



UPPSALA
UNIVERSITET

Sammanlagen bioprosessteknik vid framställning av biobränsle från lignocellulosa

Anton Wahlgren

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammanlagen bioprosessteknik vid framställning av biobränsle från lignocellulosa

Anton Wahlgren

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Nya miljömål ställer ökade krav på en minskad användning av fossila bränslen. Ett alternativ till fossila bränslen är att använda energirika alkoholer. Etanol utvunnen ur glukosrika grödor brukar benämnas "första generationens biobränslen" och har använts i stor utsträckning det senaste årtiondet. Första generationens biobränslen har mött kritik då grödorna man använder gett upphov till konkurrens med matindustrin vilket tros ha bidragit till ökade livsmedelspriser. Andra generationens biobränsle använder lignocellulosa som substrat och bidrar därmed inte till konkurrensen mellan biobränsle och mat. Användandet av lignocellulosa som substrat försvåras på grund av dess stabila struktur. Konventionella framställningsmetoder sker i flera tidskrävande steg där substratet förbehandlas kemiskt eller mekaniskt, bryts ned av tillsatta enzym och till sist fermenteras till etanol av jäst. Nya framställningsmetoder behövs för att göra andra generationens biobränslen konkurrenskraftiga. En sammanslagen bioprosessteknik (SBP) går ut på att utföra enzymproduktion, enzymnedbrytning samt fermentering i ett samlat steg och i en enstaka processtank. SBP skulle minska kostnaderna för etanolframställning ur lignocellulosa. För att kunna utföra SBP behövs en optimalt designad organism med avseende på bland annat: produktion av cellulolytiska enzym, förmåga att fermentera olika sockerarter till etanol, etanoltolerans och temperaturtolerans. Denna uppsats behandlar forskningsframsteg som har gjorts på två olika potentiella modellorganismer: en cellulolytisk organism, *Clostridium thermocellum*, och en etanologen organism *Saccharomyces cerevisiae*. Forskningsframsteg har förbättrat modellorganismerna, med hjälp av rekombinant genteknik, för att öka deras potential som en optimal SBP-organism. Trots forskningsframsteg är SBP fortfarande i ett tidigt utvecklingsstadium och ännu inte kommersiellt lönsamt. Fortsatt forskning behövs för att ytterligare effektivisera potentiella modellorganismers egenskaper för en kommersiellt gynnsam SBP som kan konkurrera ut nyttjandet av fossila bränslen och göra bränsleindustrin CO₂-neutral.

Inledning

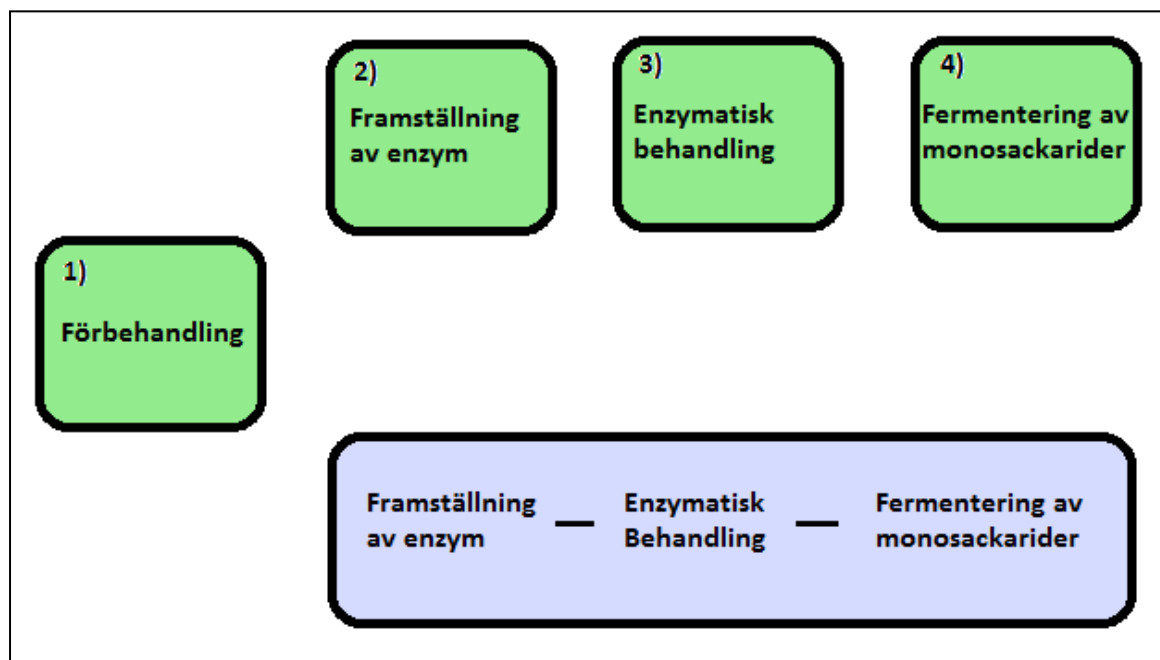
Det råder stor efterfrågan på förnybara bränslen runt om i världen. En ökad global förståelse av växthuseffekten har under det senaste decenniet ökat kraven på en minskad användning av fossila energikällor. Redan i dagsläget finns det förnybara bränslen som alternativ till de fossila. Ett av de populäraste alternativen till fossila bränslen är att istället använda energirika alkoholer, till exempel etanol, som kan utvinnas ur biomassa. Etanol har använts som fordonsbränsle i relativt stor utsträckning sedan mitten på 2000-talet men en fullständig omställning till bioetanol från fossila bränslen kräver ytterligare forskning (Agarwal 2007, Jouzani & Taherzadeh 2015).

Det finns flera anledningar till att användningen av etanol inte har lyckats konkurrera ut de fossila bränslena. De första etanolbaserade biobränslena man framställde i stora volymer tillverkades av glukosrika växter som sockerrör och majs. Användandet av dessa substrat möter kritik på grund av att det uppstår en konkurrens med matindustrin när material som kunde ha använts till föda istället går till bränsleproduktion, vilket på sikt kan bidra till ökade

spannmålspriser. Etanolframställningen från majs har även blivit kritiserad på grund av att det i framställningsprocessen sker utsläpp av N₂O som är en växthusgas (Crutzen *et al.* 2008).

