enzymer har hver for seg blitt klonet, og Z. mobilis
15 pyruvat dekarboksylase har blitt uttrykt rekombinant. Se eksempelvis Bräu & Sahm (1986a),
supra. Det var imidlertid meget usikkert hvorvidt den glykolytiske reaksjonsvei i organismer
som ikke produserer etanol som en primær metabolitt ("ikke-etanologene organismer") i
vesentlig grad kunne avledes ved pyruvattrinnet, selv om slike organismer i noen grad kunne
modifiseres for å uttrykke begge de ytterligere enzymer som var påkrevet for alkoholisk
20 fermentering.

Tvertimot var det innen faget en forventning om at en slik avledning kunne utsulte
rekombinantverten med hensyn på pyruvat og dets normale produkter. Se Bräu & Sahm
(1986a, b), supra. Det var også en mulighet at avledning av karbon fra glykolyse til
25 etanolproduksjon i ellers ikke-etanologene organismer ville forstyrre NAD/NADH -forholdet
som er avgjørende for innbyrdes forbundne reaksjonsveier for energidannelse og biosyntese.

II. Fermentering

Det er imidlertid oppdaget at organismer som utfører glykolyse eller noen variant derav, , kan
5 modifiseres til å avlede så mye som 95 % av karbonstrømmen fra glykolyse, i pyruvattrinnet,
til hva som i det vesentlige er en syntetisk reaksjonsvei som omfatter de enzymer som er
kodet ved hjelp av hetrologe pyruvat dekarboksylase (pdc) og alkohol dehydrogenase (adh) -
gener. Resultatet er en modifisert organisme som produserer etanol som sitt primære
fermenteringsprodukt. Dette innebærer at etanolproduksjonen overskrider 50 % av det totale
10 fermenteringsprodukt.

Det er også oppdaget at det for slik hetrolog ekspresjon kan utvelges verter som, ikraft av
deres iboende evne til å transportere og metabolisere oligosakkarider, kan fermentere mer
komplekse råmaterialer. (I denne sammenheng betegner "oligosakkarid" et molekyl som
15 består av to eller flere sakkaridmonomerer, inklusive men ikke begrenset til disakkaridene
cellobiose, maltobiose og xylobiose, trisakkarider så som cellotriose og xylotriase, og
langkjedede polysakkarider slik som cellulose, hemicellulose, stivelse, glykogen, pektin og
inulin.) Kapasiteten til en således utvalgt og transformert vert kan videre økes ved ekspresjon
i den samme vert av ett eller flere gener som koder for en polysakkarase, d.v.s. et enzym som
20 katalyserer nedbrytingen av komplekse oligosakkarider til mindre oligosakkarider og/eller
sakkaridmonomerer.

(A) GENETISK MODIFISERING EN KUNSTIG ETANOLOGEN REAKSJONSVEI:

25 Et viktig aspekt er et operon som leder cellene til å produserer etanol. Et eksempel på et slikt
operon er en konstruksjon som er betegnet et "pet operon", som omfatter Z. mobilis-gener
som koder for hhv. alkoholdehydrogenase II- og pyruvatdekarboksylaseaktiviteter, sammen
med egnede regulerende sekvenser, eksempelvis promotorer, inducere, operatorer, ribosomale
bindingspunkter og transkripsjonelle terminatorer. Således elimineres avhengigheten av
30 medfødt alkohol dehydrogenase-aktivitet for etanolproduksjon i tidligere rekombinante
systemer ved kombinasjon av Z. mobilis-gener som koder for alkohol dehydrogenase II og
pyruvat dekarboksylase til dannelsen av et pet operon. Videre kan vesentlige mengder alkohol
produseres i rekombinanter som inneholder dette pet operon, både under aerobe og anaerobe

betingelser.

For å tildele en mikroorganisme evnen til å produsere polysakkaraser, slik som xylanaser og cellulaser, kan et etanologen operon modifiseres ved tilsats av det gen/de gener som koder for det ønskede enzym/de ønskede enzymer. Alternativt kan ett eller flere polysakkarase-kodende gener innkorporeres inn i et plasmid som anvendes til å transformere en vertsorganisme som allerede er modifisert med et operon som styrer etanolproduksjonen, som beskrevet i det foregående. (Dette aspekt beskrives mer detaljert i seksjon II(E) i det følgende.) Ved hjelp av en alternativ tilnærningsmåte, utvelges den vert som skal transformeres med det etanologene operon utfra dets medfødte evne til å uttrykke en polysakkarase. En ytterligere tilnærningsmåte er å tilsette polysakkarasegenene inn i kromosomet ved integrering.

Tilnærningsmåten av å kombinere, i en enkelt konstruksjon, de gener som koder en metabolisk reaksjonsvei kan enkelt gis generell anvendelse overfor et utvalg situasjoner hvor gener fra forskjellig lokaliteter kan bringes sammen for å danne et kunstig operon. Dannelsen av et pet operon på denne måte er bare et eksempel på de anvendelsesområder som forutses. Eksempelvis kunne gener som koder for alkohol dehydrogenase-aktivitet fra et utvalg organismer kombineres med andre gener som koder for pyruvat dekarboksylase-aktivitet for slik å danne et operon som koder for den ønskede reaksjonsvei. Operoner som koder for andre reaksjonsveier kan også dannes. Det er også klart at, for den i det foregående diskuterte etanologene reaksjonsvei, er det ikke nødvendig at de gener som koder for alkohol dehydrogenase- og pyruvat dekarboksylase-aktiviteter er under felles kontroll. De kunne være under separat kontroll, selv i forskjellige plasmider eller på forskjellige lokaliteter på kromosomet. Likeledes kunne gen/gener som koder for polysakkaraser være under felles eller separat kontroll, eller lokalisert i forskjellige plasmider eller i forskjellige kromosomale posisjoner.

Også anvendelse av rekombinante etanolproduserende verter til effektiv produksjon av rekombinante peptider eller proteiner beskrives. D.v.s. at rekombinantcellene kan omdannes videre med gener som koder for nyttige produkter utover polysakkaraser. (Disse ytterligere gener kunne være plasmid-bårne, eller være innkorporert i kromosomet.) Nærmere bestemt uttrykker de gener som koder for de nødvendige etanologene enzymer generelt i høye nivåer og dominerer karbonstrømmen fra pyruvat og NADH-oksydasjonen under anaerob dyrking.

Under disse betingelser kan strømmen av pyruvatkarbon-skjeletter avledes fra produksjonen av organiske syrer til produksjon av etanol som det dominerende fermenteringsprodukt.

På denne måte minimaliseres graden av surgjøring pr. enhet celleprotein ved produksjon av etanol i stedet for organiske syrer. Oksygenoverføring er ofte en vesentlig begrensning under dyrking av tette mikroorganismekulturer, og det er denne begrensning som resulterer i syreproduksjon og dyrkningsmediets pH-endring. I rekombinanter som uttrykker et etanologent operon avleder derimot de hetrologe, etanologene enzymer en del av pyruvatet fra glykolyse til acetadehyd og gjenoksyderer NADH til produksjon av etanol, et mindre skadelig metaboliseringsprodukt. Dermed kan stammer som inneholder både funksjonelle respirasjonskjeder for oksydativ fosforylering og enzymer for etanolproduksjon dyrkes til enda høyere celletettheter p.g.a. driften av begge systemer under regenerering av NAD⁺ og en reduksjon i sure avfallsprodukter. Slik iboende fleksibilitet resulterer i mindre stringente krav til prosesskontroll, såvel som økede volumetriske utbytter av rekombinantprodukter.

Den akkumulering av organiske syrer som ellers forekommer anses som en konsekvens av fermentering under anaerob vekst. Men merkbare mengder acetat kan produseres selv under aerobe betingelser, d.v.s. under hurtig agetering. Dermed kan produksjonen av acetat være progressiv fra de tidligste vekststadier og ikke begrenset til de senere stadier, når celletettheten er høy og anaere betingelser dominerer. Selv under aerobe betingelser tjener syreproduksjon fra glykose til å begrense vekst i flytende og fast medium, hvilket demonstreres ved den økte endelige celletetthet i medier som inneholder et supplement av fosfatbuffer.

Således kan etanolproduserende transformanter være gode verter for produksjon av rekombinantprodukter, selv under anaerobe betingelser, ved minimal syreproduksjon. Mange rekombinante proteiner og peptider inneholder cystein- eller disulfidbroer, og egnet folding eller reaksjoner av disse er et vesentlig trekk ved dannelsen av det aktive enzym. Siden dannelse av disulfidbindinger fremmes ved oksygen, frembringer syntese av slike proteiner under anaerobe betingelser mindre mulighet for uegnet folding forut for isolering og folding under kontrollerte betingelser, hvilket resulterer i større gjenvinning av biologisk aktivt produkt.

Anvendelsen av adhB i disse konstruksjoner kan være spesielt fordelaktig. AdhB koder for et stressprotein (An et al. (1991) FEBS LETTERS 282:205-208). Stressproteiner har vært vist å hjelpe til i den egnede folding av hetrologe proteiner hvilket muliggjør opprettholdelse av biologisk funksjon. Lee et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:2849-2852. Dermed kan anvendelsen
5 av adhB tenkes å forbedre produksjonen av funksjonelle proteiner i rekombinante organismer.

Under aerobe betingelser i E. coli, metaboliseres pyruvat fra glykolyse primært ved hjelp av pyruvat dehydrogenase-komplekset og ved hjelp av laktat dehydrogenase, idet overskuddet av acetylcoenzym A omdannes til acetat. Se Gottschalk, BACTERIAL METABOLISM, pp.
10 210-80 (Springer-Verlag 1986). De tilsynelatende K_m -verdier for disse to enzymer er hhv. 0,4 og 7,2 mM. Den tilsynelatende K_m for Z. mobilis-pyruvat dekarboksylase tilsvarer (pyruvat dehydrogenase) eller er lavere enn (laktat dehydrogenase) for de to E. coli-enzymer, hvilket letter acetaldehydproduksjonen. NAD^+ -regenerering under aerobe betingelser fremkommer primært fra biosyntese og fra $NADH$ -oksidase (koplet til
15 elektrontransportsystemet) med en tilsynelatende K_m på 50 μM . Den tilsynelatende K_m for Z. mobilis-alkoholdehydrogenase II er over fire ganger lavere enn for E. coli NAD^+ -oksydase, hvilket tillater at Z. mobilis-enzymet effektivt kan konkurrere om endogene $NADH$ -reservoarer for reduksjon av acetaldehyd til etanol. Dermed er egenskapene for de Z. mobilis etanologene enzymer og deres relativt høye eksplosjonsnivåer velegnede for avledning av
20 karbonstrømmen til etanol under aerobiske betingelser.

Under anaerobiske betingelser i E. coli, metaboliseres pyruvat fra glykolyse primært ved hjelp av laktatdehydrogenase og pyruvat/formatlyase. De tilsynelatende K_m -verdier for disse to enzymer er hhv. 18 og 5 ganger høyere enn tilsvarende for Z. mobilis pyruvatdekarboksylase.
25 På liknende måte er de tilsynelatende K_m -verdier for de prinsipielle enzymer som er involvert i NAD^+ -regenereringen i E. coli også betydelig høyere enn de for Z. mobilis-alkoholdehydrogenase II. Dermed er de etanologene enzymer fra Z. mobilis ganske konkurransedyktige med hensyn på karbon (pyruvat) og reduksjonspotensial ($NADH$) i forhold til de normale fermentative enzymer og den oksydative fosforylering i E. coli, hvilket
30 tillater effektiv kanalisering av glykolytiske produkter til etanol.

Det er også oppdaget at laktose og alle de dominerende sukkerer som foreligger i cellulose og hemicellulose (nemlig glykose, xylose, arabinose, galaktose og mannose) kan omdannes til

etanol ved hjelp av rekombinantverter som uttrykker gener som koder for etanologene enzymer, lik de som omfattes av den i det foregående diskuterte etanolreaksjonsvei for Z. mobilis.

- 5 Et utvalg faktorer bør betraktes ved utvelging av vertsstammer som er egnet til etanolproduksjon. Disse faktorer inkluderer utvalget av substrat og miljømessig hardførhet, slik som sukkertoleranse, salttoleranse, etanoltoleranse, toleranse overfor lav pH og temperaturtoleranse. Som beskrevet i det foregående fremviser eksempelvis E. coli-stammen ATCC 9637 (Waksman-stamme W) overlegne egenskaper når det gjelder miljømessig
- 10 hardførhet, selv om etanolproduksjonen fra glykose var lavere enn med andre stammer. Stammen ATCC 9637 ble utvalg primært p.g.a. dens evne til å anvende sukrose. Ved fordel gjør dette trekk ved ATCC 9637 denne stamme egnet til fermentering av sukkerroer, rørsukker og andre råmaterialer som inneholder sucrose. ATCC 11303 (Luria-stamme B) og ATCC 15244 (Kepas-stamme ML300) som inneholder pLOI297 produserte de høyeste
- 15 etanolnivåer og fremviste akseptable grader av miljømessig hardførhet. Plasmider var ganske stabile i disse to konstruksjoner og de ble utvalgt som de beste kandidater for videre utvikling av etanolproduksjon. Begge konstruksjoner uttrykte de høye nivåer av Z. mobilis-pyruvatdekarboksylase som kreves for effektiv etanolproduksjon. Se Ingram et al. (1987).
- 20 Alle større sukkerkomponenter i plantebiomasse ble konvertert til etanol ved hjelp av den rekombinante E. coli som inneholdt etanolreaksjonsveien fra Z. mobilis. Konverteringseffektiviteten av glykose og xylose til etanol var høyere enn det som tidligere har vært rapportert for S. cerevisiae, se Lovitt et al (1988) CRC Crit. Rev. Biotechnol. 7: 107-186, og for pentosefermenterende gjærssystemer. Se Beck (1989) Biotechnol. Bioeng. Symp.
- 25 17:617-627; Jeffries et al. (1988) Biotechnol. Bioeng. 31:502-506; Skoog et al. (1988) Enzyme Microbiol. Technol. 10:66-79; Slininger et al. (1985) Biotechnol. Lett. 7:431-436). Ved hjelp av rekombinant E. coli ble xylose konvertert til etanol med en høyere effektivitet enn glykose ved hjelp av S. cerevisiae, som rapportert av Lovitt et al., supra. De usedvanlig høye etanolutbytter med xylose (over 100 % av det teoretiske) kan skyldes etanol som
- 30 avleveres fra kataboliseringen av komplekse næringsstoffer. Mange aminosyrer og komplekse medium-komponenter kataboliseres direkte til glykolytiske mellomprodukter eller til pyruvat. Dette pyruvat kunne deretter omdannes til etanol.

Pdc- og adh-gener transformeres inn i et utvalg forskjellige verter og uttrykkes ved anvendelse av et utvalg promotorer. Det befinner seg godt innen kapasiteten til en person som er trenet innen dette området å anvende de beskrivelser som frembringes heri til å utføre disse overføringer. Eksempelvis kan pdc- og adh-gener enkelt innføres i plasmider som har forskjellige vertsområder. Plasmider som er konstruert for å repliseres i *E. coli* og én annen målorganisme kalles ofte "skyttelvektorer", siden de er i stand til å replikere i to eller flere verter. Disse plasmider er lett tilgjengelige og kan anvendes med enkelhet. De hyppigste kombinasjoner inkluderer skytler mellom *E. coli* og andre bakterier, *E. coli* og gjær, og *E. coli* og dyreceller. Disse vektorer er tilgjengelige fra kataloger som er velkjente for fagfolk.

Z. mobilis pdc- og adh-gener har vært inkopert og uttrykt i *Xanthomonas*, *Klebsiella* og *Erwinia*. Liknende suksess i andre organismer kan også oppnås med letthet. Selv om en eller annen enkel modifikasjon av eksempelvis promotoren kan være nødvendig for å frembringe den optimale konstruksjon, er suksessen i høy grad forutsigbar, basert på biokjemiske egenskaper og aktuell kunnskap om ekspresjon av løselige cytoplasmiske proteiner. Fremmede gener som uttrykker enzymatisk aktivitet som er nødvendig for å omdirigere pyruvatmetaboliseringen kan endog integreres i kromosomet og uttrykkes uten behov for et plasmid. Se seksjon II(C), *infra*. Eksempelvis kan en pet-konstruksjon som mangler en promotor integreres i *E. coli*-kromosomet straks bak promotoren for pyruvat/formatlyasegenet. Analog integrering inn i *pfl* eller andre gener er mulig i de fleste organismer, og krever bare et fragment av målgenet for å lede punktet for integrering ved homolog rekombinering. Målgener utover *pfl* kunne også anvendes for integrering. Siden pet-uttrykkende konstruksjoner lett identifiseres på indikatorplater, er denne tilnærningsmåte for den hurtige og effektive konstruksjon av andre organismer for etanolproduksjon gjennomførbar i et stort antall tilfeller.

Det er tilgjengelig et stort antall publikasjoner som beskriver prosedyrer for ekspresjon av fremmede gener. Kataloger opplister også vektorer som kan anvendes for forskjellige organismer. Kloningsvektorer for gramnegative bakterier, grampositive bakterier, vektorer med tilpasningsevne til et bredt utvalgt verter, soppkloningsvektorer, insektkloningsvektorer, dyrekloningsvektorer og plantekloningsvektorer er alle velkjente for fagfolk. Kataloger som disse kloningsvektorer kan bestilles utfra er lett tilgjengelige og velkjente for fagfolk. Se eksempelvis Marino (1989) *BioPharm* 2: 18-33; *VECTORS: A SURVEY OF MOLECULAR*

CLONING VECTORS AND THEIR USES (Butterworths 1988).

- En fagperson har også tilgang til alternative *pdh*- og *adh*-gener og til andre slike gener som kan identifiseres ved anvendelse av de førnevnte *Z. mobilis*-gener som sonder (probes), eller
- 5 heller ved å observere aktivitet på indikatorplater. Til oppnåelse av formålene ifølge denne oppfinnelse spiller det ingen rolle hvorvidt alkoholdehydrogenase-aktiviteten frembringes fra et gen som er isolert fra en hest, en gjær, et menneske, en insekt eller et annet bakteriegen. Siden ekspressjonen av alkoholdehydrogenase-aktivitet kan observeres direkte på aldehyd-indikatorplater, er det ikke nødvendig med sekvensinformasjon for isolering av ytterligere
- 10 gener som koder for proteiner som fremviser den enzymatiske aktivitet. Faktisk er mange alkoholdehydrogenase-gener allerede velkjente for fagfolk, noe som kan illustreres ved å ramse opp de 252 *adh*-gener som pr. mars 1991 befant seg i the Genbank database (IntelliGenetics Inc., 700 E. El Camino Drive, Mountain View, CA 94040).
- 15 *Z. mobilis* inneholder to gener som koder for funksjonelle alkoholdehydrogenasegener, og et av disse (*adhB*) er evolusjonsmessig beslektet med en butanol dehydrogenase fra *Clostridium acetobutylicum*, propandioloksidoreduktase fra *E. coli* og ADHIV-alkoholdehydrogenase fra *Saccharomyces*. Alle har vært klonet og sekvensert. Det andre alkoholdehydrogenasegen fra *Z. mobilis*, *adhA*, er en sink-alkoholdehydrogenase som også har vært klonet og sekvensert.
- 20 Basert på sammenlikninger av primærstruktur avledet fra sekvenser som er lett tilgjengelige, antas *adhA*-genet å være evolusjonsmessig beslektet med den typiske alkoholdehydrogenase som er beskrevet i dyr, planter og i det dominante *adh*-gen i gjær. *AdhA*-genet og andre alkoholdehydrogenasegener kan erstatte det opprinnelige *adhB*-gen som er eksemplifisert heri.
- 25 På samme måte spiller det for denne oppfinnelses formål ingen rolle hvorvidt pyruvatdekarboksylase-aktiviteten er frembrakt av et gen fra *Z. mobilis* eller av et gen som koder for den nødvendige enzymatiske aktivitet men som kommer fra mais, gjær eller en annen organisme. Utviklingen av livsformer fra felles opphav er nå godt akseptert og har blitt demonstrert i utmerket detalj ved metoder av molekylær genetikk. Ikke bare kan organismer
- 30 arrangeres i fylogenetiske trær basert på makro-karakteristikk, men de opphavsgener som er utviklet for spesifikke funksjoner har blitt beholdt gjennom utviklingen med opprettholdelse av trekk som kreves for slike funksjoner. Dette høye nivå av opprettholdelse gjør det mulig for fagfolk å isolere funksjonelt ekvivalente, genetisk beslektede enzymer fra andre

organismer ved anvendelse av primær informasjon fra ett eller flere medlemmer av en enzymfamilie. Glykolyseenzymene er noen av de beste eksempler på dette siden slike enzymer er så grundig studert.

- 5 Faktisk har nettopp en slik tilnærmingsform vært anvendt med fremgang til å klonе pyruvatdekarboksylase-genet fra mais, ved anvendelse av informasjon om Z. mobilis pdc og om pdc fra S. cerevisiae til å utforme en DNA-sonde. Se Kelly (1989 Plant Molecular Biology 13: 213-22. Alternative strategier kunne ha anvendt hele genene som sonder. Siden syntesen av et protein med pyruvatdekarboksylaseaktivitet (pyruvat omdannet til acetaldehyd
10 pluss karbondioksid) kan observeres direkte på aldehydindikatorplater, ville det ikke være nødvendig med sekvensinformasjon for å lokalisere andre gener, selv om sekvensinformasjon har vært anvendt til å isolere maisgenet. Mange andre pyruvatdekarboksylase-gener som frembringer en funksjonell ekvivalent kan isoleres fra andre organismer. Disse øvrige gener ville være egnede erstatninger for Z. mobilis pdc, på samme måte som flere
15 alkoholdehydrogenaser har vist seg å være egnet. Videre i den forbindelse, har the GenBank database opplistet i det minste 5 pdc-gener pr. mars 1991.

- Som en ytterligere forbedring, kan en rekombinantvert transformeres med gener som koder for nøkkelkomponenter for glykosetransporten i Z. mobilis, nemlig de gener som koder for Z. mobilis-glykokinase (glk) og for det glykosefaciliterte diffusjonsprotein (glf). Spesielt kan glk
20 og glf kombineres i et kunstig operon, etter de linjer som er beskrevet i det foregående for et etanologent operon slik som pet, og transformeres til en rekombinant som allerede inneholder det sistnevnte operon. Ekspresjon av dette glk/glf-operon vil resultere i en økning av glykosestrømmen gjennom membran og, dermed en økt hastighet for etanolproduksjon.
25 Likeledes kan gener som koder for nøkkelkomponenter for transporten av oligosakkarider i andre verter, eller gener som koder for nøkkelkomponenter i den glykolytiske reaksjonsvei, også anvendes til ytterligere å transformere verter. Slike transformasjoner med gener som koder for hastighetsbegrensende trinn i en strøm kan forventes å øke etanolproduksjonens hastighet og heve nivåene av glykolytiske mellomprodukter som en kilde til skjeletter for
30 biosyntese.

(B) FERMENTERINGSPARAMETERE:

Ifølge den foreliggende oppfinnelse uttrykkes hetrologe etanologene gener i nivåer som letter

produksjonen av etanol som et fermenteringsprodukt ved hjelp av rekombinantverten. Ved å innføre slike gener i en egnet ikke-etanologen organisme, som beskrevet i det foregående, *gjøres den transformerte vert i stand til å produsere vesentlige mengder etanol fra oligosakkarider lik cellobiose, cellotriose, xylobiose og xylotriase.* Som diskutert i det følgende, kan etanolkonsentrasjoner i størrelsesorden 1 M og opp til 1,5 M oppnås fra rekombinantverter ifølge den foreliggende oppfinnelse.

(C) KROMOSOMAL INTEGRERING AV FREMMEDE GENER:

Kromosomal integrering av fremmede gener kan by på flere fordeler sammenliknet med plasmidbaserte konstruksjoner, idet den sistnevnte har mange begrensninger i forbindelse med kommersielle prosesser. Plasmidbaserte konstruksjoner er i seg selv mindre stabile enn kromosomale gener og tjener som en miljømessig fare, et reservoar for transmisjon av hetrologe trekk. Ustabilitet forverres ofte ved tilsats av flere plasmider. Ikke desto mindre kan plasmidbaserte konstruksjoner ofte være nyttige for innledningsvise eksperimenter som involverer ekspresjon av hetrologe gener, slik som gener som koder for cellulaser, siden de enkelt kan anvendes for å transformere vertceller. Men for å lette screening av det resulterende protein (eksempelvis en cellulase), er det ofte ønskelig å eliminere behovet for et plasmid som bærer etanolproduserende gener ved hjelp av kromosomal integrering.

Etanologene gener har vært integrert kromosomalt i E. coli B, se Ohta et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57: 893-900. Generelt oppnås dette ved rensing av et DNA-fragment som inneholder (1) de ønskede gener oppstrøms fra et kloramfenikol-gen og (2) et fragment av homologt DNA fra målorganismen. Dette DNA kan liggeres til dannelsen av sirkler uten replikon og anvendes til transformasjon. Dermed kan pfl-genet målsøkes i tilfellet med E. coli, og korte, tilfeldige Sau3A-fragmenter kan liggeres i Klebsiella for å fremme homolog rekombinasjon.

Innledningsvise utvalg av rekombinanter kan utføres på plater med 20 mg kloramfenikol ("Cm")/liter for å tillate vekst etter integrasjon av en enkelt kopi. Disse konstruksjoner kan eventuelt oppnås med en meget lav frekvens. Etanologene gener kan innledningsvis uttrykkes i lave nivåer, tilstrekkelige til å tillate effektiv etanolfermentering. Ekspresjon på høyere nivå kan oppnås som et enkelt trinn ved utvelgelse på plater som inneholder 600 til 1000 mg Cm/liter. Slike stammer har vist seg å være meget stabile og det forventes at den samme

tilnærmingmåte vil være fremgangsrik for mer optimale stammer av Klebsiella og Erwinia. Preliminær testning av noen få ville stammer viser at elektroporering forbedrer plasmidavlevering og kan redusere den innsats som kreves til oppnåelse av integreringer. (Se eksempel 16 i det følgende.)

5

(D) UTVELGELSE AV VERT:

Området av organismer som er egnet for modifikasjon til ekspresjon av hetrologe pdc- og adh-gener, som beskrevet i det foregående, inkluderer bl.a. aukaryote celler, slik som
 10 dyreceller, insektsceller, soppceller og gjær som ikke er naturlig etanologene, og ikke-etanologene bakterier. I tillegg til E. coli er eksempelvis andre tarmbakterier fra slektene Erwinia, lik E. chrysanthemi, og Klebsiella, lik K. planticola og K. oxytoca, spesielt attraktive verter fordi de kan metabolisere et utvalg sukkere, inklusive pentoser. Fordelaktige verter kan også utvelges fra den bredere kategori av gramnegative bakterier, slik som arter av slekten
 15 Xanthomonas, og fra de grampositive bakterier, slik som medlemmer av slekten Bacillus, Clostridium og Cellulomonas. Det er tilgjengelig egnet transformasjonsmetodologi for hver av disse forskjellige vertstyper.

Visse organismer blant de førnevnte mikrober tilfredsstiller også kriteriene for utvelgelsen av
 20 en vert for fermentering av oligosakkarid(er) til etanol. Nærmere bestemt kan en vert i denne henseende utvelges fordi den produserer (1) de proteiner som er nødvendige for å transportere et oligosakkarid inn i cellen og (2) intracellulære (cytoplasmiske) nivåer av enzymer som metaboliserer disse oligosakkarider. Førnevnte mikrober som tilfredsstiller disse kriterier inkluderer tarmbakterier som E. chrysanthemi og andre Erwinia- og Klebsiella-arter slik som
 25 K. oxytoca, som naturlig produserer en β -xylosidase, og K. planticola. Visse E. coli tilfredsstiller også kriteriene fordi de transporterer og metaboliserer cellobiose, maltose og/eller maltotriose. Se eksempelvis Hall et al. (1987) J. Bacteriol. 169: 2713-17.

Verter kan, under tilfredsstillelse av kriteriene (1) og (2) i det foregående, utvelges fra de
 30 bredere kategorier gramnegative bakterier, slik som Xanthomonas-arter, og grampositive bakterier, inklusive medlemmer av slekten Bacillus, slik som B. pumilus, B. subtilis og B. coagulans; Clostridium, eksempelvis Cl. acetobutylicum, Cl. aerotolerans, Cl. thermocellum, Cl. thermohydrosulfuricum og Cl. thermosaccharolyticum; Cellulomonas-arter lik C. uda; og

- butyrivibrio fibrisolvens. Liknende akseptable er forskjellige typer gjær, eksemplifisert ved arter av Cryptococcus lik Cr. albidus, arter av Monilia, Pichia stipitis og Pullularia pullulans; og andre oligosakkarid-metaboliserende bakterier, inklusive men ikke begrenset til Bacteroides succinogenes, Thermoanaerobacter-arter lik T. ethanolicus, Thermoanaerobium-arter slik som T. brockii, Thermobacteroides-arter lik T. acetoethylicus, og arter av slekten Ruminococcus (eksempelvis R. flavefaciens), Thermonospora (slik som T. fusca) og Acetivibrio (eksempelvis A. cellulolyticus). Igjen er egnede transformasjonsteknikker tilgjengelige for disse forskjellig verter.
- 10 Den litteratur som vedrører mikrober som tilfredsstiller de foreliggende kriterier reflekterer eksempelvis i Biely (1985) Trends in Biotech. 3: 286-90, i Robsen et al. (1989) Enzyme Microb. Technol. 11: 626-44, og i Beguin (1990) Ann. Rev. Microbiol. 44: 219-48, hvis respektive innhold medtas heri under henvisning. Fagfolk vil erkjenne at mange andre verter vil være egnet til anvendelse i den foreliggende oppfinnelse. Egnede verter kan altså
- 15 identifiseres ved screening til fastsettelse av hvorvidt den testede mikrobe transporterer og metaboliserer oligosakkarider. Screening innen dette område kan gjennomføres på forskjellige måter. Eksempelvis kan mikroorganismer screenes til bestemmelse av hvem som vokser på egnede oligosakkarid-substrater, idet screeningen er utformet til utvelgelse av de mikroorganismer som ikke bare transporterer monomerer inn i cellen. Se eksempelvis Hall et
- 20 al. (1987), supra. Alternativt kan mikroorganismer analyseres med hensyn på egnet intracellulær enzymaktivitet, eksempelvis β -xylosidase-aktivitet.

Et eksempel på en "utvalgsregiment" (selection regimen) som er egnet til anvendelse er en hvor minimalt medium som inneholder pectin anvendes til å isolere en mykrotet Erwinia-

25 stamme fra plantematerialer under forråtnelse. Se Starr,, "The Genus Erwinia," in Vol. II THE PROKARYOTES 1260-71 (Springer-Verlag 1981). Isolater som forårsaker gropdannelse i kalsiumstabilisert pectin kan karakteriseres ytterligere til bekreftelse av identitet. Se Bergey's Manual, Volum 1, sidene 469-76.

- 30 Egnede kandidatstammer av Klebsiella, som finnes rikelig i papirmasse og papiravfall (Huntley et al. (1976) J. Water Pollution Control Federation 48: 1766-1771; Knittel et al. (1977) Appl. Environ. Microbiol. 34: 557-63), kan eksempelvis frembringes fra avfallsstrømmene til produksjonsbedrifter i Perry og Palatka, Florida. Tilstedeværelsen av et

høyt antall Klebsiella i slikt avfall kan fremme utvelgelsen av spesielt egnede stammer med optimale karakteristika slik som resistens overfor giftige kjemikalier og evnen til å utnytte oligosakkarider. Stammen kan innledningsvis utvelges ved dyrking på koliform-spesifikt medium, se Seidler, "The Genus Klebsiella (Nonmedical Aspects)," in II THE

- 5 PROKARYOTES 1166-72, og ytterligere identifiseres ved indol-produksjonen, Voges-Proskauer reaksjon, citrat, etc.. Se Bergey's Manual, Volum 1, sidene 461-65.

Isolater av Klebsiella og Erwinia kan sammenliknes med hensyn på deres evne til å degradere karboksymetyl cellulose, xylan-blått, metyl-umbelliferyl- β -D-glykotyranosid, metyl-
10 umbelliferylclobiosid, metyl-umbelliferylxylosid og metyl-umbelliferyl-arabinosid som modellsubstrater for hhv. endoglykanase, xylanase, β -glykosidase, cellobiohydrolase, xylosidase og arabinosidase på plater som er buffret til pH 6,0 (30 °C). Stammer bør også screenes med hensyn på deres evner til å metabolisere monosakkarider (heksose og pentose) såvel som cellobiose, cellotriose, xylobiose og xylotriase. Nivåer av disakkarider og
15 trisakkaride kan testes i rørkulturer som dyrkes over natten ved hjelp av tynnskikt-kromatografi til overvåking av anvendelsen av sukker under en natts inkubasjon. Xylosidaser kan genereres fra bjørketre-xylan (Sigma) ved behandling med C. thermocellum-xylanase.

