

## БІОПАЛИВНИЙ ЕТАНОЛ З ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗИ (РОСЛИННОЇ БІОМАСИ): ДОСЯГНЕННЯ, ПРОБЛЕМИ, ПЕРСПЕКТИВИ

*Світова ситуація з енергоносіями характеризується, з одного боку, постійним зростанням цін на викопне паливо, особливо нафту, а з другого — зменшенням її розвіданих запасів [17]. За деякими прогнозами, запаси нафти практично вичерпаються близько 2050 р. Водночас загальне використання енергії людством невпинно зростає. Особливо значною є потреба у пальному для автомобілей з дизельними та двигунами внутрішнього згоряння. Тому не дивно, що останніми роками актуалізуються дослідження щодо використання поновлюваної сировини, зокрема рослинної біомаси, як потенційно невичерпного джерела рідкого палива [59]. Олійні культури можуть слугувати сировиною для виробництва біодизеля, який у майбутньому здатний цілком замінити сучасне дизельне паливо з нафти. Але це справа майбутнього, а нині бензин можна використовувати для отримання сумішей з етиловим спиртом, що виробляється з рослинної біомаси.*

*Автор огляду аналізує сучасний стан і перспективи отримання паливного етанолу з рослинної біомаси, розмірковує над питаннями здійснення відповідних досліджень в Україні та пошуку джерел їхнього фінансування.*

Отримання етанолу та алкогольних напоїв за обсягом продажу донині вважається найбільшою галуззю біотехнології. Світове виробництво етанолу, за даними 1998 р. становило 31,2 млрд л, з яких лише 7% одержано хімічним способом з газу або вугілля, а 93% — шляхом мікробної ферментації. Слід зазначити, що тільки 15% етанолу використовується для приготування міцних спиртних напоїв, ще 15% — у хімічній промисловості та інших галузях, решта ж (70%) — як автомобільне паливо у двигунах внутрішнього згоряння. Найбільшими його виробниками є Бразилія (13,5 млрд л) і США (6,4 млрд л) (дані 1998 р.). Сполучені Штати останніми роками значно нарощують виробництво етанолу, продукція якого в 2004 р. становила 12,5 млрд л (приріст виробництва — 17% на рік), а в 2012 р. планують отримати майже 20 млрд л [31]. Практично весь етанол, що

виробляє Бразилія, надходить у паливний сектор, тоді як США використовує його з цією метою близько 90%. У 1998 р. уся Європа виробила 4,7 млрд л етанолу, з яких понад 2 млрд л припадало на країни ЄС, де спостерігається значний інтерес до паливного етанолу. Згідно з Директивою Комісії ЄС 2003/30/ЄС частка біопалива в загальному вмісті традиційного палива має зрости з 2% у 2005 р. до не менш як 5,75% у 2010 р. Уряд Швеції планує, що в 2010 р. частка етанолу в загальному споживанні палива в транспортному секторі становитиме 15% [57]. Однак сьогодні, крім Бразилії, яка замінила не менше 20% бензину на етиловий спирт, частка етанолу в загальному споживанні рідкого палива ще незначна. Наприклад, у 1998 р. автомобілі США використали 450 млрд л рідкого палива, тобто частка етанолу (6,4 млрд л, або 1,4%) була дуже незначною.

Україна в 2002 р. виробила 0,26 млрд л етанолу, з яких 73% використано для одержання спиртних напоїв і близько 30 млн л — як додаток до бензину. Водночас потужності існуючих спиртових заводів завантажені лише на 40%. Тому «Програмою розвитку спиртової, лікєро-горілчаної та виноробної галузей на 2003—2007 роки», затвердженою Постановою Кабінету Міністрів України від 1 квітня 2003 р. № 451, передбачалося довести виробництво етанолу, використовуваного як додаток до бензину, до 0,21 млрд л у 2005 р. і 0,35 млрд л у 2007 р., що дало б змогу, зокрема, повністю завантажити існуючі потужності спиртових заводів. Зазначена програма є розвитком прийнятої у 2000 р. Кабінетом Міністрів України Постанови «Про затвердження програми «Етанол» від 4 липня 2000 р. № 1044, що передбачала розширення використання етилового спирту як енергоносія та сировини для промисловості. Прийнято Закон України «Про альтернативні види рідкого та газового палива» від 14 січня 2000 р. № 1391-XIV. Він визначає правові, соціальні, економічні, екологічні та організаційні засади виробництва і споживання альтернативних видів рідкого та газового палива на основі залучення нетрадиційних джерел і видів енергетичної сировини і спрямований на створення необхідних умов для розширення виробництва і використання цих видів палива в Україні.

Слід нагадати, що наприкінці XIX ст. Генрі Форд конструював двигуни своїх перших автомобілів з розрахунку саме етанолу як пального і вже пізніше, після відкриття потужних родовищ нафти, використання його стало нерентабельним. Нафтова криза 1973 р. зумовила появу національної програми у Бразилії, спрямованої на виробництво пального етанолу з цукрової тростини, та програми випуску так званого «газохолу» (суміші, що складається з 90% бензину і 10% етанолу) з кукурудзяного крохмалю у США [77]. Підраховано, що за час існування Бразиль-

ської програми ця країна заощадила не менше 75 млрд доларів США на імпорті нафтопродуктів [84]. Нині практично весь етанол на планеті, зокрема і паливний, отримують із традиційної сировини: цукру (сахарози) та крохмалю, причому в Бразилії задіяна для цього цукрова тростина, а у США — кукурудзяний крохмаль. Інші країни теж використовують для виробництва етанолу цукор або крохмаль, наприклад, в Україні етиловий спирт одержують з крохмалю злаків і картоплі або ж з м'яси (відходи цукроварень). Технологія отримання етанолу з цукру добре опрацьована, а щодо крохмалю, то тут ще залишається багато можливостей для удосконалення процесу.

Які ж існують переваги та можливі недоліки застосування етанолу порівняно з бензином? Передовсім це економічні та екологічні чинники. Про економічні вже згадувалось. Отримання етанолу з цукрової тростини, скажімо, в Бразилії є високорентабельним процесом [84]. Виробництво ж його з крохмалю потребує додаткового етапу гідролізу крохмалю до глюкози, отже, є менш рентабельним. Тому в США до 2007 р. діє спеціальний пільговий податок для виробників паливного етанолу, що забезпечує рентабельність процесу навіть за ціни 15 дол. за барель сирої нафти (1 л паливного етанолу з крохмалю в 1999 р. коштував 34 центи). Нині, за ціни 60 дол. за барель нафти, виробництво паливного етанолу з крохмалю може стати рентабельним навіть без податкових пільг.

Характеризуючи якості етанолу як моторного пального, слід зазначити, що у нього, на відміну від бензину, вище октанове число і вищий тиск парів. Однак внаслідок наявності кисню в його молекулі вагова частка етанолу містить на 33% менше енергії, ніж така сама — вуглеводню (бензину) [42, 86]. Застосуванню етанолу як моторного пального сприяє можливість використання бензино-етанольних сумішей з 25%-м умістом етанолу існуючими двигунами без їх переробки

[84]. Важливими є екологічні переваги етанолу як пального. Внаслідок неповного згоряння бензину вихлопні гази автомобілів містять значні кількості токсичних чадного газу, закису та окису азоту. Спалювання у двигунах чистого етанолу або додавання до бензину кисневмісних добавок, чим і є етанол, істотно знижує вміст чадного газу та інших продуктів неповного окиснення у вихлопних газах. Можливо, ще значнішим є екологічний ефект від біотехнологічно отриманого етанолу як палива з огляду на глобальне потепління, спричинене здебільшого додатковою емісією в атмосферу двоокису вуглецю; останній є наслідком спалювання викопного палива. Спалювання ж етанолу, одержаного з біомаси, не призводить до викидів у повітря додаткового CO<sub>2</sub>, адже ці його кількості і так вивільнилися б унаслідок кругообігу вуглецю завдяки життєдіяльності мікроорганізмів.