För att kringgå problemen med att använda glukosbaserade substrat har forskningen ändrat fokus till att försöka utvinna etanol ur material som inte ger upphov till en direkt konkurrens med matindustrin. Ett av materialen, som det bedrivs mycket forskning på, är lignocellulosa (kristallin cellulosa omgiven av lignin och hemicellulosa). Fördelen med lignocellulosa som substrat jämfört med glukos är att det finns i överflöd på en global skala. Lignocellulosa som används för etanolframställning kan hämtas från i princip vilken växt som helst samt från restprodukter från skogs- och pappersindustrin. Den enorma tillgången på lignocellulosa leder till ett ökat antal potentiella odlingsmarker för biomassa i syfte för etanolframställning. Risken att det skulle uppstå konkurrens mellan biobränsleproduktion och matproduktion förväntas minska vid biobränsleproduktion med lignocellulosa som substrat (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Ett stort problem när man använder cellulosa som substrat är dess komplexa och rigida struktur. Den komplexa strukturen leder till att framställningsprocessen måste ske i flera steg (Figur 1). Det första steget innefattar förbehandlingen av substratet där cellulosa frigörs från lignin och hemicellulosa. Förbehandlingen sker vanligtvis genom upphettning och ångbehandling eller genom kemisk uppluckring med starka syror eller baser. Efter förbehandlingen tillsätts en blandning cellulytiska enzym som utför hydrolysering av cellulosan och hemicellulosan. Enzymerna som tillsätts produceras antingen i en separat tank eller köps in från externa aktörer som framställt enzymerna. De långa polysackariderna delas upp i monosackarider, främst pentos och hexos. Till sist fermenteras sockermolekylerna av mikroorganismer till alkohol. Det är väldigt kostsamt och tidsödande att utföra tillverkningen av etanol i så många steg och bränslemarknaden är fortfarande dominerad av fossila bränslen. Det behövs metoder som är mer kostnads- och tidseffektiva för att etanolbränslen ska kunna konkurrera ut de fossila bränslena (Lynd *et al.* 2005, Jouzani & Taherzadeh 2015).



Figur 1. En generell beskrivning av de steg som sker under en konventionell framställningsprocess av etanol från lignocellulotisk biomassa (grönt). I SBP-metoden sker steg 2-4 simultant i en och samma processtank (blått).

En metod som på senare år börjat undersökas är en så kallad "sammanslagen bioprosessteknik" (SBP) där man undersöker möjligheten att använda en och samma organism för att sköta produktionen av enzym, nedbrytningen av cellulosa samt fermenteringen av sockermolekyler till etanol. Kan modellorganismer för SBP utvecklas tillräckligt för att göra biobränslen utvunna ur lignocellulosa ett konkurrenskraftigt alternativ till fossila bränslen?

Denna uppsats kommer fokusera på:

- Fördelarna med SBP
- Vilka egenskaper en organism behöver för att kunna utföra SBP
- Modellorganismer som passar för SBP
- Forskningsframsteg vid optimering av SBP-organismer

Sammanlagan bioprosessteknik bakgrund

Konventionella metoder för framställning av etanol från cellulosabaserad biomassa kräver i regel fyra steg: 1) Kemisk eller mekanisk uppluckring av substratet, 2) framställning/upphandling av enzym kapabla att bryta ned cellulosa, 3) själva enzymatiska nedbrytningen av cellulosa till enskilda sockermolekyler och till sist 4) fermenteringen av glukos till alkohol (Lynd *et al.* 2002). Hittills har man inte hittat en organism som, i sitt naturliga tillstånd, ensam klarar av att utföra alla stegen i framställningsprocessen i en produktionstank. Istället använder man sig av olika typer av organismer och nedbrytningsmetoder för att utföra framställningen stegvis. Detta betyder att man som producent måste ta hänsyn till flera olika organismers optimala levnadsförhållande och utföra produktionen i flera separata utrymmen där delprocesserna sker isolerade från varandra. Biomassan flyttas stegvis till följande tank för respektive behandling innan etanolen kan utvinnas (Figur 1). Det uppstår även problematik då det har visat sig att de stora mängder sockerrester som uppstår (hexos och pentos) ofta inhiberar olika funktioner hos de modellorganismer man forskar på (Lynd *et al.* 2002, Vinuselvi *et al.* 2011). En metod där man använder SBP skulle innebära en stor kostnadsminskning då steg 2,3 och 4 utförs samtidigt av en genmodifierad organism. Dessutom motverkas inhiberingen av de cellulytiska enzymerna då organismen tar hand om och börjar fermentera de fria hexoserna/pentoserna direkt efter att de bildats (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Forskningsmål för SBP

Det största problemet som SBP måste övervinna är, precis som i de konventionella metoderna, cellulosaens stabila struktur. För att en SBP-organism ska kunna framställa etanol ur lignocellulosa måste den ha förmågan att producera en kaskad av olika enzym för att bryta ned lignin, hemicellulosa och cellulosa till enklare monosackarider. Till sist måste organismen kunna fermentera alla olika monosackarider som frigjorts ur biomassa bestående främst av glukos och xylos. För att få alla enzym att effektivt utföra hydrolysen av biomassa måste reaktionen ske nära enzymernas optimala verkningstemperatur vilket ställer krav på organismens tolerans för höga temperaturer (Lynd *et al.* 2002).

