

## *Navorsings- en oorsigartikels*

# **Die genetiese manipulasie van die gis *Saccharomyces cerevisiae* vir die moontlike omskakeling van polisakkariedryke landbougewasse en nywerheidsafval na enkelselproteïen en brandstofetanol**

I.S. Pretorius

Departement Mikrobiologie en Instituut vir Biotechnologie, Universiteit van Stellenbosch, Stellenbosch 7600

Ontvang 11 Mei 1994; aanvaar 14 Julie 1994

### **UITTREKSEL**

Die wêreld se probleem ten opsigte van oorbevolking en omgewingsbesoedeling het 'n dringende behoefte aan alternatiewe proteïen- en energiebronne laat ontstaan. Een wyse waarop hierdie nypende tekorte aangevul kan word, is om enkelselproteïen (vir byvoeging tot voedsel en dierevoer) en brandstofetanol met behulp van bakkersgis vanaf polisakkariedryke landbougewasse en industriële afval te produseer. Weens die afwesigheid van bepaalde depolimeriserende ensieme kan die gis *Saccharomyces cerevisiae* eger nie die oorvloedige energiebronne wat in stysel, pektien, sellulases en hemisellulases opgesluit is, benut nie. Ensieme soos amilases, pectinases, sellulases en hemisellulases word vereis vir die vrystelling van fermenteerbare suikers vanaf die genoemde polisakkariede. Vir die volledige omsetting van stysel na glukose word 'n vervloeatingsensiem ( $\alpha$ -amilase), 'n versuikeringsensiem (glukoamilase) en 'n onttakingsensiem (pullulanase) benodig. Tot dusver is die  $\alpha$ -amilasegeen (*AMY1*) van die bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*, die glukoamilasegeen (*STA2*) van die gis *S. cerevisiae* var. *diastaticus* en die pullulanasegeen (*PUL1*) van die bakterie *Klebsiella pneumoniae* gekloneer, gemanipuleer en in *S. cerevisiae* uitgedruk. Ten einde die duur voorafbehandeling ('n kookproses) van stysel in toekomstige industriële aanlegte te vermy, is die gene (*RSA1* en *RSG1*) vir roustysel-abrekende amilases uit die gis *Endomyces fibuliger* gekloneer, en word daar tans probeer om hierdie gene by die bestaande amilasekasset in te sluit en na *S. cerevisiae* te transformeer. Die bio-omskakeling van pektien word deur pektienesterases en -depolimerases gekataliseer. Sommige rasse van *S. cerevisiae* produseer pektienesterase en kan dus pektien na pektaat omsit. 'n Pektinasekasset bestaande uit gisekspressie/sekresiesisteme wat die pektatiasegeen (*PEL5*) van die plantpatogeen, *Erwinia chrysanthemi*, en die poligalakturonasegeen (*PEH1*) van *Erwinia carotovora* bevat, is ontwerp en suksesvol in *S. cerevisiae* uitgedruk. Die belangrikste ensieme betrokke by die afbraak en benutting van sellulose en hemisellulose kan in die volgende groep ingedeel word: endoglukanase (glukanohidrolase), eksoglukanase (sellobiohidrolase), sellobiase ( $\beta$ -glukosidase),  $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -xilosidase en xilose-isomerase. Die endo- $\beta$ -1,3-1,4-glukonasegeen (*END1*) van die rumenbakterie *Butyrivibrio fibrisolvens*, die eks- en endo- $\beta$ -glukanasegene (*BGL1/EXG1* en *BGL2/ENG2*) van *S. cerevisiae*, die sellobiase- en  $\beta$ -glukosidasegene (*BGL1* en *BGL2*) van *E. fibuliger* asook die  $\beta$ -xilanasegene (*XYN2* en *XYN3*) van *Aspergillus kawachii* en *Trichoderma reesei* is gekloneer, gemanipuleer en in *S. cerevisiae* uitgedruk. Die sellobiohidrolasegeen (*CBH1*) van die witvrotswam *Phanerochaeta chrysosporium* en die xilanasegeen (*XYN1*) van die bakterie *Ruminococcus flavefaciens* word tans voorberei vir uitdrukking in *S. cerevisiae*. Terselfdertyd probeer ons laboratoria ook om die gene vir  $\beta$ -xilosidase (*XYL1*) en xilose-isomerase (*XYS1*) vanaf die fungi *T. reesei*, *Aspergillus niger* en *Candida boidinii* te kloneer en in *S. cerevisiae* uit te druk. Uiteindelik sal daar gepoog word om die amilase-, pectinase-, sellulase- en hemisellulase-kassette op 'n kunsmatige minichromosoom saam te voeg en na *S. cerevisiae* oor te dra, ten einde bakkersgis in staat te stel om hierdie verskillende polisakkariedes te benut.

### **ABSTRACT**

**The genetic manipulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the aim of converting polysaccharide-rich agricultural crops and industrial waste to single-cell protein and fuel ethanol**

The world's problem with overpopulation and environmental pollution has created an urgent demand for alternative protein and energy sources. One way of addressing these burning issues is to produce single-cell protein (for food and animal feed supplements) and fuel ethanol from polysaccharide-rich agricultural crops and industrial waste by using baker's yeast. Owing to the absence of certain depolymerising enzymes, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is unable to utilise the vast reserves of energy sources present in starch, pectin, cellulose and hemicellulose. Enzymes such as amylases, pectinases, cellulases and hemicellulases are required for the release of fermentable sugars from these polysaccharides.

For the complete conversion of starch to glucose one requires a liquefaction enzyme ( $\alpha$ -amylase), a saccharifying enzyme (glucoamylase) and a debranching enzyme (pullulanase). Thus far we have cloned, manipulated and expressed the  $\alpha$ -amylase gene (AMY1) from the Gram-positive bacterium *Bacillus amyloliquefaciens*, the glucoamylase gene (STA2) from *S. cerevisiae* var. diastaticus and the pullulanase gene (PUL1) from the Gram-negative bacterium *Klebsiella pneumoniae* in *S. cerevisiae*. To circumvent the expensive pretreatment (a cooking process) of starch in future industrial plants, we have also cloned the genes (RSA1 and RSG1) encoding raw starch-degrading amylases from the yeast *Endomyces fibuliger* and are currently endeavouring to incorporate these genes into the existing amylase cassette to be expressed in *S. cerevisiae*. The bioconversion of pectin is catalysed by pectinesterases and depolymerases. Some strains of *S. cerevisiae* produce pectinesterase and can convert pectin into pectate. A pectinase cassette comprising yeast expression/secretion systems that contain a pectate lyase gene (PEL5) from the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*, and the polygalacturonase gene (PEH1) from *Erwinia carotovora* was designed and successfully expressed in *S. cerevisiae*. The most important enzymes involved in the degradation and utilisation of cellulose and hemicellulose can be divided into the following groups: endoglucanase (glucanohydrolase), exoglucanase (cellobiohydrolase), cellobiase ( $\beta$ -glucosidase),  $\beta$ -xylanase,  $\beta$ -xylosidase and xylose isomerase. We have cloned, modified and expressed the endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene (END1) from the rumen bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*, the exo- and endo- $\beta$ -1,3-glucanase genes (BGL1/EXG1 and BGL2/ENG2) from *S. cerevisiae*, the cellobiase and  $\beta$ -glucosidase genes (BGL1 and BGL2) from *E. fibuliger* and the  $\beta$ -xytanase genes (XYN2 and XYN3) from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus kawachii* in *S. cerevisiae*. The cellobiohydrolase gene (CBH1) from the white rot fungus *Phanerochaeta chrysosporium* and the xylanase gene (XYN1) from the bacterium *Ruminococcus flavefaciens* are currently being prepared for expression in *S. cerevisiae*. At the same time, our laboratories are also seeking to clone and express the genes encoding  $\beta$ -xytanase (XYN1),  $\beta$ -xylosidase (XYL1) and xylose-isomerase (XYS1) from the fungi *T. reesei*, *Aspergillus niger* and *Candida boidinii*. Eventually we will endeavour to combine these amylase, pectinase, cellulase and hemicellulase cassettes onto an artificial minichromosome and introduce it into *S. cerevisiae*, thereby enabling baker's yeast to utilise these different polysaccharides.

## INLEIDING

Die wêreld se bevolkingsontploffing en gepaardgaande omgewingsbesoedeling het dit dringend noodsaaklik gemaak om alternatiewe bronne van proteïene (vir die aanvulling van dierevoer en voedsel) en energie (bv. brandstofaanvullings) te vind. Moderne bioteknologie bied nuwe werktuie en strategieë om hierdie knellende vraagstukke mee aan te pak.

Intensieve navorsing is reeds vir 'n geruime tyd gedoen om die produksie en gehalte van landbougewasse deur middel van klassieke landboukundige metodes te verbeter. In die talle onderontwikkelde lande van Afrika, Asië en Latyns-Amerika kon die produksie van proteïenryke voedsel egter nie met die tempo van die bevolkingsaanwas tred hou nie. Terwyl langtermynoplossings vir hierdie rampspoedige toedrag van sake nog gevind moet word, kan mikrobiiese proteïen intussen as 'n moontlike goedkoop bron van hoe gehalte ontgin word. Die term *enkelselproteïen* (ESP) verwys na mikrobiiese biomassa wat in groot gistsingsvate aangekweek kan word. In vergelyking met die produksie van plant- en diereproteïene, hou die produksie van ESP verskeie voordele in. ESP kan onder beheerde fabriekstoestande geproduseer word en is dus minder afhanklik van faktore soos klimaat, seisoene, arbeid, peste en siektes wat normale landboukundige praktyke grootliks beïnvloed. Verder is die tempo waarteen ESP geproduseer kan word aansienlik hoër as die produksietempo van plant- en diereproteïene. Daar sal egter eers aan heelwat kriteria ten opsigte van veiligheid, voedingswaarde, gesondheidsregulasies, prosesseringsvereistes, ekonomiese lewensvatbaarheid, ens. voldoen moet word alvorens ESP wyd aanvaar sal word. Die enigste voorbeeld van ESP wat deur die mens verbruik word, is voedselgiste en duisende ton daarvan is gedurende die twee wêreldoorloë deur soldate, prisoniers en burgerlikes as 'n bron van proteïen en geurmiddel ingeneem.<sup>1</sup> Die voorkoms van newe-effekte (bv. maagongesteldheid, oormatige vorming van uriensuur,

ens.) by menslike verbruikers van ESP sal egter nog ondersoek moet word. Die gebruik van droë gisbiomassa, bestaande uit 48% proteïen en 9% as, in die rantsoene van varke en hoenders het reeds bewys dat die gehalte van gisproteïen ekwivalent aan dié van sojaboonproteïen is.<sup>2</sup> Daar is ook toenemende bewyse dat die probiotiese eienskappe van voedselgiste 'n heilsame en funksionele rol in rantsoene en diête kan speel.<sup>3</sup> Verskeie substrate, soos n-paraffiene, gasolie, metanol, etanol en industriële uitvloeisels is in die verlede vir ESP-produksie gebruik, maar weens ekonomiese redes het dit duidelik geword dat goedkoper, hernieubare substrate (bv. polisakkariedryke gewasse en afval) gebruik sal moet word alvorens ESP met sojaboon- en vismeelproteïen kan meeding.