Етанол — досить дешевий біотехнологічний продукт, оскільки ціна сировини (цукру, крохмалю) становить 40% його вартості [87]. Сировинна ж база для отримання цукру та крохмалю є обмеженою. Тому останніми десятиліттями дедалі більшу зацікавленість викликає рослинна біомаса, як потенційна сировина для виробництва паливного етанолу, а запаси її справді безмежні. Сюди входять відходи сільського господарства (солома, кукурудзяні качани, соняшникова лузга тощо), деревообробної та целюлозно-паперової промисловості (гілки, тирса, кора дерев, сульфатні лужні золи), комунальні відходи, що на 40–50% складаються з рослинної біомаси. Розглядається також можливість спеціального культивування швидкорослих рослин (сорго, вільха, осика) з метою подальшої переробки біомаси всієї рослини для одержання етанолу. Глобальна продукція такої біомаси становить 200·10<sup>9</sup> т на рік, причому 90% її — це так звана лігноцелюлоза (гетеробіополімер, що складається з целюлози, різних геміцелюлоз та лігніну) [52, 63]. Підраховано, що лише переробка макулатури та

комунального сміття у США могла б щороку давати 400 млрд л етанолу [54], а потенційно ця країна може переробляти 2,45<sup>3</sup> млрд т лігноцелюлози, продукуючи щорічно 1050 млрд л етанолу (це більш як удвічі перевищує річне споживання бензину у Сполучених Штатах) [7].

#### СТРУКТУРА ТА ГІДРОЛІЗ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗИ

Лігноцелюлоза набагато комплексніша структура порівняно з крохмалем чи особливо сахарозою. Цим, власне, й пояснюється те, що поки не розроблено її рентабельної технології для конверсії в етанол.

Розглянемо структуру лігноцелюлози детальніше. Середній вміст у ній целюлози становить 45%, геміцелюлоз — 30 і лігніну — 25% [85]. Ці цифри дуже усереднені. Вміст целюлози може коливатися у відсотках: від 15 у листях чи 25 у шкаралупі горіхів до 95 у волоськах насіння бавовника і 85–99 у папері; геміцелюлози — від 0 у папері та 5–20 у волоськах насіння бавовника до 50 у пшеничній соломі і 85 у листях, а лігніну — практично від 0 у папері та листях до 40 у горіховій шкаралупі [12, 77]. Целюлоза та геміцелюлози є полімерами цукрів, тоді як лігнін — ароматичний гетерополімер. Лише продукти гідролізу полімерів цукрів (целюлози і геміцелюлози) можуть бути використані як субстрати для біотехнологічної конверсії в етанол.

Целюлоза — найпоширеніший лінійний полімер у природі, що складається з тисяч молекул безводної глюкози, з'єднаних між собою β(1,4)-глікозидними зв'язками. Кожен ланцюг водневими зв'язками з'єднується з іншими 30–50 ланцюгами, які разом утворюють мікрофібрилу. Целобіоза формує кристалічну структуру. В складі лігноцелюлози мікрофібрили целюлози оточені шарами геміцелюлози та лігніну, тому вона дуже стійка до гідролізу [85]. Геміцелюлози — надзвичайно розгалужені гетерополімери різних цукрів: пентоз (D-ксилоза, L-арабіноза), гексоз

(D-галактоза, L-галактоза, D-манноза, D-глюкоза, L-рамноза, L-фукоза) та уронічних кислот (головним чином D-глюкуронова кислота). Геміцелюлозу значно легше гідролізувати, ніж целюлозу [14]. Існує багато різних типів геміцелюлоз. Однією з найпоширеніших є ксилан — гетерополімер, що в основному складається із залишків ксилози, з'єднаних між собою  $\beta(1,4)$ -глікозидними зв'язками, з невеликими кількостями залишків арабінози та глюкуронової кислоти. Часто зустрічаються також галактоглюкоманнан, гетерополімер, основний ланцюг якого складається із залишків маннози (більшість) і глюкози. До ланцюга приєднані залишки галактози та ацетильні залишки [8]. Лігнін — найрозповсюдженіший ароматичний полімер у природі, що складається з трьох ароматичних спиртів, транс-пара-кумарилового, транс-пара-коніферилового, транс-пара-синапілового та деяких ароматичних кислот [41].

Ферментація лігноцелюлози здійснюється у кілька етапів: попередня обробка разом з делігніфікацією (відокремлення лігніну), гідроліз та спиртове бродіння (алкогольна ферментація) (рис. 1). Попередня обробка потрібна для часткового руйнування мікрофібрил целюлози, зменшення ступеня її кристалізації та полімеризації, вилучення геміцелюлози, руйнування комплексу целюлози з лігніном та модифікації структури лігніну, збільшення поверхні, доступної для дії гідролізуючих ферментів, а також для видалення лігніну (делігніфікації) [76, 84]. Попередня обробка передбачає механічне подрібнення рослинної біомаси, обробку перегрітою парою або ж дію кислот чи лугів для делігніфікації. Перспективним способом делігніфікації лігноцелюлози може стати використання грибів, здатних деградувати цей полімер, наприклад *Phanerochaete chrysosporium* [28]. У результаті попередньої обробки досягається не лише делігніфікація, а й частковий гідроліз геміцелюлоз та целюлози.

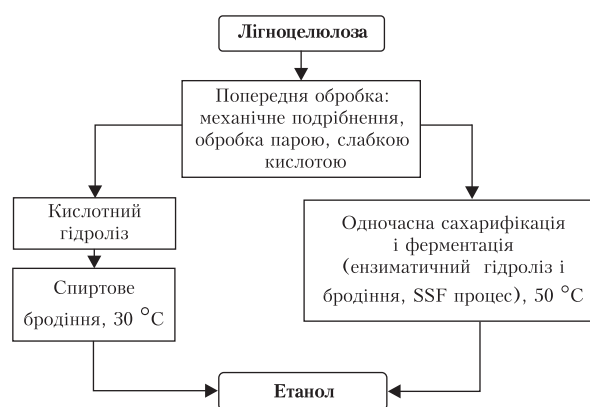


Рис. 1. Технологічні етапи перетворення лігноцелюлози до етанолу

Гідроліз целюлози та геміцелюлоз до моносахаридів відбувається за участю кислот або ферментів. Кислотний гідроліз здійснюють розведеною сірчаною кислотою або ж концентрованими сірчаною чи соляною кислотами. Гідроліз розведеною кислотою [78] є класичним і найдешевшим методом, проте він має певні недоліки. Зокрема, це утворення великих кількостей токсичних побічних продуктів, які гальмують ріст і ферментацію мікроорганізмів (фурфурол і метилфурфурол, оцтова та мурашина кислоти, феноли), а їх детоксикація досить дорога [50, 89]. Важливим підходом може стати також селекція мутантів мікроорганізмів, резистентних до зазначених інгібіторів. Під час гідролізу концентрованими кислотами утворюється менше побічних токсичних продуктів, однак цей процес дорожчий і породжує серйозні екологічні проблеми. Найефективнішим і найперспективнішим методом гідролізу попередньо обробленої лігноцелюлози є ферментативний, який, загалом, не дає жодних токсичних побічних продуктів [32]. Він відбувається за участю целюлаз та геміцелюлаз про- й еваріотичних мікроорганізмів, головним чином грибів. Найкраще вивчено целюлозний комплекс гриба *Trichoderma reesei* [2, 5, 54]. Він складається з п'яти ферментів, двох целобіогідролаз, двох ендоглюконаз і целобіази ( $\beta$ -глю-

козидаза). Целобіогідролази та ендоглюканази мають ідентичну послідовність розміром 35 амінокислотних залишків, що відповідає за зв'язування з фібрилами кристалічної целюлози. Кінцевим продуктом дії цих ферментів є дисахарид целобіоза, яка розщеплюється до глюкози целобіазою. Серед геміцелюлаз найбільше застосування знайшли ксиланази.

Упровадженню ферментативного гідролізу в практику заважає кілька чинників, одним з яких є висока ціна. Інший негативний фактор — сильне гальмування ферментативного гідролізу моно- та олігосахаридами, що звільняються під час дії целюлаз і геміцелюлаз, тобто гальмування кінцевим продуктом [32]. Для подолання цього ферментативний гідроліз (сахарифікацію) слід проводити водночас і разом з мікроорганізмами, які ферментують звільнені цукри до етанолу. Показано, що такий процес (так звана одночасна сахарифікація і ферментація — Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) є значно продуктивнішим порівняно з роздільними процесами сахарифікації та ферментації [89]. Однак тут існує нерозв'язана проблема — оптимальна температура для дії целюлаз і геміцелюлаз — близько 50–55 °С, тоді як оптимальна температура для більшості відомих мікроорганізмів, що здійснюють спиртове бродіння, коливається у межах 30–40 °С [32]. Пошуки термотолерантних видів дріжджів, здатних ферментувати основні цукри гідролізувати лігноцелюлози за температур близько 50 °С, досі не були результативними. Загальну схему етапів конверсії лігноцелюлози до етанолу подано на рис. 1.