Etanolfremställning med SBP metoden ställer dessutom höga krav på den verkande organismens tålighet och motståndskraft mot toxiska eller inhiberande biprodukter samt slutproduktens eventuella toxicitet. Eftersom hela produktionen sker i en och samma processtank utsätts organismen för flera olika toxiska och/eller inhiberande föreningar på samma gång. Under nedbrytningsprocessen av lignin frigörs reaktiva oxiderande föreningar som kan åsamka DNA-skador hos organismen, försvarssystem mot dessa reaktiva föreningar

måste därför inkorporeras i organismens sammansättning. Slutprodukten som bildas kan i höga nivåer ha en toxisk effekt hos många mikroorganismer, därför måste en utvecklad tolerans mot höga koncentrationer av etanol finnas i en designad SBP-organism (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Nedbrytning av cellulosa med hjälp av cellulytiska enzym

För att enzymatiskt kunna bryta ned cellulosa till glukos behövs enzym från minst tre olika enzymfamiljer: endoglukanaser, exoglukanaser och β -glukosidaser. Endoglukanaser fungerar genom att spjälka cellulosakedjan invändigt på slumpmässigt valda platser. Endoglukanaserna hydrolyserar bindningarna mellan glukosmolekylerna och genererar därmed kortare cellulosafragment. Exoglukanaser verkar på cellulosakedjornas ändar där de bit för bit spjälkar av glukos och cellobios, som består av två glukosmolekyler, från kedjan. β -glukosidaser bryter ned mindre cellulosafragment som cellobios och cellodextrin till glukos. De nämnda enzymerna fungerar synergistiskt och för att få en effektiv nedbrytning av cellulosa behövs allihop. Den initiala spjälkningen som utförs av endoglukanaser ger upphov till ett ökat antal fria cellulosaändar som exoglukanaserna kan fästa vid, vilka i sin tur kan bilda mer cellobios som β -glukosidaserna kan ta hand om och bilda fria glukosmolekyler (Lynd *et al.* 2002).

Det finns även andra cellulytiska enzym utöver de basala enzym som används vid cellulosanedbrytning. Enzym som tillhör familjen benämnda lytiskt polysackarid monooxygenaser (LPMO) verkar tillsammans med enzymet cellobios dehydrogenas (CDH). LPMO kan, efter den mottagit en elektron från CDH, oxidativt klyva bindningar hos tätt packad kristallin cellulosa. När LPMO har klyvt bindningen exponeras en yta där exoglukanaser kan fästa och fortsätta nedbrytningen av cellulosan (Horn *et al.* 2012).

Den optimala verkningstemperaturen hos cellulytiska enzym beror på vilka specifika enzym man väljer att använda från de ovan nämnda enzymfamiljerna. I många studier inom SBP forskning arbetar man med enzym från termofila organismer såsom *C. thermocellum*, dessa enzym fungerar optimalt vid cirka 50°C (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Rekombinant genteknik

En stor del av forskningsmetoderna för att designa den optimala SBP-organismen grundar sig i användandet av rekombinant genteknik. Kortfattat går metoden ut på att identifiera och isolera en gensekvens hos en "donatororganism". Gensekvensen inkorporeras i en vektor, ofta en bakterieplasmid eller ett virus. Vektorn introduceras sedan till målorganismen och de nya generna förenas med målorganismens. Ofta innehåller vektorn gener som bidrar till antibiotikaresistens. När de nya generna har inkorporerats i målorganismens genom får organismen tillväxa i ett medium innehållandes antibiotika. Endast de organismer som har tagit upp vektorn överlever antibiotikabehandlingen. Med rekombinant genteknik framställs genmodifierade organismer som uttrycker ett annat genom än den ursprungliga organismen (Griffiths *et al.* 2000).

Optimering av mikroorganismer för SBP

Eftersom man inte har lyckats optimera en organism för SBP råder det viss debatt hos forskare om vilken organism man ska utgå ifrån när man ska designa den optimala organismen. Det finns i dagsläget mikroorganismer, till exempel jäst, som i hög grad kan fermentera alkoholer från glukos men saknar förmågan att producera cellulosanedbrytande enzym. Dessa etanolproducerande mikroorganismer brukar benämnas som etanologena. Det finns även

Minimering av biprodukter

Ett problem vid kommersiella försök att använda *C. thermocellum* är att biprodukterna som bildas förhindrar en fullständig etanolutvinning ur substratet. Vid framställning av etanol ur biomassa vill man enbart utvinna etanol och minimera restprodukter, dels för att det inte finns något vinstintresse i dem men också eftersom de kan agera inhiberande eller toxiskt i höga koncentrationer. Cellulosomen innehållandes det cellulosanedbrytande enzymkomplexet har varit ett av forskningsobjekten när man försökt minimera biprodukter (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Ett stort framsteg gjordes i en studie av Tripathi *et al.* (2010). De lyckades i ett försök ta fram en effektiv metod att radera genuttrycket av ett specifikt enzym, laktatdehydrogenas, i *C. thermocellum*'s cellulosom. Laktatdehydrogenas står för produktionen av pyruvat till laktat. Metoden gick ut på att tillföra en vektor innehållandes en genssekvens som när den inkorporerats i *C. thermocellum*'s genom, stänger av uttrycket av målenzymet. Vektorn innehöll även en antibiotikaresistensgen för att enkelt kunna odla fram den muterade *C. thermocellum*. Resultatet påvisade att försöket givit upphov till en muterad stam *C. thermocellum* som producerade mindre etansyra men det uppmättes bara en måttlig ökning av etanol. I en liknande studie utförd av Argyros *et al.* (2011) använde man sig även där av en plasmidvektor för att inaktivera genuttrycket för några av de enzym som producerar oönskade biprodukter. I försöket lyckades de slå ut fosfat acetyltransferas, utöver redan inaktiverade laktatdehydrogenas. Inaktiveringen av båda enzymerna ledde till att varken etansyra eller laktat producerades. Den positiva effekten som uppstår när man lyckas bli av med bildandet av oönskade biprodukter är att mer av det tillgängliga organiska materialet istället går till bildandet av etanol. I studien av Argyros *et al.* (2011) uppmättes en fyra gånger högre etanolproduktion i den genetiskt modifierade *C. thermocellum* än i vildtypen.