- 20 Fremvokste lovende stammer kan ytterligere screenes med hensyn på etanoltoleranse, salttoleranse og temperaturløstoleranse på en måte som i det vesentlige likner den som ble anvendt ved utvelgelse av E. coli B. Se Alterhum et al., (1989) Appl. Environ. Microbiol. 55: 1943-48; Beall et al., Biotechnol. & Bioeng. (1991) 38: 296-303. Selv om de fleste isolater kan nedfrysnes i flytende nitrogen for lagring, kan de tre mest lovende stammer fra hver gruppe
25 utvelges for videre utvikling. Lagrede stammer kan vise seg egnede i fremtidige studier som kilder for nye polysakkarasegener.

Optimale stammer bør ha beholdt evnen til effektivt å metabolisere alle bestanddeler av lignocellulose (disakkarider, trisakkarider og monosakkarider), til å vokse i

- 30 etanolkonsentrasjoner over 440 g/liter, å tolerere saltnivåer på 0,3 molar, å tolerere acetatnivåer på 0,2 molar, og å tolerere temperaturer på 40 °C samt å produsere høye nivåer av enzymer som er egnet til cellulose-, hemicellulose- og pectindepolymisering med minimal protease-aktivitet. Noen stammer kan også inneholde naturlige xylanaser eller cellulaser. Etter

integrering av fremmede gener for alkoholproduksjon, bør optimale konstruksjoner produsere alkohol fra alle testede sukker med over 90 % teoretisk utbytte samtidig som de nyttige trekk i det foregående beholdes.

- 5 Ytterligere studier kan utføres for å evaluere utskilte cellulasers samlede pH- og temperaturoptima og for å bestemme temperaturstabilitet. Denne informasjon kan bli nyttig ved utforming av optimale betingelser for kombinerte hydrolyse- og fermenterings-prosesser.

(E) EKSPRESJON AV HETROLOGE POLYSAKKARASER:

- 10 Som beskrevet i det foregående vurderer en foretrukken utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse produksjon av rekombinanter som uttrykker hetrologe polysakkaraser, hvorved behovet for kommersielle enzymer i forbindelse med fermentering av oligosakkarider reduseres. Eksempler på slike polysakkaraser inkluderer cellulolytiske enzymer, hemicellulytiske enzymer, xylanolytiske enzymer og stivelsesdegraderende
15 enzymer.

- I en fordelaktig utførelsesform er polysakkarasen termstabil. I dette henseende kan eksempelvis gener som koder for termofile proteiner fra Clostridium thermocellum (celA, B, C og D) uttrykkes individuelt ved høye nivåer som cytoplasmatiske produkter. Rekombinant
- 20 reproduerte enzymer gjenvinnes ved å høste cellene ved avslutning av fermenteringen og deretter frigjøre de termostabile enzymer fra disse celler ved oppvarming til eksempelvis 60 °C, en temperatur hvorved de fremviser nær maksimal aktivitet og god stabilitet. Deretter tillates enzymene å vike på et komplekst polysakkarid-substrat i løpet av et forutbestemt tidsrom, eksempelvis av størrelsesorden 12 timer. Modifikasjoner som eliminerer
25 signalpartiene av utvalgte gener forbedrer i stor grad de aktiviteter som er frembrakt i E. coli, og kan ha en liknende effekt i Klebsiella og Erwinia.

- CelD-genet er spesielt å foretrekke til anvendelse i denne sammenheng, og celD-transformerte rekombinanter er egnet til fermentering av et substrat likt SOLKA-FLOC, et
- 30 pulverformet celluloseprodukt som oppnås ved mekanisk pulverisering av rensset tremasse. Som vist i eksempel 18 og figur 14 i det følgende, kan prehydrolyse av substrat med det celD-kodede enzym redusere behovet for kommersielle cellulaser til omtrent 1/5 del i forhold til rekombinanter som mangler celD. Denne tilnærmingssmåte med anvendelse av enzymer som

er hetrologt uttrykt og intracellulært akkumulert, for å "bråstarte" forsukringen av et komplekst substrat kan generaliseres til enhver etanologen rekombinant som ytterligere er transformert med et polysakkarase-kodende gen, hvis ekspresjonsprodukt kan gjenvinnes til det formål å bryte ned komplekset oligosakkarider (cellulose, hemicellulose, stivelse, glykogen, pectin, inulin, etc.). Se eksemplene 17-19 i det følgende.

Dermed kan eksempelvis celler fra en foregående fermentering anvendes som en enzymkilde for hver påfølgende fermentering. Dessuten er enzymutskillelse ikke påkrevet og i stede drar prosessen fordel av intracellulær akkumulering for å lette innhøsting av enzymer. Det høyeste nivå av rekombinant enzym er til stede innledningsvis i stedet for langsomt akkumulert i løpet av vekst og fermentering. Videre foreligger det en redusert risiko for mikrobiell kontaminering siden oligosakkarid-utnyttelse er uvanlig blant mikroorganismer og dermed vil færre kontaminerende mikroflora konkurrere om disse sukkere.

Det beskrives også en polysakkarase som i det minste delvis utskilles fra verten og katalyserer hydrolysen av et komplekst oligosakkarid ekstracellulært. Et slikt genprodukt kunne supplere aktiviteten av ett eller flere kommersielle enzymer, slik som produktene av *cenA* (endoglykanase) og *cex* (eksoglykanase), vanligvis tilført under forsukring og etanolproduksjon. Illustrerende for polysakkarase-kodende gener som kan anvendes i den forbindelse er cellulase-genene fra *Cellulomonas fimi*, som delvis utskilles (omtrent 50 - 60 %) når de er transformert inn i *Klebsiella* eller *Erwinia*. På en laboratoriestamme av *Erwinia* som er transformert med *cex*-genet, utskilles eksempelvis over 50 % av det hetrologe ekspresjonsprodukt inn i dyrkningsmediet.

Effektiviteten av slik utskillelse bør økes ved fusjon til signalfrekvenser for hhv. pullulanase i *Klebsiella* og for en pectatlyase i *Erwinia*. Se Murooka (1990) *Ferment. Technol. Ind. Appl.* 40-45; Pugsley et al. (1990) *Ann. Rev. Genetics* 24: 67-90; He et al. (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88: 1079-83; Saarihahti et al. (1990) *Gene* 90: 9-14.

Av spesiell interesse er en etanologen transformant som uttrykker både et termastabilt genprodukt i tillegg til et genprodukt som utskilles. En slik transformant ville frembringe (1) via lysering, enzymatisk aktivitet til anvendelse i en forbehandling til nedbryting av cellulose eller annet komplekst substrat til enklere oligosakkarider og monosakkarider, og (2) via

utskillelse, enzymer for fortsatt depolymerisering under fermenteringen.

Hetrologe gener koplet med mutasjoner eller genetiske modifikasjoner som overuttrykker naturlige trekk vil vise seg egnede under bestemte omstendigheter. Eksempelvis kan mutageneser og utvelgelse utføres til økning av nivået av ekspresjon av naturlige endoglukaner i *Erwinia*-stammer. I noen tilfeller undertrykkes disse av høye glykose-konsentrasjoner. Utvelgelse av undertrykte mutanter på glykose/CMC-skåler kan anvendes til identifikasjon av stammer som har tapt denne kontroll, hvorav noen muligens overproduserer disse enzymer.

Fagfolk vil bemerke at mange forskjellige polysakkaraser kan anvendes. På samme måte er et bredt tilbud av transformerende vektorer tilgjengelige for anvendelse ifølge dette aspekt av den foreliggende oppfinnelse. En viss grad av rutineeksperimentering kan være nødvendig til oppnåelse av den optimale tilpasning av vert og vektor. Eksempelvis kan RSF1010-baserte vektorer konstrueres, se Conway et al. (1987c) Appl. Environ. Microbiol. 53: 235-41, og disse foretrekkes i den grad deres brede vertsområde skulle tillate innføring av hetrologe gener inn i mange gramnegative bakterieverter, inklusive alle *Erwinia*- og *Klebsiella*-isolater, med utvelgelse for tetrasyklinresistens. Derimot kan pUC-baserte plasmider vise seg ustabile i noen *Erwinia*-stammer og vil i så fall i mindre grad være å foretrekke.

Blant andre polysakkarasegener som passende kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse er de som koder en av de cellulolytiske aktiviteter som er opplistet i det følgende:

SUBSTRAT					
ENZYMTYPE:	KRYSTALLINSK CELLULOSE:	CARBOKSYMETYL-CELLULOSE (CMC):	AMORF CELLULOSE:	CELLOTETROSE:	CELLOBIOSE:
Endoglykanase	-	+	+	+	-
Cellobiohydrolase	+	+/	+	+	-
β -Glukosidase	-	-	-	+	+

En endoglykanase hydrolyserer β -1,4-glykosidiske bindinger tilfeldig. Den angriper ikke cellobiose men hydrolyserer cellodekstriner, fosforsyresvullen cellulose og substituerte

celluloser som CMC og HEC (hydroksyetylcellulose). Noen endoglykanaser virker også på krystallinsk cellulose.

Derimot virker en cellobiohydrolase på cellulose, og kapper nærmere bestemt av cellobioscenheter fra kjeden ikke-reduserende ende. Cellobiohydrolase hydrolyserer cellodekstriner men ikke cellobiose. β -glucosidase hydrolyserer cellobiose og cellooligosakkarider til glykose, men angriper ikke cellulose eller høyere cellodektriner.

I tillegg til de cellulase-kodende gener fra *C. thermocellum* som er nevnt i fet foregående, har andre gener som koder for cellulolytisk aktivitet blitt karakterisert. Se eksempelvis Beguin (1990) Ann. Rev. Microbiol. 44: 219-48, hvis innhold herved medtas under henvisning. Videre er slike gener lett tilgjengelige, eksempelvis gjennom GenBank database, som blant annet pr. mars 1991 inneholdt lister over 13 endoglykanaser, 3 cellobiohydrolaser og 3 β -glucosidaser.

På samme måte kan gener som koder for et xylanolytisk enzym anvendes som beskrevet i det foregående, ifølge den foreliggende oppfinnelse. Av spesiell interesse i denne forbindelse er gener som koder for et xylanolytisk enzym som utvelges fra den gruppe som består av endo-1,4- β -xylanase, β -xylosidase, α -glykuronidase, α -L-arabinofuranosidase, acetylerase og acetylxylanesterase. Eksempler fra denne gruppe er de respektive ekspresjonsprodukter fra *C. thermocellum* xynZ-genet og *Butyrivibrio fibrisolvens* xylB-genet, begge er uttrykt i etanologene transformanter som beskrevet i det følgende (se eksempel 17). Igjen er gener for slike xylanaser lett tilgjengelige, hvilket reflekteres i at GenBank pr. mars 1991 har med 7 endo-1,4- β -xylanaser, 5 β -xylosidaser og 1 α -L-arabinofuranosidase.

På liknende måte kan det i den foreliggende oppfinnelse anvendes gener som koder for de enzymer som er involvert i nedbrytingen av stivelse. Illustrative enzymer av denne sort er opplistet i det følgende, sammen med biologisk kilde og annen karakteriserende informasjon:

Enzym:	Type:	Kilde:	Mengde:	Aktivitet:
α -Amylase	Gjør flytende	<i>Bacillus subtilis</i> (n)	0,06 vekt-% stivelse	Minsker viskositet (Kløver 1-4, pH 5,5, 70 °C)
		<i>B. licheniformis</i>	0,06 vekt-% stivelse	Minsker viskositet (92 °C)

		Byggmalt (b)	0,5 - 1,0 vekt-% korn	Minsker viskositet (60 °C)
α -Amylase	Forsukring	Byggmalt (b)	2,0 vekt-% korn	Danner maltose (Kløver 1-6, pH 5,5, 60 °C)
Glykoamylase	Forsukring	Aspergillus niger (b)	0,18 vekt-% stivelse (1,7 Vtonn)	Danner glucose (Kløver 1-6, pH 5,0, 60 °C)
Pullulanase	Forsukring	B. acidipullulyticus	0,2 vekt-% stivelse (2,0 kg/tonn)	Kløver 1-6, pH 5,0, 60 °C

(a) Endoamylase

(b) Eksoamylase

5

Enzymer som er involvert i nedbryting av stivelse er eksemplifisert i det følgende ved en B. stearothermophilus α -amylase og en T. brockii pullulanase. Slike gener er likeledes lett tilgjengelige, hvilket ses av GenBank's liste pr. mars 1991 over 190 α -amylaser, 3 β -amylaser, 8 glykoamylaser og 3 pullulanaser. Andre polysakkaraser slik som β -glykanase, arabinosidase, mannanase, pectin hydrolase og pectatlyase er også enkelt tilgjengelige gjennom GenBank eller fra litteratur som opplyser om kloning av slike gener.

10

Bacillus polysakkarase-gener uttrykkes ofte godt i E. coli og burde dermed være egnet til anvendelse i tarmbakterier generelt. Faktisk utskiller medlemmer av Bacillaceae et bredt utvalg slike enzymer, inklusive amylaser, β -glykanaser og hemicellulaser, og et antall arter utskiller cellulaser, inklusive stammer av B. subtilis, B. polymyxa, B. licheniformis og B. cereus. Se Beguin (1990), supra, og Robson et al. (1989) Enzyme Microb. Technol. 11: 626-44, hvis innhold heri medtas under henvisning. Dersom en signalsekvens som henger sammen med et hetrologt polysakkarase-gen viser seg ikke funksjonelt i den utvalgte vert, slik som Klebsiella eller Erwinia, er det en rutinemessig utvei å erstatte dette signal med genfusjon til en signalsekvens fra verten i det tilfelle hvor, som beskrevet i det foregående, utskillelse av et hetrologt enzym er ønsket.

20

Stammer av Bacillus stearothermophilus er en kilde til gener som koder for termostabil hydrolase og andre aktiviteter, slik som endoglykonase (CMC-ase og nitrofenyl/cellobiosidase-aktiviteter), som med fordel kan utnyttes ifølge den foreliggende oppfinnelse. Mange gener av denne type har vært karakterisert og er tilgjengelige gjennom GenBank eller fra den relevante litteratur. Se også Beguin (1990), supra.

25

30 (F) UTVELGELSE OG TRANSFORMASJON AV VERTER:

Å utvelge stammer som potensielle verter for hetrologe polysakkarasegener, kan rekobinantstammer innen den foreliggende oppfinnelse som inneholder integrerte gener for alkoholproduksjon testes i fermenteringer ved anvendelse av SOLKA-FLOC som det celluloseholdige substrat, sammen med en kommersiell cellulase for hydrolisering av cellulosen. En doseresponskurve kan genereres for alkoholproduksjon og omdanningshastighet som funksjoner av fortynning av kommersielle enzympreparater. De industrielle cellulasepreparater (eksempelvis SPEZYME, MULTIFECT og CYTOLASE (Genencor)) kan anvendes i disse eksperimenter, eksempelvis ved å anvende pH-kontrollerte fermenteringer ved 35 °C og pH 6,0.

Tilsats av en heterolog polysakkarase kan deretter gjennomføres på den måte er illustrert i eksemplene 17 - 19. Eksempelvis kan polysakkarasegener som er utvalgt som spesielt fordelaktige integreres ved anvendelse av homolog rekombinasjon. Tetracyclin (5 mg/liter) kan anvendes til utvelgelse av innledningsvise rekombinanter og høyere nivåer anvendes til utvelgelse av mutanter med forhøyet ekspresjon av nyttige gener. Fusarinsyreutvelgelse kan anvendes til innaktivering av genet for tetracyclinresistens (tet) slik at mutiple enzymer kan tilsettes sekvensielt ved den samme protokoll. Disse konstruksjoner kan evalueres for anvendbarhet i entrinns og flertrinns cellulosefermenteringsprosesser.

En foretrukken rute til utvikling av etanologene, grampositive organismer, slik som B. subtilis eller en cellulomonasstamme, involverer kjemisk mutagenese koplet med screening av kolonier ved anvendelse av antistoffer mot Z. mobilis-pyruvatdekarboksylase, for derved å påvise økninger i ekspresjon. Kloner som således er identifisert som å fremvise høyere ekspresjon studeres til fastsettelse av den mekanisme/de mekanismer som er ansvarlig(e) for fenotypen. Slike mutanter kan i seg selv være nyttige, og burde egne seg godt til ekspresjon av andre hetrologe proteiner i en organisme som generelt betraktes som sikker (GRAS).

Ved transformasjon av etanologene verter med hetrologe cellulasegener, for derved å oppnå høye intracellulære konsentrasjoner av aktivt enzym, kan det være nødvendig med noen ytterligere rutinemessig genetisk manipulasjon eller screening, avhengig av den vert og den cellulase som utvelges. Eksempelvis kan proteaser som utskilles av en vert vise seg å være en barriere overfor hetrolog ekspresjon. Flere tilnæringsmåter kan anvendes, slik som indikatorplater for proteinaseaktiviteter og utvelgelse med hensyn på høyere nivåer av

målenzym, til oppnåelse av mutanter hvori dette problem er minimalisert.

Videre er det ofte en pris å betale, når det gjelder veksthastighet og effektivitet, for produksjonen av et hvert hetrologt protein, inklusive en polysakkarase. Den "genetiske byrde" kan minimaliseres ved testing av multiple konsentrasjoner av spesielt egnede gener. Integreringspunktet kan også påvirke den tilsynelatende "genetiske byrde" og dette kan derfor være en variabel som bør testes ifølge den foreliggende oppfinnelse.

De konstruksjoner som fremstilles ifølge disse retningslinjer kan anvendes i prøver på cellulosefermentering, som illustrert i eksempel 18 i det følgende, til evaluering av effektivitet i kombinasjon med kommersielle enzymer og med hensyn på fermenteringseffektivitet. Dermed kan man teste evnen til de cellulaser som utskilles av den transformerte vert til å erstatte kommersielle cellulaser i entrinns prosesser hvor kommersielle cellulaser tilsettes ved tidspunktet for inoculering med etanolproduserende, cellulaseutskillende rekombinanter. Anvendbarheten av termofile cellulaser kan testes ved tilsats av etanologene celler som stammer fra en tidligere fermentering og som inneholder disse enzymer til cellulosesuspensjoner ved 60 °C. Innkubasjon kan fortsette et tidsrom, slik som 12 timer, under betingelser som er optimalisert for det bestemte enzym. I de fleste tilfeller kan temperatur og pH senkes til frembringelse av optimale betingelser for et kommersielt enzym, slik som SPEZYM, MULTIFECT og CYTOLASE, og innkubasjonen fortsetter i 12 timer. Etter at temperaturen er senket til 35 °C og pH er hevet til 6,0, kan dyrkningsmediet inoculeres med rekombinant etanologen. Etanolutbytter og produksjonshastigheter kan deretter bestemmes. Mange variasjoner av denne tilnæringsmåte kan anvendes for å tilfredsstille de individuelle enzymeres spesifikke krav for optimal aktivitet.

De molekylærgenetiske metoder som bør anvendes er veldokumenterte. Se eksempelvis Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS AND MOLECULAR GENETICS (John Wiley & Sons, 1987). Fermenteringen kan gjennomføres ved de pH nivåer som er beskrevet i det foregående og i eksemplene. Etanol kan måles ved gass-/væskeskromatografi, som beskrevet av Goel et al. (1984) Biotechnol. Lett. 3: 177-182, og Dombek et al. (1985) Appl. Environ. Microbiol. 51: 197-200. Monomere sukkerer kan

bestemmes kolometrisk og ved HPLC. Se Ashwell (1966) *Methods Enzymol.* 8: 93-95; Wood et al. (1988) *Methods Enzymol.* 160. Oligosakkarider kan analyseres ved HPLC og tynnskikt-kromatografi. Kulturer kan dyrkes enten på komplekse media slik som Luria medium eller i mineralsalter. Se Starr, Vol. II *THE PROKARYOTES* 1166-1172, 1260-1271 (Springer-Verlag, 1981); Mizutani et al. (1986) *Biotechnol. Bioeng.* 28: 204-09. Organismer kan opprettholdes i fast medium som inneholder 1,5 % agar og beholdninger kan lagres i glyserol ved -70 °C.

Cellulaseenzymer kan testes som i det vesentlige beskrevet av Curry et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 476-484, og av Gripenet et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 4576-4581. Eksoglykonase-aktivitet kan bestemmes ved anvendelse av p-nitrofenylcellobiosid som modellsubstrat. Karboksymetyl-cellulase(endoglykonase)-aktivitet kan måles som frigjøring av reduserende sukker. Cellulase-aktivitet kan også testes ved den konvensjonelle tilnæringsmåte ved å måle frigjøringen av reduserende sukkere fra filterpapir. Metyl-/umbelliferyl-derivater, CMC og pektat kan anvendes til å preparere indikatorplater for kvalitative sammenlikninger, og derved til identifikasjon av stammer som produserer høye nivåer av et enzym som hydrolyserer et av disse substrater.

(G) FORBEDRING AV ALKOHOLTOLERANSE OG PRODUKSJON AV TRANSFERMANTER:

Maksimumsnivåer av etanol som produseres med etanologene rekombinater ifølge den foreliggende oppfinnelse kan eksempelvis overskride 1 M. Etanolproduksjonen kan overskride 1,5 M for fermentering av laktose ved hjelp av en *E. coli* transformant, KO11, som er deponert som ATCC 55124. Forbedret alkoholtoleranse i de etanologene rekombinanter ifølge den foreliggende oppfinnelse er derfor spesielt nyttig. Endringer som påvirker membranlikvider og/eller stressproteiner er sannsynlige grunnlag for slike forbedringer. *Z. mobilis* adhB, en komponent fra et foretrukket etanologen operon (pet) innen den foreliggende oppfinnelse, er også identifisert som et prominent *Z. mobilis*-stressprotein, og reagerer både på temperatur og på alkohol. Se Haejung et al. (1991) *J. Bacteriol.* 173: 5975-82. Andre *Z. mobilis*-gener som koder for et stressprotein bør være egnet i den samme sammenheng. For å kunne frembringe slike gener, kan gener slik som de som finnes i *E. coli* og som uttrykker proteiner for stort stress, rapportert av Johnson et al., (1989) *J. Bacteriol.*

171: 1590-96, Ang et al. (1989) J. Bacteriol. 171: 2748-55, Lipinska et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 7545-61, og Fayet et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 435-45, anvendes som sonder til isolering av tilsvarende gener fra Z. mobilis.

- 5 Det er sannsynlig at gener for lipid-syntese også vil vise seg nyttige for etanoltoleranse. Andre gener som er nyttige for etanoltoleranse kan utvelges ved transformasjon av biblioteker direkte inn i etanologener og berike ved serielle passasjer i fermenteringsmedium hvori
overskuddsnivåer av sukker opprettholdes for å tillate ytterligere vekst av etanolresistente
organismer etter at etanolnivåene overskrider det opprinnelige inoculum toleranse.
- 10 Kjemostatisk tilnærming kan også være spesielt gode for disse utvelgelser.

- Genbiblioteker fra den i høy grad etanol resistente Lactobacillus homohiochii og L. heterohiochii, se Ingram (1990) Critical Rev. Biotechnol. 9: 305-19, kan også testes i disse
berikninger. Siden disse mikrober forårsaker sporing av saker, kan de tolerere alkohollnivåer
15 av størrelsesorden 15 volum-% (over 2,5M). Ved denne tilnærming måte kan det derfor
utvikles rekombinantstammer som burde være i stand til rutinemessig å produsere
etanollnivåer på i det minste 80 gram pr. liter.

- Dessuten kan de glykolytiske enzymer fra Z. mobilis anvendes til å forbedre etanologene
20 rekombinanter ifølge den foreliggende oppfinnelse. D.v.s. ekspresjonen av ett eller flere av de
13 gener som koder for glykolytiske enzymer burde øke den glykolytiske strøm og dermed
etanolproduksjonshastigheten.

(H) PROSESSUTFORMING:

- 25 Det kan, ifølge den foreliggende beskrivelse, konstrueres tallrike fermenteringsprosesser til
iverksettelse av den foreliggende oppfinnelse. Slike prosesser vil generelt sett ha i det minste
to trinn: et "forsuknings"-trinn, hvor biomasse kontaktes med polysakkarase for å bryte ned
oligosakkaridene deri til enklere oligosakkarider og/eller monosakkarider, og et påfølgende
"fermenterings"-trinn hvori de enklere oligosakkarider og/eller monosakkarider fermenteres
30 til etanol. De to trinn kan med fordel utføres hver for seg siden optimumsbetingelsene for
utførelse av det enkelte trinn er vesensforskjellige. Optimumsbetingelsene for
forsukningstrinnet omfatter en temperatur på ca. 50 til 60 °C og en pH fra ca. 4,5 til 5,0.
Optimumsbetingelsene for fermenteringstrinnet inkluderer en temperatur på fra ca. 30 til 35

°C og en pH på ca. 6,0.

For å forbedre prosessens effektivitet, kan det forekomme noe resyklering av materialer fra fermenteringstrinnet til forsukringstrinnet. Videre, siden de resyklerte materialer vil ha fermenteringstrinnets temperatur på fra ca. 30 til 35 °C, kan disse materialer med fordel anvendes i en varmeveksler til avkjøling av effluenten av høyere temperatur fra forsukringstrinnet før den innføres i fermenteringstrinnet. En eksempelvis prosess er diskutert i det følgende og illustrert i figur 19.

- 10 Idet det nå henvises til figur 19, leveres det polysakkarase og forbehandlet biomasse til enzymreaktoren 10, hvor utgangsoligosakkaridene i biomassen nedbrytes til enklere oligosakkarider og monosakkarider. Enzymreaktoren 10 holdes ved en temperatur på ca. 50 til 60 °C og en pH på ca. 4,5 til 5,0. En blanding av faste stoffer og væske tappes fra enzymreaktoren 10 gjennom ledningen 12 og inn i en faststoff/væskeseparator 14, hvor det 15 faste stoff og væsken separeres, eksempelvis ved sentrifugering.

- Det utskilte faste stoff returneres til enzymreaktoren 10 gjennom ledningen 16. Effluenten fra separatoren føres deretter gjennom ledningen 18 til varmeveksleren 20, hvor den avkjøles til ca. 30 til 35 °C. Effluenten føres deretter gjennom ledningen 22 til membranseparator 24 som 20 separerer ut polysakkaraser av større molekylvekt, som deretter returneres via ledning 26 til enzymreaktoren 10. Membranseparatoren kan eksempelvis være et ultrafilter, slik som filteret CARRE Du Pont (registrert varemerke), og som har et filtreringsområde på fra ca. 10⁻³ til omtrent 10⁻⁴ microns. Alternativt kan membranseparatoren 24 elimineres og effluenten direkte innføres inn i fermenteringskaret 30. Den gjenværende sukkerløsning, som omfatter 25 oligosakkarider og/eller monosakkarider, transformeres deretter via ledning 28 til fermentoren 30. Før den ankommer fermentoren justeres imidlertid sukkerløsningens pH oppover, eksempelvis ved tilsats av base.

- Karbondioksiden tappes fra fermenteringskaret gjennom ledningen 32. Effluenten tappes fra 30 fermenteringskaret gjennom ledningen 34 til en destillasjonskolonne (ikke vist) for etanoldestillering. Mesk tappes fra fermenteringskaret og føres gjennom ledningen 36 til en fast stoff/væskeseparator 40 (eksempelvis en sentrifuge). Mikroorganismer som separeres i separatoren 40 returneres til fermenteringskaret gjennom ledningen 42. Effluenten fra

separatoren 40 leveres til varmeveksleren 20 for å avkjøle effluenten fra faststoff/væskeseparatoren 14. Etter at den har forlatt varmeveksleren 20, justeres effluentens pH nedover, eksempelvis ved tilstats av syre, til ca. 4,5 til 5,0 og deretter innføres effluenten i enzymreaktoren 10. Både enzymreaktoren 10 og fermenteringskaret 30 kan være forsynt med mikserne 48 og 50, som kan være av enhver vanlig type.

Eventuelt kan, på kontinuerlig basis, væske (øl) med etanolkonsentrasjon på ca. 0,5 til 5 %, og typisk på ca. 1 til 2 %, tappes av fra fermenteringskaret 30 gjennom ledningen 52 og mates inn i fordampningskaret 54, hvor etanol og vann avdampes og føres bort gjennom ledningen 56 til et annet destillasjonstrinn (ikke vist). Konsentrasjonen av etanol i ledningen 56 kan være ca. 20 til 25 %. Det øl som fjernes fra fordamperen 54 og returneres til fermenteringskaret 30 gjennom ledningen 58 vil ha en etanolkonsentrasjon av en størrelsesorden mindre enn ca. 0,5 %, d.v.s. generelt ca. 0,3 %. På denne måte kan etanolkonsentrasjonen i fermenteringskaret holdes på et relativt lavt nivå, slik at det opprettholdes en høy produksjonshastighet for etanol i fermenteringskaret.

Likeledes vil den effluent som returneres til reaktoren 10 gjennom ledningene 36, 44 og 46 ha en lavere etanolkonsentrasjon og dermed frembringe mindre inhibering av reaksjonene i reaktoren. En slik kontinuerlig prosess kan drives ved kontinuerlig tilsats av biomasse til reaktoren 10. Det kan imidlertid være ønskelig å tømme ut reaktorens 10 og fermenteringskarets 30 innhold periodisk for å rense opp for akkumulert fast stoff og minske kontamineringsmuligheten.

Dermed kan den i det foregående diskuterte fermenteringsprosess frembringe en effektiv fremgangsmåte for fermentering av biomasse til etanol. Fagfolk vil erkjenne at mange andre ytterligere trinn og/eller stadier kan tilføres til fermenteringsprosessen. Eksempelvis kan det inkluderes trinn med forbehandling av biomasse, hvor biomassen eksempelvis rives opp, hydrolyseres (med eller uten damp og/eller syre), behandles med polysakkaraser og/eller andre enzymer, etc.. Dessuten kan det foreligge et innledningstrinn hvori rekombinante vertceller uttrykker og intracellulært akumulerer polysakkaraser tilføres og oppvarmes til lysning av cellene og frigjøring av polysakkarasen. Det kan også foreligge multiple fermenteringstrinn sammen med ytterligere separering og resykling av fast stoff og effluenter under veis.

III. Eksempler

Den foreliggende oppfinnelse beskrives videre under henvisning til de følgende illustrerende eksempler som ikke må oppfattes som begrensende. Alle prosentandeler er vektmessige og

5 alle proposjoner av løsningsmiddelblandinger er volumetriske om ikke annet bemerkes.

Andre metodologiske aspekter ved eksemplene diskuteres i det følgende:

Organismer og dyrkningsbetingelser: Escherichia coli TC4, se Conway et al. (1987a), og plasmidholdige derivater derav ble anvendt. Plasmider som inneholdt genet for Z. mobilis-pyruvatdekarboksylase (pLOI276) og genet for alkoholdehydrogenase B (pLOI284) har vært
5 beskrevet av Conway et al. (1987b).

Stammer og dyrkningsbetingelser: Plasmydene pUC18 og pUC19 har vært beskrevet tidligere, se Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33: 103-19), på samme måte som pLOI204 og pLOI295. Se Conway et al. (1987b); Ingram et al. (1987). Konstruksjonen og egenskapene for
10 pLOI292, pLOI291, pLOI297, pLOI308, pLOI308-2, pLOI308-5 og pLOI308-10 beskrives i det følgende.

Kulturene ble dyrket ved 37 °C i Luria-medium, se Luria & M. Delbruck (1943) Genetics 28: 491-511, som inneholdt 50 gram glykose pr. liter. Celler for enzymanalyse og inocula for
15 fermenteringsstudier ble dyrket i rør (13 x 100 mm) som inneholdt 3 ml medium ved 37 °C i en rør-rotator. Overnattingskulturer ble fortynnet 100 ganger i ferskt medium. Aerobiske kulturer (50 ml medium i 250 ml kolber) ble rystet i et frem og tilbakegående vannbad (120 svingninger pr. minutt). Anaerobiske kulturer ble dyrket tilstoppede serumsflasker (100 ml medium i 130 ml flasker) med gyratoragitering (150 omdreining/min). I en 37 °C incubator.
20 Anaerobiske kulturer ble ventilert med en 25-gauge nå for å tillate unnslipping av gassformige fermenteringsprodukter.

Veksten ble overvåket spektrofotometisk med et Spectronic 70 spektrofotometer (Bausch & Lomb, Inc. Rochester, NY) ved 550 nm. Engangs styrkningsrør (10 x 75 mm) ble anvendt
25 som kyvetter. Under våre betingelser inneholdt en absorpsjonsenhet omtrent 0,25 mg cellulært protein pr. ml. Veksten ble målt ved A550.