#### **МІКРОБНА ФЕРМЕНТАЦІЯ ЦУКРІВ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗИ**

Зрозуміло, що вимоги до мікроорганізму, який здійснює алкогольну ферментацію цукрів гідролізувати лігноцелюлози, є значно вищими, ніж до організму, котрий ферментує продукт гідролізу крохмалю (глюкозу) або ж сахарозу (пекарські дріжджі *Saccharomyces*

*cerevisiae*). Мікроорганізм, що зброджує гідролізат лігноцелюлози, повинен бути здатним ефективно ферментувати принаймні основні цукри гідролізувати, якими є глюкоза (середній вміст 40%) та ксилоза (30%), а також маннозу, галактозу та L-арабінозу (вміст останнього цукру значний у деяких гідролізатах, наприклад, вміст арабінози у качанах кукурудзи досягає 10%) [33]. Ефективність ферментації визначається двома головними критеріями: виходом етанолу (1 г етанолу, утвореного з 1 г вуглецевого субстрату) і продуктивністю (1 г етанолу, утвореного в 1 л ферментера за 1 год). Вважається, що вихід етанолу має становити хоча б 90% теоретично можливого, а продуктивність процесу — не менше 1 г етанолу в 1 л за 1 год. Додатковими вимогами до штама, використовуюваного в алкогольній ферментації лігноцелюлози, є: висока стійкість до утворюваного етанолу; максимальна термотолерантність для можливості проведення SSF процесу; стійкість до токсичних речовин, які утворюються під час гідролізу; мінімальна кількість побічних продуктів; здатність до одночасної утилізації вуглецевих субстратів; непатогенність; мінімальні поживні потреби та деякі інші.

Нині не виявлено у природі і не сконструйовано в лабораторії жодного мікроорганізму, який би цілком відповідав усім переліченим критеріям. Враховуючи велике народногосподарське значення цієї проблеми, над створенням ефективних продуцентів паливного етанолу з лігноцелюлози працюють дослідники багатьох сучасних лабораторій у розвинених країнах — таких, як США, Канада, Швеція, Данія, Фінляндія, Німеччина, Китай тощо. Впродовж останніх 15 років у світовій літературі з'явилося не менше 1200 статей з проблем алкогольної ферментації лігноцелюлози, тобто щороку друкується близько 80–100 статей з цієї тематики. Звичайно, висвітлити всі напрями робіт неможливо, тому спинимося на найголовніших.

У природі існують лише два мікроорганізми, здатні до ефективної алкогольної ферментації глюкози та сахарози, — дріжджі *S. cerevisiae*, що традиційно, впродовж тисяч років, застосовуються для отримання етанолу та спиртових напоїв, і бактерії *Zytopomonas mobilis*, яких використовують у виробництві алкогольного напою «пульке» із соку агави в Мексиці. Обидва мікроорганізми виявляють високу стійкість до етанолу, витримуючи його до 18% (дріжджі) і 12% (бактерії). *S. cerevisiae* — найкраще вивчений евкаріотичний організм, для якого добре опрацьовано сучасні методи молекулярної генетики та метаболічної інженерії. *Z. mobilis* теж достатньо добре вивчено, відома повна послідовність його генома [31]. Проте ці організми не можуть ферментувати пентози і є мезофілами (оптимальна температура для росту і ферментації дріжджів — 30 °С, бактерій — 30–40 °С) [89].

Ключовою проблемою у метаболічній інженерії продуцентів етанолу з лігноцелюлози є конструювання мікроорганізмів, здатних ефективно ферментувати хоча б основні цукри лігноцелюлози: глюкозу, інші гексози та ксилозу. З ферментацією глюкози та інших гексоз немає проблем, однак необхідно сконструювати штами, які могли б також ефективно ферментувати ксилозу (бажано й L-арабінозу), тобто розширити спектр ферментованих субстратів. Водночас відомі деякі бактерії та дріжджі, здатні ферментувати не лише глюкозу, а й ксилозу, хоча вони виявляють недостатню стійкість до етанолу, ефективність ферментації у них невисока. Існує два основних підходи в цих роботах. Більшість дослідників працює з усталеними продуцентами етанолу (*S. cerevisiae*, *Z. mobilis*), намагаючись увести в них гени метаболізму ксилози й арабінози з інших організмів та підвищити вихід і продуктивність синтезу етанолу в таких штамів шляхом додаткових генно-інженерних маніпуляцій. Інші дослідники прагнуть поліпшити параметри ферментації гексоз та пентоз у мікроорганізми

(бактерії *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, дріжджі *Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha*), які ніколи не використовувалися для отримання етилового спирту. Коротко розглянемо обидва підходи.

Слід зазначити, що економічно вигідної технології одержання етанолу з лігноцелюлози ще не опрацьовано. Тому нині порівнюють властивості різних сконструйованих організмів, бактерій та дріжджів у лабораторних умовах та дослідних установках. Хоча вихід етанолу і продуктивність процесу вища для бактерій, дріжджі також мають свої технологічні переваги. Клітини дріжджів більші за розміром, тому їх легше відокремити від культуральної рідини, вони не чутливі до фаголізису. Крім того, слід пам'ятати, що людство використовувало дріжджі для промислового виробництва етанолу з конвенційної сировини впродовж кількох століть, тому існує відпрацьована технологія, яка з певними модифікаціями може застосовуватися і для одержання етанолу за участю дріжджів з лігноцелюлози.

#### МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ДРІЖДЖІВ *S. CEREVISIAE*

**К**онструювання штамів, що ферментують ксилозу внаслідок експресії генів *P. stipitis*. Дріжджі *S. cerevisiae* неспроможні метаболізувати ксилозу, але в середовищі з ксилулозою у напіванаеробних умовах нагромаджують незначні кількості етанолу [56]. Ксилулоза фосфорилується ксилулокіназою (ген *XKS1*) до ксилулозо-5-фосфату [19], який у реакціях неокисної частини пентозофосфатного шляху перетворюється до інтермедіатів гліколізу (фруктозо-6-фосфат, гліцеральдегід-3-фосфат). Останні, у свою чергу, можуть перетворюватися до етанолу (рис. 2). Тому дослідники вирішили ввести у геном *S. cerevisiae* гени, які кодуєть ферменти перетворення ксилози до ксилулози, сподіваючись, що відповідні рекомбінантні штами ефективніше утворюватимуть етанол у

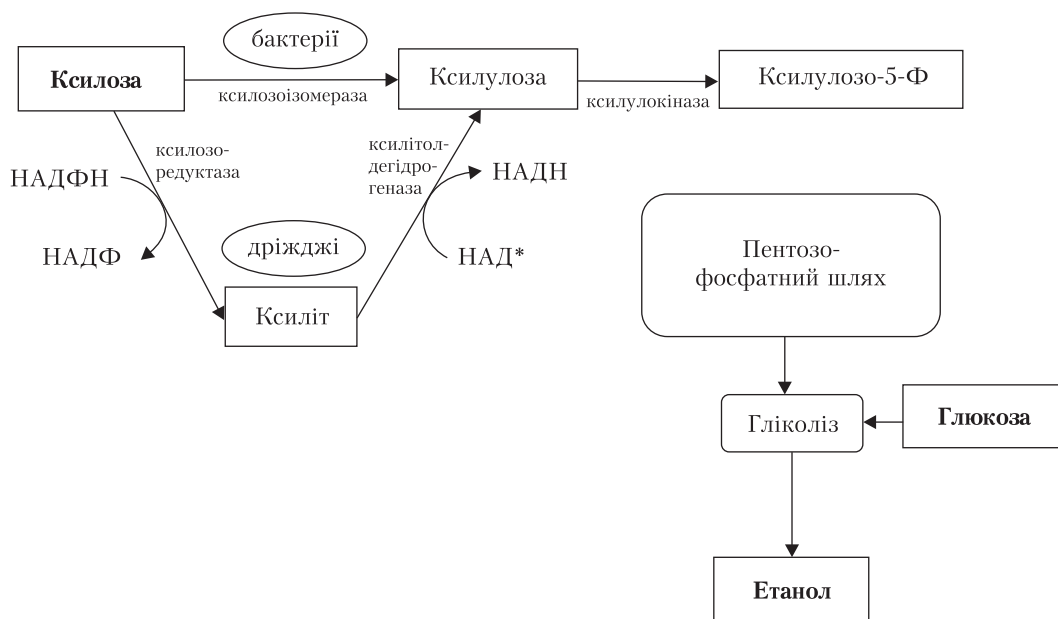


Рис. 2. Схема перетворення ксилози і глюкози до етанолу

середовищі з ксилозою. Дійсність виявилась, однак, набагато складнішою.