Etanoltolerans

Ett annat problem är att *C. thermocellum* i sitt naturliga tillstånd inte överlever i de höga etanolkoncentrationer som oundvikligen uppstår vid etanolproduktion i den ensamma processtanken vid en SBP. I sitt naturliga tillstånd kan en kultur av *C. thermocellum* endast tolerera en etanolkoncentration på cirka 5 g/L (Jouzani & Taherzadeh 2015). *C. thermocellum* behöver inte tolerera höga koncentrationer av etanol i dess naturliga miljö då etanol inte är dess huvudsakliga produkt, samt att den ofta lever i organismsammansättningar där andra organismer kan ta hand om etanol.

I ett försök att undersöka huruvida man kunde öka etanoltoleransen hos *C. thermocellum* utförde Shao *et al.* (2011) en behandling av en kultur vildtyp *C. thermocellum* som över generationer utsattes för etanolstress. I försöket odlades nya kulturer upp, i etanol och cellulosa medium, från den ursprungliga vildtypen. De nya kulturer som uppstod fördes sedan över till ett nytt odlingsmedium innehållande en högre koncentration av etanol. Efter att ha behandlat 40 generationer bakteriekulturer, i medium med gradvis högre etanolkoncentration, lyckades man uppnå en etanoltolerans hos *C. thermocellum* som uppnådde 50 g/L etanol (Shao *et al.* 2011).

Inhibering av sockerrester

Vid användning av *C. thermocellum* för etanolframställning uppstår det en flaskhalseffekt till följd av bildandet av cellobiosrester. Cellobios är ett ofullständigt nedbrutet cellulosafragment bestående av två sammankopplade glukosmolekyler som cellulosomen har svårt att ta hand om och bryta ned tillräckligt snabbt (Gefen *et al.* 2012). I *C. thermocellum*'s naturliga miljö leder en hög koncentration av cellobios till en inhibering av cellulosanedbrytning. De höga cellobioskoncentrationerna signalerar att tillräckligt med cellulosa har brutits ned och

nedbrytningen av cellulosa inaktiveras. I en naturlig miljö finns det ingen anledning för *C. thermocellum* att producera mer energi än vad den behöver för att överleva (Lynd *et al.* 2002, Jouzani & Taherzadeh 2015).

De modifierade stammarna av *C. thermocellum*, som används i kommersiell etanolframställning, är bättre anpassade för de höga etanolnivåerna och eftersom man skördar etanolen som bildas blir istället cellobiosinhiberingen ett hinder för en effektiv produktion. *C. thermocellum* besitter förmågan att till viss del bryta ned cellobios genom att uttrycka och sekretera enzymet β -glukosidas. β -glukosidas är ett enzym som bryter ned cellobios via hydrolys. I konventionella etanolframställningsmetoder tillsätter man fritt β -glukosidas till processtanken för att minska cellobiosinhiberingen (Jouzani & Taherzadeh 2015). Tillsatsen av β -glukosidas är ineffektiv då hela processtankens innehåll behandlas till skillnad från om *C. thermocellum* lokalt kunde ta hand om cellobiosen. Den ineffektiva behandlingsmetoden leder till att stora mängder enzym måste inhandlas för en effektiv produktion. I en studie utförd av Gefen *et al.* (2012) lyckades man med rekombinant genteknik uppreglera genuttrycket av β -glukosidas och dessutom inkorporera det i cellulosomen. Gensekvensen för β -glukosidas kombinerades med samma dockerinprotein som *C. thermocellum*'s ursprungliga enzym använder sig av för att fästa vid cellulosomens ryggradsprotein. Möjligheten att få *C. thermocellum* att egenhändigt uttrycka β -glukosidas i ökad kvantitet och dessutom inkorporera enzymet i cellulosomen för lokal nedbrytning av cellobios ökade den totala etanolproduktionen hos *C. thermocellum* (vildtyp) med en faktor på 2,3.

Den etanologena modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae*

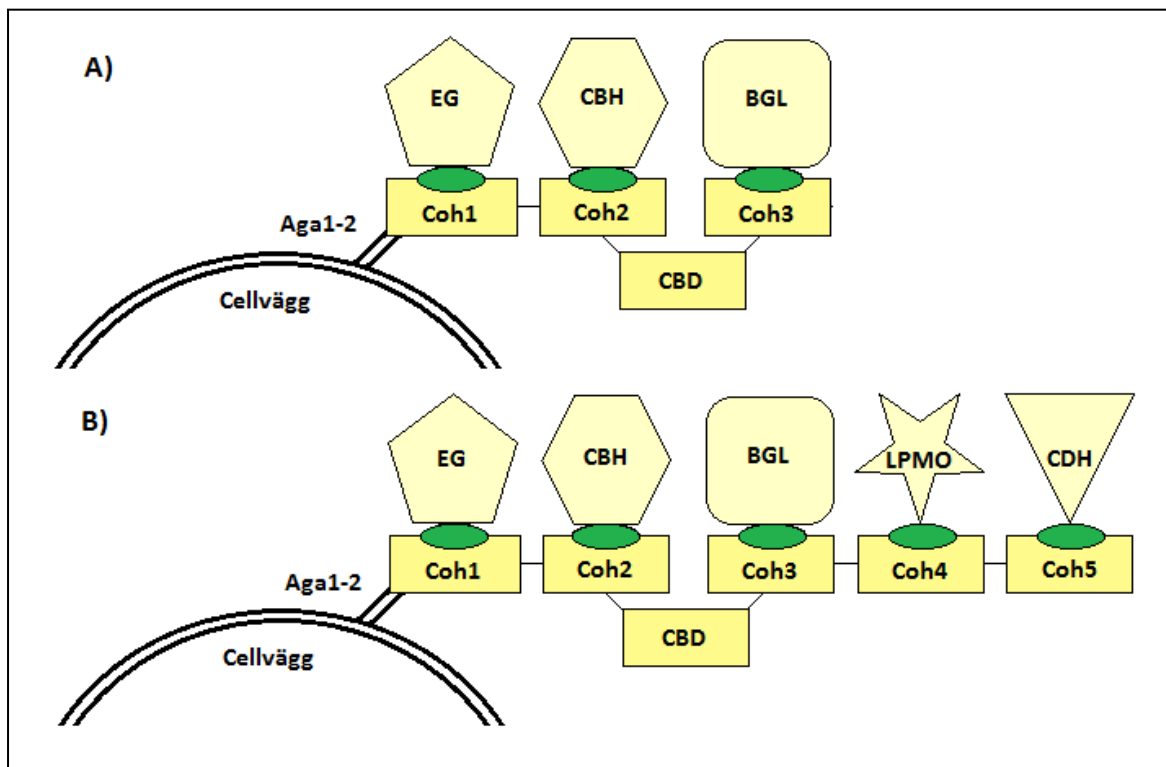
En etanologen organism är en organism som i vildtyptillstånd besitter förmågan att fermentera glukos till etanol. Historiskt sett har människan använt sig av etanologena organismer, som till exempel jästsvamp, vid framställning av alkoholhaltiga drycker men det har även använts vid framställning av första generationens biobränslen. Användandet av jästsvamp för biobränsleproduktion var väldigt effektivt då jäst enkelt kan metabolisera stärkelsen som användes som substrat i första generationens biobränslen. Det som försvårar att använda jästsvamp som andra generationens biobränsle är att man använder sig av svärnedbrutet lignocellulosa som substrat (Lynd *et al.* 2002, Jouzani & Taherzadeh 2015). En jästsvamp som kommit fram som en potentiell kandidat vid användandet av SBP är *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae är en effektiv fermenterare av glukos till etanol men saknar förmågan att bryta ned cellulosa. En stor anledning till att just *S. cerevisiae* används som modellorganism för biobränsleframställning är att den länge har använts som modellorganism för fermentering i allmänhet. Därmed har forskarvärlden redan en god uppfattning om dess metaboliska processer samt dess genetiska struktur. Den utbredda kunskapen om *S. cerevisiae* underlättar för forskning med målet att designa en optimal organism för SBP (Lynd *et al.* 2002, Jouzani & Taherzadeh 2015).