Terwyl die Derde Wêreld nypende voedseltekorte (veral proteïentekorte) ondervind, staar stygende energiekostes en die uitputting van nie-hernieubare energiebronne die energie-afhanklike gemeenskappe van die Eerste Wêreld in die gesig. Met die natuurlike beperkinge op die produksie van hidro-elektriese krag en die groeiende skeptisme teenoor kernkrag, is die wêreld se energieverbruik swaar op fossielbrandstof (olie, steenkool en natuurlike gas) gekonsentreer. Hierdie krisis dien as die sterkste dryfkrag om plaasvervangers of aanvullings van petrol en dieselloolie te vind. Die belowendste plaasvervangers blyk metanol vanaf steenkool, natuurlike gas en hout, en etanol vanaf polisakkariedryke biomassa te wees. Die gebruik van gisgeproduseerde etanol in petrolmengsels om die oktaan te verhoog en om die inhoud van koolstofmonoksied in uitlaatgas te verlaag, word reeds in verskeie lande aangemoedig.<sup>4,5</sup> Meer as 90% van alle voertuie wat tans in Brasilië gebou word, word deur 10 tot 20% etanolbevattende brandstof aangedryf.<sup>6,7</sup> Dit het reeds die vlakte van besoedeling dramaties verlaag en die mylafstand van hierdie voertuie met 5% verhoog.<sup>7</sup>

Dit is dus duidelik dat giste ingespan kan word om ESP (onder oksidatiewe toestande) en brandstofetanol (onder fermentatiewe toestande) vanaf polisakkariedryke landbou-

gewasse en industriële afval te produseer. Hierdeur kan die wêrelde proteïen- en energietekorte, asook die besoedeling van die atmosfeer deur uitlaatgasse en van waterbronne deur hoë organiese industriële uityloeisels, beperk word. Die gesikste gis vir hierdie taak is bakkersgis, *Saccharomyces cerevisiae*, aangesien dit reeds vir duisende jare gebruik word om voedsel en alkohol te produseer. Daarom geniet dit die sogenaamde ABAV-status (Algemeen Beskou As Veilig). *S. cerevisiae* het 'n kort generasietyd (ca. 90 min.), is 'n doeltreffende etanolproduseerder met 'n hoë alkoholverdraagsaamheid en is ryk aan proteiene, vitamiene en minerale. Die grootste nadeel van *S. cerevisiae* in die produksie van ESP en etanol is dat dit nie in staat is om volop substrate wat ryk is aan polisakkariede (soos stysel, pektien, sellulose en hemisellulose), as koolstofbron te kan gebruik nie. Dit kan daarvan toegeskryf word dat *S. cerevisiae* nie oor ekstrasellulêre depolimerisering-sisteme, bestaande uit amilases, pektinases, sellulases, hemisellulases, ens. beskik nie. Hierdie ensiemsisteme is nodig vir die afbraak van polisakkariede en die vrystelling van fermenteerbare suikers. Tans word ko-kulture (gemengde kulture) en/of kommersiële ensiembereidings in multistaps prosesse gebruik om polisakkariedryke biomassa na belangrike kommoditeite om te skakel. 'n Alternatiewe benadering word egter in ons laboratorium gevolg. Hiervolgens word probeer om *S. cerevisiae* geneties sodanig te manipuleer dat dit in staat sal wees om polisakkariede te benut. So 'n geneties-gemanipuleerde *S. cerevisiae* wat heteroloë polisakkaras kan sintetiseer en uitskei, kan dan in ekonomies doeltreffende eenstap-omsettingsprosesse aangewend word. Dit wil sê, die afbraak van landbougewasse en industriële uityloeisels na fermenteerbare suikers en die gisting daarvan na ESP of etanol kan dan gelyktydig deur die rekombinante *S. cerevisiae* bewerkstellig word.

## STRUKTUUR EN ENSIMATIESE AFBRAAK VAN POLISAKKARIEDE

Polisakkariede, soos stysel, pektien, sellulose en hemisellulose, is die volopste hernieubare organiese stowwe in die natuur. Die hidrolise van hierdie polimere na monomere of assimileerbare suikers bly steeds 'n groot tegnologiese en ekonomiese probleem. Die afbraak van polisakkariede kan deur middel van suur- of alkaliese behandelings uitgevoer word, maar dit genereer toksiese neweprodukte en uityloeisels wat duur is om te behandel. Derhalwe word die ensimatiese hidrolise van polisakkariede, wat 'n skoon omskakeling teweegbring, verkies.

### Stysel en amilases

Die hoofbron van styselagtige materiaal is hoër plante se sade, bolle en wortels, waar dit tussen 20 en 70% van die massa uitmaak. Die hoof styselbron in die Weste is mielies, terwyl cassawe, sago en graansorghum die hoofbronne in ontwikkelende lande is.<sup>8</sup>

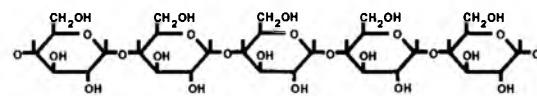
Stysel bestaan uit twee komponente, nl. amilose en amilopektien; dit word skematis in figuur 1 voorgestel. Amilose maak 20 tot 30% van stysel uit en is hoofsaaklik 'n lineêre polimeer, bestaande uit  $\alpha$ -1,4-gekoppelde  $\alpha$ -D-glukoseresidu's met 'n paar  $\alpha$ -1,6-vertakkingspunte. Die gemiddelde kettinglengte van amilose is 500 tot 1000 glukose-eenhede. Amilopektien is die hoofbestanddeel

van stysel (70 - 80%) en het 'n hoogs vertakte struktuur. Amilopektien is ook 'n glukosepolimeer, maar die konfigurasie daarvan bestaan uit lineêre kettings (A, B, C) wat deur middel van  $\alpha$ -1,6-bindings by die vertakkingspunte aan mekaar gekoppel is.<sup>9</sup> Die A-kettings is slegs deur die potensiële reduserende groep aan die molekuul gekoppel, terwyl die B-kettings soortgelyk gekoppel is, maar ook een of meer A-kettings dra. Die C-ketting dra die enigste reduserende groep. Amilopektien het kort en lang kettings waarvan die lengte onderskeidelik wissel tussen 40 tot 60 en 11 tot 25 D-glukosielresidu's.<sup>9</sup>

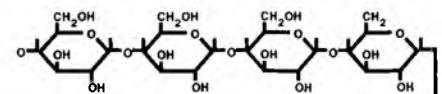
Daar is minstens ses klasse amilolitiese ensieme en die werking daarvan op stysel word skematis in figuur 1 voorgestel. Die ensimatiese hidrolise van stysel na glukose bestaan uit twee prosesse, nl. vervloeiing (deur  $\alpha$ -amilases) en versuikering (deur glukoamilases en onttakkingsensieme,

## STYSEL EN AMILASES

### Struktuur:

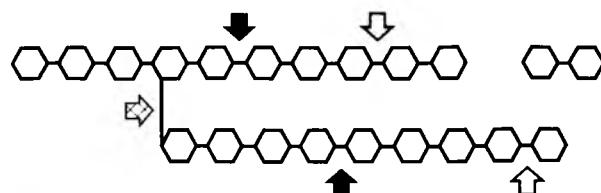


Amilose



Amilopektien

### Hidrolise:



### Amilases:

↓  $\alpha$ -Amilase

↓  $\beta$ -Amilase

↓ Glukoamilase

↗ Pullulanase, Isoamilase

○ Glukose

○○ Maltose

FIGUUR 1: 'n Skematische voorstelling van stysel (amilose en amilopektien) se struktuur en die hidrolise (vervloeiing, onttakking en versuikering) daarvan deur die amilolitiese ensieme.

bv. pullulanase).  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukaanglukanohidrolase EC 3.2.1.1) is 'n endo-ensiem wat  $\alpha$ -1,4-bindings breek en poli- en oligosakkariedkettings (deksstriene) van wisselende lengtes vrystel.  $\beta$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukaanmaltohidrolase, EC 3.2.1.2) is 'n eksensiem wat elke tweede  $\alpha$ -1,4-glukosidiese binding vanaf die nieresuderende punt van die styselmolekuul hidroliseer en dekstrien en die  $\beta$ -anomeriese vorm van maltose produseer, maar dit is egter nie in staat om verby die  $\alpha$ -1,6-vertakpunte te beweeg nie. Glukoamilase (1,4- $\alpha$ -D-glukaanglukanohidrolase EC 3.2.1.3) is 'n eksokarbohidrase wat  $\alpha$ -1,4-bindings aan die nieresuderende punt van die styselmolekuul en tot 'n mindere mate  $\alpha$ -1,6-bindings splits om glukose te lewer. Pullulanase ( $\alpha$ -deksstrien-6-glukanohidrolase EC 3.2.1.41) is 'n ontakingsensiem wat  $\alpha$ -1,6-bindings van pullulaan (maltotriose-eenhede wat deur  $\alpha$ -1,6-glukosidiese bindings gekoppel is) en ander vertakte oligosakkariede splits. Isoamilase (glikogeen-6-glukanohidrolase, EC 3.2.1.68) onttak amilopektien en glikogeen, maar toon geen aktiwiteit op pullulaan nie.<sup>10</sup> Vir die meeste amilolitiese ensieme is stysel slegs toeganklik as substraat indien die stysel vooraf in 'n sogenaamde "kookproses" verhit is. Daar is egter enkele amilases wat rou stysel kan hidroliseer.