Escherichia coli-verter som inneholdt plasmidene ifølge den foreliggende oppfinnelse er deponert hos the American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive,
30 Rockville, Maryland 20852 USA. Kulturene ble tildelt disse adgangsnumrene ved deponeringen:

<u>KULTUR:</u>	<u>ADGANGSNUMMER:</u>	<u>DEPONERINGSDATO:</u>
E. coli pLOI308-10	ATCC 67983	15. mai 1989
TC4 (pLOI292)	ATCC 68237	23. februar 1990
TC4 (pLOI308-11)	ATCC 68238	23. februar 1990
TC4 (pLOI297)	ATCC 68239	23. februar 1990
TC4 (pLOI295)	ATCC 68240	23. februar 1990
E. coli pLOI510	ATCC 68484	
K. oxytoca M5A1 (pLOI555)	ATCC 68564	14. mars 1991

De aktuelle kulturer er deponert under betingelser som sikrer at adgang til kulturene, for den som utpekes av U.S. Commissioner of Patents and Trademarks ifølge 37 CFR 1.14 og 35 USC 122, vil være tilgjengelig under behandlingen av denne patentsøknad. De deponerte kulturer er tilgjengelige slik det kreves av fremmede patentlover i land hvor motstykker til den foreliggende søknad eller dens opphav registreres. Men det skal bemerkes at de deponerte kulturers tilgjengelighet ikke utgjør en lisens til å utføre den foreliggende oppfinnelse i strid med patentrettigheter som tildeles ved regjeringsbeslutning.

Videre vil deponeringer av de aktuelle kulturer bli lagret og gjort tilgjengelig for publikum ifølge bestemmelsene under Budapest-avtalen for deponering av mikroorganismer. Dette innebærer at de vil bli lagret med all nødvendig omsorg for å holde den levedyktige og ukontaminerte i løpet av en periode på i det minste 5 år etter begjæring om utlevering av en prøve av en deponert kultur, og i alle tilfeller, i løpet av en periode på i det minste 30 år etter deponeringsdatoen eller i løpet av den legale levetid for enhver patent som måtte publiseres og som omtaler kulturene. Den deponerende part erkjenner plikter til å erstatte de deponerte kulturer dersom den instans som har de deponerte kulturer skulle være ute av stand til å levere en prøve på forespørsel, p.g.a. den deponerte kulturs tilstand. Alle restriksjoner på de aktuelle deponerte kulturer vil ugjenkallelig fjernes ved tildelingen av en patent som omtaler dem.

Genetiske teknikker: Transformasjoner, plasmidkonstruksjoner, DNA-oppsplittings og analyser ble utført som tidligere beskrevet. Rekombinanter ble utvalgt på fast medium (1,5 % agar) som inneholdt 2 gram glykose pr. liter og passende mengde antibiotika. Rekombinanter som inneholdt funksjonelle etanologene gener fra Z. mobilis ble identifisert som forstørrede kolonier som vokste på Luria agarplater som inkluderte glykose, og identifikasjon ble bekreftet ved observasjoner av svak vekst på Luria agarplater som manglet glykose og av ekspresjon av alkoholdehydrogenase på aldehydindikatormedium.

10 Enzymtester: Celler ble revet opp, varmeinaktivert og testet med hensyn på pyruvatdekarboksylase-aktivitet (termostabil) som beskrevet tidligere. Se Conway et al (1987b). Celler ble preparert og testet med hensyn på alkoholdehydrogenase II-aktivitet i retningen av etanoloksidasjon som beskrevet tidligere, bortsett fra at cellene ble vasket og revet opp i 30 mM kaliumfosfatbuffer til hvilken det nylig var tilsatt fast
15 ferrorammoniumsulfat (sluttkonsentrasjon 0,5 mM) og natriumaskorbat (1 mM). Se Neale et al. (1986) Eur. J. Biochem. 154: 119-24. Denne modifikasjon, kombinert med den øyeblikkelige testing av alkoholdehydrogenase-aktivitet uten lagring, resulterte i en meget høyere spesifikk aktivitet enn hva som tidligere er rapportert. For det formål å beregne effektiviteten av etanol-produksjonen, ble cellemassen målt som proteininnhold pr. kultur,
20 ved anvendelse av folin/fenolreagens-metoden til Lowry et al., J. Biol. Chem. 193: 265-75.

Analyse av fermenteringsprodukter: Fermenteringsproduktene ble bestemt i klarnet væskeformet medium med en Millipore/Waters høy-ytelses væsekromatograf (Millipore Corporation Bedford, MA) som var utstyrt med en refraksjonsindeks-monitor og en
25 elektronisk integrator. Seperasjoner ble utført på en Aminex HPX-87H-kolonne (300 x 7,8 mm) som var innkjøpt fra Bio-Rad Laboratories, Richmond CA, ved 65 °C og en strømningshastighet på 0,25 ml/minutt (100 µl injeksjonsvolum). Toppene ble identifisert ved anvendelse av autentiske standarder. De to topper som eluerte foran glykose og den siste ukjente topp som eluerte ved 45,4 til 45,8 minutter er komponenter av urinnoculert medium.

EKSEMPEL 1. STAMMEKONSTRUKSJON

Størrelsene av de strukturelle gener som koder for pyruvatdekarboksylase og alkoholdehydrogenase II er hhv. 1,7 og 1,1 kilobaser, og disse gener koder for proteiner med molekylvekter på 60.000 og 40.100. Hver av disse gener er lokalisert på derivater av pUC18 under kontroll av lac-promotoren (figur 1). De to gener ble kombinert ved innsetting av det promotorfrie 1,4 kilobasers fragment som var generert ved hjelp av sestriskjonsendonukleasene EcoRI og SalI fra pLOI284 (alkoholdehydrogenase) inn i BamHI-punktet nedstrøms fra pyruvatdekarboksylasegenet i pLOI276. Disse kloner ble utvalgt p.g.a. resistens overfor ampicillin og p.g.a. nærvær og ekspresjon av alkoholdehydrogenase-aktivitet på en nylig utviklet pararosaniline/etanolindikatorplate som påviser aldehydproduksjon. Kloner som inneholdt den vist konstruksjon, pLOI295, vokste svakt på overflaten av Luriaagarplater (aerobiske) i fravær av tilsatt glykose, men vokste til mye høyere tettheter enn den plasmidfrie stamme og stammer som inneholdt pLOI276 eller pLOI284 på agarplater som inneholdt 2 % glykose.

Rekombinanter som inneholdt operonet pet kunne enkelt påvises som større, mer opake kolonier på Luriaagarplater (aerobiske) som inneholdt glykose. Denne forskjell i kolonistørrelse og ugjennomsiktighet har det vist seg å være en egnet makør for identifikasjon av rekombinanter som inneholder plasmider som uttrykker gener både for alkoholdehydrogenase og pyruvatdekarboksylase.

Den fullstendige basesekvens for pLOI295 er kjent. Den åpne leseramme for det gen som koder for pyruvatdekarboksylase begynner 163 baser nedstrøms fra lac-promotoren og ender med to stoppkodoner 85 baser oppstrøms fra den åpne leseramme for det gen som koder for alkoholdehydrogenase II. Begge gener inkluderer sekvenser som likner på ribosombindingspunkter straks oppstrøms fra hver åpne leseramme. Det gen som koder for alkoholdehydrogenase II inneholder et enkelt stoppkodon fulgt av en palindromisk sekvens på 13 basepar som tjener som en transkripsjonsterminator.

EKSEMPEL 2 EKSPRESJON AV Z. MOBILIS-GENER I E. COLI

Både pyruvatdekarboksylase- og alkoholdehydrogenase II-gener ble uttrykt i høye nivåer i E. coli under kontroll av lac-promotoren alene (hhv. pLOI276 og pLOI284) og sammen.

- 5 Pyruvatdekarboksylase foreligger ikke i den ville type E. coli, men en induserbar alkoholdehydrogenase foreligger i lave konsentrasjoner. Under dyrking av E. coli i nærvær av glykose, minsket de spesifikke aktiviteter av Z. mobilis-enzymene med omtrent 50 %, hvilket er konsistent med lac-promotorens glykoseundertrykkelse. Den spesifikke aktivitet av pyruvatdekarboksylase som ble kodet for av det plokysmale gen i pet-operonet, var tre ganger
- 10 høyere i pLOI295 enn i pLOI276. Den spesifikke aktivitet av produktet av alkoholdehydrogenase II-genet, det fjerneste genet i pet-operonet, var i pLOI295 uttrykt i et nivå to ganger høyere enn i pLOI284.

EKSEMPEL 3 FERMENTERING AV GLYKOSE VED HJELP AV**15 REKOMBINANTSTAMMER**

- Ekspresjon av pet-operonet i E. coli resulterte i produksjonen av etanol som det primære fermenteringsprodukt under anaerobisk vekst. Opphavsstammen produserte succinat (1,5 mM), lactat (18 mM) og acetat (7 mM) som vesentlige fermenteringsprodukter (figur 3A). En identisk fermenteringsprofil ble observert i celler som inneholdt pLOI284, som bærer
- 20 alkoholdehydrogenaser II-genet (figur 3C). Med pLOI276 som bærer genet som koder for pyruvatdekarboksylase, er en etanoltopp lett påvisbar (18 mM), idet dette tilsvarer en tredjedel av de akumulerde fermenteringsprodukter. Dette høyere etanolnivået skyldes de kombinerte aktiviteter av pyruvatdekarboksylase fra Z. mobilis og den naturlige E. coli-alkoholdehydrogenase. Med pLOI295 som inneholder pet-operonet (både
- 25 pyruvatdekarboksylase og alkoholdehydrogenase II-gener fra Z. mobilis), produserte E. coli store mengder etanol (750 mM, 4,3 volum-%), hvilket representerte over 95 % av fermenteringsproduktene.

- De høye nivåer av alkoholdehydrogenase og pyruvatdekarboksylase som ble produsert i celler
- 30 som inneholdt pet-operonet dominerte NADH-oksidasjonen i E. coli. Derved var denne organismes fermentering omdannet til hva man får med S. cerevisiae og Z. mobilis. Under normal fermentativ vekst, omdannes pyruvat til acetylcoenzym A ved hjelp av pyruvatdehydrogenase-komplekset, til oksaloacetat (og til succinat) ved hjelp av

fosfoenolpyruvatcarboksylase, til format og acetylcoenzym ved hjelp av pyruvatformatlyase og til lactat ved hjelp av lactatdehydrogenase. Denne siste reaksjonsvei er den dominerende rute for regenerasjonen av NAD⁺ i umodifiserte stammer av E. coli. Men Km'er for bakterielle lactatdehydrogenaser er ganske høy, og spenner fra 10 til 1.000 mM (Garvie, E.I. (1980) "Bacterial lactate dehydrogenases", Microbiol. Rev. 44: 106-139, Tarmy, E.M., og N.O. Kaplan (1968) "Kinetics of Escherichia coli B D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate controlled change in conformation", J. Biol. Chem. 243: 2587-2596). Km for pyruvatdekarboksylase fra Z. mobilis er 0,4 mM (Bringer-Meyer, S., K.-L. Schimz, og H. Sahm (1986) "Pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis: Isolation and partial characterization", Arch. Microbiol. 146: 105-110). Rikeligheten av dette enzym, koplet med den lavere Km, leder effektivt strømmen av pyruvat fra glykolyse til etanol.

Høye celletettheter oppnås også under blandede dyrkningsbetingelser med moderat agitering eller omrøring av dyrkningskarene hvori gassutveksling ikke begrenses. Under disse betingelser ble det observert en endelig pH på 6,3 eller over, avhengig av omfanget av lufting.

EKSEMPEL 4 PLASMIDKONSTRUKSJONER OG EKSPRESSJON AV Z. MOBILIS-ETANOLOGENE ENZYMER I E. COLI

Plasmidet pLOI295 inneholder de Z. mobilis-gener som koder for pyruvatdekarboksylase og alkoholdehydrogenase II under styring av lac-promotoren. Denne konstruksjon betegnes som pet-operonet og anvendes som kilde for etanologene gener til konstruksjon av ytterligere plasmider med alternative promotorer. Fragmentet EcoRI-SalI fra pLOI295 som inneholder de etanologene gener ble behandlet med Klenow-fragmentet fra DNA-polymerase til frembringelse av stumpe (blunt) ender. Dette stumpendede DNA-fragment ble innført inn i Smal-punktet på pUC19 med pdc-genet straks nedstrøms fra lac-promotoren. Det resulterende plasmid, som ble betegnet pLOI293, inneholder pet-genene flankert av BamHI-punktene. Plasmidene pLOI291 og pLOI292 (motsatte orienteringer) ble konstruert ved å innsette det BamHI-fragment som inneholdt de gener som koder for de etanologene enzymer inn i ekspresjonsvektoren pLOI204. BamHI-fragmentet inkluderer ribosom-bindingspunktet, fullstendige sekvenser for begge gener, og en transkripsjonsterminator lengst bort fra adhB. I pLOI292 uttrykkes de to gener under kontroll av den Z. mobilis-promotor som rommes i den originale ekspresjonsvektor.

Plasmidet pLOI308 ble konstruert til fjerning av pet-genene fra kontrollen av lac-promotoren mens det oppstrøms BamHI-punkt for innsetting av alternative promotorer ble holdt. Delvis oppsplitting av pLOI293 med BamHI og Klenow-behandling ble anvendt til å fjerne BamHI-punktet lengst borte fra adhB-genet. De etanologene gener ble fjernet fra dette plasmid i form av et promotor-fritt BamHI (umiddelbart proksimalt til pdc) -EcoRI (distat til adhB) - fragment, som ble retningsbestemt innsatt inn i BamHI- og EcoRI-punktene til pUC18 til frembringelse av pLOI308. Dette plasmid uttrykte lave nivåer av adhB på aldehydindikatorplater men fremviste ikke den fenotype med store kolonier som hang sammen med de øvrige funksjonelle pet-plasmidene pLOI295, pLOI291 og pLOI292.

Kromosomalt DNA fra Z. mobilis ble delvis oppsplittet med Sau3A slik at mesteparten av DNA syntes å være mindre enn 4 kilobaser langt. Dette ufraksjonerte DNA ble anvendt som en kilde til promotorfragmenter og ble ligatert inn i det defosforylerte BamHI-punkt til pLOI308. Ampicillin-resistente rekombinanter med et veluttrykt pet-operon ble identifisert som store kolonier på Luriaagarplater som inneholdt glykose. Tre av rekombinantstammene, pLOI308-2, pLOI308-5 og pLOI308-10 ble utvalgt for studium. Z. mobilis-DNA-fragmentet med promotor-aktivitet i disse plasmider var hhv. 6, 2 og 2 kilobaser lange.

Tabell 1 oppsummerer aktivitetene av pyruvatdekarboksylase og alkoholdehydrogenase i overnatningskulturer med den rekombinante E. coli. Aktivitetene av pyruvatdekarboksylase rangerte fra 0,37 IU/mg celleprotein i stammen TC4 (pLOI291) til 8,23 IU i TC4 (pLOI295). Når det gjelder pyruvatdekarboksylase-aktivitet kan rekombinantstammene fra TC4 rangeres som følger (fra høyeste til laveste): pLOI295 > pLOI308-10 > pLOI308-2 > pLOI308-5 > pLOI292 > pLOI291.

Tabell 1. Ekspressjon av etanologene enzymer fra Z. mobilis i E. coli

PLASMID	PYRUVAT DEKARBOKSYLASE		ALKOHOL DEHYDROGENASE	
	Sp akt (a)	% celle-protein (b)	Sp akt (a)	% celle-protein (c)
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
pLOI308-5	1,11	1,1	0,76	0,10
pLOI308-10	6,5	6,5	2,51	0,34
pLOI295	8,2	8,2	9,65	1,4
Intet	0	0	0,08	

(a) Uttrykt som mikromolekyler substrat anvendt pr. minutt pr. milligram totalt cellulær protein.

- 5 (b) Beregningen forutsetter en spesifikk aktivitet på 100 for det rene enzym.
- (c) Beregningen forutsetter en spesifikk aktivitet på 710 for det rene enzym etter fradrag av naturlig alkoholdehydrogenase-aktivitet.
- 10 Alkoholdehydrogenase-aktiviteter i rekombinantstammene fulgte den samme trend når det gjelder ekspressjon fra forskjellige plasmider som pyruvatdekarboksylase. De målte alkoholdehydrogenaseaktiviteter representerer en kombinasjon av det naturlige enzym fra E. coli og Z. mobilis-enzymet. Det nivå som ble observert i stammen TC4 som manglet et plasmid var relativt lite sammenlignet med de som ble observert i stammer som bar plasmider
- 15 med Z. mobilis-genet. Aktivitetene av Z. mobilis-enzymet (korrigert for naturlig E. coli-alkoholdehydrogenase) rangerte fra 0,13 IU/mg celle-protein fra stammen TC4 (pLOI291) til 9,6 IU i TC4 (pLOI295).

EKSEMPEL 5 DYRKING AV REKOMBINANTSTAMMER SOM INNEHOLDT DE ETANOLOGENE ENZYMER FRA Z. MOBILIS

- 20 Det å endre nedbrytingen av glykose til produksjon av etanol påvirket også dyrkningsmediets dyrkningsutbytte og pH-drift. Selv om fermenteringsproduktene er forholdsvis ugiftige, kan de akkumuleres til giftige nivåer under fermentering. Under anaerobisk dyrking i flasker som inneholdt Luria-medium med 10 % glykose, oppnådde den plasmidfrie stamme og den
- 25 stamme som bar pLOI284 (som bar det gen som koder for alkoholdehydrogenase II) en

endelig tetthet på 0,25 mg celle-protein pr. ml etter 48 timer, med en endelig pH på 4,4.

Celle-tettheten økte til det dobbelte i den stamme som var pLOI276 (som bærer det gen som koder for pyruvatdekarboksylase), med en endelig pH på 4,5. For den stamme som bar pLOI295 (pet-operon) var den endelige celle-tetthet 2,5 mg/ml, ti ganger høyere enn for

- 5 kontrollstammen. Den endelig pH var 4,7, ved en tetthet på 2,5 mg celle-protein pr. ml, synes magnesium å være begrensende, og en 1,5 ganger ytterligere økning i celle-tetthet oppnås lett ved tilsats av 0,5 mM magnesiumsulfat.

Veksten av de rekombinante stammer ble eksaminert under både aerobiske og anaerobiske

- 10 betingelser (figur 3). Under aerobiske betingelser (figurene 3A og tabell 2), vokste stammen TC4 med en generasjonstid på omtrent 30 minutter under den hurtigste vekstfase. Den stamme TC4 som bar derivatene av pLOI308 fremviste ekvivalente maksimale veksthastigheter, med generasjonstidsrom på mellom 26 og 30 minutter. Stammen TC4 (pLOI295) vokste svakt under disse betingelser (generasjonstid 71 minutter) og ble fulgt av
- 15 delvis lysning. Stammene TC4 (pLOI291) og TC4 (pLOI292) vokste med mellomliggende hastigheter, hver med en generasjonstid på 46 minutter.

Tabell 2. Maksimale generasjonstider, endelige celle-tettheter og endelige pH-verdier for mediet under aerobisk og anaerobisk vekst

DYRKNINGS- pH (a) BETINGELSE:	PLASMID:	CELLETETTHET (a) (MG PROTEIN/ML):	GENERASJONSTID (MIN.):	ENDELIG:
Aerob	Intet	0,7	29	4,4
	pLOI291	0,7	46	5,3
	pLOI292	1,3	46	5,1
	pLOI295	1,1	71	5,7
	pLOI308-2	1,7	27	5,5
	pLOI308-5	0,8	30	5,0
	pLOI308-10	2,5	26	5,0
Anaer	Intet	0,3	32	4,4
	pLOI291	0,4	40	4,5
	pLOI292	1,0	48	5,0
	pLOI295	2,1	39	4,7
	pLOI308-2	0,8	42	5,7
	pLOI308-5	0,4	38	4,9
	pLOI308-10	2,2	41	5,2

5

(a) Målt etter virking i 24 timer.

Under anaerobebetingelser (figur 3B og tabell 2), var generasjonstiden for den stamme TC4 som manglet et plasmid 32 minutter, betydelig kortere enn for rekombinantstammer som inneholdt de etanologene enzymer. Alle rekombinantene fremviste liknende maksimale veksthastigheter, med generasjonstider på 38 og 41 minutter, bortsett fra TC4 (pLOI292), som vokste noe langsommere, med en generasjonstid på 48 minutter.

Alle rekombinantene bortsett fra TC4 (pLOI295) vokste etter 12 timer under anaerobiske og aerobiske dyrkningsbetingelser til celletettheter som tilsvarer eller er høyere enn de for stammen TC4 som mangler et plasmid (figurene 3A og B). Tabell 2 oppsummerer de endelige celletettheter for stammen TC4 og rekombinatene etter dyrking i 24 timer. Under

15

aerobiske betingelser nådde den stamme TC4 som innholdt pLOI308-10 den høyeste celletetthet, fulgt av den TC4 som inneholdt pLOI308-2, pLOI292, pLOI295 (med noe lysning synlig), og pLOI308-5.

- 5 Under anaerobiske betingelser var de endelig celletettheter for den stamme TC4 som inneholdt pLOI308-10 og pLOI295 grovt sett ekvivalente, fulgt av de av TC4 som inneholdt pLOI292, pLOI308-2, pLOI308-4 og pLOI291.

Figur 4 viser relasjonen mellom nivået av pyruvatdekarboksylase-aktivitet i celler og den endelig celletetthet etter dyrking i 24 timer. Siden syntesen av pyruvatdekarboksylase i disse rekombinanter er koplet til syntesen av alkoholdehydrogenase II, representerer dette diagramm effektene av det alternative *Z. mobilis*-system for NAD⁺-regenerering på endelig celletetthet. Fra disse data er det klart at ekspressjonen av *Z. mobilis*-reaksjonsveien for produksjonen av etanol øker endelig celletetthet både under anaerobiske og aerobiske betingelser. I stammen TC4 (pLOI308-10), var ekspressjonsnivåene for pyruvatdekarboksylase (6,5 IU) og alkoholdehydrogenase II (2,5 IU) nært optimale både for anaerobisk og aerobisk vekst. Ekspressjonsnivået for etanologene enzymer i stammen TC4 (pLOI295) synes å være overdreivet, hvilket resulterer i minsket cellevekst fulgt av delvis lysning under aerobiske betingelser og svakt redusert vekst under anaerobiske betingelser.

20 Stammens TC4 (pLOI295) økte vekst under anaerobiske betingelser med liten tilsynelatende lysning i kontrast til den svake vekst og lysning under vekst i raskt rystede kolber antydning at et i høy grad aerobisk miljø kan være ødeleggende for denne konstruksjon. Lysning i denne rekombinant ble dramatisk redusert og den endelige celletetthet ble økt under dyrking i rystede kolber når svingningshastigheten ble minsket med en tredjedel.

EKSEMPEL 6 EFFEKTER AV ETANOLOGENE ENZYMER PÅ SURGJØRING AV MEDIUM UNDER VEKST

Figur 3C viser et diagram over endringene i mediets pH under anaerob vekst. PH falt raskt i løpet av de første 6 timers dyrking av den stamme TC4 som manglet et plasmid men minsket langsommere i derivater som inneholdt de etanologene enzymer. Surgjøring i løpet av de første 12 timer ble i størst mulig grad redusert i den stamme TC4 som inneholdt pLOI295, fulgt av TC4 som inneholdt pLOI308-10, pLOI308-2 og pLOI308-5. Data for stammene TC4

(pLOI291) og TC4 (pLOI292) er ikke vist men ligger hhv. under og over data for TC4 (pLOI308-5). Selv om rekombinantene nådde frem til en høyere endelig celletetthet, var pH av mediet fra de rekombinanter som ble dyrket i 24 timer både under anaerobiske og aerobiske betingelser mindre surt enn for mediet fra den stamme TC4 som manglet etanologene enzymer (tabell 2).

Den reduserte surgjøringshastighet og -grad i rekombinanter som ble ledsaget av økt cellevekst antydde at fallet i pH var en betydelig vekstbegrensende faktor selv under i høy grad aerobiske betingelser. Denne hypotese ble støttet av en 85 % øking i den endelige celletetthet for stammen TC4 (som manglet et plasmid) som ble dyrket i medium supplert med et 1/10 volum 1M natriumfosfatbuffer (pH 7,0). Lavere nivåer av buffertilsats resulterte i mellomliggende vekstnivåer.

EKSEMPEL 7 EFFEKTER AV ETANOLOGENE ENZYMER PÅ

FERMENTERINGSPRODUKTER

Tabell 3 oppsummerer analysene av de fermenteringsprodukter som ble frembrakt av stammen TC4 og rekombinantene etter dyrking i 24 timer under aerobiske og anaerobiske betingelser. Under aerobiske betingelser, var acetat det primære fermenteringsprodukt som akkumulerte under dyrking av den TC4-stamme som manglet et plasmid i rikt medium, uten noe påvisbar etanol. Den produserte acetat-mengde ble drastisk redusert i stamme som inneholdt de etanologene enzymer fra Z. mobilis, og etanol viste seg å være det hovedsakelige fermenteringsprodukt. Den stamme TC4 som inneholdt pLOI308-10 produserte mest etanol, fulgt av TC4 som inneholdt pLOI295, pLOI308-2, pLOI292, pLOI208-5 og pLOI291. Under disse aerobiske betingelser ble det også produsert små mengder lactat (0,5 til 1,2 mM) av alle disse stammer. Bare den TC4-stamme som inneholdt pLOI308-10 akkumulerte påvisbare mengder succinat, selv om dette produkt fremdeles utelukkende representerte 1 % av de totale fermenteringsprodukter, idet 94 % var etanol.

Tabell 3 Sammenlikning av fermenteringsprodukter under aerobisk og anaerobisk vekst

DYRKNINGS- BETINGELSER:	PLASMID:	FERMENTERINGSPRODUKT (mM (SD)):			
		SUCCINAT:	LAKTAT:	ACETAT:	ETANOL:
Aerobisk	Intet	0,2 (0,1)	0,6 (0,2)	55 (2)	Spør
	pLOI308-2	Spør	1,2 (0,3)	22 (2)	98 (3)
	pLOI308-5	Spør	0,9 (0,2)	43 (3)	15 (2)
	pLOI308-10	4,9 (0,5)	1,0 (0,2)	17 (2)	337 (21)
	pLOI295	Spør	1,1 (0,4)	13 (1)	114 (10)
	pLOI291	Spør	0,6 (0,2)	34 (3)	7 (1)
	pLOI292	Spør	1,3 (0,2)	30 (1,5)	24 (1)
Anaerobisk	Intet	0,9 (0,1)	22 (1)	7 (0,3)	0,4 (0,2)
	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)	1,2 (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)

- 5 Under anaerobiske betingelser var laktat det hovedsakelige fermenteringsprodukt som akkumulerte under 24 timers dyrking av den TC4-stamme som manglet et plasmid i rikt medium som inneholdt glykose, med mindre mengder acetat, succinat og etanol tilsted. Laktatproduksjonen ble dramatisk redusert i stammer som inneholdt de etanologene enzymer og ble fulgt av produksjonen av vesentlige mengder etanol. Stammen TC4 (pLOI308-10)
- 10 produserte den største etanolemengden, og dette produkt alene representerte 97 % av de totale løselige fermenteringsprodukter. Tendensen til etanolproduksjon blant de testede organismer var den samme som under aerobisk vekst. Alle organismer unntatt TC4 (pLOI308-10) produserte faktisk mindre totalt etanol etter 24 timer under anaerobiske betingelser enn under aerobiske betingelser. Det er sannsynlig at dette lavere nivå av akkumulert etanol var
- 15 forårsaket av reduksjonen i den totale celledensitet som ble frembrakt under disse aerobiske betingelser, slik at den volumetriske hastighet for etanolproduksjon ble redusert.

Graden av etanolproduksjon under anaerobiske og under aerobiske betingelser (tabell 3) var direkte relatert til nivået av ekspressjon av Z. mobilis etanologene gener (tabell 1).

Etanolproduksjonen syntes å være optimal i stammen TC4 (pLOI308-10), med en
5 pyruvatdekarboksylase-aktivitet på 6 IU og alkoholdehydrogenase II-aktivitet på 2,5 IU.

Derivater av E. coli TC4 som inneholdt plasmider som uttrykker de etanologene enzymer fra Z. mobilis vokste til høyere celletettheter enn den moderorganisme som manglet et plasmid. Økningen i den endelige celletetthet, graden av etanolakkumulering i mediet og reduksjonen
10 av surgjøringshastigheten for kulturmediet under dyrking korrelerte alle med ekspressjonsnivået for Z. mobilis etanologene enzymer. Homologe promotorer ble anvendt til å uttrykke genene i alle konstruksjoner bortsett fra pLOI295 (lac) for å minimalisere potensielle problemer forbundet med transkripsjonsregulering. Det ekspressjonsnivå som var nærmest optimalt for dyrking og etanolproduksjon ble frembrakt med pLOI308-10 (6,5 IU
15 pyruvatdekarboksylase og 2,5 IU alkoholdehydrogenase II pr. mg totalt cellulært protein). Dette ekspressjonsnivå i E. coli er betydelig høyere enn hva som foreligger i Z. mobilis CP4, som utelukkende inneholder etanolreaksjonsveien for regenereringen av NAD⁺.

Ekspressjonsnivået for etanologene enzymer syntes å være for stort i stammen TC4
20 (pLOI295) (omtrent 17 % av det løselige cellulære protein). Dette høye ekspressjonsnivå var fuglt av delvis cellelysning, langsommere vekst og en reduksjon i etanolproduksjon under aerobe betingelser. Disse effekter ble redusert ved lavere agetering og ved dyrking under anaerobiske betingelser. Den tilsynelatende skade og delvise lysning som opptrådte under i høy grad aerobisk vekst kan ha vært relatert til uttappingen av NADH ved hjelp av en
25 kombinasjon av de høye nivåer av Z. mobilis-alkoholdehydrogenase II og den naturlige NADH-oksidasen (koplet til elektrontransportsystemet).

Produksjonen av etanol som et hovedprodukt synes ikke å påvirke veksthastigheten for E. coli TC4 på en skadelig måte. Stammer som inneholder derivater av pLOI308 (ColE1-replikon)
30 som uttrykte pet-operonet og produserte etanol vokste like raskt som moderorganismen under aerobiske betingelser med glykose og nådde høyere endelige celletettheter enn moderorganismen. Stammer som inneholdt pLOI291 eller pLOI292 med RSF1010-replikonet vokste langsommere under aerobiske betingelser. Siden disse to konstruksjoner uttrykte lave

nivåer av de etanologene enzymer og produserte mindre etanol enn pLOI308-10, kan årsakene til den lavere vekst skyldes vektorens egenskaper heller enn ekspressjonen av pet-operonet.

5 EKSEMPEL 8 FREMSTILLING AV YTTERLIGERE STAMMER

Ytterligere *E. coli*-stammer ble testet for å identifisere bakterier med overlegne egenskaper for anvendelse som en etanolproduserende mikrobe. De følgende *E. coli*-stammer ble evaluert: ATCC 8677, ATCC 8739, ATCC 9637, ATCC 11303, ATCC 11775, ATCC 14948, ATCC 15244 OG ATCC 23227. Disse ble dyrket i et rystet vannbad ved 30 °C i

- 10 Luriamedium (Luria, S.E. og M. Delbruck (1943) Genetics 28: 491-511) som inneholdt trypton (10 g/l), gjærekstrakt (5 g/l), natriumklorid (5 g/l) og et fermenterbart sukker. Glykose og laktose ble tilsatt til konsentrasjoner på 100 g/l og xylose til en konsentrasjon på 80 g/l når ikke annet er vist. Sukkeret ble autoklavert separat (121 °C, 15 minutter), dobbelt styrke i destillert vann. Xylose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)-løsninger ble surgjort og ble
- 15 nøytralisert med natriumhydroksid forut for autoklaving. Manglende nøytralisering resulterte i omfattende brunning og dekomponering. Liknende fermenteringsresultater ble oppnådd med sukkeret som ble autoklavert eller filtersterilisert. Overlevelse i medium og på plater for rekombinantstammer som inneholdt gener som koder for genene fra etanolreaksjonsveien krevde nærvær av et fermenterbart sukker. Når det er vist ble det tilsatt
- 20 tetracyklin til en sluttkonsentrasjon på 10 mg/liter.

EKSEMPEL 9 YTTERLIGERE STAMMERS MILJØMESSIGE HÅRDFØRHET

Forut for innføringen av plasmider for etanolproduksjon, ble veksten av de tidligere identifiserte 8 forskjellige stammer av *E. coli* sammenliknet med hensyn på miljømessig

25 hårdførhet. Stammene ble testet med hensyn på deres resistens overfor natriumklorid, sukkere, lav pH og etanol. Konsentrasjoner av natriumklorid og sukkere i tabell 4 inkluderer hva som foreligger i det opprinnelige medium. Mediets opprinnelige pH var 6,8. Denne ble justert med HCl til lavere verdier når dette er vist. Surgjorte medier destillisert ved filtrering. Etanol ble tilsatt til autoklaverte medier etter avkjøling. Sukkeret ble autoklavert separat.