У мікроорганізмів існує два шляхи перетворення ксилози до ксилулози. У бактерій наявний фермент ксилосоізомераза, яка безпосередньо перетворює ксилозу до ксилулози [25]. Дріжджі ж спочатку відновлюють ксилозу до ксиліту в реакції, що каталізує ксилосоредуктаза (відповідний ген у *P. stipitis* позначається *XYL1*), а у подальшій реакції, яку каталізує ксилітолдегідрогеназа (ген *XYL2*), ксиліт перетворюється до ксилулози. У більшості дріжджів, що засвоюють ксилозу, ксилосоредуктаза є НАДФН-залежною (інший продукт реакції – НАДФ), а ксилітолдегідрогеназа – НАД-залежною (продукт реакції – НАДН). Фермента трансгідрогенази, який би перетворював НАДН (продукт другої реакції) до НАДФН (субстрат першої реакції), у дріжджів немає, що спричинює так званий дисбаланс кофакторів. Тому в більшості дріжджів, які можуть ферментувати ксилозу до етанолу, внаслідок зазначеного дисбалансу частина ксилози перетворюється до ксиліту, що виділяється у середовище [33, 34].

Єдиним видом дріжджів, який практично не виділяє ксиліту в процесі ферментації ксилози, виявилися *Pichia stipitis*, тому саме вони використовувались як джерело генів *XYL1* та *XYL2*, що кодують ксилосоредуктазу та ксилітолдегідрогеназу, для введення у клітини *S. cerevisiae* [43]. Отримані трансформанти росли і слабо ферментували ксилозу, а додаткова надекспресія гена, що кодує ксилулокіназу, істотно поліпшувала продукцію етанолу [27, 37]. Однак, на відміну від диких штамів *P. stipitis*, трансформанти *S. cerevisiae* секретували в середовище ксиліт і нагромаджували значно менше етанолу. Причини цього не зовсім зрозумілі.

Проведено кілька серій робіт з поліпшення характеристик ферментації ксилози рекомбінантними штамми *S. cerevisiae*. Показано, що білкова інженерія ксилосоредуктази, яка зумовлює зменшення спорідненості до НАДФН, поліпшує параметри алкогольної ферментації ксилози [35]. Інший перспективний підхід полягав у скороченні пулу внутрішньоклітинного НАДФН унаслідок дефекту глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, що

є одним з основних джерел цього кофериенту в клітині [36]. Отримані штами сприяли підвищеному виходу етанолу, однак їх ріст був послаблений.

Ще один підхід до поліпшення параметрів ферментації ксилози у *S. cerevisiae* полягав у надекспресії чотирьох власних генів неокислюваної частини пентозофосфатного шляху (рибозофосфатізомерази, рибулозофосфатпімерази, трансальдолази, транскетолази) і делетування гена альдозоредуктази [40], або надекспресії лише одного гетерологічного гена трансальдолази з *P. stipitis* [37].

Цікавим може виявитися ще один спосіб поліпшення параметрів ферментації ксилози — введення у пекарські дріжджі генів бактерій, що кодують фосфокетолазу та фосфотрансацетилазу разом з геном найпростішого, який кодує ацетальдегіддегідрогеназу [73]. Відповідні рекомбінантні штами здатні розщеплювати ксилулозо-5-фосфат до гліцеральдегід-3-фосфату (безпосередній попередник етанолу) та ацетилфосфату, який під впливом гетерологічних фосфотрансацетилази й ацетальдегіддегідрогенази також перетворювався до етанолу. Цікаво, що трансформанти *S. cerevisiae*, які отримали гени *P. stipitis* метаболізму ксилози, могли рости на цьому цукрі лише за аеробних умов. Шляхом «еволюційної інженерії» за допомогою тривалого культивування вихідного рекомбінантного штама в хемостаті в середовищі з ксилозою за умов низького парціального тиску кисню отримано штам *S. cerevisiae*, здатний рости і ферментувати ксилозу в анаеробних умовах [72]. Однак і сьогодні кращі рекомбінантні штами *S. cerevisiae* не перевершують або ж поступаються за характеристиками алкогольної ферментації ксилози дикому штамму *P. stipitis* [33].

*Експресія ксилозоізомерази у дріжджів S. cerevisiae.* Перший підхід у конструюванні ефективного продуцента етанолу з ксилози у *S. cerevisiae* полягав в експресії генів бактерійної ксилозоізомерази, ферменту, що не

потребує кофакторів. У разі ефективної експресії ксилозоізомерази в клітинах дріжджів проблема дисбалансу кофакторів не повинна поставати й ефективність алкогольної ферментації мала б підвищуватися. Проте більшість спроб експресувати гени ксилозоізомерази з багатьох прокариотичних організмів були безуспішними. Як правило, дріжджові трансформанти синтезували відповідний білок, але він виявився неактивним [25]. Лише під час трансформації *S. cerevisiae* геном ксилозоізомерази термофільної бактерії *Thermus thermophilus* дріжджі утворювали активний фермент і були здатні до незначної утилізації ксилози, однак максимальна активність ксилозоізомерази спостерігалася за 85 °С, тоді як за оптимальної для росту дріжджів температури (30 °С) ензиматична активність не визначалася [83]. Низький рівень метаболізму трансформантів також залежав від наявності у *S. cerevisiae* альдозоредуктази, що відновлює ксилозу до ксиліту, який є інгібітором ксилозоізомерази. Були отримані трансформанти з делецією гена альдозоредуктази [79]. Крім того, проведено мутагенез гена ксилозоізомерази і знайдено такі мутантні форми ферменту, які забезпечують певну (хоч і дуже низьку) його активність за 30 °С [53], а отримані в результаті таких маніпуляцій штами виявляли поліпшені характеристики алкогольної ферментації ксилози [25].

Другий підхід до експресії ксилозоізомерази в клітинах *S. cerevisiae* базується на спостереженні, що анаеробний гриб *Piromyces* sp. E2, подібно до бактерій, використовує для метаболізму ксилози ксилозоізомеразу [26]. З'ясувалося, що ксилозоізомераза гриба ефективно експресується в клітинах дріжджів і вони слабо росли на ксилізі [45]. У подальшому отримано штами, які значно краще ростуть на ксилізі і ферментують цей цукор в аеробних, а потім — і в анаеробних умовах [48]. Але швидкість утилізації та ферментації ксилози була низькою. Надекспресія ксилулокінази і чотирьох генів, що кодують



ферменти пентозофосфатного шляху (рибозофосфатізомерази, рибулозофосфатепімерази, транскетолази і трансальдолази), значно поліпшувала ріст і характеристики алкогольної ферментації ксилози в анаеробних умовах [46]. За допомогою тривалого культивування у хемостаті в умовах селекційного тиску («еволюційна інженерія») з останнього штаму отримано штам, у якого глюкоза менше гальмує ферментацію ксилози [47]. Одержані штами *S. cerevisiae* є прикладом успішного застосування різних прийомів метаболічної інженерії у конструюванні ефективного штаму для промислового використання. Одним із способів поліпшення цих штамів може бути експресія у клітинах *S. cerevisiae* ефективніших гетерологічних транспортерів ксилози, активність яких не гальмується глюкозою.

*Конструювання штамів, здатних ферментувати L-арабінозу.* Природних штамів мікроорганізмів, спроможних до алкогольної ферментації арабінози, не виявлено. Хоча відомі бактерії, дріжджі та гриби, що можуть використовувати цю пентозу як єдине джерело вуглецю та енергії для росту. Шляхи метаболізму арабінози у грибів і бактерій різняться. Для створення таких рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* дріжджі трансформували грибними або бактерійними генами, що кодують ферменти катаболізму арабінози. Введення у дріжджі двох грибних генів, які кодують L-арабінітолдегідрогеназу та L-ксилозоредуктазу, генів *P. stipitis* для ксилозоредуктази та ксилітолдегідрогенази разом з надекспресією власного гена ксилулокінази дало змогу створити штами *S. cerevisiae*, спроможні рости і слабо ферментувати L-арабінозу [66]. Було також експресовано три гени *araBAD* арабінозного оперону з *Escherichia coli* у *S. cerevisiae*. Трансформанти виявляли активність усіх трьох відповідних ферментів метаболізму арабінози, але не могли рости на цій пентозі [68].

Результативнішими виявились експерименти, здійснені іншою групою авторів, які

експресували в дріжджах ген *araA Bacillus subtilis*, гени *araB, araD E. coli* та надекспресували власний ген *GAL2*, що кодує галактозопермеазу, яка переносить у клітину й арабінозу. Отриманий трансформант слабо ріс у середовищі з арабінозою, однак у результаті «еволюційної інженерії» утворився штам з поліпшеним ростом на цьому цукрі, тобто у нього відбулися зміна структури бактерійної L-рибулокінази і дерепресія дріжджової трансальдолази [9]. Такий штам виявився спроможним ферментувати L-арабінозу до етанолу, причому значно ефективніше, ніж штам, у який введено грибні гени метаболізму цього цукру.

#### МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ БАКТЕРІЇ *Z. MOBILIS*

Для перетворення глюкози на етанол *Z. mobilis* використовує метаболічний шлях Ентнера—Дудорова, який енергетично менш вигідний порівняно з гліколізом. Тому ця бактерія виявляє значно вищі, на відміну від дріжджів, швидкість і продуктивність процесу та вихід етанолу під час ферментації глюкози, що сягає 97% теоретично можливого [90]. Однак цей організм не спроможний метаболізувати пентози. Тому в нього було введено чотири гени з кишкової палички *E. coli* — організму, що росте на ксилізі: *xyIA, xyIB, talB, tktA*, які кодують ксилізоізомеразу, ксилулокіназу, трансальдолазу і транскетолазу, відповідно. Отриманий трансформант активно ферментував цей цукор як з модельних розчинів, так і з гідролізатів лігноцелюлози [13]. Для конструювання штаму *Z. mobilis*, здатного ферментувати L-арабінозу, в нього вводили п'ять генів *E. coli* — *araA, araB, araD, talB, tktA*, що кодують, відповідно, ізомеразу, кіназу, епімеразу, трансальдолазу і транскетолазу [18]. Одержаний штам ріс і ферментував арабінозу до етанолу. На основі цих даних було сконструйовано штам *Z. mobilis*, що ніс сім генів *E. coli*, необхідних для метаболізму ксилізи й арабінози, який ефективно ферментував обидва цукри: на суміші кси-

лози і арабінози вихід етанолу становив 82–84% теоретично можливого [91]. Однак при перевірці ферментації реальних гідролізатів лігноцелюлози рекомбінантний штам, що ферментує ксилозу й арабінозу, виявився чутливішим до токсичних продуктів гідролізатів порівняно зі штамом дикого типу [51].

### МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ БАКТЕРІЇ *E. COLI* З МЕТОЮ СТВОРЕННЯ ЕТАНОЛОГЕННИХ ШТАМІВ

Кишкова паличка є найкраще вивченим прокаріотичним організмом, а протягом останніх десятиліть *E. coli* стала важливим промисловим продуцентом гетерологічних білків та деяких амінокислот [6]. Цей мікроорганізм здатний метаболізувати всі основні цукри гідролізатів лігноцелюлози і здійснювати ферментацію так званого змішаного типу, продуктами якої є практично рівні кількості етанолу, лактату, ацетату і форміату. Він не вибагливий до поживного середовища, відносно резистентний до етанолу, витримує 5%-ві його концентрації, оптимальними умовами ферментації є температура 35 °С і кислотність 7 [89].

Завдання метаболічної інженерії полягало у створенні так званого етанологенного штама *E. coli*, який би ферментував гексози і пентози лігноцелюлози лише до етанолу. Конструювання етанологенних штамів *E. coli*, проведене в кілька етапів, стало першим прикладом успішного застосування метаболічної інженерії. Основним етапом роботи було клонування генів *pdc* та *adhB* *Z. mobilis*, що кодують піруватдекарбоксилазу й алкогольдегідрогеназу, під спільним *PET* промотором (так званий *PET* оперон) і їхня інтеграція у хромосому *E. coli* [29]. Потім проводили селекцію трансформантів *E. coli* класичними методами та делетували ген фумаратредуктази для елімінації здатності накопичувати сукцинат як побічний продукт ферментації, в результаті чого отримали штам КО11, що виявляв високу активність піруватдекарбоксилази й алкогольдегідрогенази і нагро-

маджував етанол як єдиний продукт ферментації гексоз і пентоз [61]. Цей штам ефективно ферментує гексози та пентози з їхніх сумішей у реальних гідролізатах лігноцелюлози [30] і нині вважається одним з найефективніших штамів, здатних ферментувати лігноцелюлозу [13, 89]. Є повідомлення про отримання мутантів зі штама КО11 із збільшеною стійкістю до етанолу [88].

Подібні експериментальні підходи використані при конструюванні етанологенних штамів іншої кишкової бактерії – *Klebsiella oxytoca*. Цей організм, на відміну від *E. coli*, може утилізувати целобіозу, ксилобіозу та інші продукти неповного гідролізу полімерів лігноцелюлози. Введення у клітину цієї бактерії *PET* оперону зумовило утворення етанолу як основного продукту ферментації лігноцелюлози [16]. Додаткова інсерція в клітину гена ендоглюканази з *Clostridium thermoaceticum* та генів, що забезпечують посилення секреції білків з *Erwinia chrysantemi*, викликала синтез і секрецію ферменту, здатного гідролізувати целюлозу [92].

### МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ *P. STIPITIS*

Серед природних штамів дріжджів *P. stipitis* найефективніше ферментує ксилозу до етанолу і практично не нагромаджує ксиліт під час ферментації [32, 33]. Як уже зазначалося, дикі штами *P. stipitis* не поступаються за характеристиками ферментації ксилози найкращим рекомбінантним штамам *S. cerevisiae*. На відміну від *S. cerevisiae*, *P. stipitis* не може рости і ферментувати у цілком анаеробних умовах, а в цілком аеробних останній вид окиснює ксилозу до CO<sub>2</sub>, тому для максимального нагромадження етанолу ферментацію ведуть за умов незначної аерації. Делеція гена *CYC1*, що кодує цитохром *c*, спричинює послаблення росту на кsilозі, тоді як кількість нагромадженого етанолу не змінюється, тобто зростає продуктивність ферментації [69]. *P. stipitis* містить альтернативну оксидазу, чутливу до саліцил-

гідроксамату, що не бере участі в окисному фосфорилуванні. Показано, що делеція такої альтернативної оксидази *STO1* зумовлює зростання продукції етанолу і не впливає на ріст організму [70]. Опрацьовано ауксанографічний метод селекції мутантів цього виду, спроможних продукувати збільшені кількості етанолу в середовищі з ксилозою [24]. Дріжджі *P. stipitis* мають значний біотехнологічний потенціал, для них розроблено методи класичної [58] та молекулярної [34] генетики, а нещодавно закінчено повне секвенування геному названого організму. Клоновано десятки генів цього виду, вивчено особливості регуляції експресії деяких із них [32–34]. Зокрема, показано, що експресія гена *ADH2*, задіяного в утворенні етанолу, активується за умов гіпоксії [62]. Хоча ще дуже мало відомо про особливості регуляції ферментації ксилози цього організму, а відповідні регуляторні гени не ідентифіковано.

Крім *P. stipitis*, виявлено деякі інші види дріжджів, здатних до алкогольної ферментації ксилози, зокрема *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Candida tenuis*, *Pichia segobiensis*, *Brettanomyces naardensis*, причому для *P. tannophilus* розроблено методи генетичної трансформації і клоновано кілька генів [33]. За своїми властивостями ці дріжджі подібні до *P. stipitis*, який є модельним об'єктом для всіх природних ксилозо-ферментуючих дріжджів. Відомо, що певні види роду *Brettanomyces* виявляють надзвичайно високу стійкість до етанолу, що може перевищувати навіть відповідний показник *S. cerevisiae*. Тому розробка генетичних методів аналізу дріжджів роду *Brettanomyces* та ідентифікація генів, які забезпечують високу стійкість клітин до етанолу, становлять значний інтерес.

#### МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

Термотолерантні метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* є об'єктом фундаментальних праць у вивченні молекулярних механізмів

біогенезу та деградації пероксисом [1, 3, 20, 74], катаболітної репресії [4, 75], механізму відповіді еукаріотичної клітини на фактори метаболічного стресу [80, 81]. Вони також — один з найпопулярніших біотехнологічних об'єктів для отримання продуцентів гетерологічних білків медичного призначення [21, 22, 44]. Для них добре розроблено методи класичної і молекулярної генетики [39, 49], відома повна послідовність геному [64]. Ці дріжджі мають дуже сильні регульовані та конститутивні промотори [23, 39]. Максимальна температура росту цього виду дріжджів становить 50 °С, що є абсолютним рекордом серед усіх дріжджів, і лише на 10 °С нижча максимальної температури росту відомих еукаріотичних організмів [60, 65].