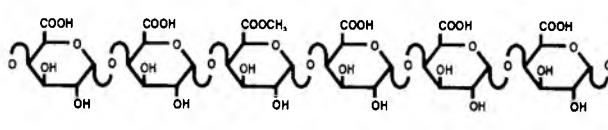
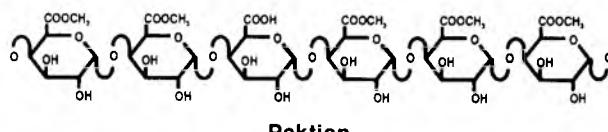
### Pektien en pektinases

Die term *pektiese verbindings* verwys na kompleks kolloiedale polisakkariede wat ryk aan die  $\alpha$ -D-(1,4)-gekoppelde kettings van galaktopiranosiduroonsuur-residu's is. Dit is strukturele heteropolisakkariede en is die hoofbestanddele van die middellamellae en primêre selwand van hoër plante. Pektiese polimere se molekulêre massas wissel tussen 30 000 en 300 000.<sup>11</sup> Die basiese lineêre skelet bestaan uit kettings van gedeeltelik gemetileerde  $\alpha$ -D-1,4-gekoppelde galaktopiranosiduroonsuur-residu's waarop blokke van L-ramnopiranosiel-residu's met onregmatige intervalle voorkom.<sup>11</sup> Hierdie ramnoseryke blokke koppel die lang galakturonankettings aan mekaar. Die galakturonosiel-residu's is gewoonlik met metanol verester en/of by C<sub>2</sub> of C<sub>3</sub> O-geasetileer. Die neutrale suikers D-galaktopiranose en L-arabinofuranose kom as hoogs vertakte arabinogalaktane of hoofsaklik lineêre kettings van  $\beta$ -D-1,4-galaktopiranosiel-residu's voor en is kovalent deur die terminale galaktopiranosiel-residu aan C<sub>4</sub> van ramnose aan die galakturonanketting gekoppel.<sup>11</sup> Die struktuur van pektien word diagrammaties in figuur 2 weergegee.

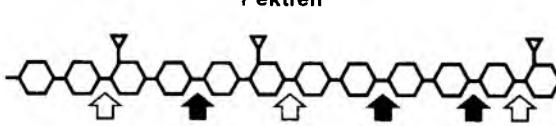
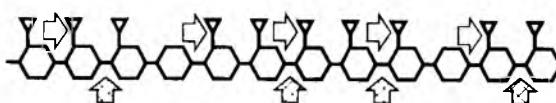
Pektolitiese ensieme kan in twee klasse gegroepeer word, nl. dié wat vir versepding van veresterde gebiede in die galakturonankettings verantwoordelik is en die depolimerases wat die splitsing van die kettings kataliseer. Die werking van pektinases word skematis in figuur 2 voorgestel. Die versepdingsensieme of pektienesterases (pektienpektielhidrolase of pektienmetilesterase EC 3.1.1.11) splits die metilestergroep van die poligalakturoonsuur af.<sup>11</sup> Hidrolise van hierdie metilestergroep deur die pektienesterases begin by die reduserende punt van veresterde pektiensuur en omskep pektien in pektaat, pektiensuur en metanol. Die depolimerases bestaan uit hidrolases en liases. Poligalakturonases is vir die hidrolitiese splitsing van die  $\alpha$ -D-1,4-glikosidiese bindings langs die vrye karboksielgroep verantwoordelik en is die aktiefste op pektaat.<sup>11</sup> Endopol-

## PEKTIEN EN PEKTINASES

### Struktuur:



### Hidrolise:



### Pektinases:

- Pektienesterase**
- Pektaatiase**
- Pektienliase**
- Poligalakturonase**

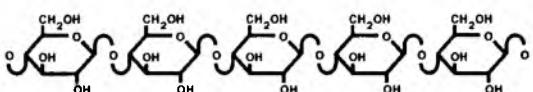


**FIGUUR 2:** 'n Skematiese voorstelling van pektiese verbindings (pektien en pektaat) se struktuur en die degradasie daarvan deur die pektolitiese ensieme (versepdingsensieme en depolimerases).

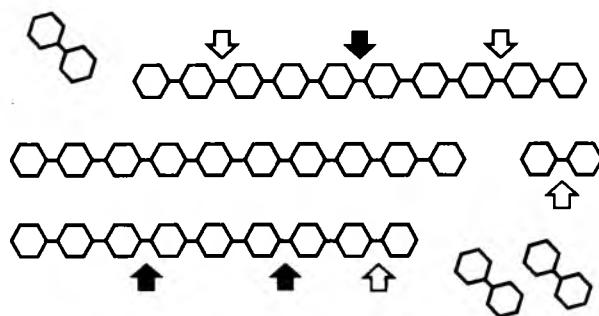
galakturonases (EC 3.2.1.15) splits die pektiese ketting lukraak wat tot 'n klein toename in reduserende groepes en 'n groot afname in viskositeit lei. Daarteenoor splits eksopoligalakturonases (EC 3.2.1.67) mono- en dimere vanaf die galakturonanketting se nieresuderende punt af met 'n gevoldlike stadige afname in viskositeit. Die liases kataliseer 'n  $\beta$ -eliminatingsaksie wat tot die vorming van 'n dubbelbinding tussen C<sub>4</sub> en C<sub>5</sub> in die terminale residu by die nieresuderende punt van die galakturonanketting lei en dit lewer 'n oligomeer met 'n 4,5 onversadigde galaktopiranosiel by daardie punt.<sup>11</sup> Verskillende liases kan op grond van hul voorkeur vir hoogs veresterde pektiensuur of ongemetileerde pektiensuur onderskei word. Pektienliase (EC 4.2.2.10) is die enigste depolimerase wat spesifiek vir hoogs veresterde pektien is en genereer onversadigde oligogalakturonan-metilesters deur die ketting lukraak te

## SELLULOSE EN SELLULASES

### Struktuur:



### Hidrolise:



### Sellulases:

- |                                       |  |            |
|---------------------------------------|--|------------|
| Endoglukanase                         |  | Glukose    |
| Sellobiase<br>( $\beta$ -Glukosidase) |  | Sellobiose |
| Sellobiohidrolase<br>(Eksoglukanase)  |  |            |

FIGUUR 3: 'n Skematische voorstelling van sellulose se primêre struktuur en die hidrolise daarvan deur sellulolitiese ensieme.

breek.<sup>11</sup> Endo- (EC 4.2.2.2) en eksopektaatliases (EC 4.2.2.9) depolimeriseer pektaat. Laasgenoemde ensiem is spesifiek vir die voorlaaste binding by die reduserende punt van die galakturonanketting en stel onversadigde digalaktosiduronaat as enigste eindproduk vry.

### Sellulose en sellulases

Sellulose is verreweg die volopste van alle soliede organiese materiaal en biljoene ton daarvan word jaarliks deur fotosintetiese fiksasie van koolstofdioksied in plante geproduseer.<sup>12</sup> Die algemeenste bron van sellulose is hout. In die natuur is sellulose altyd met ander verbindings, soos hemisellulose, lignien en pektien, geassosieer. Op 'n droë basis, bevat hout 40 tot 55% sellulose (onoplosbare vesels van  $\beta$ -1,4-glukaan), 25 tot 40% hemisellulose en 15 tot 35% lignien ('n komplekse fenoliese struktuur).<sup>13</sup> Groot hoeveelhede sellulosebevattende materiaal word jaarliks

as afval deur munisipale, industriële en landbou-aktiwiteite (bv. in die hout-, papier- en graanbedrywe) geproduseer. In die VSA alleen word daar jaarliks meer as 250 miljoen ton stedelike afval (bestaande uit 40 tot 50% sellulose) en 200 miljoen ton selluloseryke landbou-afval geproduseer.<sup>14</sup>

Sellulose is 'n lineêre kondensasie-poli-alkohol bestaande uit  $\beta$ -1,4-glykosidies-gekoppelde D-anhidroglukopiranose-eenhede.<sup>12</sup> Dit bestaan uit 'n lineêre polimeer van glukose-eenhede waarin elke glukose-residu 180° relatief tot die naasliggende residu langs die hoofas van die ketting geroteer is. Die graad van polimerisasie van sellulose wissel tussen 30 en 15 000 glukose-eenhede.<sup>12</sup> Die primêre struktuur van sellulose (soos voorgestel in figuur 3) is relatief eenvoudig, maar die tersiêre struktuur daarvan is uitsers kompleks. Tussen 60 en 70 naasliggende unipolare kettings assosieer deur middel van waterstofbindings en Van der Waals-interaksies om gevormde mikrofibrille te vorm, wat op hulle beurt weer aggregeer om onoplosbare vesels te vorm.<sup>12</sup> Die hoë kapasiteit van waterstofbindings tussen individuele kettings verleen aan sellulose 'n hoë graad van sterkte en is ook die basis van sy water-onoplosbaarheid. Sellulose kom in verskeie kristallyne vorme voor en staan bekend as sellulose I tot IV.<sup>13</sup> Sellulose I is die natuurlike vorm van sellulose wat in die selwande van plante voorkom. In die natuur is kristallyne sellulosevesels gebed in 'n matriks van hemisellulose, lignien en pektien wat deur middel van waterstofbindings saamgesnoer is.