Konstruerad minicellulosom för cellulosedbrytning

Jästsvampar i sitt naturliga tillstånd saknar delvis eller helt uttrycket av de enzym som behövs för att bryta ned kristallin cellulosa till enkla glukosmolekyler. Ett stort forskningsmål har därför varit att inducera egenhändig produktion av enzym med cellulolytisk karaktär. Utefter vad man redan känner till om andra organismer som, med hjälp av deras cellulolytiska enzymkomplex, naturligt har förmågan att bryta ned cellulosa har forskare försökt skapa ett minicellulosomkomplex. Som tidigare nämnt använder sig cellulolytiska organismer, som *C. thermocellum*, av en samling enzym i en cellulosom. Enzymerna i cellulosomen samverkar spatialt nära varandra för en effektiv cellulosa nedbrytning (Gold & Martin 2007).

Inspirerade av cellulytiska cellulosomkomplex gjorde Wen *et al.* (2010) ett försök att genom rekombinant genteknik designa och sedan inducera genuttrycket för en minicellulosom hos *S. cerevisiae*. I försöket lyckades man inducera genuttrycket för en minicellulosom bestående av ett ryggradsprotein med tre olika cellulytiska enzym (endoglukanas, cellobiohydrolas och β -glukosidas), samt en cellulosa-bindande domän med hög affinitet för kristallin cellulosa (Figur 3A). Generna, som introducerades till *S. cerevisiae* med hjälp av rekombinant genteknik, var tagna från *C. thermocellum*. Ryggradsproteinets design var för hög affinitet till ett av *S. cerevisiae*'s redan befintliga cellväggsproteiner, α -agglutinin adhesionsreceptor (Aga). Den nu modifierade stammen *S. cerevisiae* kunde, till skillnad från vildtypen (Jouzani & Taherzadeh 2015), växa i ett medium med enbart kristallin cellulosa som ensam energikälla och producerade låga koncentrationer etanol som uppmättes till 1,8 g/L. Wen *et al.*'s försök var det första av sin sort som lyckades inducera en minicellulosom innehållandes tre olika cellulytiska enzym (Wen *et al.* 2010).



Figur 3. A) En minicellulosom bestående av en ryggrad med tre tillhörande cellulytiska enzym: Endoglukanas (EG), Cellobiohydrolas (CBH), β -glukosidas (BGL) (Wen *et al.* 2010). B) En större minicellulosom bestående av ytterligare två cellulytiska enzym: lytiskt polysackarid monooxygenas (LPMO) och cellobios dehydrogenas (CDH) (Liang *et al.* 2014). Båda ovanstående komplex innehåller dessutom en cellulosa-bindande domän (CBD) och är bundna till cellväggen genom α -agglutinin adhesionsreceptor (Aga).

Den nya stammen av *S. cerevisiae* som Wen *et al.*'s studie gav upphov till har legat som grund för mycket efterföljande forskning. I ett senare försök, baserat på Wen *et al.*'s studie, lyckades Liang *et al.* (2014) skapa ett genuttryck för en minicellulosom som bestod av ytterligare 2 cellulytiska enzymtyper, cellobios dehydrogenas (CDH) och lytiskt polysackarid monooxygenas (LPMO). Enzymerna förväntades tillsammans ge minicellulosomen en oxidativ förmåga att klyva bindningarna hos cellulosan, där CDH donerar elektroner till LPMO som i sin tur oxiderar cellulosan. Generna för LPMO hämtades från en termofil svamp, *Thermoascus aurantiacus*. LPMO har ett temperaturoptimum vid 40-50°C (Horn *et al.* 2012). Generna för CDH hämtades från mjukrötesvampen *Humicola insolens*. CDH har ett

temperaturoptimum vid ungefär 65°C (Henriksson *et al.* 2000). Faktumet att både LPMO och CDH kan verka i höga temperaturer, nära de övriga enzymernas temperaturoptimum, är en basal egenskap för att få alla enzym i den konstruerade minicellulosomen att fungera synergistiskt. Det nya enzymtillskottet till minicellulosomen ökade etanolavkastningen från 1,8 g/L till 2,7 g/L (Liang *et al.* 2014).