- 30 Overnattingskulturer som ble dyrket i hvert respektive sukker i fravær av testmiddelet ble fortynnet 60 ganger i 13 x 75 mm's kulturrør som inneholdt 3 ml testmedium. Veksten ble målt som O.D. ved 550 nm etter 48 timer. En O.D. på 1,0 er ekvivalent med 0,25 mg/ml celle-protein og 0,33 mg tørrvekt celler. I tester med hensyn på miljømessig hårdførhet

reflekterte en endelig O.D. på under 0,2 mindre enn to doblinger og ble betraktet som neglisjerbar.

Tabell 4 oppsummerer disse resultater i medium som inneholder glykose. Liknende resultater
5 ble oppnådd i medium som inneholder laktose eller xylose. Stammene av ATCC 8677, ATCC
8739 og ATCC 11775 var spesielt følsomme overfor inhibering ved hjelp av lave
etanolkonsentrasjoner. Stammene ATCC 9637 og ATCC 11775 var mest resistente overfor
lav pH selv om alle stammer vokste med i det minste 2 til 4 doblinger ved pH 4,0, bortsett fra
ATCC 23227. Alle stammene vokste ved 45 °C med begrenset vekst ved høyere
10 temperaturer. Ingen kunne subkultiveres over 45 °C. Alle stammene vokste på medium som
inneholdt 20 % glykose, 20 % laktose eller 12 % xylose.

Tabell 4 Dyrking av *E. coli* i Luriamedium som inneholder 100 g/l glykose under kjemiske og fysiske stress.

STRESS:	DYRKING AV <i>E. COLI</i> -STAMMER (ATCC-NUMMERE):							
	8677	8739	9637	11303	11775	14948	15224	23227
NaCl (g/l)								
50	+	++	++	++	++	++	++	++
60	0	+	++	++	+	++	+	++
70	0	0	+	+	0	+	+	+
Etanol (vol-%)								
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
Surhet								
pH 4,50	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 4,25	++	++	++	+	++	++	++	+
pH 4,00	+	+	++	+	++	+	+	0
pH 3,75	0	0	+	0	+	0	0	0
Temperatur (°C)								
45	++	++	++	++	+	++	++	++
47	+	+	+	+	+	+	+	+
49	0	0	+	+	0	0	+	+

5

0 = mindre enn to doblinger i O.D. 550 nm.
 + = to eller fire doblinger.
 ++ = over fire doblinger.

10 EKSEMPEL 10 YTTERLIGERE STAMMERS SUKKERUTNYTTELSE

Sukkerutnyttelse ble testet på to måter. Stammer som utviklet røde kolonier på MacConkey-agar som var supplert med 2 % karbohydrat ble ansett å skåre positivt for sukkerutnyttelse (Silhavy, T.J. og J.R. Beckwith (1985) Microbiol. Rev. 49: 398-418). Cellene ble også testet ved anvendelse av Biolog EC-platene (Biolog, Inc., Hayward, CA) ifølge produsentens

rettningslinjer. Biolog-plantene var raske og praktiske, påviste NADH-produksjonen (konvertering av et tetrazoliums salt til det uløselige formazan) som et mål på substratutnyttelse. Begge metoder var i fullstendig overensstemmelse fordi 13 undersøkte sukkerarter.

5

Alle de testede stammer utnyttet glykose, fuktose, galaktose, mannose, arabinose, laktose, glukuronsyre og galakturonsyre. Stamme 11775 utnyttet ikke xylose. Maltose og maltotriose ble ikke anvendt av ATCC 11303 og ATCC 23227. Alle stammer fremviste en svak positiv reaksjon med cellobiose. Bare stammen ATCC 9637 utnyttet succrose. Resultatene etter studiene av sukkerutnyttelse er vist i tabell 5.

10

Tabell 5 Dyrking av *E. coli*-stammer som rommer pLOI297 og pLOI308-11.

SUKKER:	PLASMID:	ENDELIG O.D. 550 nm AV <i>E. coli</i> -STAMMER (ATCC-NUMRE):							
		8677	8739	9637	11303	11775	14948	15224	23227
Glykose	Intet	4,0	3,7	6,1	6,0	4,7	5,6	7,0	6,6
Glykose	pLOI297	10,0	10,5	10,5	10,0	9,5	-	9,5	10,2
Glykose	pLOI308-11	9,8	9,5	11,4	11,2	-	9,3	10,8	11,4
Laktose	Intet	4,3	3,8	7,5	6,0	4,5	6,1	7,0	6,4
Laktose	pLOI297	13,0	6,8	11,6	10,8	7,6	-	10,5	7,0
Laktose	pLOI308-11	10,0	10,0	11,5	11,0	-	7,3	10,0	10,0
Xylose	Intet	4,1	3,7	7,7	7,3	4,9	5,9	7,2	7,0
Xylose	pLOI297	8,1	10,6	10,8	10,6	4,7	-	11,0	11,0
Xylose	pLOI308-11	10,0	6,8	11,4	8,5	-	11,4	10,6	12,0

15 Tankestrekene indikerer at ingen data er tilgjengelige.

Eksempel 11 GENTISK ENDRING AV YTTERLIGERE STAMMER

To nye plasmider ble konstruert ved anvendelse av vanlige fremgangsmåter (Maniatis, T., E.F. Fritsch, og J. Sambrook (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA) og disse inneholdt resistensgener for

20

ampicillin og tetracyklin som utvelgbare markører. Operonet for etanolproduksjon (pet-operon) som inneholdt en kryptisk Z. mobilis-promotor, pyruvatdekarboksylase, alkoholdehydrogenase og transkripsjonsterminator ble fjernet iform av et 5,2 kb EcoRI-fragment fra pLOI308-10 (Ingram og Conway (1988), Supra) og innsatt i EcoRI-punktet på pBR322 til frembringelse av pLOI308-11. Plasmidet pLOI297 ble konstruert ved å innsette
5 det 2,6 kb EcoRI-fragment fra pCOS2EMBL (Poustka, A., H.R. Rackwitz, A.-M. Firschauf, og H. Lehrach (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4129-4133) som inneholdt det tetracyklin-resistente gen inn i Sall-punktet på pLOI295 (Ingram et al. (1987), supra). De kohesive ender ble fjernet ved behandling med Klenow-fragmentet fra E. coli-DNA-
10 polymerase (Maniatis et al., supra), forut for ligering.

Plasmidene ble innført inn i de forskjellige stammer av E. coli ved transformasjon ved anvendelse av kalsiumklorid-prosedyren til Mandel og Higa (Mandel, M., og A. Higa (1970) J. Mol. Biol. 53: 159-162). Utvelgelser ble utført på fast medium som inneholdt 2 % glykose
15 og tetracyklin. Plasmidstabilitet ble uttrykt som prosentandelens celler som beholdt den antibiotiske markør etter 25 generasjoners vekst i fravær av antibiotisk utvelgelse.

Rekombinantstammer som rommet plasmider med genene for etanolproduksjon vokste som usedvanlig store kolonier som ble gule etter 24 til 48 timer på fast medium som inneholdt et
20 fermenterbart sukker. I væskeformet medium ble disse rekombinantes hendelige celletetthet to til tre ganger høyere enn for den kontroll som manglet plasmid. Ingen transformanter ble oppnådd etter flere forsøk fra ATCC 14948 med pLOI297 eller fra ATCC 11775 med pLOI308-11. Stammen ATCC 11775 utnyttet ikke xylose og rekombinanter av denne stamme vokste ikke til høyere tettheter enn kontrollen med xylose som fermenterbart sukker, selv om
25 økt vekst ble observert med laktose og glykose.

Plasmidstabilitet ble undersøkt etter dyrking i 25 generasjoner på medium som inneholdt glykose (tabell 6). Begge plasmider inneholdt de samme replika og holdt seg vel i alle stammer bortsett fra ATCC 8677 og ATCC 8739.

Tabell 6 Stabilitet av pLOI297 og pLOI308-11 etter dyrking i 25 generasjoner med glykose i fravær av antibiotisk utvelgelse.

ATCC-STAMME:	CELLER SOM HOLDER TILBAKE PLASMID (%):	
	pLOI297	pLOI308-11
8677	75	85
8739	44	47
9637	100	90
11303	98	98
11775	100	---
14948	---	97
15224	99	100
23227	91	100

5

Stiplede linjer indikerer at ingen data er tilgjengelige.

EKSEMPEL 12 EKSPRESSJON AV PYRUVATDEKARBOKSYLASE-AKTIVITET I GENETISK ENDREDE STAMMER

- 10 Pyruvatdekarboksylase-aktivitet ble målt som tidligere beskrevet (Conway et al. (1987), supra; Neale et al. (1987), supra) bortsett fra at cellene ble høstet ved en O.D. på 4,0, omtrent halvparten av maksimal vekst.

- 15 Ekspressjonen av Z. mobilis-pyruvatdekarboksylase-aktivitet ble undersøkt etter dyrking i nærvær av tetracyklin (tabell 7). Med pLOI297 uttrykkes Z. mobilis-gener under kontroll av E. coli-lac-promotoren. pLOI308-11 anvender en typisk Z. mobilis-promotor for ekspresjon av pet-operonet. Stammene ATCC 11303 (pLOI297), ATCC 11775 (pLOI297) og ATCC 15224 (pLOI297) inneholdt de høyeste aktivitetsnivåer.

Tabell 7 Ekspressjon av *Z. mobilis*-pyruvatdekarboksylase i *E. coli*-stammer som rommer pLOI297 og pLOI308-11 under dyrking med glykose.

ATCC-STAMMER:	PYRUVATDEKARBOKSYLASEAKTIVITET (a):	
	pLOI297	pLOI308-11
8677	5,7	6,0
8739	0,8	1,4
9637	1,1	1,4
11303	16,7	2,1
11775	17,1	---- (b)
14948	---- (b)	2,5
15224	16,3	1,8
23227	2,3	1,7

5

(a) Aktivitet i I.U./mg celleprotein.

(b) Stiplede linjer indikerer at ingen data er tilgjengelige.

10 EKSEMPEL 13 ETANOLPRODUKSJON VED HJELP AV GENETISK ENDREDE STAMMER

Luriamedium ble modifisert for fermenterings-ekperimenter ved hjelp av tilsats av kaliumfosfatbuffer (pH 7,0) i en sluttkonsentrasjon på 0,2 M. Fosfatbuffer, komplekse mediumkomponenter og sukker ble autoklavert separat og blandet etter avkjøling.

Tetracyklin ble tilsatt i en konsentrasjon på 10 mg/l. Inocula ble dyrket i 24 timer fra nylig

- 15 isolerte kolonier, vasket i det fermenteringsmedium som skulle testes og tilsatt til en innledningsvis O.D. 550 nm på omtrent 1,0. Fermenteringene ble utført ved 30 °C eller 37 °C i 100 ml volumetriske kolber som inneholdt 80 ml medium, utstyrt med gummimembran og 25 gauge måler for å muliggjøre unnslipning av gass. Fermenteringskolbene var nedsenket i et temperaturkontrollert vannbad og ble omrørt ved 100 omdreininger/minutt ved hjelp av en
- 20 magnetisk rører.

Etanolkonsentrasjonen ble målt med gasskromatografi som tidligere beskrevet (Dombek,

K.M. og L.O. Ingram (1985) Appl. Environ. Microbiol. 51: 197-200) og uttrykkes som volum-%. Omdanningseffektiviteten ble beregnet basert på tilsatt sukker, forutsatt at 100 % effektivitet resulterer i produksjonen av 12,75 ml etanol (10,2 g) per 20 g glykose eller xylose og 13,5 ml etanol (10,8 g) per 20 g laktose.

5

Alle genetisk modifiserte stammer av E. coli produserte vesentlige mengder etanol fra sukkeret (tabell 8). Preliminære eksperimenter med stammen ATCC 15244 (pLOI297) viste at høyere nivåer av etanol ble produsert i medium som inneholdt 0,2 M kaliumfosfatbuffer (pH 7,0). Det forventes at liknende eller bedre resultater ville fremkomme ved anvendelse av en automatisert pH-justering i stedet for denne buffer. Med 15 % glykose ble det produsert høyere etanolnivåer ved 30 °C enn ved 37 °C etter 48 timer. Fermenteringen av laktose og xylose ble utelukkende undersøkt ved den lavere temperatur, 30 °C. Generelt ble høyere etanolnivåer produsert ved hjelp av stammer som rommet pLOI297 enn med pLOI308-11. Stammene ATCC 11303 (pLOI297), ATCC 11775 (pLOI297) og ATCC 15224 (pLOI297) produserte de høyeste etanolnivåene etter 24 timer fra 15 % glykose, 5,8 til 6,9 volum-%. De fleste stammer var mindre tolerante for xylose i de innledende eksperimenter og fermenteringssammenlikninger ble utført ved anvendelse av 8 % xylose. Stammene ATCC 9637 (pLOI297), ATCC 11303 (pLOI297) og ATCC 15224 (pLOI297) produserte de høyeste etanolnivåer (4,8 % til 5,2 %) fra 8 % xylose etter 72 timer. Alle stammer vokste godt i 15 % laktose. Stammene ATCC 11303 (pLOI297) og ATCC 15224 (pLOI297) produserte de høyeste etanolnivåer fra laktose etter 48 timer, hhv. 6,1 % og 5,6 %.

20

Tabell 8 Etanol produsert ved satsvis fermentering fra glykose (48 timer), xylose (72 timer) og laktose (48 timer) ved hjelp av *E. coli*-stammer som rommet pLOI297 og pLOI308-11.

KARBOHYDRAT:	PLASMID:	ETANOL (% V/V) PRODUSERT AV <i>E. coli</i> -STAMMER (ATCC-NUMRE):							
		8677	8739	9637	11303	11775	14948	15224	23227
15 % glykose	pLOI297 (a)	2,4	4,7	4,2	4,3	4,8	—	4,8	0,9
15 % glykose	pLOI308-11 (a)	3,6	1,4	2,1	1,3	—	3,4	2,8	1,3
15 % glykose	pLOI297 (b)	3,2	4,7	4,1	5,8	6,9	—	6,1	3,1
15 % glykose	pLOI308-11 (b)	5,8	5,0	3,5	1,5	—	3,8	3,0	3,2
15 % laktose	pLOI297 (b)	2,3	4,4	5,3	6,1	4,5	—	5,6	3,7
15 % laktose	pLOI308-11 (b)	2,3	2,1	3,4	0,9	—	2,9	2,7	3,0
8 % xylose	pLOI297 (b)	0,9	4,1	4,8	5,2	—	—	4,8	1,2
8 % xylose	pLOI308-11 (b)	2,0	2,8	2,8	1,2	—	2,0	3,5	1,0

Tankestreker viser at ingen data er tilgjengelige.

(a) Incubert ved 37 °C.

(b) Incubert ved 30 °C.

Basert på disse sammenlignende studier syntes stammen ATCC 11303 (pLOI297) og ATCC 15224 (pLOI297) å være de beste konstruksjoner for etanolproduksjon. Tidsforløpet for vekst og etanolproduksjon ble undersøkt med begge stammer i 12 % glykose, 12 % laktose og 8 % xylose (figur 1). Cellemassen øker omtrent 10-foldig, og når en endelig tetthet på 3,6 g tørrvekt/l. Med xylose økte cellemassen med halvparten av den hastighet som er observert med glykose eller laktose. Etanolproduksjonen og vekst var omtrent linær for de tre sukkere inntil etanolkonsentrasjonen nådde 5 %.

For å beregne omdanningseffektiviteten av sukker til etanol, ble gjennomsnittet av den endelige etanolkonsentrasjon etter 120 timer beregnet fra de tre sett med eksperimenter (tabell 6). Den endelig konsentrasjon av etanol i kulturer som ble dyrket med 12 % glykose var 7,2 % (volumetrisk), hvilket tilsvarer 94 % av det teoretiske utbytte fra glykose. Med 12 % laktose var den endelige etanolkonsentrasjon 6,5 %, 80 % av det teoretiske utbytte fra laktose. Med 8 % xylose ble det ifølge oppfinnelsen konsistent oppnådd utbytte på 100 % og høyere.

Disse høyere utbytter under langsommere vekst med xylose kan reflektere omdanningen av pyruvat fra nedbrytingen av komplekse næringsmidler til etanol, i tillegg til pyruvat fra glykose.

- 5 Hastigheten av etanolproduksjonen ble beregnet fra de grafiske fremstillinger i figur 1 og er oppsummert i tabell 9. Den volumetriske etanolproduktivitet rangerte fra 1,4 g/l pr. time for glykose til 0,64 g/l pr. time for xylose. Den spesifikke etanolproduktivitet var, for hvert av de tre sukkere, høyest under den innledningsvise vekstperiode. Den høyeste produktivitet ble oppnådd med glykose, 2,1 g etanol/g tørr cellevekt pr. time. Det høyeste utbytte av etanol pr. gram sukker ble oppnådd med xylose, og dette oversteg det maksimale teoretiske utbytte for sukker alene.

Tabell 9 Gjennomsnittlige kinetiske parametre for etanolproduksjon ved hjelp av ATCC 11303 (pLOI297) og ATCC 15224 (pLOI297).

SUKKER:	VOLUMETRISK (a) PRODUKTIVITET:	SPESIFIKK (b) PRODUKTIVITET:	UTBYTTE (c):	EFFEKTIVITET (d):	ETANOL (e):
12 % glykose	1,4	2,1	0,48	95 %	58
12 % laktose	1,3	2,0	0,43	80 %	52
8 % xylose	0,6	1,3	0,52	102 %	42

(a) g etanol/l pr. time.

(b) g etanol/g tørr cellevekt pr. time.

(c) g etanol/g sukker.

(d) produsert etanol/teoretisk maksimum fra sukkersubstrat x 100.

(e) endelig etanolkonsentrasjon i g/l.

Forsøkene ble utført med ATCC 11303 (pLOI297) for å undersøke etanolproduksjon fra arabinose, galaktose og mannose. Etanolkonsentrasjoner på 3 til 4 % ble oppnådd etter 48 timer ved 30 °C men disse ble ikke undersøkt videre. Disse sukkere ble metabolisert ved reaksjonsveier som likner de for glykose og xylose og ville forventes å produsere analoge utbytter (Lin, E.C.C. (1987) carboxylates", i F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, og M. Schaechter (eds), Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Vol. 1, pp. 244-284. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA).

EKSEMPEL 14 ETANOLPRODUKSJON FRA VERTER UTOVER E. COLI

Den store grad av likhet i reaksjonsveier mellom de forskjellige organismer gjør det forutsigbart at et utvalg verter kan transformeres med gener som da tildeler den transformerte vert evnen til å produsere etanol som et fermenteringsprodukt. Når verter transformeres med adh- og pdc-genene, som beskrevet heri, kan det med sikkerhet forutsies at egnede
 5 ekspresjonsvektorer kan anvendes til å oppnå ekspresjon. Straks ekspresjon er oppnådd, er produksjonen av etanol i høy grad forutsigbar p.g.a. ensartetheten av denne reaksjonsvei hos forskjellige potensielle verter.

EKSEMPEL 15 ETANOLPRODUKSJON I TRANSFORMERT KLEBSIELLA

- 10 Den Klebsiella-stamme som ble anvendt i dette studium var tidligere betegnet som Klebsiella pneumonie stamme M5A1 (Mahl, M.C., P.W. Wilson, M.A. Fife, W.H. Ewing (1965) J. Bacteriol. 89: 1482-1487). Denne stamme, en dinitrogenfikserende organisme, ble opprinnelig identifisert som Aerobacter aerogenes men fikk på grunnlag av antigenegenskaper nytt navn. Siden nye taksionomiske kriterier for Klebsiella-pneumonie
 15 ble definert i den 8. utgave av Bergy's Manual, ble artsinndelingen for denne nye stamme undersøkt videre. Stammen M5A1 vokste ved 10 °C i minimalt glykosemedium men unnlot å produsere gass fra laktose ved 44,5 °C. Denne stamme var indol-positiv og utnyttet både m-hydroksybenzoat og gentisat som eneste karbonkilde for vekst ved både 30 °C og 37 °C. Basert på disse tester ble M5A1 betegnet K. oxytoca. Stammen ble subkultivert på
 20 Luriaagarplater som manglet tilsatt sukker unntatt at de huset plasmider som kodet for Z. mobilis-gener. Rekombinanter som inneholder adhB og pdc krever et fermenterbart karbohydrat for å kunne overleve og ble opprettholdt på plater som inneholdt 2 % glykose eller xylose. Antibiotiske konsentrasjoner var som følger: ampicillin 50 ig/ml, kloramfenicol, 40 ig/ml og tetracyklin, 12,5 ig/ml. Ekspresjon av Z. mobilis adhII i rekombinanter ble
 25 screenet ved anvendelse av aldehydindikatorplater. Escherichia coli-stamme TC4 ble anvendt som vert for alle plasmid-konstruksjoner.

- Siden M5A1 er relativt resistent overfor penicillin og dets derivater er det konstruert E. coli-skyttelvektorer som bærer genene cat (cmr) eller tet (Tcr). Et tet-gen ble tilsatt til
 30 pLOI276 som inneholdt Z. mobilis-pdc ved å innsette et 2,6 kilobasepars EcoRI-fragment fra pcos2EMBL (Poustka, A., H.R. Rackwitz, A.-M. Frischauf, B. Hohn, H. Lehrach (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4129-4133) inn i Sall-punktet på pLOI276. Kohesive ender ble fjernet ved behandling med Klenow-fragmentet fra E. coli-DNA-polymerase før ligering.

Den resulterende konstruksjon ble bekreftet ved restriksjonsanalyse og betegnet pLOI560.

- Preliminære studier indikerte at E. coli B (ATCC 11303) rommet plasmider av kryptisk lave kopitall. En ny og hensiktsmessig vektor ble konstruert in vivo ved integrering av Z. mobilis-
5 pdc og adhB sammen med cat inn i disse plasmider. Dette ble gjort ved å isolere et 4,6 kilobasepars promotorløst PstI-fragment som inneholdt pdc, adhB og cat fra pLOI501. Det foreligger ingen replikeringsfunksjoner i dette fragment. Etter sirkularisering ved selvligering, ble disse fragmenter transformert inn i E. coli B ved utvelgelse for Cmr på Luriaagarplater som inneholdt 2 % glykose. Transformanter ble testet på
10 aldehydindikatorplater og mørkerøde kloner ble utvalgt for ekspresjon av adhB-genet på høyt nivå. Plasmidpreparater fra disse stammer ble testet med hensyn på deres evne til å transformere antibiotisk resistens og Z. mobilis-gener inn i E. coli TC4 ved transformasjon. Alle rekombinanter var sensitive overfor ampicillin, hvilket indikerer en mangel av det pCU18-fragment som inneholder bla og colE1-replikonet. En av disse, pLOI555 (8,4
15 kilobasepar), produserte de mest intens røde kolonier på aldehydindikatorplater, tildelte utmerket etanolproduksjonsevne til E. coli og syntes å foreligge i lavt kopiantall basert på utbytter fra plasmidisoleringer i liten skala. Dette plasmid, såvel som pLOI297 og pLOI560, ble anvendt til å transformere K. oxytoca M5A1 med seleksjon for Cmr.
- 20 Tre plasmidkonstruksjoner som inneholdt det Z. mobilis-gen som koder for PDC ble transformert inn i M5A1 (tabell 10). PDC-nivåene var 8 ganger høyere i de to pUC-baserte konstruksjoner (pLOI297 og pLOI560) enn med pLOI555. Ved å anta en maksimal spesifikk aktivitet for rent PDC på 100 U, utgjør dette enzym over 25 % av cytoplasmaproteinet i M5A1 (pLOI297) og M5A1 (pLOI560) og 3,6 % i M5A1 (pLOI555).

Tabell 10 Plasmidstabilitet og pdc-ekspressjon i rekombinantstammer av M5A1.

PLASMID:	PDC-AKTIVITET ETTER 24 TIMER (U/mg PROTEIN):	PROSENTANDEL VARIGE EGENSKAPER (a, b) (ANTALL GENERASJONER):	
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)

- 5 (a) Det ble tatt prøver av celler 2 ganger under dyrkingen.
- (b) Både aldehydegenskapen og antibiotisk resistens ble mistet samtidig.

10 Ekspressjonen av Z. mobilis-gener i M5A1 ble ytterligere bekreftet i SDS/PAGE-gel. Bånd som inneholder PDC og ADHII ble lett identifisert ved sammenlikning med den naturlige stamme. Det bånd som inneholdt PDC er mye større i pUC-baserte rekombinanter enn i en M5A1 (pLOI555), hvilket stammer med målinger av enzymaktivitet. Selv om ADHII er mye mindre forekommende enn PDC, er den relative ekspressjon av dette Z. mobilis-gen også høyere i M5A1 (pLOI297) enn i M5A1 (pLOI555). Intet bånd som svarer til ADHII kom frem

15 i M5A1 (pLOI560) som utelukkende inneholder Z. mobilis-pdc-genet.

Kopitallet for pLOI555 ble, basert på utbytter i plasmidpreparasjoner i liten skala, estimert å være mindre enn 1/10 del av de to øvrige konstruksjoners. Selv om dette bare er et tilnærmelsesvis estimat, er det klart at de høye PDC-nivåer som foreligger i de pUC-baserte

20 konstruksjoner delvis skyldes høyere kopiantall.

Celler som rommet pLOI555, pLOI297 eller pLOI560 ble serielt overført i mer enn 60 generasjoner ved 30 °C i Luriamedium som inneholdt 10 % glykose uten antibiotikum. Egnede fortynninger av kulturer ble lagt i plater på Luriaagar som inneholdt 2 % glykose uten

25 antibiotikum. Koloniene ble testet på aldehydindikatorplater med hensyn på tilbakeholdelse av etanolproduksjonsgenene fra Z. mobilis og med hensyn på resistens overfor egnede antibiotika.

Overdreven ustabilitet av Z. mobilis-gener i pBR322-baserte vektorer er tidligere rapportert for Klebsiella planticola (Tolan, J.S., R.K. Finn (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53: 2039-2044) og ville ikke være aksepterbart for industrielle prosesser. Rekombinanter som rommer pLOI555 var meget stabile i det 98 % av populasjonen beholdt både resistensgenet overfor antibiotika og genene fra Z. mobilis. Selv om utelukkende adhB-ekspresjonen påvises ved aldehydindikatorplater, beholdt disse rekombinanter også fenotypen med store kolonier hvilket indikerer ekspresjon av både pdc og adhB.

Det ble utført fermenteringer i Luriamedium som inneholdt 10 % (vekt/volum) glykose eller xylose ved 30 °C, pH 6,0, agitering med 100 omdreininger/minutt. Inocula ble dyrket over natten ved 30 °C fra isolerte kolonier i urystede kolber. Fermenteringene ble inoculert til en innledningsvis O.D.550nm på 1,0 (330 mg tørrvekt celler/liter). Et Bausch and Lomb Spectronic 70 spektrofotometer ble anvendt til å overvåke veksten.

Etanolkonsentrasjonene ble bestemt med gass/væskekromatografi. Omdanningseffektiviteten ble korrigert for volumendringer som forårsakes av tilsatsen av base og forutsatt at alle sukkere hadde blitt metabolisert. Det maksimale teoretiske utbytte av etanol fra xylose og glykose ble beregnet å være 0,51 g etanol pr. gram sukker mens resten var karboksid. Den volumetriske produktivitet ble estimert fra de mest aktive perioder og representerer maksimumsverdier. Alle fermenteringsdata i tabeller og i figurer er i gjennomsnitt fra to eller flere satsvise fermenteringer.

Tabell 11 viser effektene av Z. mobilis PDC+ADHII på etanolproduksjon fra hhv. glykose og xylose for den naturlige stamme M5A1. M5A1 (pLOI555) var klart den beste konstruksjon for etanolproduksjon med maksimale volumetriske produktiviteter på 2,1 g/l pr. time for både glykose og xylose. Med begge sukkere produserte denne rekombinant omtrent 37 g etanol/liter etter 30 timer. Fermenteringen av disse sukkere var i det vesentlige fullført etter 48 timer med 45 g etanol/l.

Tabell 11 Etanoproduksjon fra glykose og xylose ved hjelp av rekombinantstammer fra M5A1 (a).

PLASMID:	GENER (b):	BASE (MMOL/G SUKKER) (c):	TID (d) (TIMER):	ETANOLUTBYTTE:		TEORETISK UTBYTTE (%):	VP (G/LITER PR. TIME) (e):	30 TIMER ETANOL (G/LITER):	CELLEUTBYTTE (G/G SUKKER):
				G/L	G/G AV SUKKER:				
Glykose									
Intet plasmid		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
pLOI555	pdc adhB	1,0	48	48	0,50	98	2,1	4,3	0,040
Xylose									
Intet plasmid		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
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

5

- (a) Beregningene er basert på totalt sukker tilsatt ved start.
- (b) De viste gener er fra Z. mobilis.
- (c) Den mengde base som forbrukes for å opprettholde en pH på 6,0 under fermentering.
- (d) Tidspunkt for maksimal etanolkonsentrasjon.
- (e) VP, maksimal volumetrisk produktivitet under satsvis fermentering

10

Som ved etanolproduksjon, var veksten av M5A1 (pLOI555) klart overlegent. Veksten av denne rekombinant var neste ekvivalent med den for moderstammen. I motsetning til moderstammen sank celletettheten imidlertid progressivt etter at den nådde et maksimum etter 15 timer. Denne minskning kan skyldes en reduksjon i refraktivitet ved

5 etanolakkumulering siden det ikke syntes å ha foregått noen lysning. Uten tilsats av base for å kunne kontrollere pH, vokste rekombinanter som inneholdt *pdh* + *adhB* til over to ganger moderorganismens tetthet p.g.a. en redusert syreproduksjonshastighet (høyere andel nøytrale fermenteringsprodukter) i forhold til hva som tidligere er observert med *E. coli*.

10 I maksimale volumetriske produktiviteter (2,1 g etanol/l pr. time) er nesten det dobbelte av *E. coli* rekombinantes samtidig som liknende høye effektiviteter og endelige etanolkonsentrasjoner opprettholdes. I motsetning til *E. coli*, fermenterer M5A1 (pLOI555) xylose og glykose med ekvivalente hastigheter. Plasmidet pLOI555 ble holdt stabilt i M5A1 i fravær av antibiotisk utvelgelse. Siden substratbredden for M5A1 tilsvarer *E. coli*, tilbyr

15 M5A1-rekombinater en avgjort og uventet fordel ved etanolproduksjon.

EKSEMPEL 16 FERMENTERING AV CELLOBIOSE TIL ETANOL VED HJELP AV ETANOLOGENE REKOMBINATER AV ERWINIA OG AV KLEBSIELLA

Dette eksempel illustrerer fermenteringen av et oligosakkarid, cellobiose, ved anvendelse av
20 etanologene rekombinater av *Erwinia* og *Klebsiella*.

Den *Erwinia* som ble anvendt i dette eksempel var en typisk stamme av *Erwinia carotovora*. *Erwinia*en ble transformert ved anvendelse av det plasmid pLOI555 som ble beskrevet i det foregående i eksempel 15. Plasmidet pLOI555 ble innsatt i *Erwinia*en ved anvendelse av en
25 Biorad Electroporation enhet og ved å følge prosedyrene til Ito et al. (1988) *Ag. and Biol. Chem.* 52(1): 293-4 (spenning = 2,0 kV, kapasitans = 25 iF, og resistans = 100 ohm). Et høyere antall transformater, d.v.s. mer enn 100.000 pr. ig plasmid-DNA, ble utvunnet.

Den *Klebsiella* som ble anvendt i dette eksempel var *Klebsiella oxytoca* M5A1 stamme P2,
30 som fremkom som beskrevet i det følgende i eksempel 18.

Fermenteringene ble utført som i eksempel 15, ved anvendelse av 10 % cellobiose i Luriamedium (pH 6, 30 °C) og agitering med 100 omdreininger/minutt. Den

etanolkonsentrasjon som ble produsert av Erwinia og Klebsiella oxytoca var hhv. 1,113 molar og 1,065 molar. Resultatene er vist i figur 6 som g/l produsert etanol. Symboler: #, Erwinia; #, Klebsiella.

5 EKSEMPEL 17 FERMENTERING AV POLYMERE RÅVARER TIL ETANOL VED HJELP AV EN ENKELT, GENETISK MODIFISERT MIKROORGANISME

- Oppsummering av eksempelet: Dette eksempel illustrerer en tottrinns prosess for fermentering av polymere råvarer til etanol ved hjelp av en enkelt mikroorganisme som er genetisk modifisert til produksjon av etanol som et primært fermenteringsprodukt og til
- 10 produksjon av xylanase intracellulært. Nærmere bestemt ble det trunkerte xylanase-gen (xynZ) fra den termofile bakterie C. thermocellum, sammensmeltet med N-terminus for lacZ til eliminering av utskillelsessignaler. Dette hybride gen ble uttrykt i høye nivåer i E. coli KO11 og K. oxytoca M5A1 (pLOI555) som er diskutert i det foregående. Store mengder xylanase akkumulerte som et intracellulært produkt under etanolproduksjonen. Celler som
- 15 inneholdt xylanase ble høstet ved avslutning av fermenteringen og tilsatt til en xylanløsning ved hevet temperatur, hvorved xylanase ble frigjort for forsukring. Etter avkjøling, ble hydrolysatet fermentert til etanol med den samme organisme hvorved tilførselen av xylanase ble fornyet av hensyn til en påfølgende forsukring.
- 20 Organisme og dyrkningsbetingelser: De bakteriestammer og plasmider som ble anvendt i dette eksempel er opplistet i tabell 12.