Die kompaktheid van dié molekules verlaag die toeganklikheid van sellulose vir die sellulolitiese ensieme en kompliseer daardeur die ensimatiese hidrolise daarvan.<sup>12</sup> Dit is waarom daar nie slegs hidrolitiese ensieme by die afbraak van sellulose betrokke is nie, maar ook oksidatiewe en fosforilitese ensieme. Daar word na al hierdie ensieme as *sellulases* verwys. Sellulases is multikomponent-komplekse en bestaan dikwels uit endoglukanases (1,4- $\beta$ -D-glukaanglukanohidrolases EC 3.2.1.4), eksoglukanases (1,4- $\beta$ -D-glukaansellobiohidrolase EC 3.2.1.91) en sellobiases (1,4- $\beta$ -D-glukosiedglukohidrolase EC 3.2.1.21).<sup>12</sup> Sellobiases is spesifiek vir sellobiose en behoort tot 'n diverse familie van  $\beta$ -glukosidases wat in staat is om 'n wye spektrum van  $\beta$ -glukosiede te hidroliseer. Die stapsgewyse werking van hierdie sellulosekomponente word skematis in figuur 3 uiteengesit en is sinergisties van aard. Endoglukanases val die selluloseketting lukraak aan en splits die  $\beta$ -1,4-glukosidiese bindings, terwyl eksoglukanases sellobiose (twee  $\beta$ -gekoppelde glukose-eenhede) van die nereduserende punt van sellulose vrystel.<sup>12</sup> Die hoofproduk van gesamentlike endoglukanase- en eksoglukanase-aktiwiteit op sellulose is dus sellobiose wat dan deur  $\beta$ -glukosidases na glikose omgeskakel word.<sup>12</sup>

### Hemisellulose en hemisellulases

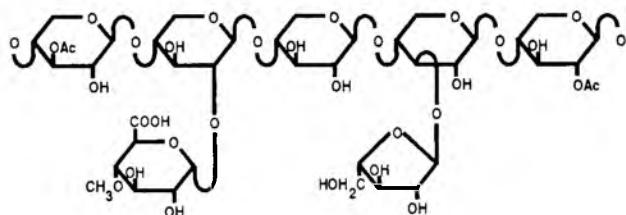
Hemisellulose is die tweede volopste polisakkarie in die selwande van plante, die grootste reservoir van gefikseerde koolstof in die natuur. In teenstelling met sellulose, het hemisellulose nie 'n homogene chemiese samestelling nie. Hemisellulose bestaan uit 'n reeks van heteropolisakkarie wat glukane, mannane, arabinane en xilane insluit.<sup>15</sup> Die vernaamste hemisellulose,  $\beta$ -1,4-xilaan, het 'n hoë graad van polimerisasie en is hoogs vertak. Die algemeenste substituente wat op die  $\beta$ -1,4-gekoppelde D-xilopiranosi-

residu's voorkom, is asetiel-, arabinosiel- en glukuronisiel-residu's (figuur 4). Die frekwensie en samestelling van dié sytakke hang van die xilaan af.<sup>16</sup> Die belangrikste hemisellulose van jong monokotiele se selwande is 'n rugggraat van  $\beta$ -1,4-gekoppelde D-xilopiranosieleresidu's wat sykettings van enkel glukuronsuur-eenhede en kort vertakte kettings van  $\alpha$ -1,3- en  $\alpha$ -1,5-gekoppelde arabinofuranoseresidu's.<sup>15</sup> Indikotiele se primêre selwande vervang xiloglukane die arabinoxilanen as die vernoomste hemisellulose.<sup>16</sup> Aansienlike hoeveelhede bykomende hemisellulose word tydens die sekondêre verdikking van plantselwande neergelê. In sowel monokotiele as dikotiele neem dit die vorm van glukuronono-arabinoxilane aan. Afhangende van die plant, word kleiner hoeveelhede glukose, galaktose en ramnose ook aangetref.

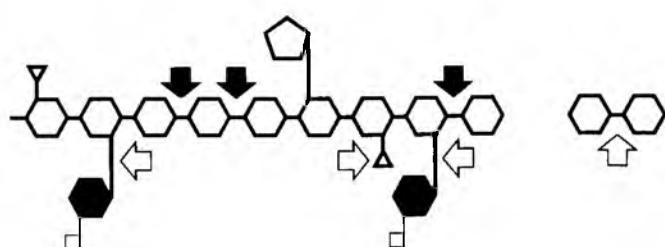
Hardehout (loofhout) se vernaamste hemisellulose is geasetileerde xilaan, terwyl dit galaktoglukomannaan en arabinoxilaan in sagtehout (jonghout of greinhout), arabinogalakaan in kernhout (pithout) en arabinoxilaan in grasse is.<sup>15</sup> Koppeling tussen xilaan en lignien kan ook plaasvind, terwyl fenoliese verbinding soms in die kruiskoppeling van xilaanmolekules en in die koppeling van xilaan aan ander polisakkariede betrokke is.<sup>16</sup> Xilaan neig om aan sellulose te adsorbeer en deur middel van waterstofbindings met ander komponente van hemisellulose te aggregeer. Die huidige konsep van die struktuur van lignosellulose is dat die sellulosevesels in 'n lignien-hemisellulose-matriks gelede is en dat xilaan 'n betekenisvolle rol in die strukturele integriteit van selwande deur sowel kovalente as niekovalente assosiasies speel.<sup>16</sup>

## HEMISELLULOSE EN HEMISELLULASES (xilaan and xilanases)

### Struktuur:



### Hidrolise:



### Hemisellulases:

- |                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| Xilanase             | Asetiel             |
| Xilosidase           | Xilose              |
| Ander hemisellulases | Arabinose           |
|                      | Metlelglukuroonsuur |

FIGUUR 4: 'n Skematiese voorstelling van die struktuur van hemisellulose se hoofkomponent,  $\beta$ -xilaan, en die hidrolise daarvan deur die xilanolitiese ensieme.

Nie alle xilosidiese bindings in lignosellulose is ewe toeganklik vir xilanolitiese ensieme nie. Gedurende die proses van hidrolise verander die toeganklikheid van sommige bindings. Ten einde die verskillende bindings doeltreffend aan te val, het mikro-organismes xilanolitiese sisteme ontwikkel wat uit verskeie ensieme met verskillende spesifisiteite bestaan. Hierdie xilanolitiese sisteme is heelwat meer kompleks as die multi-ensiem sellulolitiese sisteme, omdat hemisellulose struktureel soveel ingewikkelder as sellulose is. Die selwande van plante is huis ontwerp om mikrobiiese afbraak te weerstaan en daarom beskerm lignien en hemisellulose die sellulose teen ensimatiese aanval.

Hemisellulases (glikaanhidrolases EC 3.2.1), wat spesifiek die ruggraat van hemisellulose afbreek, sluit  $\beta$ -D-galaktanases,  $\beta$ -D-mannanasen en  $\beta$ -D-xilanases in.<sup>16</sup> Endoxilanases (EC 3.2.1.8) word dikwels deur substituente verhinder om die xilaanruggraat te splits. In baie gevalle moet hierdie substituente eers verwijder word alvorens die xilaanskelet afgebreek kan word. Die ensieme wat hier betrokke is, sluit asetylesterases (EC 3.1.1.6),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasen (EC 3.2.1.55) en  $\alpha$ -glukuronidasen (EC 3.2.1) in.<sup>16</sup> Eens die endoxilanases klein xilo-oligosakkariede vrygestel het, splits die  $\beta$ -xilosidasen (EC 3.2.1.37) die oligomeriese fragmente hoofsaaklik na xilose. Die werking van hierdie ensieme word skematis in figuur 4 aangetoon. Die doeltreffende en volledige hidrolise van hemisellulose vereis dus sinergistiese interaksies van 'n verscheidenheid van hoofketting- en sykettingsplitsende ensieme met verskillende spesifisiteite.<sup>15</sup>

## GENETIESE UITDRUKKING VAN POLISAKKARASEGENE IN GIS

Ten einde die substraatreks van *S. cerevisiae* te verbreed sodat dit in staat sal wees om polisakkariedyke materiaal na kommersieel belangrike kommoditeite om te skakel, moet gene wat vir amilases, pektinases, sellulases in hemisellulases kodeer, eers gekloneer, gekarakteriseer en gemanipuleer word alvorens dit met behulp van effektiewe ekspressie-sekresie-kassette in industriële rasse van *S. cerevisiae* uitgedruk kan word. Om hierdie doel te verwesenlik, is grondige kennis van die onderskeie sellulêre meganismes en strukture wat regstreeks of onregstreeks tot die uiteindelike produkopbrengs bydra, nodig. Die keuse van transformasiesisteem wat gebruik word om 'n spesifieke geen na 'n gis oor te dra en dit daarin uit te druk, asook die genetiese agtergrond van die bepaalde ontvangersgis, is dus van kardinale belang. Die regulering van geen-uitdrukking in *S. cerevisiae* vind op verskillende vlakke plaas, nl.(i) die organisasie van genetiese materiaal, soos vervat in die chromosome en selkern, (ii) transkripsie (inisiasie, verlenging, terminering), (iii) die boodskapper-ribonukleïensuur (mRNA) se metabolisme (transport, spitslas, kroning, stabilisering of afbraak), (iv) translasie (inisiasie, verlenging, terminering) en (v) natranslasieprosesse (polipeptiedvouwing, prosessering en glikosilering).<sup>17</sup> Aangesien geenuitdrukking en protein-uitskeiding komplekse, multistapprosesse is (figuur 5), kan hindernisse op talle plekke teegekom word - vanaf transkripsie tot die stabiliteit van die uitgeskeide geenproduksie. Die tipe vektor, seleksiemerker, promotor en sekresiesein

wat gebruik gaan word om die polisakkarasegene in *S. cerevisiae* mee uit te druk, moet dus uiters omsigtig gekies word. Hierdie parameters speel ook 'n krities belangrike rol ten opsigte van die wetlike kriteria waaraan geneties gemodifiseerde mikro-organismes moet voldoen voordat dit vrygestel mag word vir gebruik in die industrie. Bo en behalwe hierdie wetlike riglyne moet die vrese en eise van die verbruiker met betrekking tot die gebruik van geneties gemanipuleerde giste in die produksie van ESP en alkohol ook besweer word. Die volledige nukleotiedvolgorde van die deoksiribonukleïensuur (DNA) wat in die gemodifiseerde polisakkarolitiese gis getransformeer word, sal dus bepaal en deeglik ontleed moet word, sodat geen potensiële gesondheidsgevaar of ekologiese versturing kan ontstaan nie.