Liang *et al.* (2014) beskrev även en problematik som uppstår då den inducerade konstruktionen av en minicellulosom utsätter *S. cerevisiae* för metabolisk stress. Den metaboliska stressen förmodas uppkomma på grund av att *S. cerevisiae* saknar de kringliggande funktionerna som behövs för att kunna utföra konstruktionen av minicellulosomen utan att påverka organismens metabolism (Lambertz *et al.* 2014). I fortsatta försök att konstruera större och mer komplexa minicellulosomer måste hänsyn tas till modellorganismens metabolism som helhet för att undvika att metabolisk stress uppkommer (Lambertz *et al.* 2014). Fortsatt forskning på inducering av förbättrade minicellulosomkomplex hos *S. cerevisiae* kan vara en nyckelfaktor till att göra den till en optimal organism för SBP (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Inducerat genuttryck för fermentering av rester från hemicellulosa

En stor del av biomassan i lignocellulosa består av hemicellulosa. Hemicellulosa skiljer sig från kristallin cellulosa genom att den består av en kedja av heterogena sockermolekyler. Kristallin cellulosa består enbart av sammanfogade glukosmonomerer medan hemicellulosa består av sockerenheter med både sex kolatomer samt fem kolatomer. Den vanligaste monomeren i hemicellulosa är pentosen xylos. Förmågan att fermentera xylos till alkohol finns till viss del hos *S. cerevisiae* men den är kraftigt begränsad och behöver optimeras för att *S. cerevisiae* ska kunna användas i en SBP. I en rapport skriven av Zhou *et al.* (2012) beskrivs ett försök att introducera och uppreglera gener för en underlättad fermentering av xylos. Målet var att inducera produktion av enzymerna xylos isomeras (XI), från svampen *Piromyces sp.* och xylulos kinase (XK), från svampen *Pichia stipitis*. XR och XI är nödvändiga för att effektivt tillgodogöra xyloset till xylulos-5-P. Xylulos-5-P kan sedan fermenteras i *S. cerevisiae*'s redan befintliga mekanism för pentos-fosfat-metabolisering (PFM). För att undvika att en flaskhalseffekt uppstod uppreglerades även genuttrycket för PFM. Resultatet av försöket gav upphov till en effektiv xylosnedbrytande stam *S. cerevisiae*, som i ett medie med enbart xylos som energikälla kunde producera 0,41 gram etanol per gram xylos. Detta jämfördes med *S. cerevisiae* utan uppreglerade gener för XI, XK och PFM som endast producerade 0,27 gram etanol per gram xylos (Zhou *et al.* 2012).

Temperaturlighet

Enzymerna som behövs för att bryta ned cellulosa kräver ofta en hög temperatur på upp till 50°C för att uppnå maximal verkningsgrad (Jouzani & Taherzadeh 2015). Jästsvampar är generellt sett inte värmeteranta och *S. cerevisiae* är inget undantag. *S. cerevisiae*, i dess naturliga tillstånd, växer optimalt vid en temperatur runt 35°C. Forskning i syfte att öka temperaturligheten hos *S. cerevisiae* behövs. Särskilt värmeteranta stammar *S. cerevisiae* som observerats på labb har undersökts närmre i syfte att förstå de bakomliggande anledningarna till den ökade värmeteransen. Hos en av de stammar som kunde växa obehindrat i en temperatur på 40 °C fann Shamsavarani *et al.* (2012) en mutation i en allel, RSP5, som stod för kodandet av ubiquitin ligas E3 (ULE3). Den muterade allelen benämns RSP5-C. Funktionen hos ULE3 är att märka in skadade proteiner för proteosomala degrading. Mutationen av allelen ledde till att mer ULE3 transkriberas än i omuttrade celler. Genom rekombinerad genteknik lyckades Shamsavarani *et al.* uppreglera genuttrycket av RSP5-C allelen. Resultatet av uppregleringen ledde till ett ökat uttryck av ULE3 samt en ökad värmeterans hos de behandlade stammarna *S. cerevisiae*. Anledningen till den ökade värmeteransen hos

S. cerevisiae ansågs vara ett effektivare återvinningssystem för proteiner som skadats av den höga temperaturen och förlorat sin funktion. Ett förbättrat system för att märka in de skadade proteinerna till proteosomal degradering leder till en minskning av ofunktionella proteiner varpå cellen kan producera nya. De stammar *S. cerevisiae* som hade ett uppreglerat uttryck av RSP5-C påvisade normal tillväxt i en temperatur på 43°C. Försöket påvisade möjligheten att med rekombinant genteknik öka temperaturlönsen genom uppregleringen av en enstaka gen (Shahsavarani *et al.* 2012). Fortsatt forskning för att öka temperaturlönsen skulle kunna möjliggöra användningen av *S. cerevisiae* i ett SBP-system.

Diskussion

Egenskaperna som krävs hos en kommersiellt användbar SBP-organism är välkända och fördelarna med att utföra framställningsprocessen av etanol i ett enstaka steg likaså. Forskningen som under de senaste åren har bedrivits för att hitta en temperaturlöns, mångsidig, etanologen och cellulytisk organism. Med hjälp av rekombinant genteknik har forskning lett till många nya framsteg och genombrott inom design av en SBP-organism. Framsteg har gjorts hos cellulytiska *C. thermocellum* med avseende på: minskad mängd biprodukter (Tripathi *et al.* 2010), förbättrad tolerans mot höga koncentrationer etanol (Shao *et al.* 2011) och en minskad inhibering som följd av ofullständigt nedbrutna sockerrester (Gefen *et al.* 2012). Forskning har även lyckats förbättra egenskaperna hos den etanologena jästsvampen *S. cerevisiae*. Framsteg för att förbättra *S. cerevisiae* har gjorts genom; ett inducerat uttryck för en minicellulosom med cellulytiska enzym (Wen *et al.* 2010), möjliggörandet av hemicellulosa metabolism med hjälp av inducerade och uppreglerade enzym (Zhou *et al.* 2012) och förbättrad temperaturlöns genom ökat uttryck av ubiquitin ligas (Shahsavarani *et al.* 2012).