Tabell 12 Anvendte bakteriestammer og plasmider.

BAKTERIE/PLASMID:	KARAKTERISTIKA:	KILDE ELLER REFERENSE:
<i>E. coli</i> DH5 α	lacZM15,recA	Bethesda Rsrch Lab
<i>E. coli</i> KO11	frd,Cmr,Ipet (a)	Ohta et al. (c)
<i>K. oxytoca</i> M5A1 (pLOI555)	Cmr,pet (b)	Eksempel 15, supra
pCT1202	Apr,xynZ ⁺	Grepinet et al. (d)
pLOI1001	Apr,xylB ⁺	Utt et al. (e)
pLOI2000	Apr,xylB ⁺	Dette eksempel
pLOI2001	Apr,lacZ: :xynZ ⁺	Dette eksempel
pLOI2002	Apr,lacZ: :xynZ ⁺	Dette eksempel
pLOI2003	Apr,lacZ: :xynZ ⁺ ,xylB ⁺	Dette eksempel

- 5 (a) Ipet henviser til integreringen av *Z. mobilis* pdc- og adhB-gener inn i kromosomet.
- (b) pet henviser til tilstedeværelsen av *Z. mobilis* pdc- og adhB-gener på plasmidet pLOI555.
- 10 (c) Ohta et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57: 893-900.
- (d) Grepinet et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 4582-4588.
- (e) Utt et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57: 1227-1234.

15

Stammene bevirket i Luriamedium som var supplert med 50 g xylose/l. Transformanter av *E. coli* ble utvalgt på Luriaagarplater som inneholdt 50 mg ampicillin/liter eller 40 mg kloramfenicol/l. Transformanter av *K. oxytoca* M5A1 ble utvalgt på Luriaagarplater som inneholdt 1.000 mg. ampicillin/l eller 40 mg kloramfenicol/l.

20

Rekombinantklonene ble screenet med hensyn på xylanase-aktivitet ved anvendelse av mikrotiterplater som inneholdt 4-metylumbelliferyl- β -D-cellobiopyranosid (100 mg/l) (Millet (1985) FEMS Microbiol. Lett. 29: 145-149). På liknende måte ble ekspresjon av genet *Butyrivibrio fibrisolvens* xylB som koder for både xylosidase- og arabinosidase-aktiviteter

screenet ved å inkorporere 4-metyumbelliferyl-Ó-L-arabinofuranosid (20 mg/l) inn i fast medium (Utt et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57: 1227-1234). Hydrolyse av disse substrater ved hjelp av positive kloner produserte et fluoriserende produkt (umbelliferon), hvilket lett kunne påvises under 340 nm ultrafiolett lys.

5

Genetiske prosedyrer og rekombinantteknikker: Plasmidpreparering, oppsplitting med restriksjonsenzymer, ligering, transformasjon og gelelektroforese ble utført ved anvendelse av vanlig fremgangsmåte. E. coli-stammen DH5Ó ble anvendt som vert for alle plasmidkonstruksjoner. Polymerasekjedereaksjoner ble utført med TempCycler Model 50 (Coy Laboratory Product Inc., Ann Arbor, MI) og et GeneAmp utstyrsett (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) som inneholdt Taq-polymerase. Forsterkningsreaksjonene inneholdt 2 mM av hver dNTP, 100 pmol av hver primer, 20 ng mal (template), og 2,5 U Taq-polymerase i totalvolum på 100 µl. Produktene ble isolert etter 30 forsterkningscykler (1 minutt ved 94 °C, 2 minutter ved 47 °C og 1 minutt ved 72 °C, endelig forlengelse i 3 minutter ved 72 °C).

10

15

Bestemmelse av enzymaktiviteter: Xylanase-, xylopyranosidase- og arabinofuranosidase-aktiviteter ble målt i rekombinanter som hadde vært dyrket over natten ved 30 °C. Cellene ble høstet ved sentrifugering (7.000 g, 10 minutter) og vasket to ganger med forfocitratbuffer (50 mM kaliumfosfat og 12,5 mM sitronsyre, pH 6,3) for bestemmelse av xylanase-aktivitet eller med fosfatbuffer (5 mM natriumfosfatbuffer som inneholdt 10 mM 2-merkapttoetanol, pH 6,8) for måling av xylosidase- og arabinosidase-aktiviteter. Cellen ble revet opp ved å føres to ganger gjennom en French trykkcelle ved 1.400 kp/cm². Det resulterende lysat ble sentrifugert (13.000 g i 30 minutter, 4 °C) til fjerning av cellerester.

20

25

Xylosidase- og arabinofuranosidase-aktiviteter ble målt som tidligere beskrevet (Utt, *supra*). Xylanase ble målt ved den samme prosedyre men ved anvendelse av p-nitro-β-D-cellobiosid som substrat. Xylanase-aktivitet ble også estimert ved måling av frigjøringen av reducerende sukker (Bergmeyer (ed) (1983) Methods of enzymatic analysis, Vol. II, 3. utgave, p 151-2, Verlag Chemie, Weinheim, Tyskland) fra hydrolysen av bjerketrexytan (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Alle aktiviteter er oppgitt som millimikromål produkt frigjort pr. minutt. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved metoden til Bradford (Bradford (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254).

30

Separasjon av xylooligosakkarider ved tynnsiktkromatografi: En blanding av xylooligosakkarider ble preparert ved delvis hydrolyse av 0,5 % bjerketrexylan med trifluoreddiksyre (Domer (1988) Meth. Enzymol. 160: 176-180). Løsningen ble konsentrert 10 ganger under vakum ved romtemperatur og prøver på 1 μ l ble anvendt som standard. Xylooligosakkaridene ble separert ved romtemperatur ved enkel utvikling på uaktiverte Whatman 150A silikagelplater (Whatman Inc., Clifton, New Jersey) ved anvendelse av et løsningsmiddel som besto av aceton, etylacetat og eddiksyre (hhv. 2:1:1). Etter tørking ble oligosakkaridene gjort synelige med naftyletylendiamin-reagens som beskrevet av Bounias (Bounias (1980) Anal. Biochem. 106: 291-295).

Fermenteringseksperimenter: inocula for fermenteringer ble preparert fra nylig isolerte kolonier ved virking over natten i urystede kolber (30 °C). Fermenteringene ble inoculert til en innledningsvis O.D. ved 550 nm på enten 0,1 eller 0,3 og incubert ved 30 °C i omrørte, pH-statistiske beholdere (350 ml arbeidsvolum, pH 6,0). (Beall et al. (1991) Biotechnol. Bioengin. 38: 296-303.; Ohta et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57: 893-900; og Ohta et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57:2810-2815.) Kloramfenikol eller kloramfenikol og ampicillin var inkludert i fermenteringsmediene.

Xylan ble fermentert i en totrinnsprosess hvori xylandegradering ble utført ved hevet temperatur fulgt av fermentering ved 30 °C. For degraderingen av xylan ble celler fra 350 ml's fermenteringer høstet ved sentrifugering (7.000 g, 10 minutter) etter 48 timer, resuspendert i et tilsvarende volum ferkst Luriamedium fulgt av 4 % xylan (pH 6,0), og inkubert ved 60 °C i 65 timer. Etter avkjøling til 30 °C, ble hydrolysaten inoculert med rekombinantorganismer til frembringelse av en innledningsvis O.D. på 0,3 ved 55 nm.

Ved forskjellig tidspunkter ble det tatt ut prøver til overvåking av xylooligosakkarider (tynnskiktkromatografi), cellevekst (O.D. ved 550 nm) og etanol. Etanol ble målt ved gass/væskeskromatografi (Dombek et al. (1985) Appl. Environ. Microbiol. 51: 197-200).

Konstruksjon av rekombinantplasmider for hydrolyse av xylan: I det minste to aktiviteter kreves for hydrolyse av usubstituert xylan, d.v.s. en endolytisk xylanase og xylosidase. Til anvendelse i xylan-fermenteringer ble det konstruert tre plasmider hvori xynZ (xylanase) -

genet fra den termofile Clostridium thermocellum (Grepinet et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 4582-4588), og xylB (xylosidase og arabinosidase) -genet fra Butyrivibrio fibrisolvens (Utt, supra.) ble uttrykt enkeltvis og i kombinasjon som et operon (figurene 7A, 7B og 7C).

- 5 Figurene 7A, 7B og 7C illustrerer konstruksjonen av rekombinantplasmider som inneholder xynZ og xylB. Kodingsregionene er fremstilt som parallellogrammer. C. thermocellum- og B. fibrisolvens-DNA er vist ved tynne linjer. Den tykke linje betegner vektor-DNA. Punkter med stump-endet ligering er markert med et "X". En "F" markerer kodingsregionen for den innrammede (in-frame) lacZ: :xynZ-fusjon.

- 10 XylB-genet ble subklonet inn i XbaI- til PstI-regionen for polylinkeren i pUC18 ved innsetting av to fragmenter fra pLOI1001, et 0,3 kilobasepar (kbp) XbaI- til PstI-fragment som inneholdt aminoterminalen med ribosomalt bindingspunkt og et 2,4 kbp PstI-fragment som inneholdt resten av kodingsregionen og translasjonsterminator. Det resulterende plasmid, pLOI2000, uttrykte xylB-genet fra lac-promotoren.

- Tidligere studier av Grepinet et al., supra, har vist at xylanase-ekspresjon var hevet i lacZ-fusjoner hvori et stort segment som kodet for den bearbeide xylanases sekresjonssignalsekvens og aminoterminalen hadde vært slettet. En i høy grad liknende lacZ: :xynZ-fusjon ble konstruert ved stump-endet ligering av det Klenow-behandelnde 2,4 kbp StyI-fragment fra pCT1202 som inneholdt det aminotrunkerte xynZ-gen inn i det Klenow-behandlede PstI-punkt på pUC18. Begge åpne leserammer var på linje med hverandre i det resulterende plasmid, pLOI2001.

- 25 Det var nødvendig å flytte den formodede transkripsjonsterminator 30 bp nedstrøms fra kodingsregionen for lacZ: :xynZ og legge til et nytt SstI-punkt til 3'-enden av fusjonsgenet forut for konstruksjonen av et plasmid fra hvilket gener som koder for både xylanase og xylosidase ble uttrykt. Disse modifikasjoner ble utført ved anvendelse av polymerase-kjedereaksjon. Plasmidet pLOI2001 ble anvendt som mal med 5'-GAATTCGAGCTCGGTAC-3' som primer for 5'-enden og 5'-GGGAGCTCCGGCATCATTATCTG-3' som primer for 3'-ende (inkluderer et nytt SstI-punkt). Etter SstI-oppsplitting, ble dette fragment innsatt inn i SstI-polylinkerpunktene til pUC18 og pLOI2000 til konstruksjon av hhv. pLOI2001 og pLOI2003.

Ekspresjon av enzymer som er involvert i xylandegradering: Ekspresjonen av xylanase-, xylosidase- og arabinosidase-aktiviteter ble innledningsvis undersøkt i celler i stasjonær fase fra den vertsorganisme som ble anvendt for konstruksjoner, stammen DH5Ó (tabell 13).

- 5 Xylanase (xynZ) -aktivitet ble redusert med 60 % i kloner som rommet pLOI2003 som inneholder xylB nedstrøms sammenliknet med pLOI2001 som inneholder xynZ alene. Imidlertid var xylosedase- og arabinosidase (xylB) -aktiviteter liknende i kloner som rommet pLOI2000 som inneholdt xylB alene og i pLOI2003 som inneholdt et oppstrøms xynZ-gen.

Tabell 13 Spesifikke aktiviteter av rekombinant enzymer for xylandegradering.

STAMME OG PLASMID:	SPESIFIKK AKTIVITET (mU/mg):			
	XYLOSIDASE:	ARABINOSIDASE:	XYLANASE (a):	XYLANASE (b):
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
E. coli KO11	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
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
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

- 5 Om ikke annet ellers er vist: cellene ble dyrket i rystekolber som innholdt Luriamedium med 5 % xylose og de ble høstet etter 20 timer (stasjonær fase). Xylosidase- og arabinosidase- aktiviteter ble bestemt ved 30 °C. Xylanase-aktiviteter ble målt ved 45 °C. Forkortelsen nd står for "ikke påvist".
- 10 (a) Xylanase-aktiviteter ble målt ved anvendelse av p-nitrofenyl- β -D-cellobiosid som substrat.
- (b) Xylanase-aktiviteter ble målt ved anvendelse av 0,5 % bjerketrexytan som substrat.
- (c) Cellene ble høstet fra pH-statistiske beholdere (8 % xylose i Luriamedium, pH 6,0) ved avslutning av fermenteringen.
- 15 (d) Xylanase-aktiviteter ble bestemt ved 60 °C.

Plasmidene pLOI2001 og pLOI2003 ble transformert inn i den etanologene stamme av E. coli KO11, hvor genene for etanolproduksjon er integrert inn i kromosomet. Ekspresjonen ble sammenliknet i celler i stasjonær fase fra rystekolber og i celler fra en pH-statisk beholder ved avslutning av fermenteringen (tabell 13). Xylosidase-, arabinosidase- og xylanase-aktiviteter var tilsvarende til de som observeres med DH5 α . Igjen var xylanase-aktiviteten redusert i pLOI2003 hvori xylB forelå nedstrøms.

Ekspresjon ble også undersøkt i K. oxytoca-stammen M5A1 som rommet pLOI555-holdige gener fra etanolreaksjonsveien til Z. mobilis. Selv om den replikontype som foreligger i pLOI555 er ukjent, virket den ganske stabil i nærvær av et annet plasmid som ble konstruert fra pUC18. Ekspresjon av arabinosidase- og xylosidase-aktiviteter var grovt sett ekvivalent med det som observeres i E. coli. En rikelig naturlig xylosidase ble oppdaget i M5A1. Xylosidase-aktivitetene var noe høyere i celler fra rystekolber sammenliknet med celler fra pH-statistiske beholdere mens xylanase-aktivitetene fulgte den motsatte tendens.

Under de anvendte testbetingelser var arabinosidase-aktiviteten 1,5 til 1,7 ganger høyere enn xylosidase-aktiviteten, hvilket bekrefter tidligere rapporter (Utt et al., supra). Xylanase-aktivitet målt ved 47 °C var omtrent halvparten av den som måles ved 60 °C, den optimale temperatur for det naturlige enzym (Grepinet et al., Supra). Basert på de presenterte data, er spesifikke aktiviteter for xylanase-funksjonen, som er beregnet fra måling av reduserende sukker, omtrent 100 ganger høyere enn estimer basert på hydrolysen av p-nitrofenyl-β-D-cellobiosid hvilket indikerer en sterk preferanse for naturlig substrat.

Hydrolyse av xylan ved høy temperatur ved hjelp av rekombinantkloner: Stammen KO11 (pLOI2003) ble dyrket i en pH-statisk beholder som inneholdt 8 % xylose og teste som enzymkilde for xylan-hydrolyse. Cellene ble resuspendert i et tilsvarende volum ubrukt Luriamedium som inneholdt 4 % xylan og incubert ved 45 °C, den maksimale temperatur hvorved B. fibrisolvans-xylosidase er stabil, og 60 °C og den optimale temperatur for C. thermocellum-xylanase. Selv om xylanase og xylosidase ble produsert som intracellulære produkter, viste innledningsvis eksperimenter at disse enzymer lett ble frigjort inn i mediet ved incubering ved 45 °C og 60 °C. Prøvene ble fjernet etter forskjellig tidsrom og oppsplittingsproduktene ble analysert med tynnskiktkromatografi (figurene 8A og 8B).

Figurene 8A og 8B viser tynnskiktkromatografiske analyser av xylanhydrolyse ved anvendelse av E. coli-stammen KO11 (pLOI2003), incubert ved 45 °C (figur 8A) eller 60 °C (figur 8B) i Luriamedium (pH 6,0) som inneholdt 4 % bjerketrexylan. En prøvestørrelse på 1 μl ble påført hver bane. Incubasjonstidsrommene er oppgitt i timer under hver bane. Et syrehydrolysat av xylan ble anvendt som norm i den først bane (S).

Xylose, xylobiose, xylotriose og xylotetrose ble klart oppløst idet xylobiose var det

dominerende produkt. Monomer xylose akkumulerte langsomt. En sammenlikning av oppsplittingsgraden etter 24 og 48 timer viser klart at mindre hydrolyse opptrådte ved 45 °C enn ved 60 °C trass i xylosidansens ustabilitet ved 60 °C.

- 5 Selv om xylan-oppsplitting var ufullstendig selv etter 65 timer ved 60 °C, forble xylanasen ganske aktiv og den kunne enkelt påvises med 4-metyl-umbelliferyl- β -D-cellobiosid som substrat. Xylosidase ble raskt inaktivert ved denne temperatur. Ingen ytterligere endring i xylan-hydrolysatets tynnskiktprofiler ble observert etter tilsatts av cellelysater som inneholdt begge enzymer og incubering ved 60 °C i ytterligere 24 timer. Dermed synes
- 10 xylooligosakkarid-produktene å være nær oppsplittingsgrensen for oppsplittingsprodukter fra Sigma bjerketrexylan. Oksidasjonsprodukter eller substitusjoner kan blokkere fullstendig oppsplitting av dette kommersielle preparat.

Utnyttelse av xylanhydrolyse-produkter ved hjelp av rekombinant-stammer fra *E. coli* og *K.*

- 15 *oxytoca*: Det ble utført eksperimenter i liten skala til evaluering av i hvilken grad xylooligosakkarider kunne metaboliseres av *E. coli* IO11 (pLOI2003) og *K. oxytoca*-stammen M5A1 (pLOI555). Disse stammer ble inoculert inn i 1 ml xylanhydrolysat (60 °C i 65 timer, supernatant etter fjerning av cellerester ved hjelp av sentrifugering) og incubert i 48 timer ved 30 °C uten agitering. Prøvene ble fjernet og analysert ved tynnskiktkromatografien
- 20 (figurene 9A og 9B).

- Figurene 9A og 9B viser utnyttelsen av xylooligosakkarider for vekst av rekombinant *E. coli* KO11 (figur 9A) og *K. oxytoca* M5A1 (figur 9B). Xylan (4 %) ble hydrolysert i 65 timer ved incubering med *E. coli*-stammen KO11 (pLOI2003) i Luriamedium (pH 6,0), sentrifugert og
- 25 sterilisert ved filtrering. Prøvene ble inoculert og incubert ved 30 °C for å tillate vekst. Prøvene ble fjernet med 24 timers intervaller som vist under hver bane og analysert ved tynnskiktkromatografi. En blanding av xylooligosakkarider ble anvendt som norm i den første bane (S).

- 30 Utelukkende xylose ble metabolisert ved hjelp av rekombinant *E. coli* trass i nærværet av aktiv *B. fibrisolvens*-xylosidase. Xylose, xylobiose og xylotriose ble alle fullstendig forbrukt av den etanologene *K. oxytoca*. Basert på disse resultater ble derivater av *K. oxytoca* utvalgt som overlegne for videre studier av xylan-konvertering til etanol.

Fermentering av xylose og xylan ved hjelp av derivater av *K. oxytoca*-stammen M5A1:

Fermentering av xylan ble utført som en to-trinnsprosess hvori celler som var høstet fra en tidligere fermentering ble resuspendert i Luriamedium som inneholdt 4 % xylan for
5 forsukring (60 °C i 65 timer). Forsukret xylan ble inoculert og fermentert ved 30 °C (pH 6,0). Parallelle forsøk ble utført hvori cellerestene ble fjernet ved sentrifugering før inoculering. Fermenteringene ble også utført med 4,47 % xylose (ekvivalent til xylose-innholdet i 4 % xylan) for sammenlikning (figurene 10A og 10B). Data fra disse fermenteringer er vist i det følgende i tabell 14.

10

Figurene 10A og 10B viser omdanningen av xylose- og xylan-hydrolysat til etanol ved hjelp av rekombinant *K. oxytoca* M5A1. Xylanet ble hydrolysert i 65 timer ved 60 °C for
anvendelse av celler fra en tidligere fermentering som enzymkilde. Figur 10A viser veksten
av celledmassen, og figur 10B viser etanolproduksjonen. Symboler: _ = fermentering av 4,47
15 % xylose med M5A1 (pLOI555), o = fermentering av 4,47 % xylose med M5A1 (pLOI555 og pLOI2001), # = fermentering av 4 % xylan-hydrolysat som inneholdt cellerester fra
forsukring med M5A1 (pLOI555 og pLOI2001), # = fermentering av 4 % xylan-hydrolysat
etter sentrifugering til fjerning av cellerester med M5A1 (pLOI555 og pLOI2001).

Tabell 14 Etanolproduksjon fra xylose og xylan ved hjelp av rekombinant-stammer fra *K. oxytoca* M5A1 (pLOI555) (a)

SUBSTRATE OG ANDRE PLANSID:	BASE (mM/g SUKKER) (b):	TID (c) (h):	ETANOLUTBYTTE:		TEORETISK UTBYTTE (%) (d):	VP (g/l/h) (e):	CELLEUTBYTTE (g/g SUKKER):
			g/l:	g/g SUBSTRAT:			
Xylose (4,47 %)							
pLOI555 alene	1,2	36	22,6	0,51	99	1,29	0,07
med pLOI2001	1,5	48	21,7	0,49	95	1,02	0,08
med pLOI2003	1,3	36	20,6	0,47	91	0,83	0,07
Xylan (4,0 %)							
med pLOI2001 (f)	0,7	24	7,7	0,19	34	0,37	0,04
med pLOI2003 (f)	1,3	36	7,7	0,19	34	0,31	0,04
med pLOI2001 (g)	1,3	60	7,8	0,20	34	0,28	nd
med pLOI2003 (g)	1,1	60	7,9	0,20	35	0,30	nd

5

- (a) Beregningen er basert på totalt tilsatt substrat.
 (b) Mengden base forbrukt til opprettholdelse av en pH på 6,0 under fermentering.
 (c) Den tid som kreves for å nå maksimal etanolkonsentrasjon.
 (d) Teoretisk utbytte på vektbasis er 0,51 for xylose og 0,56 for xylan.
 (e) VP, maksimal volumetrisk produktivitet under sausvis fermentering.
 (f) Hydrolysat etter at cellerester fra forsøking var fjernet ved sentrifugering.
 (g) Hydrolysat som inneholder cellerester fra forsøking.

10

15

20 Det kan sees at M5A1 (pLOI555) produserte etanol meget effektivt. Xylosefermenteringen var i det vesentlige fullført etter 24 timer med 93 % av det maksimale teoretiske utbytte. Både vekst og etanolproduksjon fra xylose ble redusert ved den samtidige tilstedeværelse av et annet plasmid, enten pLOI2001 eller pLOI2003. Påkrevde fermenteringstidsrom med pLOI2001 økte til omtrent 36 timer med 91 % av det teoretiske utbytte. Denne reduksjon i

25 etanolproduktivitet fra monomert sukker reflekterer den ytterligere byrde som pålegges av de rekombinante enzymer.

30

Xylanhydrolyse (60 °C i 65 timer) ble utført med M5A1 (pLOI555) som enten inneholdt det dybride xylanasegen (pLOI2001) eller xylosidasegenet og det hybride xylanasegen (pLOI2003). Tynnskiktprofiler av disse hydrolysatorer viste seg å være identiske med profilene for KO11 (pLOI2003), som er vist i figurene 9A og 9B. Ingen forskjeller ble funnet i graden xylanhydrolyse mellom de to M5A1-derivater.

Vekst og etanolproduksjon ble målt i disse hydrolysater etter inokulering med de respektive organismer som ble anvendt i forsukringen (figurene 10A og 10B). Vekst i klarnet hydrolysat var utelukkende halvparten av hva som ble observert med ekvivalente mengder

- 5 xylosemonomer. Fermenteringene var i det vesentlige fullført etter 24 timer og syntes å gå noe raskere i klarnende hydrolysater. Etanolutbyttene fra xylan var omtrent 1/3 del av maksimale teoretiske verdier, 7,7 til 7,9 g/l.

Xylooligosakkaridene i fermenteringsmediet ble overvåket ved tynnskiktkromatografi.

- 10 Profilene ved avslutning av fermentering var identiske med hva som er vist i figur 9B (48 timer). Xylose, xylobiose og xylotriose ble fullstendig metabolisert mens xylotetrose og lengre oligomerer ble igjen.

- Diskusjon: Det kan således sees at sterk modifiserte stammer av K. oxytoca M5A1 kan
15 anvendes både som en enzymkilde for polymerhydrolyse og for etanolproduksjon fra xylan. Tilstedeværelsen av en naturlig, intracellulær xylosidase og evnen til å transportere og metabolisere xylooligosakkarider er ikke tidligere rapportert for denne organisme. Det er tidligere beskrevet E. coli-isolater fra naturen som utnytter et fosfotransferase-system for cellobiose og en intracellulær fosfocellobiase (Hall et al. (1987) J. Bacterio. 169: 2713-2717;
20 krickner et al. (1987) Genetics 115: 419-429). Analoge systemer kan fungere i K. oxytoca M5A1 for xylobiose- og xylotriose-metabolisering. Tilstedeværelsen av transportsystemer og enzymer for metabolisering av xylosemonomerer, -dimerer og -trimerer i K. oxytoca M5A1 tilbyr betydelige fordeler sammenliknet med E. coli-baserte eller S. cerevisiae-baserte systemer for videre utvikling av biomasse - til - etanolprosesser.

- 25 Mange av de tidligere problemer i forbindelse med genetisk modifisering av enkelte organismer for polymer-degradering og etanolproduksjon elimineres ved anvendelse av en to-trinns prosess med termotabile enzymer som produseres som intracellulære produkter under fermentering. Syntese av proteiner som skal skilles ut i høye nivåer påvirker ofte normale
30 cellulære prosesser på en uheldig måte. Dette problem burde minimaliseres ved anvendelse av N-trunkerte enzymer hvori utskillingssignalet er erstattet med intracellulær ekspresjon. Siden hydrolyseringstiden er en begrensende faktor ved omdanning, ville høye nivåer av hydrolytiske enzymer være mest fordelaktige nettopp i begynnelsen av omdanningsprosessen

for således å maksimalisere tidlig frigjøring av sukkeret til hurtig fermentering. I utskillingsbaserte prosesser, er enzymnivåene innledningsvis lave og akkumulerer hen i mot maksimale nivåer nær avslutningen av fermenteringen. Ved imidlertid å anvende celler fra tidligere fermenteringer som enzymkilde oppnås nær maksimale nivåer i innledningen. Selv om anvendelsen av termostabile enzymer for hydrolyse tilbyr ytterligere prosessfordeler ved minimalisering av kontaminering og dessuten kan frembringe høyere hydrolyseringshastigheter, er en primær fordel den enkle frigjøring av intracellulære enzymer fra innhøstede celler.

10 Etanoltoleranse er ofte et problem i naturlige organismer som degraderer cellulose og xylan. Slike organismer produserer typisk mindre enn 20 gram etanol pr. liter. (Se Taillez et al. (1989) Appl. Environ. Microbiol. 55: 203-06). Selv om etanolproduksjonen i høye nivåer fra xylan hittil ikke er oppnådd, er M5A1 (pLOI555) i stand til å produsere i det minste 48 gram etanol/l fra 100 g/l xylose (omtrent 95 % av maksimalt teoretisk utbytte).

15 Det samlede utbytte av etanol fra bjerketrexylan var lavere enn forventet og antas primært å skyldes ufullstendig xylanhydrolyse. Udegraderte xylooligosakkarider gjenble etter forsukringsperioden på 65 timer. Selv om det xylanasenivå som ble produsert med våre konstruksjoner var under det som ble produsert ved optimale xylanasefusjonskonstruksjoner rapportert av Grepinet et al., supra, syntes enzymnivået i seg selv ikke å være begrensende. Xylan (40 g/l, omtrent 0,3 mole anhydroxylose) burde være fullstendig degradert til xylobiose-ekvivalenter etter 24 timers hydrolyse ved en hastighet på 105 im/min. Celleutbytter fra fermenteringen var omtrent 4,5 g celleprotein/l med en xylanase-aktivitet på 144 im/min pr. gram celleprotein hvilket frembrakte en totalaktivitet av 648 im/min.

25 Xylooligosakkaridene gjenble imidlertid, selv etter 65 timer trass i den aktive xylanases standhaftighet. Disse xylooligosakkaridnivåer forble uendrede ved tilsats av friskt enzym og ytterligere incubering i 24 timer. Konkurrerende inhibering av hydrolyse ved xylooligosakkarider kan bidra til ufullstendig oppsplitting, og ble delvis testet ved hydrolyse ved 45 °C, en temperatur hvorved xylanase forblir aktiv på samme måte som de naturlige enzymer i M5A1 som metaboliserer xylose, xylobiose og xylotriose. Oligosakkarid-profilen var under disse betingelser identisk med den som observeres etter fermentering med M5A1-stammer med ekvivalente nivåer av xylootetrose og lengre oligosakkarider som forble uoppsplittet (data ikke vist). Disse oligosakkarider synes å representerer grenseproduktene for

oppsplitting selv om naturen av de substituenten som begrenser oppsplitting forblir ukjente. Ifølge produsenten er bjerketrexylan 99 % xylose. Selv om man ikke ønsker å bindes til noen spesiell teori, spekuleres det ifølge den foreliggende oppfinnelse over om dette produkt kan inneholde oksyderte rester som er dannet under lagring eller substitutter som kan ha overlevd
 5 baseekstrasjon og rensing (Chesson et al. (1983) J. Sci. Food Agric. 34: 1330-1340.

I U.S.A. utgjør fermentativ etanolproduksjon omtrent 3,8 milliarder liter pr. år (Lynd et al. Science 251: 1318-1323). Mikroorganismer slik som de genetisk modifiserte K. oxytoca, E. coli, S. cerevisiae eller Z. mobilis kunne anvendes til å produsere et utvalg enzymer som
 10 koprodukter sammen med etanol. Ved et minimalt celleutbytte på 2 gram protein/liter øl, ville avledningen av 5 % celleprotein produsere i det minste 3.800.000 kg enzymer som koprodukter. Disse enzymer behøver ikke å være begrenset til depolymerisering av substrater for fermentering men kunne også inkludere andre enzymer for store markeder slik som vaskemiddelindustrien, matvareindustrien, produksjon av tremasse og utviklingen av nye
 15 biokatalysator-baserte industrier for nye kjemikalier. Forutsatt at store markeder utvikler seg, kan verdien av slike enzymer lett overskride de løpende verdier av etanol i seg selv.

EKSEMPEL 18 ETANOLPRODUKSJONEN FRA CELLOBIOSE, AMORF CELLULOSE OG CRYSTALLINSK CELLULOSE VED HJELP AV

20 REKOMBINANT KLEBSIELLA OXYTOCA SOM INNEHOLDER KROMOSOMT INTEGRERE Z. MOBILIS-GENER FOR ETANOLPRODUKSJON OG PLASMIDER SOM UTTRYKKER TERMOSTABILE CELLULASE-GENER FRA CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM

Oppsummering av eksempelet: I dette eksperiment er Z. mobilis-gener for etanolproduksjon

25 integrert i kromosomet fra Klebsiella oxytoca-stammen M5A1. Den beste av disse konstruksjoner, stammen P2, produserte etanol effektivt fra cellobiose i tillegg til fra monomere sukkere. Utnyttelsen av cellobiose og cellotriose av denne stamme eliminerte kravet til ekstern β -glykosidase og reduserte den mengde kommersiell cellulase som behøves for å fermentere SOLKA FLOC SW40 (primært krystallinsk cellulose). Tilsatsen av
 30 plasmider som koder for endoglykonaser fra Clostridium thermocellum resulterte i intracellulær akkumulering av termostabile enzymer som koprodukter med etanol under fermentering. Den beste av disse, stammen P2 (pCT603T) som inneholdt celD, ble anvendt til å hydrolysere amorf cellulose til cellobiose og produsere etanol i en totrinnsprosess. Stammen

P2 (pCT602T) ble også testet i kombinasjonen med kommersielle cellulaser. Forbehandling av SOLKA FLOC SW40 ved 60 °C med endoglykanase D reduserte den mengde kommersiell cellulase som krevdes til fermentering av SOLKA FLOC med opptil 80 %. Den stimulerende effekt av endoglykanase D-forbehandlingen kan være resultatet av hydrolyse av amorf regioner, som eksponerer ytterligere punkter for angrep av sopp-cellulaser. Siden endoglykanase D fungerer som del av et kompleks i *C. thermocellum*, er det mulig at dette enzym kan danne kompleks med soppenszymer eller binde cellulose til frembringelse av en mer åpen struktur for hydrolyse.