## Uitdrukking van amilasegene

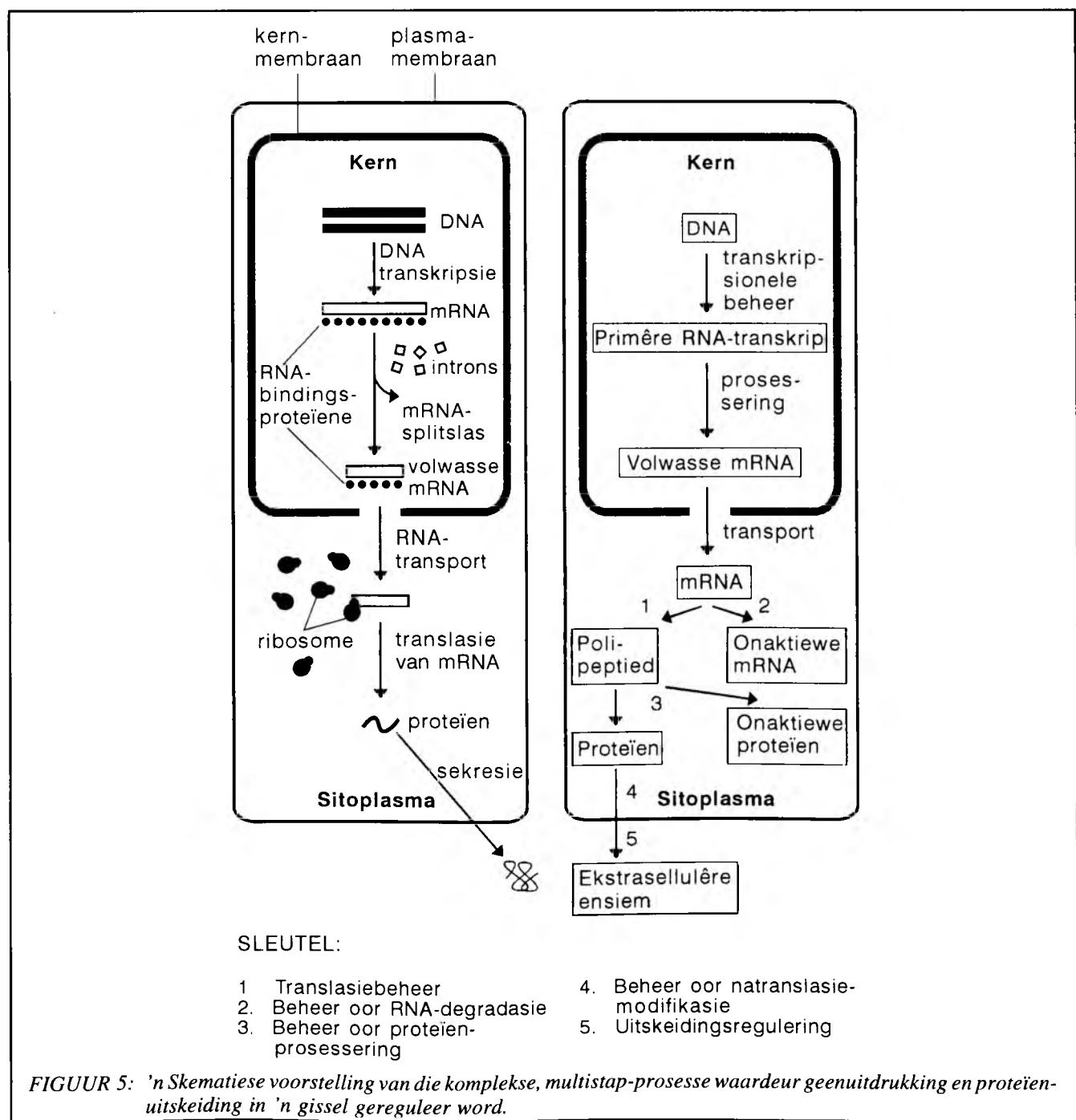
Terwyl dit algemeen aanvaar word dat *S. cerevisiae* nie oor die vermoë beskik om stysel te assimileer nie, kom beperkte amilolitiese vermoë tog by die sogenaamde "diastatiese" rasse (voorheen bekend as *S. diastaticus*) voor. Styselbenutting deur *S. cerevisiae* var. *diastaticus* is afhanglik van die teenwoordigheid van ten minste een van die drie ongekoppelde gene, *STA1*, *STA2* en *STA3*, wat elk vir 'n ekstrasellulêre glukoamilase-isoënsiem kodeer.<sup>18</sup> Hierdie glukoamilasegene is soos volg allelies verwant aan die sogenaamde dekstrinasegene: *STA1* en *DEX2*, *STA2* en *DEX1*, asook *STA3* en *DEX3*.<sup>19</sup> Buiten hierdie gene van *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, kom daar nog 'n vierde glukoamilasegeen, *SGA1*, en twee kriptiese DNA-volgordes, *S1* en *S2*, in alle rasse van *S. cerevisiae* voor.<sup>19</sup> Die *SGA1*-geen kodeer vir 'n intrasellulêre glukoamilase wat hoofsaaklik vir die afbraak van interne glikogeen tydens askospoorvorming verantwoordelik is en word slegs aangeskakel wanneer a/ $\alpha$ -diploïede-selle meiose ondergaan.<sup>19</sup> Om 'n beter begrip van die onderlinge strukturele en genetiese verwantskappe te kry, is dié gene gekloneer, gekarakteriseer en gekarteer. DNA:DNA-hibridisasiestudies het getoond dat die glukoamilasegene homoloog en polimorfies is, en dat *STA1*, *STA2*, *STA3* en *SGA1* onderskeidelik op unieke 11 kb *Aval*-, 19 kb *HindIII*-, 11 kb *Xhol*- en 9 kb *Aval*-genoomfragmente geleë is.<sup>19</sup> Die gene is soos volg gekarteer: *STA1* op chromosome IV, *STA2* op chromosome XIV, *SGA1*, *S1* en *S2* op chromosome IX.<sup>20</sup> Die restriksiekaarte van *STA1*, *STA2* en *STA3* is identies, terwyl *SGA1* se restriksiekaart identies aan die middel en die 3'-gebied van die STA-gene is.<sup>21,22,23</sup> *S1* en *S2* is homoloog aan die 5'-gebied van die STA-gene. Nadat *STA1*, *STA2*, *SGA1*, *S1* en *S2*<sup>23,24</sup> se nukleotiedvolgordes bepaal en vergelyk is, is daar tot die gevolg trekking gekom dat *STA1* en *STA2* (en *STA3* by wyse van ekstrapolasie) vir identiese glukoamilases kodeer, terwyl *S2*, *S1* en *SGA1* onderskeidelik vir die volgende homoloë komponente van die STA-glukoamilases kodeer: 'n promotor en hidrofobiese leierpeptied (HLP) vir proteïenuitskeiding, 'n treonien-serienryke domein (TS) vir styselbinding en 'n katalitiese domein (KD) vir glukoamilase-aktiwiteit. Daar is voorgestel dat die STA-gene ontwikkel het deurdat die residensiële DNA-segmente, *S1*, *S2* en *SGA1*, deur middel van rekombinasie oorsprong aan die eerste voorouerlike STA-geen gegee het.<sup>23</sup> Na alle waarskynlikheid het drie kopieë van hierdie eerste STA-geen ontstaan en oor die genoom

verstrooid geraak om so oorsprong aan die STA-multigeenfamilie te gee.

Die STA-gene word positief gereguleer deur die teenwoordigheid van die *GAMI*- (*SNF2*), *GAM2*- (*RPD1*) en die *GAM2*- (*ADR6*) gene.<sup>23</sup> Hierbenewens word die STA-gene ook deur die *trans*-werkende aksie van *SNF1*, *SNF5*, *SNF6* en *HAF2* se geenprodukte geaktiveer.<sup>24</sup> Voorts word die STA-gene op drie vlakke negatief gereguleer.<sup>18</sup> Die meeste rasse van *S. cerevisiae* (uitgesonderd *S. cerevisiae* var. *diastaticus*) bevat die *STA10*-onderdrukkergeen, wat die transkripsie van die STA-gene op 'n ongedefinieerde wyse afskakel.<sup>26,27</sup> Verder word die STA-gene vermoedelik deur die *MATα1/MATα2*-onderdrukker in talle a/α-diploïede-gisselle afgeskakel.<sup>27</sup> Die sintese van

glukoamilase is ook aan katabolietonderdrukking (glukose-onderdrukking) onderworpe.<sup>27</sup> Met behulp van delesie-analises is die fynstruktur van die STA-geenpromotoers ontleed en die elemente wat vir aktivering (UAS) en onderdrukking (URS) verantwoordelik is, is gedefinieer.<sup>23,28</sup> Hiervolgens kan daar vasgestel word watter deel van die STA-promotor interaksie met remmingsfaktore tydens onderdrukking deur *STA10* en glukose ondergaan. Geen gebied kon egter in die STA-geenpromotor gevind word wat deur die *MATα1/MATα2*-onderdrukker gebind word nie.

As 'n eerste stap in die ontwikkeling van 'n amilolitiese *S. cerevisiae*-ras, is daar gepoog om die *STA2*-geen van onderdrukking te onthef deur die *STA2*-promotor te manipuleer of te vervang.<sup>29</sup> Wanneer die *STA2*-



geenpromotor met 'n gemodifiseerde weergawe van die promotor van *S. cerevisiae* se alkoholdehidrogenasegeen ( $ADC1_p$ ) vervang is, is 'n oorproduksie van glukoamilase in *STA10*-bevattende rasse verkry. Hierdie  $ADC1_p$ -promotor se volgorde, wat aan etanolonderdrukking onderworpe is, is eers verwyder sodat glukoamilase konstitutief uitgedruk kon word.

Nadat die *STA2*-glukoamilasegeen doeltreffend in *S. cerevisiae* gefunksioneer het, is daar begin om ook 'n  $\alpha$ -amilase- en pullulanasegeen in *S. cerevisiae* uit te druk. Die  $\alpha$ -amilasegeen (*AMY1*) van die Gram-positiewe bakterie, *Bacillus amyloliquefaciens*,<sup>30</sup> is gekloneer en sonder enige manipulasie van die bakteriese promotor en sekresiesein in *S. cerevisiae* uitgedruk.<sup>31</sup> Verhoogde produksie van  $\alpha$ -amilase deur *S. cerevisiae* is egter verkry toe die bakteriese reguleringsvolgordes vervang is met die  $ADC1_p$ -geenpromotor, die paringsferomon se sekresiesein ( $MFa1_s$ ) en die triptofaan-sintasegeen se termineerder ( $TRP5_T$ ).<sup>29,32</sup> Dieselfde reguleringsvolgordes is ook gebruik om die pullulanasegeen (*PUL1*) van die Gram-negatiewe bakterie, *Klebsiella pneumoniae*,<sup>33</sup> in *S. cerevisiae* uit te druk.<sup>34,35</sup> Die gesamentlike uitdrukking van *STA2*, *AMY1* en *PUL1* in *S. cerevisiae* het bevestig dat glukoamilase,  $\alpha$ -amilase en pullulanase stysel sinergisties afbreek.<sup>36,37</sup> Laasgenoemde rekombinante giste kon tussen 93 en 99% van die kultuurmedium benut.