Проте алкогольна ферментація ксилози та інших цукрів цими дріжджами залишалася недослідженою. Ми перевірили вісім штамів *H. polymorpha*, спроможних ферментувати до етанолу глюкозу, ксилозу, маннозу, мальтозу та целобіозу, тоді як галактоза й L-арабіноза практично не підтримують ріст *H. polymorpha* [67]. Оптимальна температура для ферментації глюкози і ксилози — 37–40 °С, але навіть за 45–48 °С ферментація залишалася досить значною, що є абсолютним рекордом. Найактивніше ферментація відбувалася за умов помірної аерації або голодування клітин у флавінах, потрібних для клітинного дихання. *H. polymorpha* виявився стійкішим до токсичної дії етанолу видом, ніж *P. stipitis*, але чутливішим від *S. cerevisiae* [67]. Використовуючи згаданий вище ауксанографічний метод селекції, ізольовано мутанти *H. polymorpha*, здатні до підвищеного утворення етанолу в середовищі з ксилозою [24].

*H. polymorpha* використовує такий самий шлях метаболізму ксилози, що й інші ксилозо-ферментуючі дріжджі: він включає НАД(Ф)Н-залежну ксилоредуктазу та НАД-залежну ксилітолдегідрогеназу [82]. Ми висловили припущення, що *H. polymorpha*,

на відміну від *S. cerevisiae*, експресуватиме активну бактерійну ксилосоізомеразу. Для перевірки цього гени *XYL1* та *XYL2-A*, що кодують ксилоредуктазу та один з ізозмів ксилітолдегідрогенази, були делетовані, а відповідні нокаутні штами втрачали здатність метаболізувати ксилозу. Трансформація цих делеційних штамів бактерійними генами *xylA*, що кодують ксилосоізомеразу *E. coli* та *Streptomyces coelicolor*, відновлювала здатність трансформантів рости і ферментувати ксилозу. Трансформанти виявляли високу активність ксилосоізомерази, яка сягла 25% активності у донорних бактерійних штамів [71, 82]. Це перше повідомлення про успішну експресію бактерійних ксилосоізомераз у клітинах дріжджів. Можна сподіватися, що подальша робота в галузі метаболічної інженерії алкогольної ферментації ксилози у *H. polymorpha* (ампліфікація лімітуючих генів гліколізу та пентозофосфатного шляху, генів, які визначають стійкість до підвищеної температури й етанолу, делеція ще одного гена ксилітолдегідрогенази) дасть змогу сконструювати штами, котрі перевершать усі відомі нам за параметрами алкогольної ферментації ксилози. Максимальна температура ферментації у *H. polymorpha* (48 °C) має вперше уможливити проведення SSF процесу, тобто одночасної сахарифікації і ферментації глюкози та ксилози, оскільки ця температура близька до оптимальної для дії целюлаз і геміцелюлаз. Недоліком *H. polymorpha* є неспроможність ферментувати галактозу та L-арабінозу. Тому завданням майбутньої роботи є введення в цей організм генів з інших мікроорганізмів, що забезпечать активну ферментацію усіх основних цукрів лігноцелюлози. Досі ще не з'ясованою залишається стійкість *H. polymorpha* до токсичних продуктів (альдегіди, феноли, оцтова та мурашина кислоти), що нагромаджуються в гідролізатах лігноцелюлози під час кислотного гідролізу. Однак за умов ферментативного гідролізу кількість

таких токсичних продуктів можна звести до мінімуму. Ще одним важливим напрямом майбутніх робіт має стати експресія генів, що кодують целюлази, амілази та геміцелюлази у *H. polymorpha* з метою конструювання штамів, здатних до алкогольної ферментації лігноцелюлози одразу після її попередньої обробки.

#### ПРОМИСЛОВЕ ВИРОБНИЦТВО ПАЛИВНОГО ЕТАНОЛУ З ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗИ

Останніми роками в світі введено в дію не менше двох промислових установок з виробництва паливного етанолу з рослинних відходів. У грудні 2004 р. почав давати промислову продукцію дослідний завод в Оттаві (Канада). Він є спільним підприємством фірм «Iogen» (відомий виробник целюлолітичних ферментів), «Petro-Canada» та «Royal Dutch Shell» з річною продуктивністю 100 млн л етанолу і використовує як сировину пшеничну та кукурудзяну соломку, а також гілки дерев. Канадське підприємство на основі порівняння рекомбінантних штамів *E. coli*, *Z. mobilis* та *S. cerevisiae* у своєму виробництві застосовує штами *S. cerevisiae*, сконструйовані групою N. Но. Буде перевірено також *P. stipitis* як ферментуючий організм. У 2005 р. запрацював експериментальний завод з виробництва паливного етанолу з деревної тирси в Омсколдсвік (Швеція). Завод використовує рекомбінантні штами *S. cerevisiae*, сконструйовані групою В. Hahn-Hagerdal, і технологію, опрацьовану групою G. Zacchi. Повідомлялося про плани ввести в дію завод з переробки лігноцелюлозних залишків цукрової тростини до етанолу в Бразилії. Існуючі підприємства поки що нерентабельні, але їхня діяльність допоможе відпрацювати промислову технологію продукування паливного етанолу з лігноцелюлози, виявити критичні фактори, що впливають на економіку цієї галузі, та накреслити основні шляхи вдосконалення технології для створення рентабельного виробництва.

## ЩО РОБИТЬСЯ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ЕТАНОЛУ З РОСЛИННОЇ БІОМАСИ В УКРАЇНІ?

Наша країна гостро потребує альтернативних джерел енергії взагалі та рідкого палива зокрема. Як зазначалося вище, вона продукує значні кількості етанолу і має резерви збільшення його виробництва, зокрема для використання як кисневмісної добавки до бензину. Однак існуюча сировинна база для отримання паливного етанолу (цукор, крохмаль) не дає змоги істотно (в десятки разів) збільшити його виробництво. Тому розробка технології отримання паливного етанолу з лігноцелюлози (рослинні відходи) та її широке впровадження у виробництво має величезне економічне значення і може розглядатися як один з факторів забезпечення енергетичної незалежності нашої держави. Технологія переробки рослинних відходів до етанолу, як свідчить світовий науковий досвід, має комплексний характер і потребує ґрунтовних досліджень у галузі мікробіології, метаболічної інженерії, хімії і біохімії, а також удосконалення виробничого процесу. Закон України «Про альтернативні види рідкого та газового палива», зокрема, передбачає «підтримку розвитку науково-технічної бази виробництва альтернативних видів палива, пропаганду науково-технічних досягнень у цій сфері». Проте далі декларативних заяв справа не пішла, оскільки коштів на проведення науково-дослідних та дослідно-конструкторських робіт у цій сфері держава так і не виділила. Не передбачає фінансування наукових досліджень і програма Кабінету Міністрів України «Етанол». До останнього часу не фінансувала науково-дослідні роботи в галузі отримання паливного етанолу з рослинних відходів і Національна академія наук України. Однак нещодавно прийнято рішення про створення цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біопаливний етанол з рослинних відходів».

Науковими розробками з проблем отримання паливного етанолу з лігноцелюлози, а

саме — метаболічною інженерією термотолерантних дріжджів *H. polymorpha* — займаються лише в Інституті біології клітини НАН України (Львів). Результати цих робіт опубліковані в міжнародних наукових часописах, доповідалися на міжнародних конференціях у Львові, Південно-Африканській Республіці, Іспанії, Італії та Португалії. Власне, у Львові сконструйовані унікальні штами, які мають перспективу знайти застосування для отримання паливного етанолу в найпрогресивнішому процесі так званої одночасної сахарифікації та ферментації (SSF процес). Таким термотолерантним штамам немає аналогів у світі. Однак роботи львівських науковців у цьому напрямі в основному фінансує не НАН України, а найбільша американська фірма з виробництва паливного етанолу (з крохмалю) Archer Daniels Midland Co. За умовами договору, фірма є власником усіх винаходів, здійснених у процесі виконання роботи. Деякі дослідження, зокрема розробка нових методів селекції надпродуктів етанолу, виконуються у співпраці з польськими колегами з Жешівського університету, запланована також співдія в цій галузі з колегами з Німеччини, Швеції, Данії, Ірландії, Італії, Росії і двох українських лабораторій — Інституту мікробіології і вірусології НАН України (Київ) та Інституту виноградарства і виноробства «Магарач» УААН (Ялта) в рамках нового проекту INTAS.

Інтереси української держави потребують якомога швидшого забезпечення наукових пошуків вітчизняним фінансуванням, а також розширення досліджень із залученням широкого кола науковців — біохіміків, мікробіологів, хіміків, економістів та інженерів. Це — перспективний шлях для реального досягнення енергетичної незалежності України.

1. Назарко Т.Ю., Сибірний А.А. Молекулярні механізми автофагійної деградації пероксисом у дріжджів // Укр. біохім. журн. — 2005. — 77. — С. 16 — 25.

2. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Микробные целлюлазы // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — 38. — С. 305–321.
3. Стасик О.В., Сибірний А.А. Механізми біогенезу та деградації пероксисом у дріжджів // Вісн. Наук. товариства ім. Т.Г. Шевченка. — 2003. — 10. — С. 271–283.
4. Стасик О.В., Сибірний А.А. Молекулярні механізми катаболічної репресії у дріжджів // Мікробіол. журн. — 2003. — 65. — С. 84–103.
5. Abuja P.M., Pilz I., Claeysens M., Tomme P. Domain structure of cellobiohydrolase II as studied by small angle X-ray scattering: close resemblance to cellobiohydrolase I // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1988. — 156. — P. 180–185.
6. Altenbuchner J., Mattes R. *Escherichia coli* // Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems / Ed. G. Gellissen. — Wiley-VCH, Weinheim, 2005. — P. 7–43.
7. Aristidou A., Penttila M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization // Curr. Opin. Biotechnol. — 2000. — 11. — P. 187–198.
8. Bastawde K.B. Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action // World J. Microbiol. Biotechnol. — 1992. — 8. — P. 353–368.
9. Becker J., Boles E. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — 69. — P. 4144–4150.
10. Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — 56. — P. 326–338.
11. Berg C. World ethanol production and trade to 2000 and beyond. — 1999. — <http://www.distill.com/berg/>.
12. Betts W.B., Dart R.K., Ball A.S., Pedlar S.L. Biosynthesis and structure of lignocellulose // Biodegradation: Natural and Synthetic Materials / Ed. W.B. Betts. — Springer-Verlag, Berlin (Germany), 1991. — P. 139–155.
13. Bothast R.J., Nichols N.N., Dien B.S. Fermentation with new recombinant organisms // Biotechnol. Progr. — 1999. — 15. — P. 875.
14. Brigham J.S., Adney W.S., Himmel M.E. Hemicelluloses: diversity and applications // Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis / Ed. C.E. Wyman. — Washington DC, 1996. — P. 119–142.
15. Brown M.A., Levine M.D., Romm J.P.R.A.H., Koomey J.G. Engineering-economic studies of energy technologies to reduce greenhouse emissions: opportunities and challenges // Ann. Rev. Energy Environ. — 1998. — 23. — P. 31–39.
16. Brooks T.A., Ingram L.O. Conversion of mixed waste office paper to ethanol by genetically engineered *Klebsiella oxytoca* strain P2 // Biotechnol. Progr. — 1995. — 11. — P. 619–625.
17. Campbell C.J., Laherrere J.H. The end of cheap oil // Scientific American. — 1998. — 3. — P. 78–83.
18. Deanda K., Zhang M., Eddy M., Picataggio S. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — 62. — P. 4465–4470.
19. Deng X.X., Ho N.W. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene // Appl. Biochem. Biotechnol. — 1990. — 24/25. — P. 193–199.
20. Dunn W.A., Jr., Cregg J.M., Kiel J.A.K.W., van der Klei I.J., Oku M., Sakai Y., Sibirny A.A., Stasyk O.V., Veenhuis M. Pexophagy. The selective autophagy of peroxisomes // Autophagy. — 2005. — 1. — P. 75–83.
21. Gellissen G. (ed.) *Hansenula polymorpha* // Biology and Applications. — Wiley-VCH, Weinheim, 2002. — 347 p.
22. Gellissen, G. (ed.) Production of Recombinant Proteins // Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. 1 Edition. — Wiley-VCH, Weinheim, 2005. — 406 p.
23. Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J.M., Berardi E., Veenhuis M., van der Klei I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* — a comparison. — FEMS Yeast Res, 2005. — 5(11). — P. 1079–96.
24. Grabek D., Ryabova O.B., Oklejewicz B., Voronovsky A.Y., Sibirny A.A. Auxanographic method for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for ethanol production from xylose. — Antonie van Leeuwenhoek, 2006 (in press).
25. Hahn-Hagerdal B., Wahlbom C.F., Gardonyi M., van Zyl W.H., Cordero Otero R.R., Jonsson L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization // Adv. Biochem. Eng. — 2001. — 73. — P. 53–84.
26. Harhangi H.R., Akhmanova A.S., Emmens R, van der Drift C., de Laat W.T., van Dijken J.P., Jetten M.S., Pronk J.T., Op den Kamp H.J. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway // Arch. Microbiol. — 2003. — 180. — P. 134–141.
27. Ho N.W., Chen Z., Brainard A.P. Genetically engineered *Saccharomyces* capable of effective cofermentation of glucose and xylose // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — 64. — P. 1852–1859.
28. Howard R.L., Abotsi E, Jansen van Rensburg E.L., Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production // African J. of Biotechnology. — 2003. — 2. — P. 602–619.

29. Ingram L.O., Conway T., Clark D.P., Sewell G.W., Preston J.F. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. — 1987. — 53. — P. 2420–2425.
30. Ingram L.O., Gomez P.F., Lai X., Moniruzzaman M., Wood B., Yomano L.P., York S.W. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production // Biotechnol. Bioeng. — 1998. — 58. — P. 204–214.
31. Jeffries T.W. Ethanol fermentation on the move // Nature. — 2005. — 23. — P. 40–41.
32. Jeffries T.W., Jin Y.-S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts // Adv. Appl. Microbiol. — 2000. — 47. — P. 221–268.
33. Jeffries T.W., Jin Y.-S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — 63. — P. 495–509.
34. Jeffries T.W. and Shi N.Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts // Adv. Biochem. Eng. — 1999. — 65. — P. 117–161.
35. Jeppsson M., Bengtsson O., Franke K., Lee H., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. The expression of *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher  $K_M$  for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnol. Bioeng. — 2006 (in press).
36. Jeppsson M., Johansson B., Ruhdal-Jensen P., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains // Yeast. — 2003. — 20. — P. 1263–1272.
37. Jin Y.-S., Alper H., Yang Y.-T., Stephanopoulos G. Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering approach // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — 71. — P. 8249–8256.
38. Jin Y.-S., Ni H., Laplaza J.M., Jeffries T.W. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — 69. — P. 495–503.
39. Kang H.A. and Gellissen G. *Hansenula polymorpha* / Ed. G. Gellissen. Production of Recombinant Proteins // Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. — Wiley-VCH, Weinheim, 2005. — P. 111–142.
40. Karhumaa K., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering // Yeast. — 2005. — 22. — P. 359–368.
41. Kirk T.K., Connors W.J., Zeikus J.G. Advances in understanding the microbiological degradation of lignin // The structure, biosynthesis and degradation of wood / Ed. F.A. Loewus, V.C. Runeckles. (Plenum). — New York, 1977. — P. 369–394.
42. Kosaric N. Ethanol — potential source of energy and chemical products // Biotechnolog / Ed. H.-J. Rehm, G. Reed. — Wiley-VCH, Weinheim, 1996. — P. 122–203.
43. Kötter P., Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1993 — 38. — P. 776–783.
44. Krasovska O.S., Stasyk O.G., Stasyk O.V., Kordium V.A., Vozianov O.F., Sibirny A.A. *Hansenula polymorpha* mutants deficient in glucose repression of alcohol oxidase promoter as host for production of recombinant proteins // Biotechnol. Bioeng. — 2006 (in press).
45. Kuyper M., Harhangi H.R., Stave A.K., Winkler A.A., Jetten M.S., de Laat W.T., den Ridder J.J. Op den Camp H.J., van Dijken J.P., Pronk J.T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? // FEMS Yeast Res. — 2003. — 4. — P. 69–78.
46. Kuyper M., Hartog M.M.P., Toirkens M.J., Almering M.J.H., Winkler A.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. Xylose-isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation // Tam camo. — 2005. — 5. — P. 399–409.
47. Kuyper M., Toirkens M.J., Diderich J.A., Winkler A.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain // Tam camo. — 2006 (in press).
48. Kuyper M., Winkler A.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle // Tam camo. — 2004. — 4. — P. 655–664.
49. Lahtchev K., Semenova V.D., Tolstorukov I.I., van der Klei I., Veenhuis M. Isolation and properties of genetically defined strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* CBS4732 // Arch. Microbiol. — 2002. — 177. — P. 150–158.
50. Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood // Enzyme Microb. Technol. — 1999. — 24. — P. 151–159.
51. Lawford H.G., Rousseau J.D. Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2003. — 105–108. — P. 457–469.
52. Lin Y., Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. Dec. — 2005. — 6. — P. 1–16.
53. Lönn A., Gardonyi M., van Zyl W.H., Hahn-Hagerdal B., Otero R.C. Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. Gene cloning and protein characterization // Eur. J. Biochem. — 2002. — 269. — P. 157–163.