Eksempel 17 demonstrerte fordelen med akkumulering av *Clostridium thermocellum*-xylanase intracellulært i *K. oxytoca* M5A1 som et koprodukt med etanol. I dette eksempel har man ifølge den foreliggende oppfinnelse integrert genene for etanolproduksjon inn i *K. oxytoca*-stammen M5A1 og demonstrert at den resulterende organisme effektivt kan omdanne cellobiose til etanol. Denne organisme synes å være i stand til å transportere og metabolisere både cellobiose og cellotriose, hvilket eliminerer behovet for hetrolog β -glykosidase. Plasmider som ble tillagt til denne integrerte konstruksjon tillot produksjonen av termotabile endoglykanaser som koprodukter med etanol, hvilket reduserte behovet for kommersielle cellulaser under fermentering av cellulose.

Organismer og dyrkningsbetingelser: Tabell 15 opplister de nye organismer og plasmider som ble anvendt i denne studie. Stammer som rommer etanologene gener ble holdt på Luriaagar som inneholdt 2 % glykose (3). Andre stammer ble holdt på Luriaagar som manglet tilsatt sukker. Når ikke annet er bemerket ble kloramfenikol (20 μ g/ml), tetracyklin (6 μ g/ml) og ampicillin (50 μ g/ml) anvendt for utvelgelse. Vanligvis ble *E. coli*-stammer dyrket ved 37 °C og *K. oxytoca*-stammer dyrket ved 30 °C. Ekspresjon av det etanologene operon fra *Z. mobilis* ble overvåket ved hastigheten for fargedannelse på aldehydindikatorplate (Conway et al. (1987) J. Bacteriol. 169: 2591-2597). Koloniene ble screenet for cellulaseaktivitet ved inkubering i en til to timer ved 55 °C på Luriaagar som inneholdt karboksymetyl-cellulose fulgt av farging med kongorødt (Wood et al. (1988) Meth. Enzymol. 160: 59-74).

Tabell 15. Bakteriestammer og plasmider som ble anvendt i denne studie.

BAKTERIESTAMMER:	KARAKTERISTIKA REFERENSE:	KILDE ELLER:
<u>Stammer</u>		
K. oxytoca M5A1 (pLOI555)	Cmr, Ipet (b)	Eksempel 15
S1	Cmr, Ipet (a)	Dette eksempel
S2	Cmr, Ipet (a)	Dette eksempel
S3	Cmr, Ipet (a)	Dette eksempel
P1	Cmr, Ipet (a)	Dette eksempel
P2	Cmr, Ipet (a)	Dette eksempel
B1	Cmr, Ipet (a)	Dette eksempel
<u>Plasmider</u>		
pCOS2EMBL	Tcr	Poustka et al. (c)
pLOI510	Cmr pet (b)	Ohta et al. (d)
pCT105	Apr celA+	Cornet et al. (e)
pCT207	Apr celB+	Jeffries (f)
pCT301	Apr Tcr celC+	Petre et al (g)
pCT603	Apr Tcr celD+	Joliff et al. (h)
pCT105T	Apr Tcr celA+	Dette eksempel
pCT207T	Apr Tcr celB+	Dette eksempel
pCT603T	Apr Tcr celD+	Dette eksempel

- (a) Ipet refererer til integrering av Z. mobilis pdc- og adhB-gener inn i kromosomet.
- (b) Pet refererer til nærværet av Z. mobilis pdc- og adhB-gener på plasmidet pLOI555.
- (c) Poustka et al. (1984 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4129-4133.
- (d) Ohta et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57: 2810-2815.
- (e) Cornet et al. (1983) Bio/Technology 1: 589-594.
- (f) Jeffries, in 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. (1986) Biochimie 68: 687-695.
- (h) Joliff et al. (1986) Bio/Technology 4: 896-900.

Genetiske metoder og plasmidkonstruksjon: Vanlige genetiske prosedyrer ble anvendt.

Integrering av pet-gener inn i stammen M5A1 ble oppnådd ved å transformere celler med sirkularisert DNA (mangler alle replikasjonsfunksjoner) som inneholdt tre essensielle

5 elementer: 1) E. coli pfl-gen eller M5A1 DNA, 2) Z. mobilis pet-genene, 3) cat-genet for utvelgelse. Rekombinantene ble innledningsvis utvalgt ved anvendelse av 20 μ g klorafenikol/ml og uttrykte lave nivåer av Z. mobilis-enzym. Som med E. coli (Ohta et al. (1991) APpl. Environ. Microbiol. 57: 893-900), ble ekspresjon forsterket ved direkte utvelgelse av mutanter med resistens overfor 600 μ g kloramfenikol/ml. En enkelt klon som
10 uttrykte resistens ved høyt nivå ble holdt tilbake for hvert uavhengig utvelgelsestilfelle.

Tetracyklin-resistens ble tilsatt til plasmider som inneholdt celA (pCT105), celB (pCT207) og celD (pCT603). Plasmidene pCT105 og pCT207 ble oppsplittet med BamHI fulgt av behandling med Klenow-fragmentet fra E. coli DNA-polymerase for å danne stumpe ender.

15 Plasmidet pBR322 ble oppsplittet med EcoRI og på lignende måte behandlet til frembringelse av stumpe ender. Alle tre plasmider ble deretter oppsplittet med SalI. Det resulterende lite fragment fra pBR322 som inneholdt 5'-enden av tet ble ligert til de større fragmenter fra pCT105 og pCT207 til nydannelse av et funksjonelt tet-gen (tidligere inaktivert ved innsetting av C. thermocellum DNA), betegnet hhv. pCT105T og pCT207T. Et 2,5
20 kilobasepars EcoRI-fragment fra pCOS2EMBL (poustka et al., supra) som inneholdt det fullstendige gen ble innsatt i det unike EcoRI i pCT603 til frembringelse av pCT603T. Ingen modifikasjon av pCT301 behøvdes siden dette plasmid inneholdt et funksjonelt tet-gen i tillegg til celC. Alle celluloseholdige plasmider ble transformert inn i rekombinanten K. oxytoca med utvelgelse for tetracyklin-resistens.

25 Celulaseaktivitet: Endoglykanase-aktivitet ble bestemt i celle pluss medium og i medium alene ved 60 °C med p-nitrophenyl- β -D-cellobiosid som substrat (Petra et al., supra).

Endoglykanase D-aktivitet ble også estimert som frigjøringen av reducerende sukker fra amorf cellulose. Amorf cellulose (syresvullen og basesvullen) ble preparert fra SOLKA
30 FLOC SW40 som tidligere beskrevet for Avicel (Wood (1988) Meth. Enzymol. 160: 19-25). Reduserende sukker ble målt ved anvendelse av metoden til Nelson-Somogyi (Bergmeyer et al. (1983) pp 151-152, i Bergmeyer H.U. (red), Methods of enzymatic analysis, vol. II, 3. utgave, Verlag Chemie, Weinheim, Tyskland). Innledningsvise konsentrasjoner av amorf

cellulose ble estimert som totalt karbohydrat ved hjelp av fenol/svovelsyremetoden (Wood (1988) Meth. Enzymol. 160: 87-116).

Endoglykanase-aktiviteter ble også sammenliknet blant etanologene cel+-rekombinanter ved i
5 18 mm x 150 mm dyrkningsrør som inneholdt omtrent 15 ml Luriamedium som var gjort fast med 10 % karboksymetylcellulose av lav viskositet (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.) og legge på 2 ml kultur i stasjonær fase. Ette 48 timer innkubering ved 55 °C ble graden av væskedannelse bestemt ved inversjon.

10 Produkter av cellulose-oppsplitting ble analysert ved tynnskiktkromatografi som tidligere beskrevet for xylosider og xylan-oppsplitting (Domer et al. (1988) Meth. Enzymol. 160: 355-362). Glykose, cellobiose og cellotriose ble separert fra oligomerer. Cellobiose og glykose tjente som normer.

15 Fermenteringseksperimenter: Fermenteringer ble utført i en 500 ml Fleakers som tjente som pH-statiske beholdere (350 ml arbeidsvolum) i det vesentlige som beskrevet tidligere (Beall et al., supra). Luriamedium som inneholdt enten 10 % glykose eller 10 % cellobiose ble testet ved 30 °C, pH 6,0, 100 omdreining/minutt. Inocula for fermenteringene ble dyrket ved 30 °C over natten i urystede, 250 ml kolber som inneholdt 50 ml Luriamedium (4 % glykose). Etter
20 blanding ble celle-tetthetene målt ved 550 nm og anvendt til å beregne det volum som krevdes til frembringelse av en innledningsvis tetthet på 0,32 mg tørrvekt celler/ml (O.D. 550 nm på 1,0). Cellene ble høstet fra dette volum ved sentrifugering og de ble resuspendert i en porsjon av mediet fra hver respektive pH-statiske beholder for å starte fermenteringen.

25 Sukkeret ble sterilisert separat ved filtrering. Cellulosefermenteringene inneholdt 50 g/l SOLKA FLOC SW40 (James River Corporation, Saddle Brook, NJ, USA) og ble utført ved 35 °C. Cellulosen ble sterilisert i form av et tørt pulver ved autoklavring. For undersøkelser av cellulosefermentering ved anvendelse av kommersielle enzymer, ble CYTOLASE eller MULTIFECT tilsatt ved innokuleringstidspunktet.

30

Det ble tatt ut prøver for bestemmelse av cellemasse (O.D. 550 nm) og etanol (gass/væskekromatografi, Beall et al., supra). Etanolkonsentrasjonene ble uttrykt som g/l. Etanolutbyttene ble korrigert for fortynning ved tilsats av base under fermentering og

beregnet på basis av totalt tilstedeværende sukker eller cellulose i innledningsfasen. Det ble ikke korrigert for gjenværende karbohydrater. Maksimale teoretiske utbytter fra glykolyse og fermentering er 0,51 gram etanol/gram glykose, 0,536 gram etanol/gram cellobiose og 0,56 gram etanol/gram cellulose. Bortsett fra som vist er de presenterte resultater et gjennomsnitt av 2 eller flere fermenteringer.

Kommersiell cellulase: To kommersielle cellulaser ble undersøkt, CYTOLASE M104 og MULTIFECT CL (Genencor International, Rolling Meadows, IL, USA). Begge ble levert som væsker, forutsetningsvis medier fra mutant *Trichoderma lignibranchiatum* med opphavsmannens endringer. Begge er beskrevet som å inneholde en blanding av pectinaser, cellulaser og hemicellulaser. Disse enzympreparater optimaliseres for tiden for næringsmiddelfremstilling.

Kromosomal integrering av *Z. mobilis* pet-gener inn i M5A1: Tre tilnærmingsmåter ble anvendt for å integrere pet-gener inn i kromosomet til M5A1 (Orsdov (1984) p. 461-465, i N.R. Kreig og J.G. Holt (red.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams and Wilkins CO., Baltimore, USA). Siden *K. oxytoca* og *E. coli* er nært relatert, ble *E. coli* pfl-genet anvendt som en potensiell kilde for homologt DNA for å fremme rekombinasjon analogt med den metode som ble anvendt for *E. coli* (Ohta et al. Appl. Environ. Microbiol. 57: 893-900). Sall-fragmenter på 8,6 kbp ble rensset fra pLO510 som inneholdt pet-gener og cat innen pfl-genet til *E. coli*. Dette fragment (som manglet gener som er involvert i replikasjon) ble sirkularisert ved ligering og transformert inn i M5A1 for å tillate direkte utvelgelse for integrering. Et kortere 5 kbp PstI-fragment som inneholdt utelukkende en liten mengde frakterende *E. coli* pfl ble anvendt på en liknende måte. I den tredje tilnærmingsmåte ble homologt *K. oxytoca* M5A1 DNA (2 kbp tilfeldige Sau3A-fragmenter) ligert til et 4,6 kbp BamHI-fragment som utelukkende inneholdt tet-genene med cat (intet *E. coli*-DNA) og anvendt for transformasjon. Integrerte stammer ble utvunnet fra alle tre tilnærmingsmåter ved utvelgelse på Luriamediumplater som inneholdt 2 % glykose og 20 µg Cm/ml. Tre integrerte kloner ble utvunnet med Sall-fragmentet, to med PstI-fragmentet og ett med BamHI-fragmentet.

Etter dyrking over natten i væskeformet kultur ble 0,1 ml celler i stasjonær fase spredt utover på plater som inneholdt 600 µg Cm/ml og 2 % glykose til utvelgelse for ekspresjon på høyt

nivå. Enkle store kolonier ble tatt ut fra hvert uavhengig integreringstilfelle og navngitt ifølge det restriksjonspunkt som ble anvendt for konstruksjonen, d.v.s. S1, S2, S3, P1, P2 og B1.

Disse kloner ble testet med hensyn på tilstedeværelse av plasmider ved transformasjon av miniscrren DNA og med hensyn på ekspresjon av pet-gener på aldehydindekatorplater (tabell

- 5 16). Formodede integrerte stammer som ble funnet å inneholde plasmid-bårne cat-gener ble forkastet etter å ha oppsplittet miniscreen DNA til bekreftelse av tilstedeværelsen av pLOI510 (antakelig en liten forurensing av gel-rensede fragmenter). Moderorganismen og M4A1 (pLOI555), en utmerket etanolprodusent, ble inkludert som hhv. negative og positive kontroller. To kloner uttrykte etanolgenene i nivåene nært ekvivalent med det for M5A1
- 10 (pLOI555), stammene B1 og P2.

Tabell 16 Fermentering av 10 % glykose (48 timer) ved hjelp av M5A1-stammer som inneholder integrerte pet-gener.

STAMME (a):	BASE (mM/l):	CELLEMASSE (b) (g/l):	ETANOL (g/l):	ALDEHYD-PLATER (c):	PLASMID (d):
M5A1	108	3,2	15	-	-
M4A1 (pLOI555)	91	5,1	45	++++	+
S1	120	2,9	37	+	-
S2	171	3,2	44	++	-
S3	97	2,4	37	++	-
P1	120	2,0	38	++	-
P2	91	3,7	44	+++	-
B1	63	4,0	47	0000	-

- 5
- (a) De rapporterte verdier stammer fra et enkelt eksperiment, selv om mange ble reproduisert og gjennomsnittsberegnet i påfølgende undersøkelse.
- 10 (b) Cellemassen ble beregnet fra den maksimale O.D. ved 550 nm (omtrent 0,32 g tørrvekt/l pr. O.D.-enhet.
- (c) Sammenliknende hastighet for fargeutvikling på aldehydindikatorplater ved 30 °C ble anvendt som et relativt mål for eksprasjon fra tet-operonet.
- 15 (d) Småskalapreparater av DNA ble undersøkt på undervannsagarosegeler og testet med hensyn på deres evne til å transformere antibiotisk resistens til E. coli DH5Ö under transformasjon.

Sammenlikning av glykosefermentering ved hjelp av integrerte stammer og ved hjelp av

M5A1 (pLOI555): Etter 48 timer ble høye nivåer av etanol ekvivalent med M5A1

- 20 (pLOI555) produsert ved hjelp av 4 stammer som inneholdt pet-integreringer (tabell 16). De to som produserte de laveste nivåer av sure koprodukter vokste også til de største tettheter. Disse stammene, P2 og B1, ble utvalgt for videre undersøkelse.

Fermentering av glykose og cellobiose ved hjelp av stammene P2 og B1: Stammene P2 og

- 25 B1 ble undersøkt med hensyn på deres evne til å fermentere 10 % glykose og 10 % cellobiose (tabell 17). Under glykosefermentering (figur 11A), produserte begge de integrerte stammer

tre ganger mer etanol enn moderorganismen, M5A1, men de var noe underlegne sammenliknet med M5A1 (pLOI555) (plasmid-bårne pet-gener) med hensyn på utbyttet, og med hensyn på volumetrisk produktivitet. Uventet viste det seg at integrering og ekspresjon av pet-gener på høyt nivå i stammen B1 ble fulgt av et tap av evne til å fermentere cellobiose.

- 5 Imidlertid vokste stammen P2 godt og produserte etanol fra cellobiose (figur 11B) med 96 % av det maksimale utbytte. Stammen P2 ble deponert som ATCC 55307 den 11. mars 1992.

Figurene 11A og 11B illustrerer dermed etanolproduksjonen ved hjelp av

rekombinantstammer av K. oxytoca M5A1. Figur 11A illustrerer produksjonen av glykose

- 10 (100 g/l). Symboler: ! = stammen M5A1 (pLOI555), ^ = den P2-stamme som inneholder integrerte pet-gener, # = den B1-stamme som inneholder integrerte pet-gener, o = M5A1-kontroll. Figur 11B illustrerer produksjonen fra cellobiose (100 g/l)-fermentering ved hjelp av stammen P2. Symboler: ^ = etanol, _ = cellemasse.

Tabell 17 Etanolproduksjon ved hjelp av rekombinantstammer av K. oxytoca M5A1 og ved hjelp av E. coli KO11.

ORGANISME (a):	SUBSTRAT:	ADDITIVER (b):	VOLUMETRISK PRODUKTIVITET (g/Vh):	MAX. EtOH (g/l):	UTBYTTE:	% TEORETISK UTBYTTE (c):
M5A1	10 % glykose	Intet	0,72	16,2	0,17	33
M5A1 (pLO1555)	"	"	2,1	48,0	0,50	99
P2	"	"	1,6	46,4	0,46	90
B1	"	"	1,5	47,6	0,49	96
P2	10 % cellobiose	"	1,5	45,2	0,49	96
B1	"	"	0,1	1,2	0,01	2
P1 (pCT1057)	10 % glykose	"	0,13	16,0	0,17	33
P1 (pCT301)	"	"	0,58	19,4	0,20	40
P1 (pCT603T)	"	"	0,83	30,0	0,32	62
P2	Intet	"	0,04	1,0	-	-
P1	Intet	10 % CYTOLASE	0,12	4,7	-	-
P2	Intet	10 % MULTIFECT	0,06	4,2	-	-
P2	5 % SOLKA FLOC SW40	Intet enzym	0,05	2,0	0,04	8
P1 (pCT603T) (f)	"	1,0 % CYTOLASE	0,09	17,4	0,36	65
P1 (pCT603T) (f)	"	1,0 % MULTIFECT	0,16	17,4	0,36	65
P1	5 % SOLKA FLOC SW40	0,1 % CYTOLASE	0,08	2,3	0,07	12
P2	"	0,4 % CYTOLASE	0,13	7,0	0,14	26
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
P1	5 % SOLKA FLOC SW40	0,1 % MULTIFECT	0,08	3,3	0,07	12
P2	"	0,5 % MULTIFECT	0,18	5,9	0,13	23
P2	"	1,0 % MULTIFECT	0,36	10,4	0,23	41
P2	"	5,0 % MULTIFECT	0,76	23,8	0,51	92
P2	"	10 % MULTIFECT	0,86	32,5	0,69	123
KO11	5 % SOLKA FLOC SW40	0,1 % CYTOLASE	0,05	1,8	0,04	7
KO11	"	0,5 % CYTOLASE	0,08	5,1	0,11	19
KO11	"	1,0 % CYTOLASE	0,13	6,2	0,13	23

KO11	"	5,0 % CYTOLASE	0,51	14,7	0,31	56
KO11	"	10 % CYTOLASE	0,32	8,0	0,17	30
KO11	5 % SOLKA FLOC SW40	0,1 % MULTIFECT	0,06	2,2	0,05	8
KO11	"	0,5 % MULTIFECT	0,08	2,7	0,06	10
KO11	"	1,0 % MULTIFECT	0,18	5,6	0,12	21
KO11	"	5,0 % MULTIFECT	0,43	20,6	0,43	76
KO11	"	10 % MULTIFECT	0,84	30,7	0,63	112

(a) Glykose- og cellobiose-fermenteringene ble utført ved 30 °C. Andre fermenteringer ble utført ved 35 °C.

(b) Enzymene ble tilsatt ved inoculeringspunktet.

5 (c) Beregnet for tidsperioden mellom 6 og 24 timer.

(d) Korreksjon for fortyrning ved tilsatt av base under fermentering. S (substrat) henviser til glykose, cellobiose eller SOLKA FLOC SW40.

10 (e) Basert på et maksimalt teoretisk utbytte på 51 g etanol/100 g glykose, 53,5 g etanol/100 g cellobiose og 28 g etanol/50 g cellulose. Verdiene ble ikke korrigert for residuelt substrat.

(f) SOLKA FLOC SW40 ble forbehandlet ved 60 °C i 12 timer ved anvendelse av celler som var høstet fra en tidligere fermentering som kilde for *C. thermocellum* cellD. Etter avkjøling til 35 °C ble mediet inoculert og det ble tilsatt 1 ml kommersiell cellulase/100 ml fermenteringsvolum for å starte fermenteringen.

15 Sammenligning mellom krystallinsk cellulosefermentering (SOLKA FLOC SW40) ved hjelp av rekombinant *K. oxytoca* M5A1 og ved hjelp av *E. coli* i nærvær av forskjellige konsentrasjoner av kommersielle cellulaser: I kontrast til etanologen *E. coli* som utelukkende anvender glykose, kan rekombinant *K. oxytoca* P2 fermentere cellobiose og krever ikke eksogen β -glykosidase under cellulose-fermentering. For å eksaminere den grad i

20 hvilken cellobioseutnyttelse forbedrer etanolproduksjon fra cellulose ved anvendelse av kommersielle enzymer, ble det utført fermenteringer med 50 g SOLKA FLOC SW40 som substrat i nærvær av enten CYTOLASE eller MULTIFECT i konsentrasjoner på fra 0 til 10 % (figur 12 og tabell 17). Disse preparater inneholder en blanding av soppenzymer som inkluderer endoglykanaser, eksoglykanaser og β -glykosidaser.

25

Figur 12 illustrerer altså effekten av kommersielle cellulasetilsatser på etanolutbytte fra 50 g SOLKA FLOC SW40/l etter 120 timer. Den stiplede linje indikerer den maksimale mengde etanol som kan frembringes fra den tilsatte cellulose alene. De høyere etanolnivåer skyldes primært det ytterligere substrat som er tilsatt som opphavsmannens modifikasjoner i

30 MULTIFECT CL-preparatet. Symboler: $\blacktriangle$ = fermentert med *K. oxytoca* P2 og MULTIFECT, # = fermentert med stammen *E. coli* KO11 og MULTIFECT, _ = fermentert

med K. oxytoca P2 og CYTOLASE, # = fermentert med E. coli KO11 og CYTOLASE.

I lavere konsentrasjoner synes CYTOLASE mer effektivt selv om noen grad av giftighet fulgte med høyere konsentrasjoner av dette enzym-preparat. I alle tilfeller var ytelsen av den integrerte stamme av K. oxytoca overlegen sammenliknet med E. coli KO11 trass i nærværet av β -glykosidase i kommersielle preparater av cellulase. Sammen antyder disse resultater at β -glykosidase-aktiviteten i kommersielle cellulasepreparater ikke er tilfredsstillende i forhold til de øvrige cellulaseaktiviteter.

Med den høyeste konsentrasjon av MULTIFECT ble utbytter som overskrider det teoretiske maksimum fra 50 g cellulose/l observert. Kilden til dette ytterligere etanol ble undersøkt ved å gjennomføre fermenteringer i Luriamedium uten tilsatt karbohydrat eller enzymer og i Luriamedium som inneholdt 10 % CYTOLASE eller 10 % MULTIFECT men som manglet tilsatt karbohydrat. Omtrent 1 g etanol/l ble produsert fra Luriamedium alene og 5 g etanol/l fra Luriamedium som inneholdt 10 % tilsatt cellulase. Med fermenteringer som inneholdt 10 % MULTIFECT kunne altså omtrent 4 g etanol/l tilskrives fermenteringen av kommersielle aditiver eller enzymstabiliseringsmidler. Det er sannsynlig at proposjonelle mengder etanol også produseres fra lavere cellulasekonsentrasjoner. Korrigert for etanol som kun har vært produsert fra Luriamedium-bestanddel og 10 % MULTIFECT, er etanolutbyttene fra cellulose omtrent 94 % av det teoretiske maksimum.

Ekspresjon av C. thermocellum-cellulaser i stammen P2: Cellobiose kan fermenteres ved hjelp av stammen P2 og er det dominerende produkt fra celluloseoppsplitting ved hjelp av endoglykanaser og eksoglykanaser. Selv om ingen av disse enzymer fremstilles ved hjelp av vår organisme, letter integrering av pet-genet inn i kromosomet inklusjonen av plasmider som koder for hetrologe gener til frembringelse av disse enzymer som koprodukter under fermentering. Ekspresjonen av fire endoglykanaser fra den termofile Clostridium thermocellum ble undersøkt etter tilsatsen av tetracyklin-resistens for utvelgelse (tabell 18). CelD-genet har vært uttrykt på meget høye nivåer i E. coli og ble uttrykt på høye nivåer i stammen P2. Mesteparten av den endoglykonase-aktivitet som ble produsert fra disse gener ble holdt tilbake inne i cellene selv om Klebsiella-stammer er kjent for å ha proteinutskillelssystemer og muligheten til delvis utskillelse ble ikke eliminert.

En kvalitativ sammenlikning av effektiviteten i flytendegjøring av CMC ble utført i dyrkningsrør under 48 timers inkubering ved 55 °C. I overensstemmelse med aktivitetmålere, var rekombinante celler som rommet celD (pCT603T) de mest effektive fulgt av celC (pCT301). Stammen P2 som rommet celB (pCT207T) vokste meget svakt og ble ikke testet ytterligere. CelA (pCT105T)-rekombinanter forårsaket liten grad av flytendegjøring.

Effektene av produserende hetrologe genprodukter på evnen til å fermentere ble også undersøkt. Tilsatsen av plasmider som uttrykker en av cel-genene minsket den endelige celletetthet i 10 % glykosefermenteringer med 10 til 30 % og minsket etanolutbyttet (tabell 18). Ekspresjon av celD-genet var det minst skadelige med et etanolutbytte på 0,32 g etanol pr. g glykose, 62 % av det teoretiske maksimum. Målinger ble utført ved 60 °C ved anvendelse av p-nitrofenyl-β-D-cellobiosid som substrat. Enhetene er i mol hydrolysert pr. minutt pr. ml fermenteringsmedium som inneholder celler eller medium etter at cellene var fjernet ved sentrifugering.

Tabell 18 Ekspresjon av *C. thermocellum*-endoglykanasegener i stammen P2.

GEN:	PLASMID:	AKTIVITET (U/ml):		
		CELLER + MEDIUM:	MEDIUM:	% CELLEASSOSIERT:
Kontroll	Ingen	0,2	-	-
celA	pCT105T	2,3	0,4	83
celB	pCT207T	17	0,8	95
celC	pCT301	41	6,2	85
celD	pCT603T	49	13	73

Hydrolyse og fermentering av amorf cellulose ved hjelp av stammen P2 som uttrykker celD:

Selv om celD-genproduktet ikke vil hydrolysere krystallinsk cellulose, er dette enzym tidligere vist å hydrolysere amorf cellulose (Beguin et al., Joliff et al., *supra*). Stammen P2 (pCT603T) som uttrykker dette gen ble testet med hensyn på dens evne å konvertere amorf cellulose til etanol. Fosforsyresvullen og basesvullen (natrium hydroksid) SOLKA FLOC SW40 ble testet i en to-trinns satsvis prosess med anvendelse av cellene fra P2 (pCT603T) fra

en tidligere glykosefermentering som kilde for endoglykanase D og den samme organisme til frembringelse av etanol.

Det første trinn besto av å incubere 3 ml Luriamedium som inneholdt 76 mg/ml syresvullen cellulose eller 32 mg/ml basesvullen cellulose med 60 °C (pH 6,0) i 72 timer med anvendelse av celler som er høstet fra et ekvivalent volum fra en tidligere glykosefermentering.

Oppvarming til 60 °C innaktiverte cellene til frigjøring av endoglykanase D og frembrakte en nært optimal temperatur for aktiviteten. Frigjøringen av reduserende sukkere ble målt under hydrolysen. Selv substratkonsentrasjonene var forskjellige, ble syresvullen hydrolysert med en hastighet to ganger hastigheten for basesvullen cellulose til frembringelse av hhv. 240 imolar og 60 imolar cellobiose-ekvivalententer etter 24 timer. Den syresvullen cellulose ble ganske viskøs hvilket gjorde det vanskelig å ta prøver. Etter 72 timer forelå det 110 imolar cellobiose-ekvivalenter i oppsplittingsproduktet fra den basesvullen cellulose. Disse utbytter reflekterer den nært fullstendige hydrolyse av både syresvullen og basesvullen cellulose.

Figurene 13A, B og C omfatter den tynnskiktkromatografiske analyse av cellulose-hydrolyse og fermentering ved hjelp av P2 (pCT603T). Syresvullen cellulose (figur 13A), basesvullen cellulose (figur 13B) og krystallinsk cellulose (figur 13C, SOLKA FLOC SW40) ble testet. Cellobiose og glykose ble anvendt som normer i hvert kromatograms bane 1. I figurene 13A og 13B representerte banene 2 til 6 prøver som ble fjernet på forskjellig tidsrom under hydrolyse av amorf cellulose (hhv. 0, 6, 12, 24, 48 og 72 timer). Bane 7 representerer medium som ble analysert i bane 6 etter fermentering i 24 timer ved 30 °C med stammen P2 (pCT603T).

Figur 13C omfatter den tynnskiktkromatografisk analyse av krystallinsk cellulose (SOLKA FLOC SW40)-fermentering med 1 % MULTIFECT og P2 (pCT603T) som uttrykker C. thermocellum celD. Banesammensetningene er som følger: 2 = SOLKA FLOC-suspensjon straks forut for oppsplitting, 3 = medium etter 24 timers oppsplitting ved 60 °C med endoglykanase D levert av P2 (pCT603T) fra en tidligere fermentering, 4 = medium vist i bane 3 etter fermentering i 24 timer ved 35 °C ved hjelp av P2 (pCT603T), 5 = etter ytterligere 24 timers fermentering ved hjelp av P2 (pCT603T) ved 35 °C (total fermentering, 48 timer).

Dermed viser banene 2 til 6 i figurene 13A og 13B cellulose-oppsplittingsproduktene på forskjellige tidspunkter fra hhv. syresvullen og basesvullen cellulose. Cellobiose er det dominerende produkt i begge med en liten mengde glykose. Lave cellotriosenivåer forelå også i oppsplittingsproduktene fra syresvullen cellulose. Etter avkjøling til 35 °C ble disse medier inoculert med 50 il P2 (pCT603T) og tillatt å fermentere uten agetering eller pH-kontroll i 24 timer. Glykose, cellobiose og cellotriose ble i løpet av denne periode fjernet fullstendig (figur 13 A og B, bane 7) med produksjon av omtrent 5 g etanol/l. For basesvullen cellulose ble det produsert 0,16 g etanol/g cellulose. Selv om fallet i pH sannsynligvis tjente til å begrense graden av etanolproduksjon, er dette etanolutbytte ekvivalent med 27 % av det teoretiske maksimum.

Delvis erstatning av kommersielt cellulase ved hjelp av endogen produksjon av C.

thermocellum-endoglykanase: Selv om P2 (pCT603T) ikke krever eksternt tilført β -glykosidase og kan frembringe endoglykanase D som vil hydrolysere amorf cellulose, kreves det ytterligere aktiviteter til hydrolysering av krystallinsk cellulose. Denne stammes evne til å delvis erstatte kravet til kommersielle cellulase ble testet i en to-trinns fermenteringsprosess. Celler som ble høstet fra en tidligere glykose-fermentering ble resuspendert i et ekvivalent volum Luriamedium som innholdt 50 g SOLKA FLOC SW40/l og incubert ved 60 °C i 24 timer. Etter avkjøling til 35 °C ble disse fermenteringer inoculert med den samme organisme sammen med 1 % kommersiell cellulase. Liknende resultater ble oppnådd både for CYTOLASE og MULTIFECT med produksjon av 17,4 g etanol/l, 65 % av det maksimale teoretiske utbytte (tabell 17).

Som illustrert i figur 14 for CYTOLASE, forbedret forbehandlingen celD-gen produktet i stor grad etanolproduksjonen ved anvendelse av 1 % cellulase, idet det ble frembrakt et etanolutbytte som var ekvivalent med det for 5 % CYTOLASE. I figur 14 ble cellulose (50 g SOLKA FLOC SW40/l) ufullstendig forsukret med CYTOLASE og endoglykanase D og fermentert ved hjelp av stammene P2 og P2 (pCT603T). Symboler: _ = 5 ml CYTOLASE tilsatt pr. 100 ml medium ved tidspunktet for inoculering og fermentert med P2, # = 1 ml CYTOLASE tilsatt pr. 100 ml medium ved tidspunktet for inoculering og fermentert med P2, O = 0,1 ml CYTOLASE tilsatt pr. 100 ml medium ved tidspunktet for inoculering og fermentert med P2, # = SOLKA FLOC forbehandlet ved 60 °C i 12 timer ved anvendelse av P2 (pCT603T)-celler som er høstet fra en tidligere fermentering som kilde for C.

thermocellum-endoglykanase D og fermentert. Etter avkjøling til 35 °C ble 1 ml kommersiell cellulase/100 ml fermenteringsmedium og P2 (pCT603T) tilsatt for å starte fermenteringen.