'n Verdere verbetering van dié amilolitiese gis wat ontwikkel is, behels die insluiting van amilases wat rou stysel kan hidroliseer. In die praktyk sou dit beteken dat die stysel nie vooraf deur die duur kookproses toeganklik vir die amilolitiese ensieme gemaak hoef te word nie. Om hierdie rede is 'n  $\alpha$ -amilase- (*RSA1*) en glukoamilasegeen (*RSG1*) van die gis *Endomyces fibuliger* gekloneer, gekarakteriseer en in *S. cerevisiae* uitgedruk. Beide hierdie ensieme breek rou stysel doeltreffend af. Daar word nou beoog om die *RSA1*- en *RSG1*-gene saam met die *AMY1*-*STA2*- en *PUL1*-gene in *S. cerevisiae* uit te druk (figuur 6).

### Uitdrukking van pektinasegene

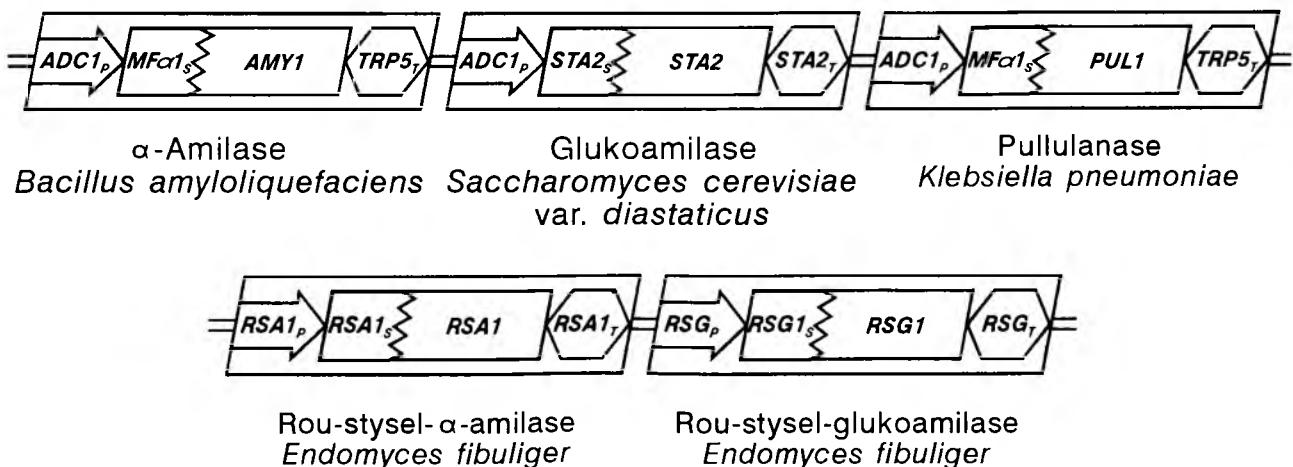
Pektinases word hoofsaaklik deur skimmelswamme en bakterieë geproduceer, terwyl pektolitiese aktiwiteit selde deur giste geproduceer word. Dit geld ook vir die genus *Saccharomyces*. Swak pektolitiese aktiwiteit is egter by enkele *Saccharomyces*-spesies, soos *S. carlsbergensis*, *S. chevalieri*, *S. oviformis*, *S. uvarum* en *S. vini* gevind.<sup>38,39,40</sup> Die meeste van hierdie spesies is intussen as *S. cerevisiae* geherklassifieer en daar kan dus aanvaar word dat sekere rasse van *S. cerevisiae* wel swak pektolitiese aktiwiteit produseer. Hierdie aktiwiteit kan toegeskryf word aan die teenwoordigheid van pektienesterase in *S. cerevisiae* wat dus pektien in pektaat omskep, maar verder geen noemenswaardige effek op pektaat het nie.<sup>39,40</sup>

Om hierdie beperkte pektolitiese aktiwiteit van *S. cerevisiae* aan te vul, is die pektaatliase- en poligalakturonasegene van die sagtevrotplantpatogene bakterieë, *Erwinia chrysanthemi* en *E. carotovora*, geïsoleer, gekarakteriseer en gemodifiseer.<sup>38,39</sup> Beide hierdie gene se promotor-, sekresiesein- en termineringsvolgordes is onderskeidelik vervang met die  $ADC1_p$ -geenpromotor,  $MFa1_s$ -leiervolgorde en  $TRP5_T$ -geentermineerde van *S. cerevisiae*. Hierdie pektaatliase- (*PEL5*) en poligalakturonasegene (*PEH1*) is suksesvol in *S. cerevisiae* uitgedruk (figuur 7). Die gesamentlike uitdrukking van *PEL5* en *PEH1* in *S. cerevisiae* het die afbraak van pektaat sinergisties verhoog.<sup>40</sup>

### Uitdrukking van sellulase- en hemisellulasegene

Talle spesies van giste produseer  $\beta$ -1,3-glukanases. Onder hulle is daar dié glukanases wat die  $\beta$ -O-glikosidiese bindings van  $\beta$ -glukaanketting hidroliseer en lei tot die vrystelling van glukose en oligosakkariedes. In *S. cerevisiae* word hierdie glukanolitiese aktiwiteit as ekso- en endo- $\beta$ -1,3-glukanases gedefinieer.<sup>41,42</sup> Eersgenoemde ensiem hidroliseer  $\beta$ -glukaan na glukose, terwyl laasgenoemde ensiem die  $\beta$ -glukaanketting by intermediêre punte aanval.

## AMILASEKASSET



FIGUUR 6: 'n Skematische voorstelling van amilasegeenkassette bestaande uit gemodifiseerde gene wat vir  $\alpha$ -amilase, glukoamilase, pullulanase en roustysel-amilases kodeer.

## PEKTINASEKASSET



**Pektaatliese  
*Erwinia chrysanthemi***

**Poligalakturonase  
*Erwinia carotovora***

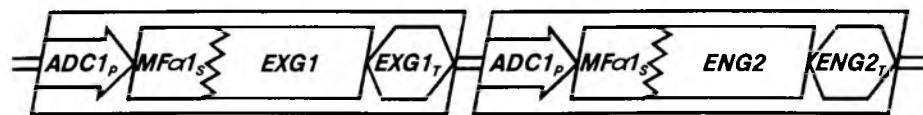
**FIGUUR 7:** 'n Skematische voorstelling van 'n pektinasegeenkaset bestaande uit die gis se pektienesterasegeen en gemodifiseerde gene wat vir pektaatliese en poligalakturonase kodeer.

en 'n mengsel van oligosakkariede en 'n geringe hoeveelheid glukose vrystel.<sup>43</sup> Aangesien β-1,3-glukaan die strukturele polisakkaried is wat vir die vorm en stewigheid van die gisselwand verantwoordelik is, kan daar verwag word dat die β-1,3-glukanases 'n rol in belangrike morfogenetiese prosesse, waar beheerde outolise van die β-1,3-glukaan betrokke is, speel. Daar word gespekuléer dat *S. cerevisiae* se endogene β-1,3-glukanases beheerde hidrolise van die selwand tydens uitsetting, botselvorming, konjugasie en sporulasie kataliseer. Hierdie aanname is daarop gebaseer dat die vlakke van β-1,3-glukanase-aktiwiteit gedurende die groeisiklus van *S. cerevisiae* wissel. Botselvorming en sporulasie gaan gepaard met 'n toename in β-1,3-glukanase-aktiwiteit. Tot op hede is daar egter nog geen direkte

beweys gevind wat daarop dui dat hierdie ensieme bepaalde funksies tydens sitodifferensiasie van die gissel verrig nie.<sup>43</sup>

Twee vorme van *S. cerevisiae* se ekso-β-1,3-glukanase (EXG1 en EXGII) kom in die kultuurmedium van vegetatief groeiende selle voor. By nadere ondersoek en ontleding van hierdie ensieme het dit geblyk dat EXG1 en EXGII ontstaan weens verskillende glikosileringpatrone van dieselfde geenproduk.<sup>44</sup> Terwyl die ekso-β-1,3-glukanase in die kultuurmedium uitgeskei word, is daar gevind dat die endo-β-1,3-glukanase deel van die gisselwand vorm.<sup>42</sup> EXG1(BGL1) en ENG2(BGL2), wat onderskeidelik vir die ekso- en endo-β-1,3-glukanase kodeer, is albei reeds gekloneer en die volgorde daarvan bepaal.<sup>41,42,43,45,46</sup> Daar

## SELLULASEKASSET



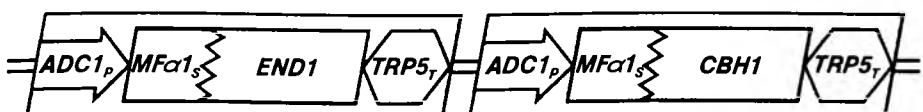
**Ekso-β-1,3-glukanase  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Endo-β-1,3-glukanase  
*Saccharomyces cerevisiae***



**Sellobiase  
*Endomyces fibuliger***

**β-Glukosidase  
*Endomyces fibuliger***

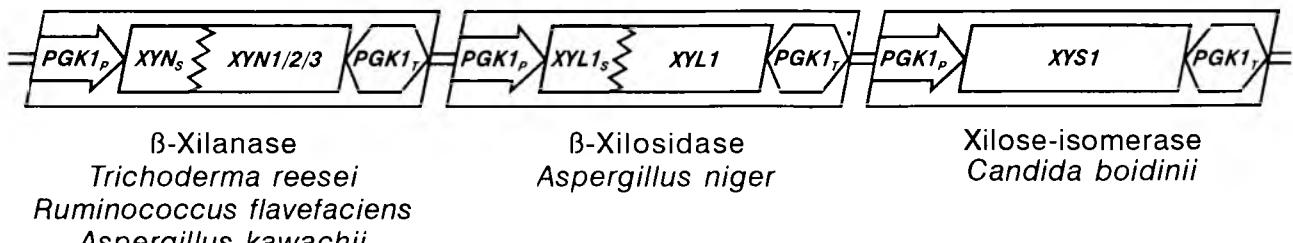


**Endo-β-1,4 glukanase  
*Butyrivibrio fibrisolvens***

**Sellobiohidrolase  
*Phanerochaeta chrysosporium***

**FIGUUR 8:** 'n Skematische voorstelling van 'n sellulasegeenkaset bestaande uit gemodifiseerde gene wat vir ekso- en endoglukanases, sellobiohidrolase, sellobiase en β-glukosidase kodeer.