54. Lynd L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy // *Ann. Rev. Energy Environ.* — 1996. — 21. — P. 403–465.
55. Lynd L.R., Lyford K., South C.R., van Walsum G.P., Levenson K. Evaluation of paper sludges for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol // *Tappi J.* — 1991. — 82. — P. 1–19.
56. Maleszka R., Schneider H. Involvement of oxygen and mitochondrial functions in the metabolism of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1984 — 228. — P. 22–30.
57. Manson T., Foo E.L.J. Swedish efforts in integration biofuels as alternative fuels for transportation in buses, lorries and cars. Foo E.L.J. and Senta T.D // *Proceedings of the Internet Conference of Integrated Biosystems.* — 1998. — <http://www.ias.unu.edu>.
58. Melake T., Passoth V.V., Klinner U. Characterization of the genetic system of the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* // *Curr. Microbiol.* — 1996. — 33. — P. 237–242.
59. Monique H., Faaij A., van den Broek R., Berndes G., Gielen D., Turkenburg W. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy // *Biomass Bioenergy.* — 2003. — 25. — P. 119–133.
60. Middelhoven W.J. History, habitat, variability, nomenclature and phylogenetic position of *Hansenula polymorpha* // *Hansenula polymorpha. Biology and Applications* / Ed. G. Gellissen. — Wiley-VCH, Weinheim, 2002. — P. 1–7.
61. Ohta K., Beall D.S., Mejia J.P., Shanmugam K.T., Ingram L.O. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1991. — 57. — P. 893–900.
62. Passoth V., Cohn M., Schafer B., Hahn-Hagerdal B., Klinner U. Analysis of hypoxia-induced *ADH2* promoter of the respiratory yeast *Pichia stipitis* reveals a new mechanism for sensing of oxygen limitation in yeast // *Yeast.* — 2003. — 20. — P. 39–51.
63. Polman K. Review and analysis of renewable feedstocks for the production of commodity chemicals // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 1994. — 45. — P. 709–722.
64. Ramezani-Rad M., Hollenberg C.P., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Piontek M., Dahlems U., Gellissen G. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis // *FEMS Yeast Res.* — 2003. — 4(2). — P. 207–215.
65. Reinders A., Romano I., Wiemken A., de Virgilio C. The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance // *J. Bacteriol.* — 1999. — 181. — P. 4665–4668.
66. Richard P., Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttila M. Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway // *FEMS Yeast Res.* — 2003. — 3. — P. 185–189.
67. Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny A.A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Tam camo.* — 2003. — 3. — P. 157–164.
68. Sedlak M., Ho N.W. Expression of *E. coli araBAD* operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* // *Enzyme Microb. Technol.* — 2001. — 28. — P. 16–24.
69. Shi N.Q., Cruz J., Sherman F., Jeffries T.W. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis* // *Yeast.* — 2002. — 19. — P. 1203–1220.
70. Shi N.Q., Davis B., Sherman F., Cruz J., Jeffries T.W. Disruption of the cytochrome *c* gene in xylose-utilizing yeast *Pichia stipitis* leads to higher ethanol production // *Tam camo.* — 1999. — 15. — P. 1021–1030.
71. Sibirny A.A., Abbas C.A., Ryabova O.B., Ishchuk O.P., Verba O.V., Dmytruk K.V., Stasyk O.V., Voronovsky A.Y. *Hansenula polymorpha* as a new promising organism for high temperature alcoholic fermentation of lignocellulose sugars // *Proc. of Bioenergy Conference, Tomar, Portugal, March, 2006.*
72. Sonderegger M., Sauer U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2003. — 69. — P. 1990–1998.
73. Sonderegger M., Schumperli, Sauer U. Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae* // *Tam camo.* — 2004. — 70. — P. 2892–2897.
74. Stasyk O.V., Nazarko T.Y., Stasyk O.G., Krasovska O.S., Warnecke D., Nicaud J.-M., Cregg J.M., Sibirny A.A. Sterol glucosyltransferases have different roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica* // *Cell Biol. Intern.* — 2003. — 27. — P. 947–952.
75. Stasyk O.V., Stasyk O.G., Komduur J., Veenhuis M., Cregg J.M., Sibirny A.A. A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *J. Biol. Chem.* — 2004. — 279. — P. 8116–8125.
76. Stenberg K., Tengborg C., Galbe M, Zacchi G. Optimisation of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated mixed softwoods for ethanol production // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* — 1999. — 71. — P. 299–308.
77. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review // *Bioresour. Technol.* — 2002. — 83. — P. 1–11.
78. Torget R., Hatzis C., Hayward T.K., Hsu T.A., Philippidis G.P. Optimization of reverse-flow, 2-temperature, dilute-acid pretreatment to enhance biomass conversion



- to ethanol // Appl. Biochem. Biotechnol. — 1996. — 58. — P. 85–101.
79. Tröff K.L., Otero Cordero R.R., van Zyl W.H., Hahn-Hagerdal B. Deletion of *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKS1* genes // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — 67. — P. 5668–5674.
  80. Ubiyovok V.M., Blazhenko O.V., Gigot D., Peninckx M.J., Sibirny A.A. The role of r-glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* // Cell Biol. Intern. — 2006 (in press).
  81. Ubiyovok V.M., Nazarko T.Y., Stasyk O.G., Sohn M.J., Kang H.A., Sibirny A.A. *GSH2*, a gene encoding g-glutamylcysteine synthetase in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res. — 2002. — 2. — P. 327–332.
  82. Voronovsky A.Y., Ryabova O.B., Verba O.V., Ishchuk O.P., Dmytruk K.V., Sibirny A.A. Expression of *xylA* genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Там само. — 2005. — 5. — P. 1055–1062.
  83. Walfridsson M., Bao X., Anderlund M., Lilius G., Bulow L., Hahn-Hagerdal B. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — 62. — P. 4648–4651.
  84. Wheals A.E., Basso L.C., Alves D.M.G., Amorim H.V. Fuel ethanol after 25 years // Trends in Biotechnol. — 1999. — 17. — P. 482–487.
  85. Wieselogel A., Tyson J., Johnsson D. Biomass feedstock resources and composition // Handbook on bioethanol: production and utilization / Ed. C.E. Wyman Taylor and Francis. — Washington DC, 1996. — P. 105–118.
  86. Wyman C.E. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview // Там само. — P.1-18.
  87. Wyman C.E. Opportunities and technological challenges of bioethanol. Presentation to the committee to review the R and D strategy for biomass-derived ethanol and biodiesel transportation fuels // Review for the research strategy for biomass-derived transportation fuels / National Research Council. National Academy. — Washington DC, 1999. — P. 1–48.
  88. Yomano L.P., York S.W., Ingram L.O. Isolation and characterization of ethanol tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 1998. — 20. — P. 132–138.
  89. Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — 56. — P. 17–34.
  90. Zhang M., Eddy C., Deanda K., Finkelstein M., Picataggio S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis* // Science. — 1995. — 267. — P. 240–243.
  91. Zhang M., Chou Y., Picataggio S., Finkelstein M. *Zymomonas mobilis* strain for xylose utilization and arabinose fermentation // Patent USA 5, 843, 760. — 1998.
  92. Zhou S., Ingram L.O. Engineering endoglucanase secreting strains of of ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — 22. — P. 600–607.

#### A. Сибірний

### БІОПАЛИВНИЙ ЕТАНОЛ З ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗИ (РОСЛИННОЇ БІОМАСИ): ДОСЯГНЕННЯ, ПРОБЛЕМИ, ПЕРСПЕКТИВИ

#### Резюме

В огляді розглядаються сучасний стан, проблеми та перспективи створення економічно вигідного виробництва паливного етанолу з рослинної біомаси (лігноцелюлози): переваги та недоліки етанолу як палива порівняно з вуглеводнями, наявні та потенційні сировинні ресурси, хімічний склад та структура лігноцелюлози, способи попередньої обробки рослинної біомаси та наступного кислотного або ензиматичного гідролізу целюлози та геміцелюлоз до моносахаридів.

#### A. Sibirnyi

### BIO-FUEL ETHANOL OF LIGNOCELLULOSE (VEGETABLE BIOMASS): ACHIEVEMENTS, PROBLEMS, PROSPECTS

#### Summary

The modern condition, problems and prospects of economic production of fuel ethanol from vegetable biomass (lignocellulose) are described in the review as well as advantages and shortcomings of ethanol as fuel in comparison with hydrocarbons, present and potential raw material resources, chemical composition and structure of lignocellulose, means of preliminary treatment of vegetable biomass and further acid or enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicelluloses to monosaccharides.