Figur 13C viser et tynnskiktkromatograf av prøver fra forskjellige trinn av en parallell to-
5 trinns fermentering med MULTIFECT. Igjen ble glykose, cellobiose og cellotriose fullstendig metabolisert. Dermed ble den mengde kommersiell cellulase som behøves til forsukring redusert med opp til 80 % etter forbehandling med rekombinant endoglykanase D som var produsert som et koprodukt med etanol i en tidligere fermentering.

10 Diskusjon: Det er kjent at hydrolyse av cellobiose til monomert sukker ved hjelp av β -glykosidase ofte begrenser celluloseoppsplitting ved hjelp av soppmedier (fungal broths). Aktiviteten av β -glykosidase er typisk den minst rykelige og minst stabile av den enzymgruppe som kreves for effektiv cellulosehydrolyse. Akkumuleringen av cellobiose som et produkt av cellulasevirkning fungerer som en konkurrerende inhibitor for videre
15 depolymerisering (Eriksson et al. (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, New York, USA; Jeffries, supra). K. oxytoca P2 er den første organisme som er rapportert å raskt og effektivt omdanne cellobiose til høye etanolnivåer.

20 Denne organisme synes å ha evnen til aktivt å transportere cellobiose og cellotriose, hvilket minimaliserer cellobioseakkumulering og eliminerer kravet til ytterligere depolymerisering ved hjelp av eksterne enzymer. Selv om transportsystemer for cellobiose ikke har vært undersøkt i K. oxytoca (Al (1989) J. Biotechnol. 12: 79-86), inneholder den nært beslektede organisme E. coli gener som koder for fosfotransferase-komponenter og fosfoglykosidase for
25 cellobiose metabolisering som er kryptiske i de fleste laboriestammer men fungerer i naturen (Hall et al. J. Bacteriol. 169: 2713-2717; Krickler et al. (1987) Geneticx 115: 419-429). Det er sannsynlig at liknende gener fungerer i K. oxytoca (Al, supra).

Integreringen av pet-gener for etanolproduksjon inn i kromosomet lettet produksjonen av
30 plasmid-bårne rekombinant-proteiner som koprodukter sammen med etanol. Selv om cellulase-gener fra C. thermocellum ble anvendt som et eksempel, kan også andre mer verdifulle rekombinantprodukter slik som lipase, proteinase, glykohydrolaser, dyrehormoner og biomedisinske produkter fremstilles. Produksjonen av C. thermocellum-cellulaser ved

hjelp av stammen P2 som et koprodukt ble fulgt av en uventet minskning i fermenteringseffektiviteten. Grunnlaget for denne minskede effektivitet er ukjent selv om oppfinnerne har gjort liknende observasjoner med etanologene E. coli som inneholder pullulanase-gener fra Thermoanaerobium brockii og med multi-plasmide etanologene konstruksjoner av K. oxytoca som uttrykker C. thermocellum-xylanasegenet.

Det foregående eksempel med K. oxytoca danner således grunnlaget for en forbedret prosess for omdanning av cellulose til etanol. Det er kjent at cellobiose og cellotriose er inhibitorer for endoglykanase og eksoglykanase, og at β -glykosidase er ansvarlig for omdanning av disse oligomerer til glykosemonomerer. Etanologene rekombinanter slik som stammen P2 krever imidlertid depolymerisering av sukkeret for metabolisering, hvilket eliminerer behovet for β -glykosidase og reduserer endeprodukt-inhiberingen av cellulaser ved hjelp av cellobiose og cellotriose. En ytterligere fordel er reduksjonen i potensielle kontaminanter siden ferre organismer er i stand til å metabolisere cellobiose eller cellotriose sammenliknet med monomerglykose. Basert på sammenlikninger med E. coli KO11, som mangler cellobiose-utnyttelse, minsker den transport og metabolisering av cellobiose som fremvises av K. oxytoca P2 behovet for kommersielle enzymer under cellulose-fermentering.

Behovet for kommersielle cellulaser ble ytterligere redusert ved anvendelse av supplementær endoglykanase som er produsert som et koprodukt under fermentering. I dette henseende synes termostabile enzymer spesielt egnede siden de lett kan høstes inne i celler etter fermentering og frigjøres i aktiv form ganske enkelt ved oppvarming til den temperatur ved hvilken de fungerer best. Forbehandling av SOLKA FLOC SW40 med endoglykanase D fra en tidligere fermentering økte dramatisk effektiviteten av Genencor-cellulaser. Siden endoglykanase D er aktivt utelukkende på cellulosens amorfe regioner (Beguin et al., supra), kan den nyttige effekt av denne forbehandling skyldes dannelsen av nye punkter for angrep fra kommersielle cellulaser. I C. thermocellum er endoglykanase D en del av et cellulase-kompleks (Beguin et al., supra). Det er mulig at dette enzym også kan danne kompleks med soppzymer eller bindende cellulose og lette en åpning av cellulosens struktur for hydrolyse.

30

Den beste konstruksjon for cellulosefermentering til etanol, P2 (pCT603T), er ikke så effektiv som naturlig C. thermocellum (Tailliez et al. (1989) Appl. Environ. Microbiol. 55: 203-211). I motsetning til C. thermocellum mangler K. oxytoca P2 (pCT603T) et fullstendig

cellulasesystem. I kombinasjon med 1 % kommersiell CYTOLASE eller MULTIFECT, produserte P2 (pCT603) imidlertid høyere utbytte og sluttkonsentrasjoner av etanol ved 35 °C enn de etanol-tolerante C. thermocellum-mutanter ved 65 °C. Ytterligere genetiske forbedringer eller prosessforbedringer kan være ønskelige.

5

EKSEMPEL 19 ETANOLPRODUKSJON FRA STIVELSE VED HJELP AV REKOMBINANT ESCHERICHIA COLI SOM INNEHOLDER KROMOSOMT INTEGRERTE Z. MOBILIS-GENER FOR ETANOLPRODUKSJON OG PLASMIDER SOM UTTRYKKER TERMOSTABILE GENER FOR FORSUKRING

- 10 Oppsummering av eksempelet: Det er utviklet etanologene stammer av E. coli som kan uttrykke termostabile enzymer for stivelsesforsukring som intracellulære produkter. Disse enzymer kan høstes inne i celler ved avslutning av fermenteringen og frigjøres ved oppvarming til den temperatur ved hvilken de fremviser maksimal aktivitet (60 til 70 °C). Organismer slik som disse kunne anvendes for å levere enzymer til gjærbaserte
- 15 fermenteringer mens de samtidig produserte en liten mengde etanol som et koprodukt.

- I dette eksempel dras det fordel av fraværet av et proteinutskillelses system i E. coli ved å utvikle etanologene stammer som uttrykker gener som koder for termostabil Ó-amylase og pullulanase som intracellulære produkter. Termostabile enzymer høstes inne i cellene ved
- 20 avslutning av fermenteringen og frigjøres for stivelsesforsukring ganske enkelt ved oppvarming til den temperatur ved hvilken disse enzymer fremviser nær optimal aktivitet.

- Organismer og dyrkningsbetingelser: Alle etanolfermenteringer ble utført i Luriamedium med tilsatt karbohydrat ved anvendelse av E. coli-stammen KO11 (Ohta et al., 1991).
- 25 Plasmider ble tilsatt til denne stamme som vist.

- Plasmid-konstruksjoner: Det ble konstruert to plasmider, pLOI140 og pLOI141 (figurene 15A og B), som inneholdt a-amylase-genet fra Bacillus stearothermophilus (Mielenz et al. (1985) U.S.-patent nr. 4.493.893) og pullulanase-genet fra Thermoanaerobium brockii
- 30 (Coleman et al. (1986) U.S.-patent nr. 4.612.287; Coleman et a. (1987) J. Bacteriol. 169: 4302-4307) ved anvendelse av vanlige metoder. Et 5,4 kilobasepars (kbp) HindIII-fragment fra pWL625Amy (ATCC 31,791) som inneholdt amylase-genet ble innsatt inn i et HindIII-punkt på pCPC902 (Coleman et al. (1986), supra) etter delvis oppsplitting. Sammenlikning

av konstruksjoner på Luriaagar som inneholdt stivelse og pullulan-rødt indikerte at innsetninger i utelukkende ett punkt tillot tilbakeholdelse av ekspresjonen på høyt nivå for begge gener, pLOI568. Et 2,5 kbp EcoRI-fragment fra pCOS2EMBL (Poustka et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4129-4133) som inneholdt et tetracyklin-gen ble tilsatt til pLOI568 etter delvis oppsplitting med EcoRI til frembringelse av pLOI140 og pLOI141. De endelige plasmider inneholdt et pBR322-replikon og var ganske stabile i stammen KO11, idet de ble holdt tilbake av 96 % av cellene etter 48 generasjoner uten antibiotisk utvelgelse.

Figurene 15A og B benytter de følgende forkortelser: amy = genkodende Bacillus

10 stearothermophilus α -amylase, pul = genkodende Thermoanaerobium brockii-pullulanase, tet = tetracyklin-resistens-gen, amp = ampicillin-resistens-gen, ori = colE1-replikon.

Fermentering og analyse: Fermenteringene ble utført i 500-ml Fleakers som tjente som pH-statistiske beholdere (350 ml arbeidsvolum) i det vesentlige som beskrevet tidligere (Beall et al., 15 supra). Media besto av Luriamedium som inneholdt 10 % glykose, 5 % glykose, 10 % maltose, 5 % maltose eller 4,5 % stivelse (30 °C, pH 6,0, 100 omdreininger/minutt). Fermenteringene ble inoculert til en innledningsvis celletetthet på 0,3 mg tørrvekt/ml. Sukkerne ble sterilisert separat ved filtrering. Stivelsen ble ikke sterilisert.

20 Cellemassen ble målt som O.D. 550 nm (omtrent 0,32 g tørr cellevekt/l ved 1 O.D.). Total forsukringsaktivitet ble målt ved 60 °C som frigjøringen av reduserende sukkere (Bergmeyer et al., supra). Etanol ble bestemt ved hjelp av gass/væskeskromatografi (Dombek et al., supra). Etanolkonsentrasjonene ble uttrykt som g/l. Etanolutbyttene ble korrigert for fortynning ved tilsats av base under fermenteringene og ble beregnet på basis av totalt sukker eller stivelse 25 uten korreksjon for uforbrukt karbohydrat. Maksimalt teoretisk utbytte fra fermentering er omtrent 0,51 g etanol/g glykose, 0,53 g etanol/g maltose og 0,56 g etanol/g stivelse. Resultatene ble basert på et gjennomsnitt av 2 eller flere fermenteringer.

Fermentering av stivelse: For stivelsesfermenteringene ble KO11 (pLOI140)- eller KO11 30 (pLOI141)-celler høstet fra en tidligere 10 % glykosefermentering etter 72 timer og lagret i frossen tilstand. Disse celler ble resuspendert i 25 ml Luriamedium som var justert til pH 6,0. Stivelse (15,75 g) ble suspendert i 325 ml Luriamedium som er justert til pH 6,0. Halvdelen av celsuspensjonen ble tilsatt til stivelsessuspensjonen, incubert i et kokende vannbad med

omrøring inntil det nådde 70 °C, og oppholdt ved 70 °C i 5 minutter. Denne blanding ble avkjølt til 60 °C. Gjenværende celler ble tilsatt og incubasjonen fortsatte i 24 timer ved 60 °C. Oppvarmingen inaktiverte rekombinant E. coli og frigjorde termostabile enzymer for stivelseshydrolyse. Den forsukrede stivelse ble avkjølt til 30 °C og justert til et volum på 350
5 ml med sterilt destilert vann.

Et inoculum ble dyrket over natten i 5 % glykose, høstet ved sentrifugering og anvendt for å starte fermenteringen (0,03 g tørrvekt av levende celler/l). Det ble tatt prøver for etanolbestemmelse og for analyse ved tynnskiktkromatografi.

10 Glykose, maltose, maltotriose og maltotetrose ble separert ved anvendelse av uaktivert Whatman silica gel 150a-plater (Whatman Inc., Clifton, New Jersey). Prøver på 1 µl som inneholdt 5 til 50 µg sukker ble påført og separert ved romtemperatur ved hjelp av en enkelt utvikling i aceton, etylacetat og edikksyre (hhv. 2:1:1) hvor til det var tilsatt 2 % vann straks
15 før anvendelse. De tørkede planter ble farget som beskrevet av Bounias (1980) Anal. Biochem. 106: 291-295. Stivelse og sukkere ble levert av Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, USA.

Fermentering av glykose og maltose ved hjelp av rekombinantstammer av E. coli:

20 Fermenteringen av glykose og maltose ved hjelp av KO11 ble undersøkt. Resultatene er illustrert grafisk i figurene 16A og B, som reflekterer hhv. etanolproduksjon og cellemasse. De symboler som ble anvendt i figurene er som følger: ! = stammen KO11 med 10 % glykose, _ = stammen KO11 (pLOI140) med 10 % glykose, # = stammen KO11 (pLOI141) med 10 % glykose, O = Stammen KO11 med 5 % maltose (resultatene med 5 % og 10 %
25 maltose var identiske).

Selv om utnyttelsen av maltose ved hjelp av E. coli er grundig studert i aerobiske kulturer, var vekst og etanolproduksjon fra maltose meget langsommere enn glykose og nådde mindre enn 25 % av det maksimale teoretiske utbytte. (53,5 g etanol/l) fra 10 % maltose og 50 % av det
30 maksimale teoretiske utbytte (26,8 g etanol/l) fra 5 % maltose. Siden liknende resultater ble observert med begge konsentrasjoner av maltose, er det usannsynlig at langsommere vekst og fermentering kommer av direkte maltosegiftighet. Den lavere fermentering av maltose sammenliknet med glykose kan komme av andre begrensninger slik som sukkertransport,

glykosefosforylering etc..

Som vist i figurene 16A og B, minsket tilsatsen av plasmidene pLOI140 og pLOI141 som koder for α -amylase og pullulanase til stammen *E. coli* KO11 hastighetene for vekst og etanolproduksjon fra glykose. Endelige celleutbytter og etanolutbytter etter 72 timer ble redusert med omtrent 1/3 del.

Ekspresjon av enzymer for forsukring: Samlede forsukringsaktiviteter frembrakt av KO11 (pLOI140) og KO11 (pLOI141) ble målt ved fermenteringens avslutning (72 timer) som frigjøringen av reducerende sukker ved anvendelse av en suspensjon av potetstivelse i Luriamedium (pH 6,0) som substrat (70 °C). Liknende aktivitet ble observert med begge stammer, 30 imole reducerende sukker/ml kultur pr. minutt. Over 90 % av denne aktivitet var intracellulær men den ble lett frigjort ved oppvarming til 70 °C.

Fermentering av stivelse: KO11 (pLOI140) og KO11 (pLOI141) ble testet i en to-trinnsprosess hvori enzymene for forsukring og etanolproduksjon involverte en enkelt organisme. Cellene ble innhøstet fra en tidligere fermentering med 10 % glykose, resuspendert og anvendt som enzymkilde til hydrolysering av et tilsvarende volum kald, 4,5 % stivelsessuspensjon (Luriamedium, pH 6,0). Halvparten av de høstede celler ble tilsatt og blandingen ble raskt oppvarmet til 70 °C i et vannbad i omtrent 5 minutter. Denne blanding ble endret til 60 °C og resten av cellene ble tilsatt for å lette hydrolysen. Mais, potet, ris og hvetestivelse ble tilsatt og samtlige oppførte seg på liknende måte. Stivelsessuspensjonen forble væskeformet under oppvarming og hydrolyse i kontrast til kontroller med KO11 som manglet stivelsesgener og som ble helt faste i løpet av 3 minutters oppvarming.

Etter 24 timers incubasjon ved 60 °C ble det Luriamedium som inneholdt hydrolysert stivelse avkjølt til 30 °C og inoculert for å starte fermenteringen (pH 6,0, 100 omdreining/minutt, inoculum på 0,03 g tørr cellevekt/l) som tidligere beskrevet (Beall et al., 1991, *supra*). Fra alle stivelsestyper ble det med en liknende hastighet fremstilt etanol, 0,26 til 0,28 g etanol/l i løpet av de første 24 timer. Endelige etanolutbytter var 0,35 til 0,37 g etanol/g stivelse, sammenliknet med et teoretisk maksimum på 0,56 g etanol/g stivelse. Resultatene av stivelsesfermenteringen er vist i figur 17.

Siden data for KO11 (pLOI140) og KO11 (pLOI141) i det vesentlige var identiske, er utelukkende data for KO11 (pLOI141) vist i figur 17. De i figur 17 anvendte symboler er som følger: _ = maisstivelse (S-4126), # = potetstivelse (S-2004), O = risstivelse (S-7260), A = hvetestivelse (S-5127), # = maisstivelse med 2 mM CaCl₂, ! = KO11 med 5 % glykose som kontroll.

Det ble tatt ut prøver på forskjellige stadier av denne to-trinnsprosess med maisstivelse og de ble analysert ved tynnskiktkromatografi (figur 18). Etter 24 timer var glykose, maltose, maltotriose, maltotetrose og lengre oligosakkarider synlige som hydrolyseprodukter. Glykose, maltose og maltotriose ble utnyttet ved hjelp av KO11 (pLOI141) under fermenteringen (72 timer).

Figur 18 viser den tynnskiktkromatografiske analyse av maisstivelsesfermentering. Maltose og glykose tjener som normer. Glykose til maltotetrose er hhv. merket G1 til G4. Banene var som følger: 1: glykose og maltose som normer, 2: medium etter 24 timers forsukring ved 60 °C, 3: medium vist i bane 2 etter fermentering i 72 timer.

Stivelsesdegraderende enzymer stabiliseres ofte ved tilstedeværelsen av kalsium ioner.

Fermenteringsforsøk som ble utført med maisstivelse i Luriamedium som inneholdt 2 mM kalsiumklorid resulterte i noe raskere fermentering og et høyere utbytte, hhv. 0,29 g etanol/l pr. time og 0,40 g etanol/g stivelse. Sammenliknet med vanlige stivelses-fermenteringer med gjær og enzymer, var fermenteringen med rekombinant *E. coli* langsommere og frembrakte en lavere endelig etanolkonsentrasjon. Det samlede etanolutbytte fra stivelse ved anvendelse av denne to-trinns prosess med en enkelt organisme var 85 % av det for aktuelle kommersielle prosesser som anvender gjær og supplementære enzymer (omtrent 0,47 g etanol/g stivelse).

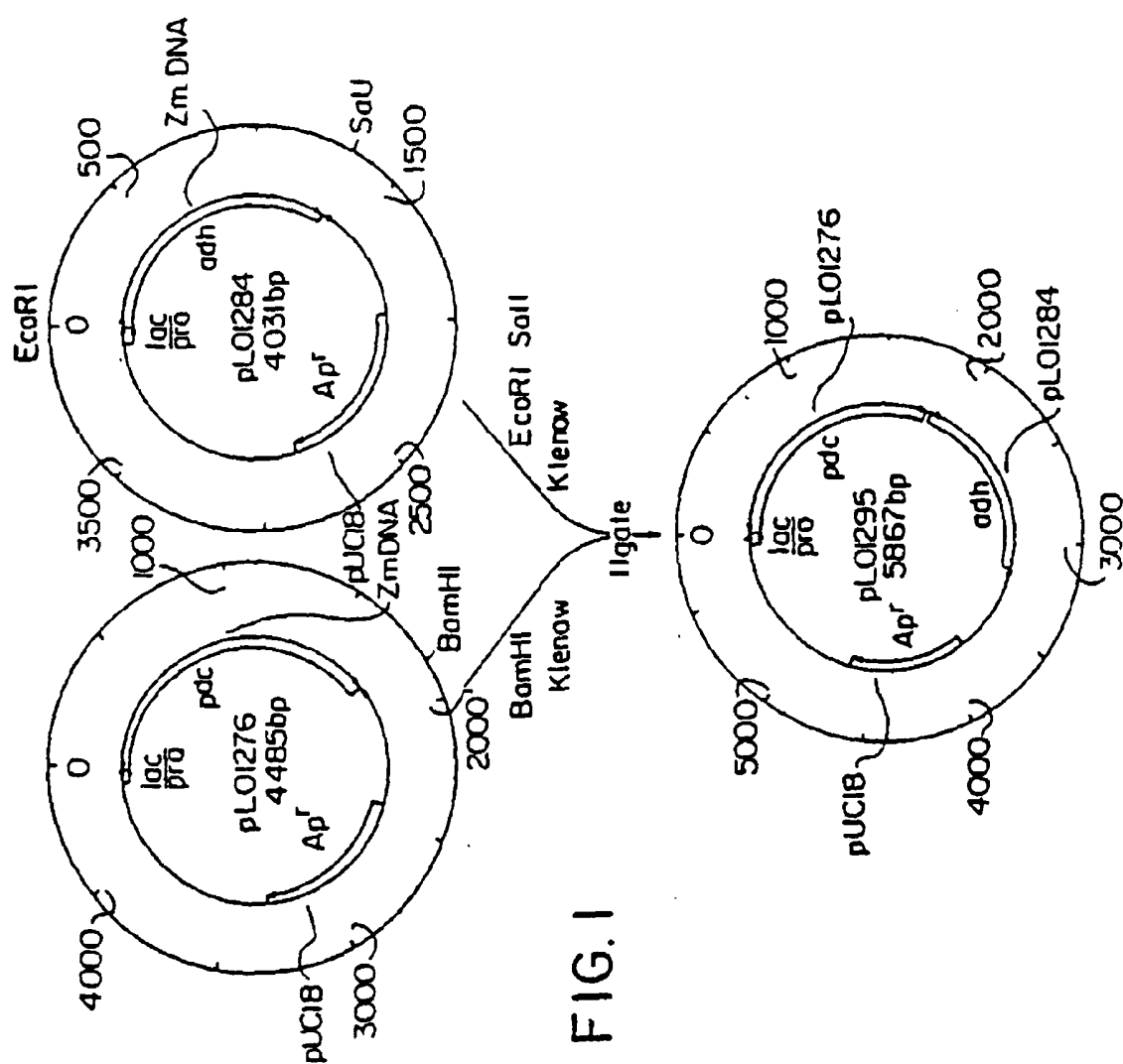
Konklusjon: Selv om ytterligere forbedringer kan ønskes, viser dette eksempel at etanologene fermenteringer med rekombinant *E. coli* kan anvendes til å frembringe en del av de enzymer som behøves til stivelsesforsukring. Enzymproduksjonen ville være ganske enkel uten behov for lufting. De termostabile bakterieenzymer fungerer optimalt ved samme pH (omtrent 6,0) som *E. coli*-basert fermentering. Med disse organismer, kunne gjenværende stivelse i lite verdifulle materialer slik som maisbelger anvendes som substrat og maislut som kilde til kompleks næring. En prosess slik som denne kan redusere kostnaden for enzymer til

PATENTKRAV

1. Rekombinant vert, *karakterisert ved* at den omfatter hetrologt DNA som koder for:
 - (a) alkohol-dehydrogenase; og
 - (b) pyruvat-dehydrogenase; og
 - (c) en polysakkarase eller en kombinasjon av ulike polysakkaraser;hvor i verten uttrykker det hetrologe DNA ved et nivå som er tilstrekkelig for å lette produksjonen av etanol som et primært fermenteringsprodukt ved hjelp av verten.
2. Rekombinant vert ifølge krav 1, *karakterisert ved* at den ytterligere omfatter hetrologt DNA som koder for proteiner som er involvert i transporten av mono- og/eller oligosakkarider inn i verten.
3. Rekombinant vert ifølge krav 1 eller krav 2, *karakterisert ved* at den ytterligere omfatter hetrologt DNA som koder for proteiner som gjør verten i stand til å transportere og metabolisere et oligosakkarid.
4. Vert ifølge et av de foregående krav, *karakterisert ved* at verten utvelges fra bakterier, fungi og eukaryotiske celler.
5. Vert ifølge krav 4, *karakterisert ved* at den er en bakterie som utvelges fra en av:
 - (a) gram-negative bakterier;
 - (b) enteriske bakterier;
 - (c) *Erwinia* spp.;
 - (d) *Klebsiella* spp.;
 - (e) *Xanthomonas* spp..
6. Vert ifølge et av de foregående krav, *karakterisert ved* at polysakkarasen(e) utvelges fra:
 - (a) cellelytiske enzymer (eksempelvis endoglucanase, cellobiohydrolase eller β -glukosidase);
 - (b) hemicellelytiske enzymer;
 - (c) xylanlytiske enzymer (eksempelvis endo-1,4- β -xylanase, β -xylosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase, acetylerase eller acetylxylanesterase);
 - (d) stivelsesdegraderende enzymer (eksempelvis α -amylase (eksempelvis fra *Bacillus stearothermophilus*), β -amylase, glukamylase eller pullulanase (eksempelvis fra *Thermoanaerobium brockii*));
 - (e) β -glukanase, arabinosidase, mannanase, pektin-hydrolase eller pektate lyase;

- (f) ekspresjonsproduktet av et gen som utvelges fra celD (eksempelvis fra Clostridium thermocellum), xynZ (eksempelvis fra Clostridium thermocellum), xylB (eksempelvis fra Butyrivibrio fibrosolvens) og et cellulasegen fra Cellulomonas fimi.
7. Vert ifølge et av de foregående krav, *karakterisert ved* at polysakkarasen(e) er:
(a) termostabil(e), og/eller
(b) i det minste delvis utskilt fra verten eller i det vesentlige akkumulert i verten.
8. Vert ifølge et av de foregående krav, *karakterisert ved* at det hetrologe DNA som koder for alkohol dehydrogenasen og pyruvat dehydrogenasen omfatter gener fra Zymomonas mobilis som koder for alkohol dehydrogenase og pyruvat dehydrogenase.
9. Fremgangsmåte for å produsere etanol, *karakterisert ved* at det fermenteres med en kultur av celler som omfatter en vert ifølge et av de foregående krav slik at verten produserer etanol som det primære fermenteringsprodukt.
10. Plasmid, *karakterisert ved* at det omfatter gener som koder for:
(a) alkohol dehydrogenase; og
(b) pyruvat dehydrogenase; og
(c) en polysakkarase eller en kombinasjon av ulike polysakkaraser;
hvor plasmidet er i stand til å lede en vert til å produsere alkohol dehydrogenase, pyruvat dehydrogenase og polysakkarasen(e) i et nivå som er tilstrekkelig til å lette produksjonen av etanol som det primære fermenteringsprodukt ved hjelp av verten.
11. Fremgangsmåte for å behandle et oligosakkarid-råstoff, *karakterisert ved* at fremgangsmåten omfatter følgende trinn:
(a) frembringelse av et råstoff som inneholder et start-oligosakkarid;
(b) bringe råmaterialet i kontakt med et enzym (eksempelvis en polysakkarase som definert i et av kravene 1-8) som bibringes ved hjelp av celler av en rekombinant vert ifølge et av kravene 1-8, slik at enzymet virker på start-oligosakkaridet.
12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, *karakterisert ved* at start-oligosakkaridet fermenteres til etanol.
13. Fremgangsmåte ifølge krav 11 eller 12, *karakterisert ved* at start-oligosakkaridet:
(a) omfatter et disakkarid eller trisakkarid;
(b) er et uløselig oligosakkarid som utvelges fra cellulose, hemicellulose og stivelse.
14. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 11-13, *karakterisert ved* at trinn
(b) omfatter oppvarming av cellene for å indusere lysering og frigjøring av enzymet (eksempelvis polysakkarase).

1 / 19



2 / 19

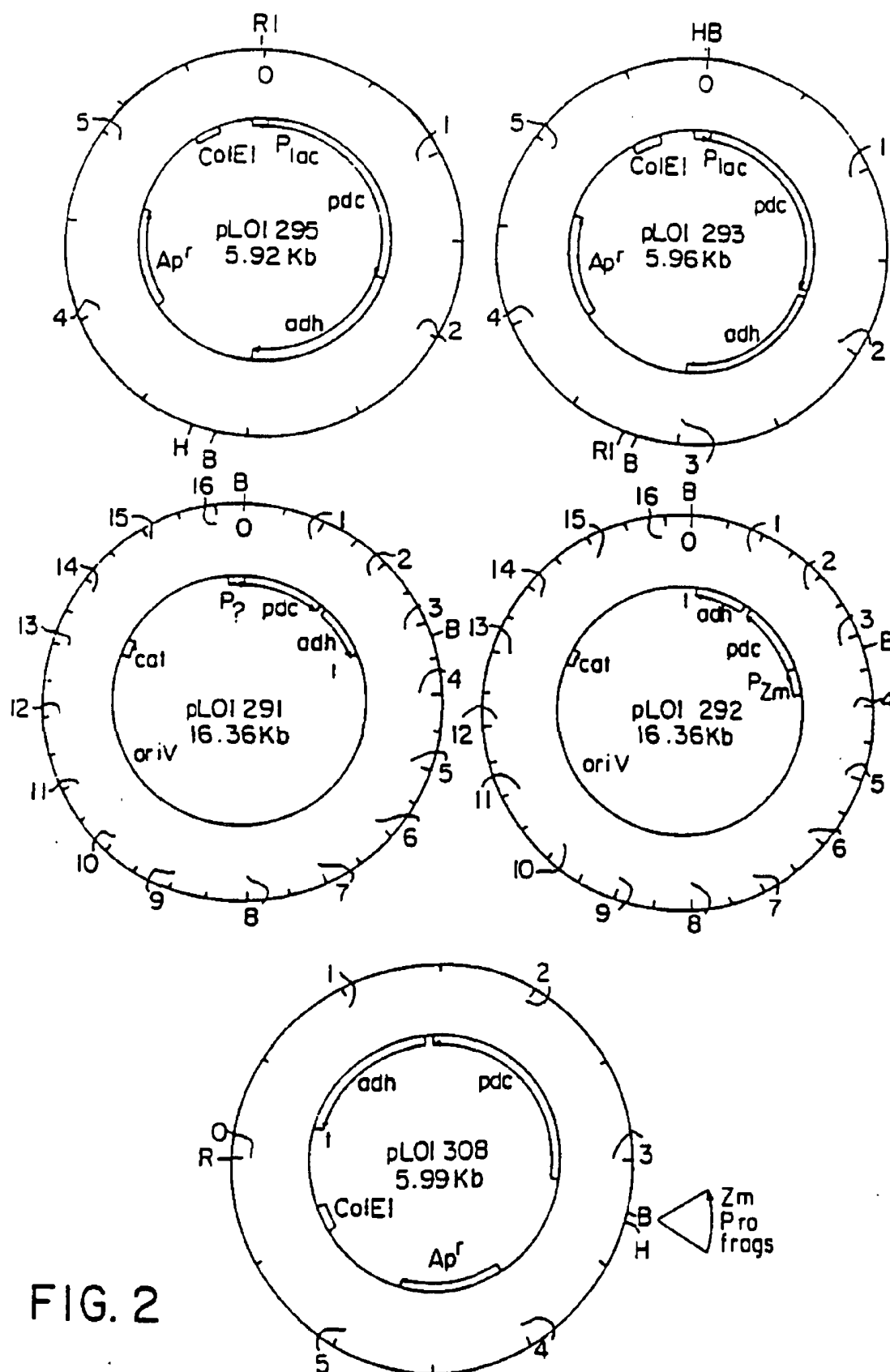


FIG. 2

3 / 19

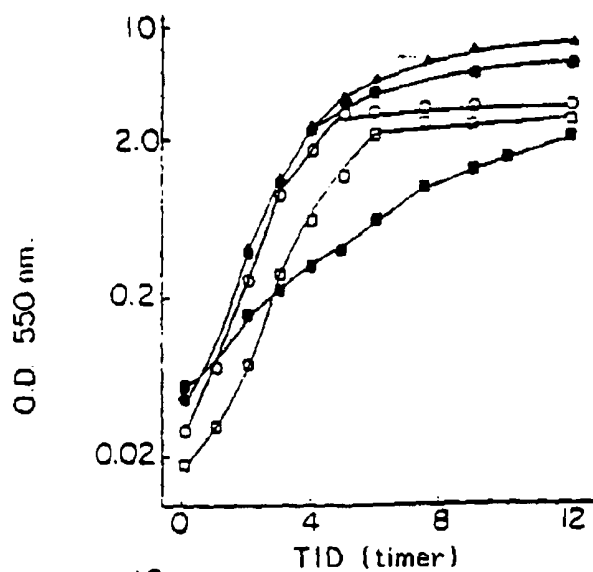
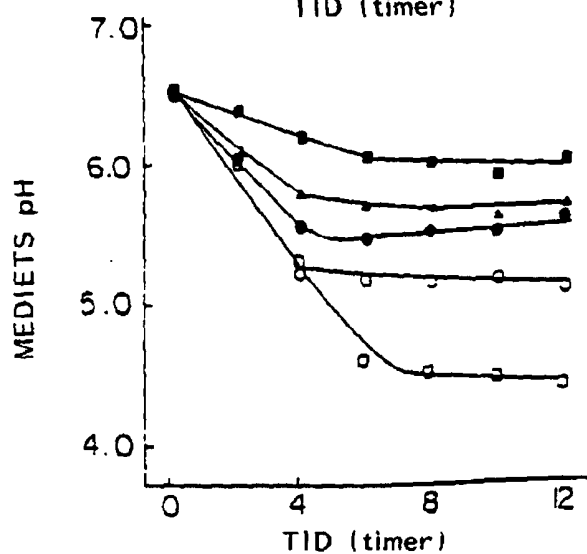
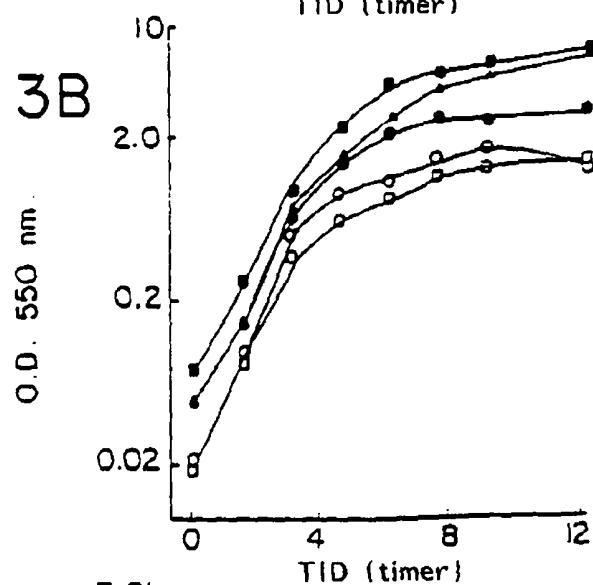