## HEMISELLULASEKASSET



FIGUUR 9: 'n Skematisiese voorstelling van 'n hemisellulasegeenkaset bestaande uit gemodifiseerde gene wat vir  $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -xilosidase en xilose-isomerase kodeer.

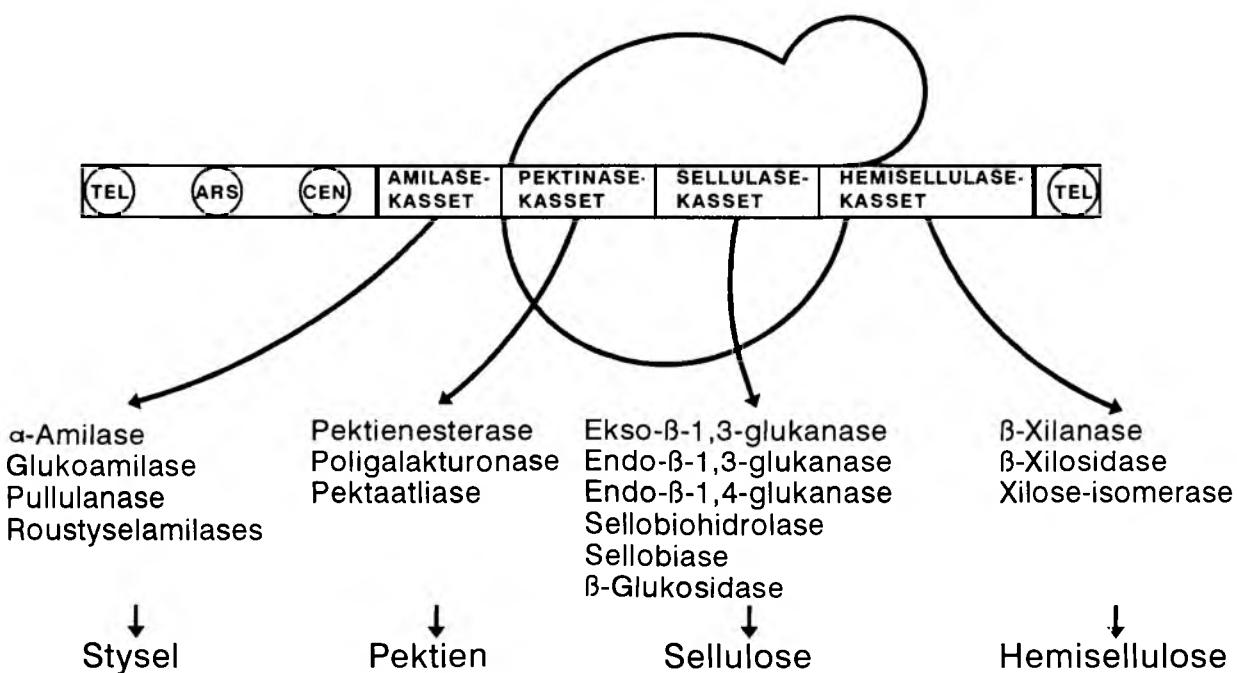
word nou beoog om hierdie twee gene aan die *ADC1<sub>p</sub>*-*MFa1<sub>s</sub>*-ekspressie/seksiekasset te koppel sodat beide ensieme konstitutief gesintetiseer en uitgeskei kan word.

Aangesien kristallyne sellulose hoofsaaklik  $\beta$ -1,4-glikosidiese bindings bevat, sal die *EXG1*- en *ENG2*-gekodeerde  $\beta$ -1,3-glukanases van *S. cerevisiae* met  $\beta$ -1,4-glukanolitiese aktiwiteit gekomplementeer moet word. Om hierdie rede is die endo- $\beta$ -1,4-glukanasegeen van die rumenbakterie, *Butyrivibrio fibrisolvens*, tussen *ADC1<sub>p</sub>*-*MFa1<sub>s</sub>* en *TRP5<sub>T</sub>* geplaas en in *S. cerevisiae* uitgedruk.<sup>47</sup> Hierdie endo- $\beta$ -1,4-glukanasegeen (*END1*) is ook reeds saam met die *PEL5*-en *PEH1*-pektinasegene in *S. cerevisiae* uitgedruk. Aangesien die *END1*-geenproduk ietwat groter is en oor vyf herhalings van Pro-Asp-Pro-Thr/Gln-Pro-

Val-Asp beskik, het laasgenoemde rekombinante gis eers die pektinases en daarna die endo- $\beta$ -1,4-glukanases uitgeskei.<sup>47</sup>

Daarbenewens is die sellobiase- (*BGL1*) en die  $\beta$ -glukosidasegene (*BGL2*) van *E. fibuliger*, asook die  $\beta$ -xilanasegene (*XYN2* en *XYN3*) van *Trichoderma reesei* en *Aspergillus kawachii* gekloneer, gekarakteriseer en in *S. cerevisiae* uitgedruk (ongepubliseerde data). Tans probeer ons ook om die sellobiohidrolasegeen (*CBH1*) van die witvrotswam *Phanerochaeta chrysosporium* en die xylanasegeen (*XYN1*) van die bakterie *Ruminococcus flavefaciens* in *S. cerevisiae* uit te druk (figuur 8). Terselfdertyd word daar ook in ons laboratoria probeer om die gene vir  $\beta$ -xilanase (*XYN1*),  $\beta$ -xilosidase (*XYL1*) en

## POLISAKKARASEKASSET



FIGUUR 10: 'n Skematisiese voorstelling van 'n kunsmatige minichromosoom bestaande uit 'n polysakkarakasset wat vir amilolitiese, pektolitiese, sellulolitiese en xilanolitiese ensieme kodeer.

xilose-isomerase (*XYS1*) uit *T. reesei*, *Aspergillus niger* en *Candida boidinii* te kloneer en dan saam met die sellulasegene in *S. cerevisiae* uit te druk (figuur 9).

## GEVOLGTREKKING EN VOORUITSKOUING

Weens die euee lange verbintenis van *S. cerevisiae* met voedsel- en alkoholproduksie, is dit die aangewese gis om landbougewasse en industriële afvalmateriaal na ESP en brandstofetanol om te skakel. Hierdie twee kommoditeite sal nie net die proteïen- en energietekorte aanvul nie, maar die bio-omsetting van polisakkariëdryke nywerheidsuitvloeisels kan grootliks tot die hersirkulering van afval en die beskerming van die omgewing en waterbronre bydra. Hiervoor moet *S. cerevisiae* egter geneties gemodifiseer word sodat dit in staat sal wees om stysel, pektien, sellulose en hemisellulose doeltreffend te kan benut. Tot op hede het ons daarin geslaag om gene wat vir bepaalde amilases, pektinases en sellulases kodeer, uit ander mikro-organismes te kloneer en op só 'n wyse te manipuleer dat dit in *S. cerevisiae* uitgedruk kan word. Bykomende sellulase- asook hemisellulasegene word tans gekloneer, gekarakteriseer en voorberei vir uitdrukking in *S. cerevisiae*.

Toekomstige navorsing sal daarop gerig word om dié gene op amilase-, pektinase-, sellulase- en hemisellulase-kassette te kombineer. Dié vier geenkassette sal op 'n kunsmatige minichromosoom geplaas word en in industriële rasse van *S. cerevisiae* getransformeerd word (figuur 10). Hierdie rekombinante giste sal dan geëvalueer word ten opsigte van hul polisakkarolitiese aktiwiteit en hul vermoe om ESP en etanol te produseer.

## SUMMARY

The world's problem with overpopulation and environmental pollution has created an urgent demand for alternative protein and energy sources. One way of addressing these burning issues, is to produce single-cell protein (for animal feed and food supplements) and fuel ethanol from polysaccharide-rich agricultural crops and industrial waste by using baker's yeast. Owing to the absence of certain depolymerising enzymes, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is unable to utilise the vast reserves of energy sources present in polysaccharides. These enzymes are necessary for the liberation of fermentable sugars from polysaccharide-rich substrates. At present, co-cultures (mixed-culture fermentations) and/or commercial enzyme preparations are being used in multi-step bioconversions of polysaccharide biomass to yield commercially important commodities. Alternatively, *S. cerevisiae* can be complemented by heterologous polysaccharase-encoding genes. The manipulation of *S. cerevisiae* to synthesise and secrete amylases, pectinases, cellulases and hemicellulases will facilitate a cheaper, direct one-step bioconversion of surplus polysaccharide-rich agricultural crops and wastes to SCP or alcohol. Such processes will not only provide a source of high-quality protein or fuel extender to Southern Africa, but will also create new markets for the region's crops and curb

environmental pollution. This will in turn stimulate agriculture in general and contribute to the upliftment of our rural communities.

Polysaccharides, such as starch, pectin, cellulose and hemicellulose, are the most abundant and widely distributed naturally occurring organic compounds. The hydrolysis of these polymers to assimilable sugars remains a major technological and economic problem. The degradation of polysaccharides can be carried out by acid or alkaline treatment, but this is expensive, time-consuming and generates toxic by-products and waste that are expensive to treat. The enzymatic hydrolysis of polymeric substances by amylases, pectinases, cellulases and hemicellulases is therefore preferred to chemical depolymerisation.

Starch, pectin, cellulose and hemicellulose are abundant but recalcitrant biopolymers. Starch consists of linear (amylose) and (amylopectin) glucose polymers, whereas pectin substances consists of partially methylated  $\alpha$ -1,4-D-galacturonan chains that are linked to L-rhamnopyranose units, carrying neutral sugar (D-galactopyranose and L-arabinofuranose) side chains. Cellulose is composed of repeating glucose units linked by  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds. Unlike cellulose, hemicellulose does not have a homogeneous chemical composition. The predominant hemicellulose,  $\beta$ -1,4-xylan, has a high degree of polymerisation and is highly branched. The common substituents found on the  $\beta$ -1,4-linked D-xylopyranosyl residues are acetyl, arabinosyl and glucuronosyl residues.