Etanologen eller cellulytisk modellorganism för SBP?

I denna uppsats behandlades forskningsframstegen hos en etanologen organism, *S. cerevisiae* och en cellulytisk organism *C. thermocellum*. Utefter de framsteg som gjorts på respektive organism är det fortfarande svårt att förutse vilken modellorganism som har störst potential inom SBP.

Jämförelse av modellorganismerna C. thermocellum och S. cerevisiae

C. thermocellum besitter en naturlig förmåga att effektivt bryta ned cellulosa och hemicellulosa till monosackarider med hjälp av sin cellulosom. Den genetiskt inducerade minicellulosomen hos *S. cerevisiae* är mindre komplex och inte lika effektiv som cellulosomen i *C. thermocellum*. Man har stött på svårigheter att tillföra ytterligare cellulytiska enzym för att ytterligare underlätta nedbrytningen av substratet. Det uppstår även en metabolisk stress hos *S. cerevisiae* då den inte besitter en tillräckligt energisnål mekanism för konstrueringen av minicellulosomen.

C. thermocellum är motståndskraftig mot de höga temperaturer som cellulytiska enzym behöver för att uppnå maximal verkningsgrad. Hittills har man endast lyckats få genetiskt modifierad *S. cerevisiae* att växa i en temperatur på 43°C. Cellulytiska enzym har generellt en optimal verkningsgrad på temperaturer runt 50°C.

C. thermocellum kan utföra metabolisering av de vanligaste monosackariderna i lignocellulosa, glukos och xylos. *S. cerevisiae* besitter stor förmåga att metabolisera glukos och kan med genmodifiering manipuleras till att även metabolisera xylos. Slutprodukten då substratet har metaboliserats är hos *S. cerevisiae* nästan uteslutet etanol.

C. thermocellum producerar även biprodukter som etansyra, laktat och metansyra. Genom att med rekombinant genteknik ta bort uttrycket för några enzym har man lyckats ta bort produktbildningen av metansyra och laktat.

Problematik samt felkällor

De olika forskningsförsöken som behandlats i uppsatsen har utförts på medium anpassade för att bevisa förbättring hos respektive undersökt egenskap. Generellt för försöken i fråga så är dessa medium inte nödvändigtvis fullt ut representativa för den lignocellulotiska biomassa som planeras användas i industriell etanolframställning. Eftersom SBP-metodiken fortfarande är i ett tidigt utvecklingsstadium diskuteras även den optimala växten för etanolframställning ur biomassa. Den lignocellulotiska sammansättningen varierar stort från växt till växt med avseende på innehåll av lignin, hemicellulosa, kristallin cellulosa samt eventuell förekomst av sekundära metaboliter. Forskare vet i dagsläget inte den exakta sammansättningen hos biomassan som ska användas, vilket med stor sannolikhet kommer att påverka valet av modellorganism som i slutändan väljs för framställning av etanol ur lignocellulotisk biomassa med SBP-metodik. Oavsett vilken organism som blir den slutgiltiga lösningen för SBP så är det mest relevanta kriteriet mängden etanol som kan produceras. I dagsläget är det svårt att jämföra etanolavkastningen då forskningen som gjorts ofta utgår från olika cellulosabaserade substrat i de utförda studierna (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Det bör poängteras att det även sker liknande forskning på många andra potentiella modellorganismer. SBP är i ett tidigt utvecklingsstadium och det är i dagsläget svårt att förutse vilken organism som kommer ligga grund för framtida metoder inom SBP. Organismerna som behandlats i denna uppsats är alltså inte nödvändigtvis ledande i forskarnas försök att designa en optimerad SBP-organism eftersom det i dagsläget finns för lite forskning i ämnet för att rangordna organismerna med avseende på vilken som är bäst lämpad för bruk inom SBP. För en översiktlig analys av potentiella modellorganismer för SBP se Jouzani & Taherzadeh rapport (2015).

Slutsats

Alla forskningsresultat behandlade i denna uppsats har visat på en högre etanolavkastning i respektive resultat men man har fortfarande inte lyckats skapa en SBP-organism som är en tillräckligt effektiv etanolproducent för kommersiell framställning från lignocellulotisk biomassa. Det finns i dagsläget bara enstaka företag som framställer etanol med lignocellulotisk biomassa som substrat. Exempelvis använder sig företaget Mascoma av *S. cerevisiae* i konsort med andra jästsvampar vid kommersiell etanolframställning med SBP som metod (Jouzani & Taherzadeh 2015).

Studierna som utförts de senaste fem åren har icke desto mindre bevisat att det finns möjligheter att i stor utsträckning förändra genuttrycket hos potentiella modellorganismer och därmed göra de mer lämpliga för SBP. Om forskare lyckas designa en organism som uppnår kraven som måste uppfyllas för egenhändig enzymtillverkning, lignocellulosanedbrytning och etanolfermentering så har man definitivt lagt en bra grund för användandet av SBP vid kommersiell etanolproduktion av lignocellulotisk biomassa.

Tack

Tack till Anna Suarez Larsson för handledning under projektet. Tack till Christoffer Mattson Langseth, Erik Gudmunds och Joel Striem för feedback och råd angående uppsatsen.