FIG. 3B



SYMBOLER : ■, pLO1295; ●, pLO1308-2; ○, pLO1308-5,
 ▲, pLO1308-10; □, STAMME TC4 SOM MANGLER PLASMID

4 / 19

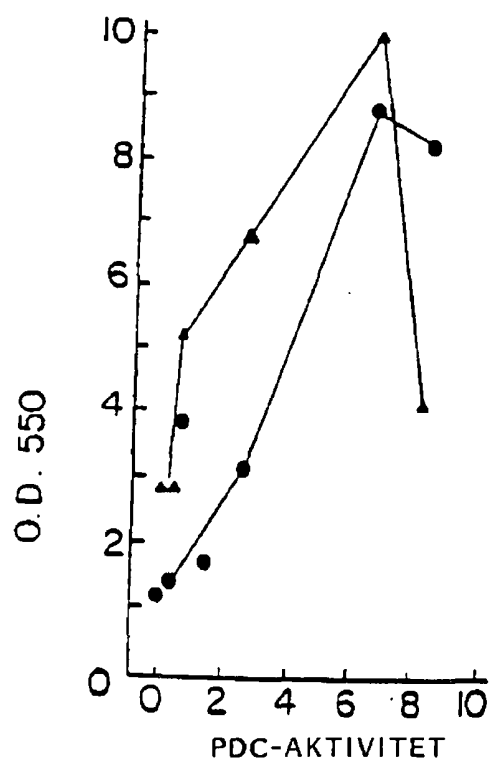
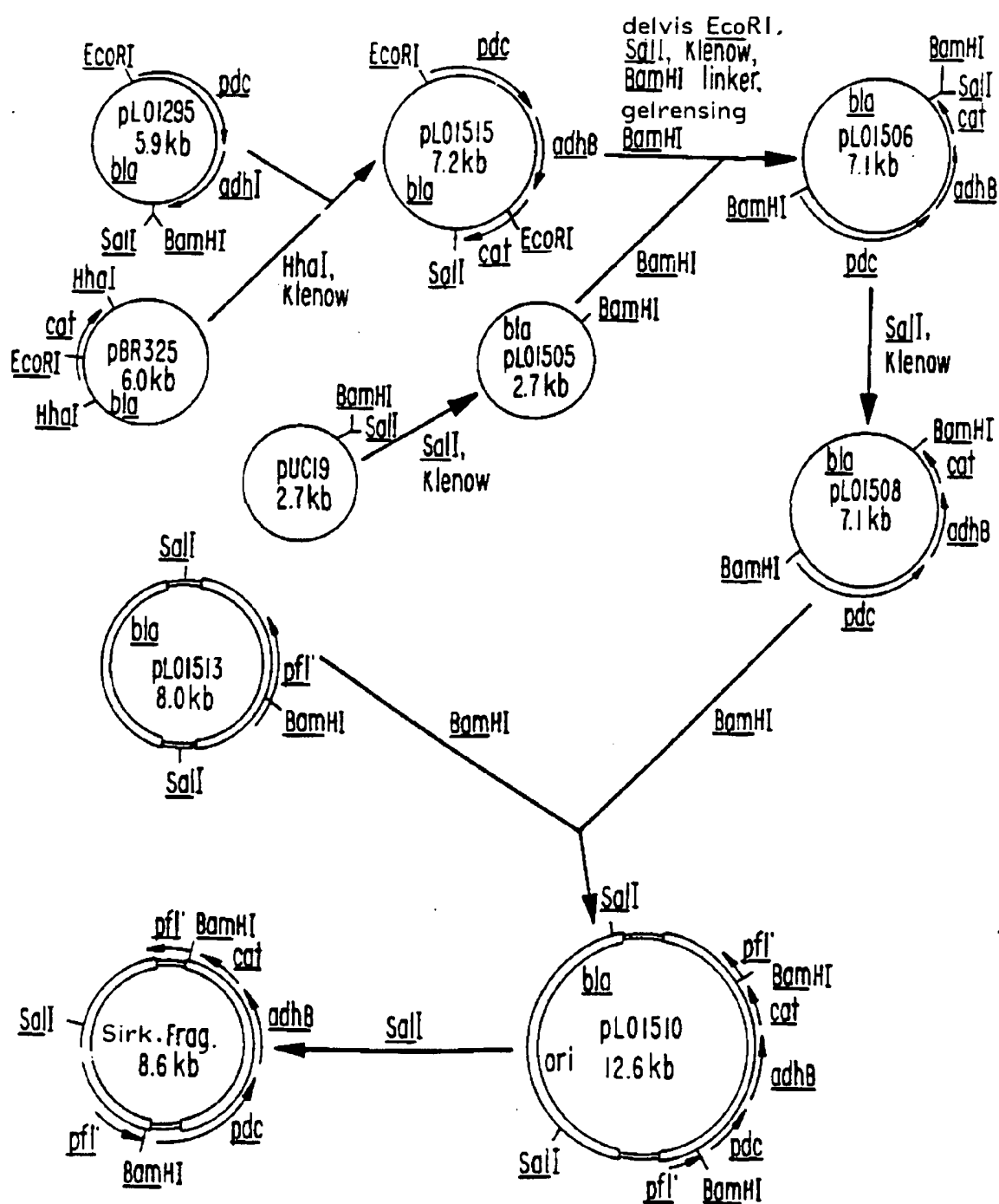


FIG. 4

SYMBOLER : ▲, AEROBISKE VEKSTBETINGELSER
●, ANAEROBISKE VEKSTBETINGELSER

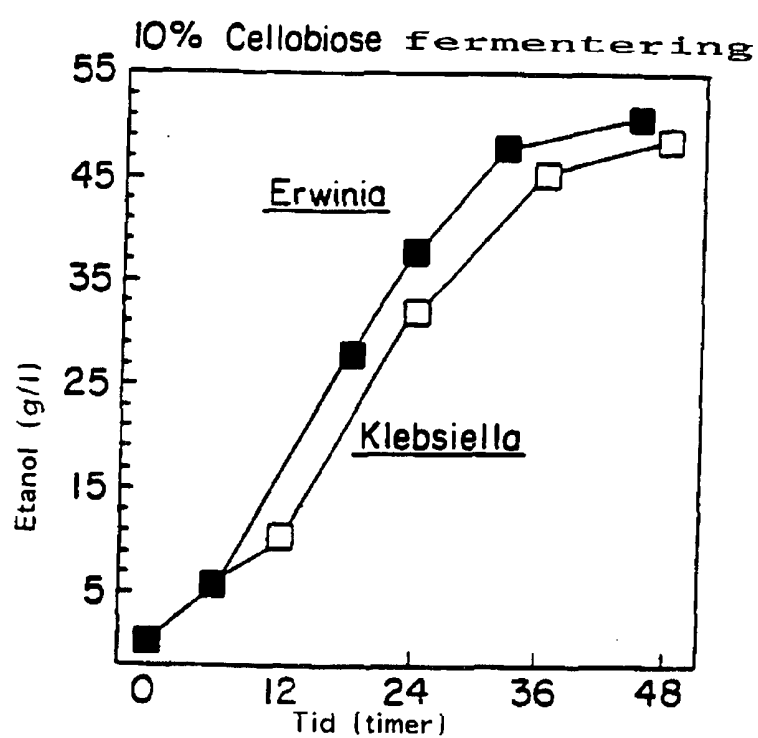
5 / 19

FIG. 5



6 / 19

FIG. 6



7 / 1 9

FIG. 7A

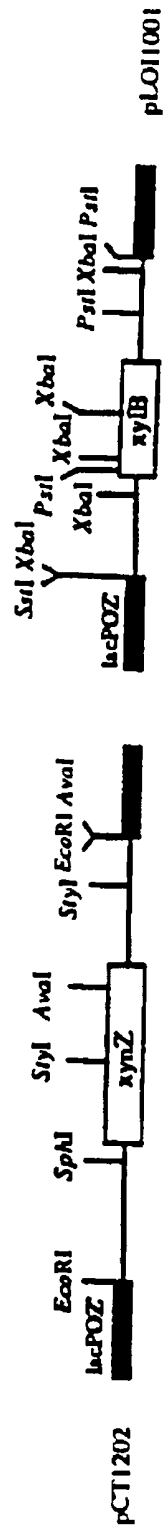
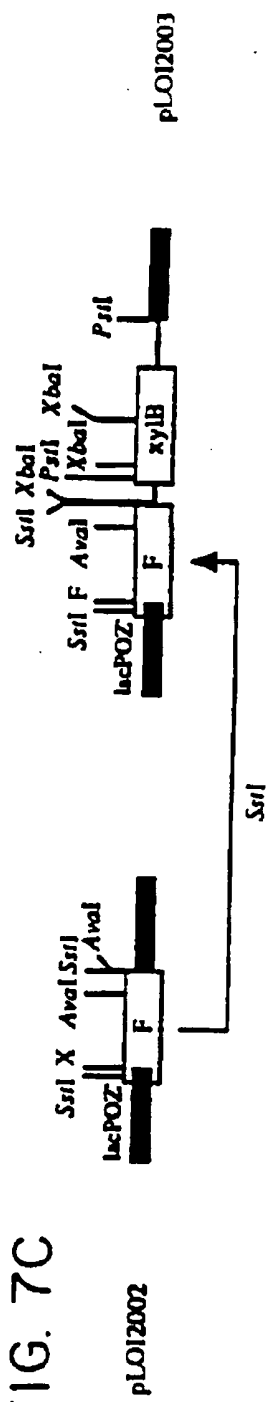


FIG. 7B



FIG. 7C



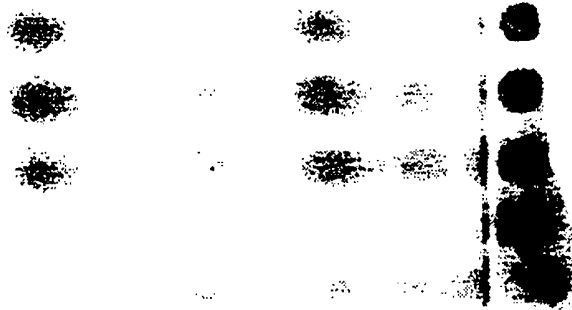
8 / 1 9

X1▲

X2▲

X3▲

X4▲



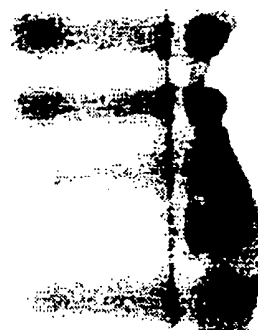
S 0 24 48 65
FIG. 8B

X1▲

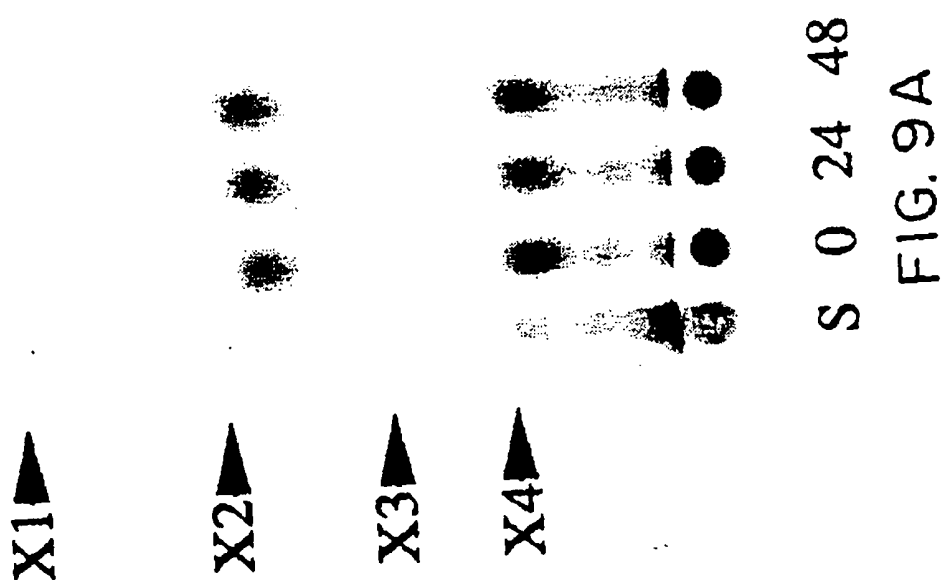
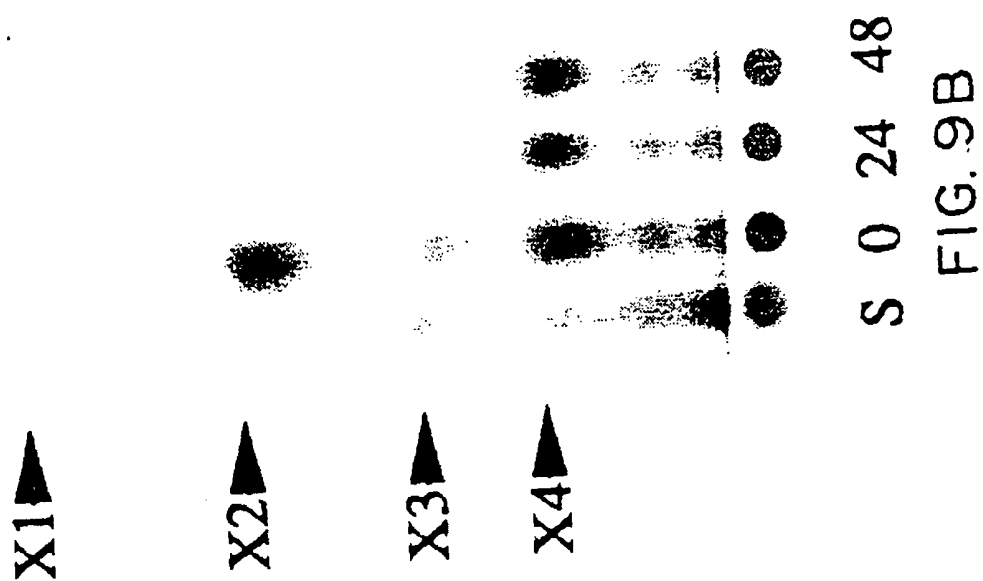
X2▲

X3▲

X4▲



S 0 24 48 65
FIG. 8A



10 / 19

FIG. 10A

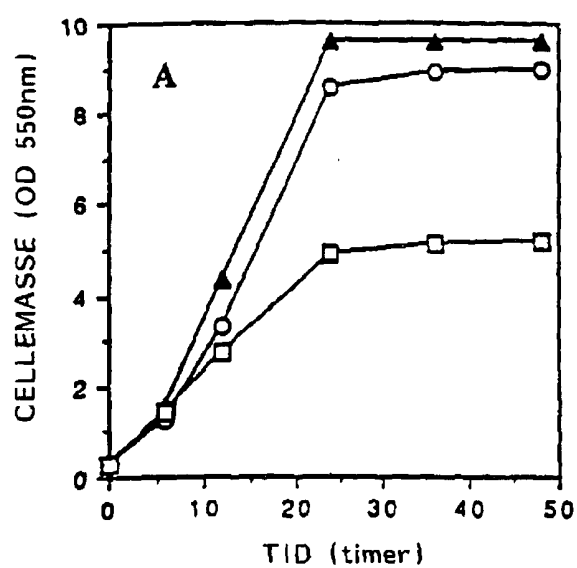
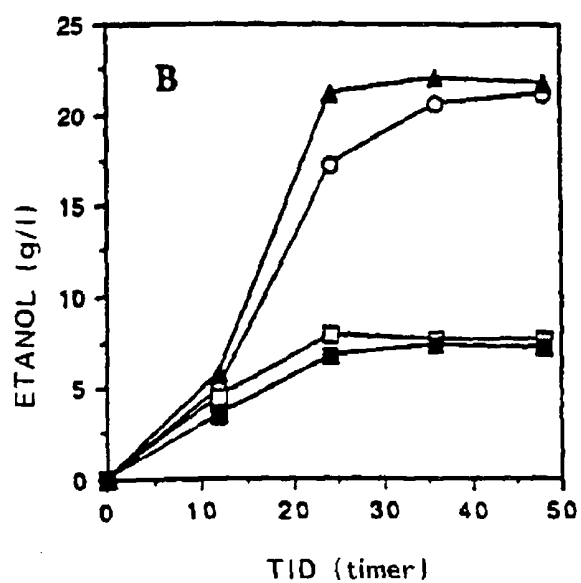


FIG. 10B



11 / 19

FIG. 11A

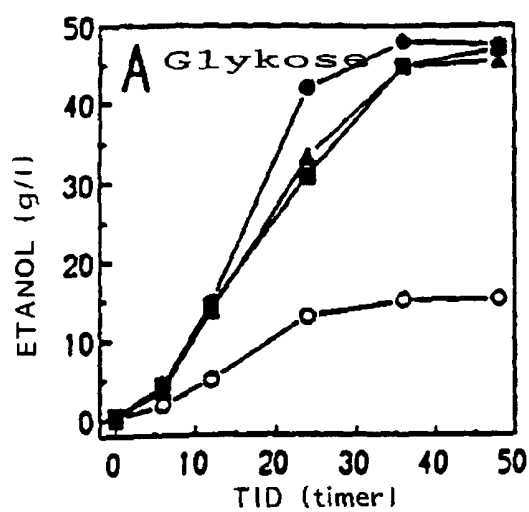
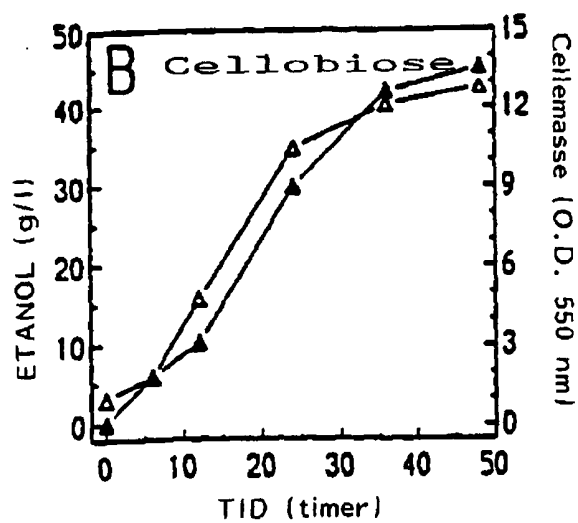


FIG. 11B



12 / 19

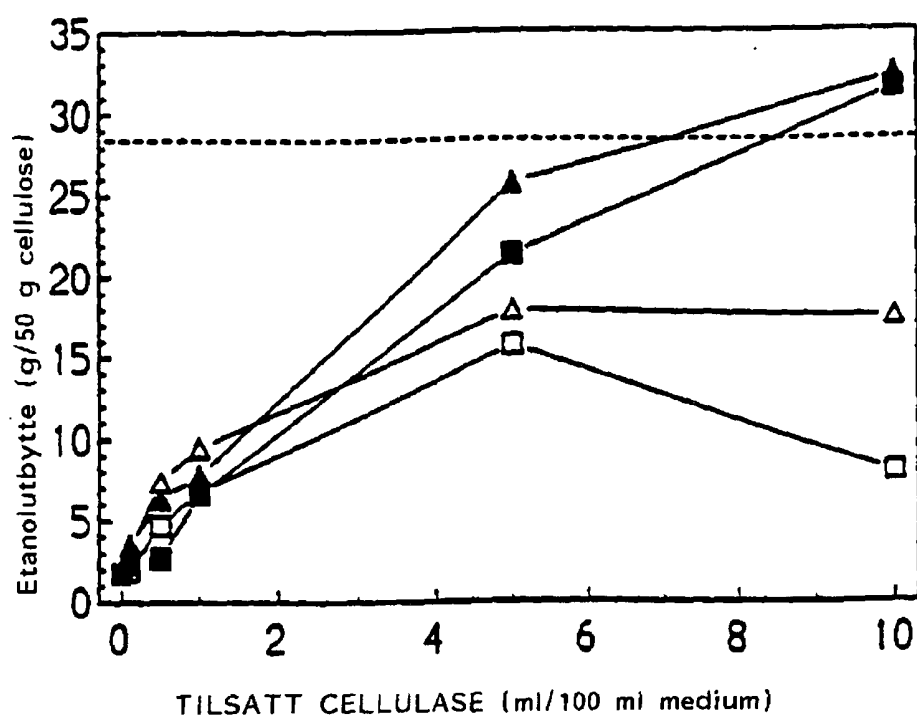


FIG. 12

13 / 19

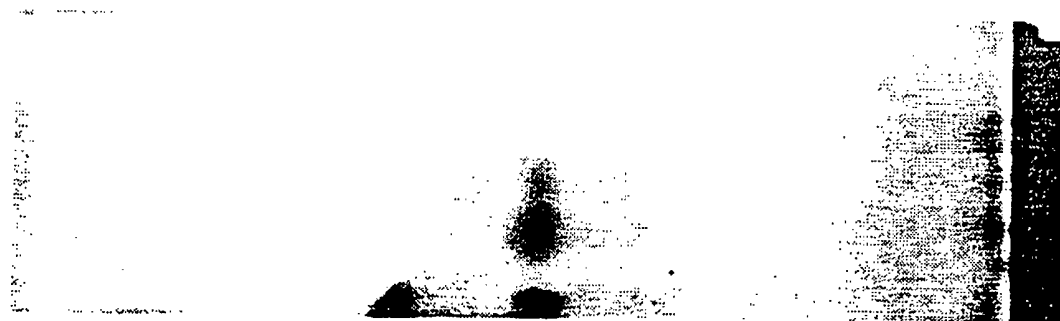


FIG. 13C

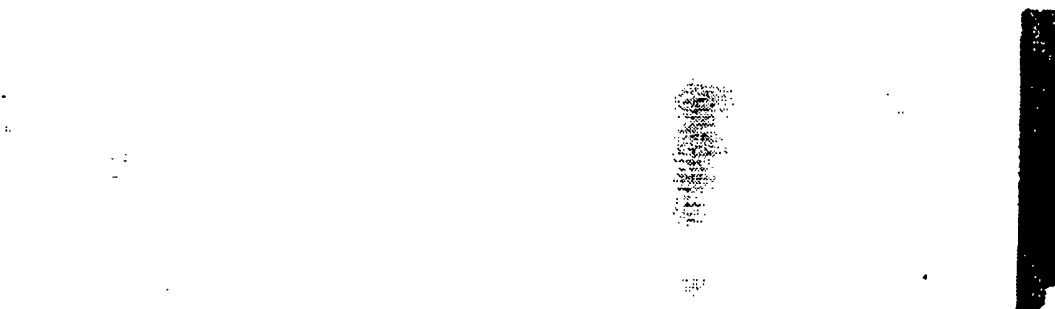


FIG. 13B

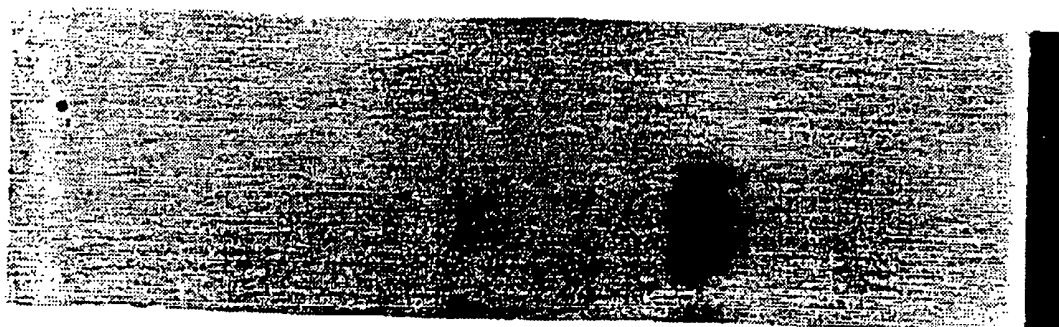


FIG. 13A

15 / 19

FIG. 15A

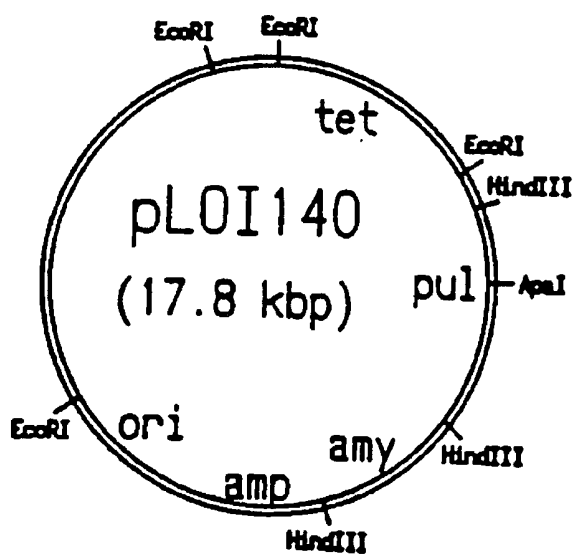
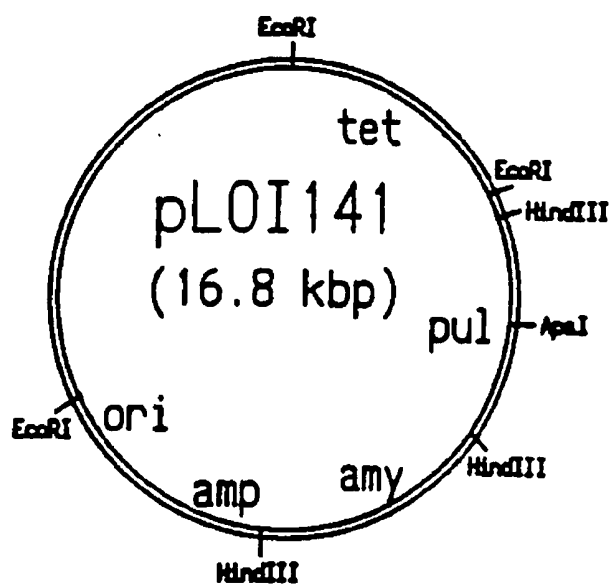


FIG. 15B



16 / 19

FIG. 16A

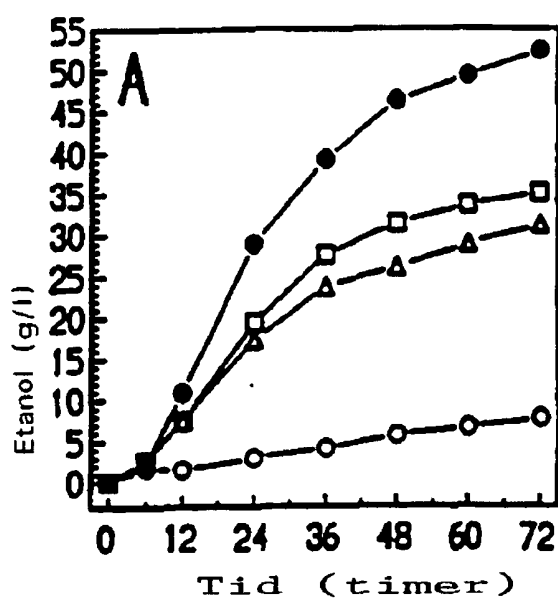
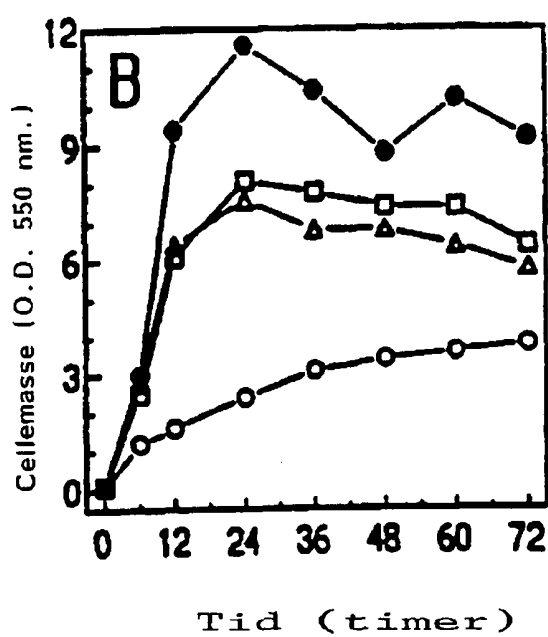


FIG. 16B



17 / 19

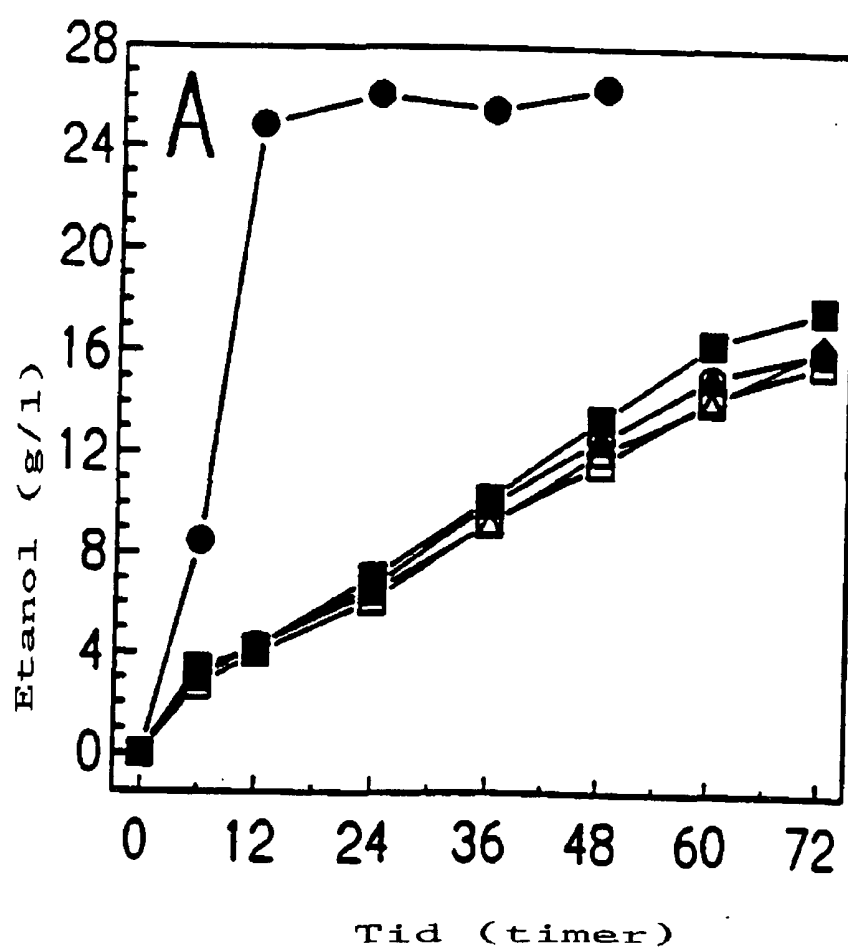


FIG. 17

315567

18 / 19

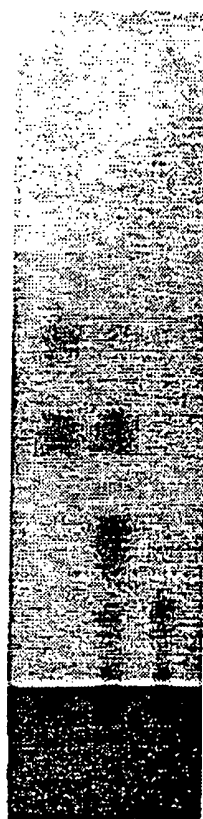


FIG. 18

FIG. 19

