

**mgr inż. Iwona Kata**

**„Konstruowanie szczepów drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha* zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu”**

**Streszczenie:**

W obecnym czasie dużym zainteresowaniem cieszy się problem utylizacji odpadowego glicerolu, powstającego w wyniku produkcji biodiesla. Z roku na rok produkcja tego biopaliwa wzrasta, co prowadzi do powstawania dużych ilości zanieczyszczonej gliceryny. Jej oczyszczanie z powodu właściwości fizyko-chemicznych gliceryny jest zbyt kosztowne. Dlatego też, tak ważne jest poszukiwanie lub konstruowanie mikroorganizmów zdolnych do przekształcenia odpadowej gliceryny do substancji o wyższej wartości, zwłaszcza do etanolu. Dla uzyskania odpowiednich szczepów niezbędnym aspektem jest poznanie metabolizmu tego związku w komórkach mikroorganizmów, a zwłaszcza tych, które mogłyby być wykorzystywane, jako obiecujący organizm, potrafiący konwertować glicerol do etanolu w podwyższonej temperaturze, a także wykorzystywać metanol, który stanowi silne zanieczyszczenie fazy glicerynowej. Niewątpliwie do takich organizmów należy *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Jednak dzięki szczepy tego gatunku produkują zbyt małe ilości etanolu. Dlatego też celem niniejszej pracy było skonstruowanie drożdży zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu, a także zrozumienie i poznanie procesu przemiany glicerolu w komórkach niekonwencjonalnych drożdży *O. polymorpha*, poznanie funkcji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za katabolizm glicerolu oraz analiza jednego z produktów tego metabolizmu, jakim jest etanol. Aby osiągnąć ten cel, przeprowadzono nadekspresję genów *ADH1* i *PDC1*, kodujących odpowiednio dehydrogenazę alkoholową oraz dekarboksylazę pirogronianową, odpowiedzialne za syntezę etanolu. W drugim etapie zaplanowano przeprowadzenie nadekspresji genów *GCY1*, *DAK1*, a także *GUT1* i *GPD1*, kodujące odpowiednio dehydrogenazę glicerolu, kinazę dihydroksyacetonu, kinazę glicerolu oraz dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanu. Są to enzymy biorące udział na początkowych etapach dwóch szlaków katabolizmu glicerolu. Na końcu dokonano analizy skonstruowanych szczepów pod względem produktów metabolizmu, poziomu aktywności oraz poziomu ekspresji wyżej wymienionych genów związanych z metabolizmem glicerolu. W wyniku tych manipulacji w pierwszym etapie skonstruowano szczep WT/ADH1/PDC1 #98, który produkował 4,3 g/l etanolu, a po zwiększeniu zawartości glicerolu w podłożu z 100 g/l do 150 g/l oraz podwyższeniu

temperatury z 37 °C do 45 °C szczep ten produkował nawet 5 g/l etanolu. Nadekspresja genów *ADHI* i *PDC1* w niewielkim stopniu poprawiły także fermentację alkoholową na podłożu z ksylozą oraz glukozą. W kolejnym etapie przeprowadzono nadekspresję genów odpowiedzialnych za początkowe etapy katabolizmu glicerolu. W komórkach *O. polymorpha* glicerol rozkładany jest na dwa sposoby. Jeden oparty na kinazie glicerolu (Gut) i dehydrogenazie glicerolo-3-fosforanu (Gpd), drugi na dehydrogenazie glicerolu (Gcy) i kinazie dihydroksyacetonu (Dak). Nadekspresja genów kodujących te enzymy spowodowała wzrost produkcji etanolu odpowiednio do 10,41 g/l (szlak Gut-Gpd) i 10,71 g/l (szlak Gcy-Dak). To pozwala stwierdzić, że geny biorące udział w pierwotnych etapach katabolizmu glicerolu w komórkach drożdży *O. polymorpha* mają istotne znaczenie w konwersji glicerolu do etanolu. Przeprowadzenie nadekspresji genów *GCY1*, *DAK1*, a także *GUT1* i *GPD1*, przyczyniło się do wzrostu produkcji etanolu, a także znacznego wzrostu tempa metabolizmu glicerolu, oraz zwiększenia konsumpcji glicerolu przez komórki zmodyfikowanych drożdży *O. polymorpha*. Przeprowadzone manipulacje genetyczne spowodowały, że *O. polymorpha* staje się coraz bardziej obiecującym organizmem do konwersji odpadowego glicerolu do etanolu, z wysoką wydajnością. Ważną cechą skonstruowanych szczepów z nadekspresją genów początkowych etapów katabolizmu glicerolu oraz genów *PDC1* oraz *ADHI* jest ich zdolność do produkcji etanolu nie tylko z czystej gliceryny, ale także z dwóch przeanalizowanych wzorców gliceryny odpadowej.