Referenser

- Agarwal AK. 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in energy and combustion science* **33**: 233–271.
- Argyros DA, Tripathi SA, Barrett TF, Rogers SR, Feinberg LF, Olson DG, Foden JM, Miller BB, Lynd LR, Hogsett DA, Caiazza NC. 2011. High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 8288–8294
- Crutzen PJ, Mosier AR, Smith KA, Winiwarter W. 2008. N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics* **8**: 389–395.
- Gefen G, Anbar M, Morag E, Lamed R, Bayer EA. 2012. Enhanced cellulose degradation by targeted integration of a cohesin-fused β -glucosidase into the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 10298–10303.
- Gold ND, Martin VJJ. 2007. Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *Journal of Bacteriology* **189**: 6787–6795.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. 2000. Making recombinant DNA. WWW-dokument: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/>. Hämtad 2016-02-09
- Henriksson G, Johansson G, Pettersson G. 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology* **78**: 93–113.
- Horn S, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH. 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* **5**: 45.
- Jouzani GS, Taherzadeh MJ. 2015. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal-Brj* **2**: 152–195.
- Lambertz C, Garvey M, Klinger J, Heesel D, Klose H, Fischer R, Commandeur U. 2014. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnology for Biofuels* **7**, doi:10.1186/s13068-014-0135-5.
- Liang Y, Si T, Ang EL, Zhao H. 2014 Engineered pentafunctional minicellulosome for simultaneous saccharification and ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 6677–6684.
- Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, Laser M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 577–583.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 506–577.
- Tripathi SA, Olson DG, Argyros DA, Miller BB, Barrett TF, Murphy DM, McCool JD, et al. 2010. Development of pyrF-based genetic system for targeted gene deletion in *Clostridium thermocellum* and creation of a Pta mutant. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6591–6599.
- Shahsavarani H, Sugiyama M, Kaneko Y, Chuenchit B, Harashima S. 2011. Superior thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of *rsp5* ubiquitin ligase. *Biotechnology Advances, Special issue on ACB 2011*, **30**: 1289–1300.
- Shao X, Raman B, Zhu M, Mielenz JR, Brown SD, Guss AM, Lynd LR. 2011. Mutant selection and phenotypic and genetic characterization of ethanol-tolerant strains of *Clostridium thermocellum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **92**: 641–652.
- Vinuselvi P, Park JM, Lee JM, Oh K, Ghim C, Lee SK. 2011. Engineering microorganisms for biofuel production. *Biofuels* **2**: 153–66.

- Wen F, Sun J, Zhao H. 2010. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 1251–60.
- Zhou H, Cheng J, Benjamin L, Wang BL, Fink GR, Stephanopoulos G. 2012. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* **14**: 611–622.

Sammanlagen bioprosessteknik vid framställning av biobränsle från lignocellulosa: etisk bilaga

Anton Wahlgren

Självständigt arbete i biologi 2015

Genmodifierade organismer i SBP

Vid en sammanslagen bioprosessteknik används genmodifierade organismer i syftet att producera etanolbaserade bränslen med cellulosa som substrat (Jouzani & Taherzadeh 2015). Etanolbaserade bränslen som kan tillverkas av ett förnyelsebart substrat som cellulosa är ur en miljövänlig synvinkel ett bättre alternativ till dagsläget användande av fossila bränslen. Nettoutsläppet av CO₂ blir vid bruk av förnybara bränslen nästintill obefintligt, man minskar därmed den antropogena påverkan på växthuseffekten och därmed även den globala temperaturökningen (Nino 2015).

Problematik kring genmodifiering vid forskning inom SBP

I uppsatsen behandlas två modellorganismer, *Saccharomyces cerevisiae* och *Clostridium thermocellum*, som med hjälp av bland annat rekombinant genteknik utsätts för genmanipulering för att öka deras förmåga att bryta ned cellulosa till etanol. Som alltid när man arbetar med genmodifierade organismer finns det en risk för att organismerna i fråga kan spridas till den naturliga omgivningen och konkurrera ut ursprungliga organismer vilket kan leda till att ekosystem rubbas. Man använder sig ofta av gener för antibiotikaresistens i kombination med den önskade tillförda gensekvensen för att säkerställa att man lyckats med inkorporeringen av den önskade genen (Jouzani & Taherzadeh 2015). En antibiotikaresistent organism som sprids till omgivningen kan försvåra eventuell bekämpning samt öka organismens konkurrenskraft mot ekosystemets ursprungliga organismer.

Förebyggande åtgärder mot spridning

Det bör ställas krav på företagen att det vidtas åtgärder för att minska spridningsriskerna av de genmodifierade organismerna. Åtgärder såsom att anamma ett sterilt arbetssätt vid hantering av organismerna är därför att önska och arbetsmiljön bör inspekteras av statliga tillsynsmyndigheter, till exempel de tillsynsmyndigheter som miljödepartementet råder över i Sverige.

Forskningsetik

I uppsatsen försökte jag kartlägga de framsteg som gjorts på två modellorganismer som forskare optimerar i syfte att använda inom SBP. Jag har även förklarat i uppsatsen att det bedrivs forskning på fler organismer inom SBP och varit objektiv i detta avseende. Källorna som använts i uppsatsen är vetenskapliga artiklar av antingen typen primär eller review (bakgrundsfakta). Andra faktorer som påverkat källval är: vilken tidsskrift som gjort publiceringen, om artikeln är "peer-reviewed", om artikeln har citerats tidigare, om källan fortfarande är aktuell i sammanhanget och om källan är objektiv utan ett dolt budskap.

Miljömålen i förhållande till riskerna

Forskning som leder till att man kan använda SBP för att tillverka förnyelsebara bränslen är en potentiell lösning till att minska den antropogena påverkan på växthuseffekten. Risken att genmanipulerade *C. thermocellum* och *S. cerevisiae* sprids till naturen bör ses som låg om en steril arbetsteknik används. *C. thermocellum* och *S. cerevisiae* producerar inga substanser som är patologiskt skadliga för människor, djur eller växter. Deras tillväxtoptimum ligger dessutom

vid relativt höga temperaturer (*C. thermocellum*: 50-68°C (Jouzani & Taherzadeh 2015), *S. cerevisiae*: 35-43°C (Shahsavarani *et al.* 2012)) vilket minskar risken för påverkan i många ekosystem.

Överlag anser jag att ändamålet med forskning på SBP överväger de risker som genmanipuleringen av organismerna medför, därför anser jag att produktion av etanol ur cellulosa med SBP bör ses som en etiskt försvarbar metod.