The enzymatic degradation of starch to glucose involves two processes, namely liquefaction (by  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases) and saccharification (by glucoamylase and debranching enzymes such as pullulanases and isoamylases).  $\alpha$ -Amylase is an extracellular endo-enzyme that catalyzes the hydrolysis of the  $\alpha$ -1,4-glucosidic linkages and is capable of bypassing  $\alpha$ -1,6-linkages, producing poly- and oligosaccharide chains of varying length.  $\beta$ -Amylase is an exo-acting enzyme that hydrolyzes alternate  $\alpha$ -1,4-glucosidic linkages from the non-reducing end of the starch molecule and is incapable of bypassing  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkages to produce dextrin and the  $\beta$ -anomeric form of maltose. Glucoamylase is an extracellular exo-acting enzyme that splits  $\alpha$ -1,4 and in some cases  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkages and also some 1,3-glucosidic linkages from the non-reducing ends of  $\alpha$ -glucans to yield D-glucose. Debranching enzymes can be classified as either direct or indirect debranching enzymes. Direct debranching enzymes degrade unmodified glycogen and/or amylopectin, whereas indirect debranching enzymes require substrate modification prior to hydrolysing the  $\alpha$ -1,6-glucosidic bonds. Pullulanase are defined as extracellular debranching enzymes capable of hydrolysing  $\alpha$ -1,6 glucosidic linkages in a variety of pullulan and other branched oligosaccharides to form maltotriose and dextrins, respectively. Isoamylase is an extracellular debranching enzyme that hydrolyzes  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkages of amylopectin, glycogen and various branched dextrins and oligosaccharides with no activity on pullulanase.

Pectin enzymes may be conveniently classified into two main groups by the site attacked: those responsible for saponification of esterified regions of the chain, and the depolymerases responsible for chain cleavage. Enzymatic breakdown of pectic polymers occurs by the de-esterifying action of pectinesterase, releasing the methyl ester groups

of the pectin molecules, and by hydrolase or lyase action of the depolymerases, splitting the  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkages in the polygalacturonate chains. Polygalacturonases are responsible for the hydrolytic cleavage of the  $\alpha$ -D-(1,4)-glycosidic linkages adjacent to a free carboxyl group. Low methoxylated pectins are good, and pectate the best, substrates. Endopolygalacturonases split the pectic chain at random, resulting in a small increase in reducing end groups accompanied by a strong reduction in viscosity of the substrate solution. Exopolygalacturonases split off monomers and dimers from the non-reducing end of the galacturonan chain, implying a slow decrease in viscosity. The  $\beta$ -eliminative attack of the lyases on the galacturonan chain results in the formation of a double bond between C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> in the terminal residue at the non-reducing end, generating an oligomer with a 4,5-unsaturated galacturonosyl at that end. Different lyases can be distinguished on the basis of their preference for highly esterified pectinic acid (pectin lyase) or pectic acid (pectate lyase) and on the degree of randomness in the eliminative depolymerisation and behaviour towards oligomeric substrates. Pectin lyase is the only depolymerase specific for highly esterified pectin. Only endotype enzymes are known. Attack is at random, accumulating the lower, unsaturated oligogalacturonate methyl esters. Pectates and low-methoxyl pectins are the best substrates for endopectate lyase. Exopeptate lyase is specific for the penultimate bond at the reducing end of the galacturonan chain, liberating unsaturated digalactosiduronate as the sole end-product.

Cellulases are multicomponent complexes that often consist of endoglucanases, exoglucanases (cellobiohydrolases) and cellobiases. Cellobiases, while specific for cellobiose, belong to the diverse family of  $\beta$ -glucosidases capable of hydrolysing a broad spectrum of  $\beta$ -glucosides. Cellulase components act in a stepwise and synergistic process to achieve efficient degradation of cellulose. The major end-product of concerted endoglucanase and exoglucanase activity is cellobiose, which is then hydrolyzed to glucose by  $\beta$ -glucosidases.

Hemicellulases, which specifically degrade the backbone of hemicelluloses, include  $\beta$ -D-galactanases,  $\beta$ -D-mannanases and  $\beta$ -D-xylanases. Endoxylanases are often prevented from cleaving the xylan backbone by the presence of substituents. Therefore, in many cases these must be removed before extensive degradation of the backbone can occur. The enzymes involved include acetyl esterases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and  $\alpha$ -glucuronidases. Once endoxylanases have released small xylo-oligosaccharides, the  $\beta$ -xylosidases cleave the oligomeric fragments, predominantly to xylose. The activity of xylanases and  $\beta$ -xylosidases also depends on the chain length of xylo-oligosaccharides, the former generally decreasing with decreasing lengths, and the latter increasing.

Endogenous glucoamylase, pectinase and glucanase activities have been described for *S. cerevisiae*. While it is generally accepted that *S. cerevisiae* cannot utilise starch as a carbon source, the so-called "diastatic" strains (previously known as *S. diastaticus*) produce limited amylolytic activity. Starch utilisation in *S. cerevisiae* var. *diastaticus* depends on the expression of any one of the three unlinked genes, *STA1*, *STA2* or *STA3*, each encoding one of the extracellular glycosylated glucoamylase isoforms

*GAI*, *GAI*I or *GAI*II, respectively. The *STA* genes, cloned into *S. cerevisiae*, were found to be regulated negatively at the level of transcription.

Most strains of *S. cerevisiae*, carry *STA10*, whose presence represses the expression of the *STA* genes in an undefined manner, whereas the *S. cerevisiae* var. *diastaticus* strains described originally lack *STA10* and allow expression of the glucoamylase genes. Furthermore, expression of the *STA* genes is suppressed in some, but not all, sporulation-competent diploids. The *MATa/MAT $\alpha$*  diploid-specific repression of glucoamylase is transcriptionally regulated by the *MATa1/MAT $\alpha$ 2*-encoded repressor.

Most strains of *S. cerevisiae* produce pectinesterases, exo- $\beta$ -1,3-glucanases and endo- $\beta$ -1,3-glucanases. Two genes, *EXG1* (*BGL1*) and *ENG2* (*BGL2*), encoding an extracellular exo- $\beta$ -1,3-glucanase and a cell-wall-bound endo- $\beta$ -1,3-glucanase, respectively, have been cloned from *S. cerevisiae*. However, *S. cerevisiae* exhibits little or no enzymatic effect on pectin and crystalline cellulose and hemicellulose substances.

As a first step in the development of an amylolytic strain of *S. cerevisiae*, we cloned the *STA2* glucoamylase gene from *S. cerevisiae* var. *diastaticus* and alleviated repression of glucoamylase synthesis in *S. cerevisiae* by manipulating or replacing the *STA2* promoter. We then cloned, manipulated and expressed the  $\alpha$ -amylase gene (*AMY1*) from the Gram-positive bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* and the pullulanase gene (*PUL1*) from the Gram-negative bacterium *Klebsiella pneumoniae* in *S. cerevisiae*. To circumvent the expensive pretreatment (a cooking process) of starch in future industrial plants, we also cloned the genes (*RSA1* and *RSG1*) encoding raw starch degrading amylases from the yeast *Endomyces fibuliger* and are currently seeking to incorporate these genes into the existing amylase cassette to be expressed in *S. cerevisiae*.

To complement the pectinesterase activity in *S. cerevisiae*, we constructed a pectinase cassette comprising the pectate lyase (*pelE*) and polygalacturonase (*peh1*) genes from the soft rot plant pathogenic bacteria *Erwinia chrysanthemi* and *E. carotovora*. As in the case of the *STA2*, *AMY1* and *PUL1* genes, the *pelE* and *peh1* genes were each inserted between a novel yeast expression/secretion cassette and a yeast terminator and expressed in *S. cerevisiae*. Transcription initiation signals present in the expression/secretion cassette were derived from the yeast alcohol dehydrogenase gene promoter (*ADC1<sub>p</sub>*), whereas the transcription termination signals were derived from the yeast tryptophan synthase gene terminator (*TRP5<sub>r</sub>*). Secretion of pectate lyase and polygalacturonase was directed by the signal sequence of the yeast mating pheromone  $\alpha$ -factor (*MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>*). A pectinase cassette comprising *ADC1<sub>p</sub>*-*MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>*-*pelE*-*TRP5<sub>r</sub>* (designated *PEL5*) and *ADC1<sub>p</sub>*-*MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>*-*peh1*-*TRP5<sub>r</sub>* (designated *PEH1*) was successfully expressed in *S. cerevisiae*. The co-expression of *PEL5* and *PEH1* synergistically enhanced pectate degradation.

We also inserted the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene (*end1*) between *ADC1<sub>p</sub>*-*MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>* and *TRP5<sub>r</sub>* (designated *END1*) and co-expressed it together with the pectinase cassette in *S. cerevisiae*. Furthermore, we also cloned the exo- and endo- $\beta$ -1,3-glucanase genes (*EXG1* and *ENG2*) from *S. cerevisiae*, the cellobiase and  $\beta$ -glucosidase genes (*BGL1* and *BGL2*) from *E. fibuliger*,

and the xylanase gene (*XYN2* and *XYN3*) from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus kawachii* in *S. cerevisiae*. The cellobiohydrolase gene (*CBH1*) from the white rot fungus *Phanerochaeta chrysosporium* and the xylanase gene (*XYN1*) from the bacterium *Ruminococcus flavefaciens* are currently being prepared for expression in *S. cerevisiae*. At the same time our laboratories are also seeking to clone and express the genes encoding  $\beta$ -xylosidase (*XYL1*) and xylose-isomerase (*XYS1*) from the fungi *T. reesei*, *Aspergillus niger* and *Candida boidinii*. Eventually we will endeavour to combine these amylase, pectinase, cellulase and hemicellulase cassettes onto an artificial minichromosome and introduce it into *S. cerevisiae*, thereby enabling baker's yeast to utilise these different polysaccharides.

## DANKBETUIGING

*Ek betuig graag my dank aan prof. W.H. van Zyl vir sy medewerking m.b.t. hierdie navorsingsprojek en die sorgvuldige deurlees van die manuskrip.*

## LITERATUURVERWYSINGS

1. Rosales, F.H. (1984). Yeast as protein source for human nutrition, *Acta Microbiol. Hung.*, 31, 159-172.
2. Slagle, S.P. & Zimmerman, D.R. (1979). Evaluation of a yeast single cell protein with young pigs, *J. Anim. Sci.*, 49, 1252-1260.
3. Dziezak, J.S. (1987). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics and processing, *Food Technol.*, 104-121.
4. Esser, K. & Karsch, T. (1983). Bacterial ethanol production: Advantages and disadvantages, *Process Biochem.*, 116-121.
5. Keim, C.R. & Venkatasubramanian, K. (1989). Economics of current biotechnological methods of producing ethanol, *Trends Biotechnol.*, 7, 22-29.
6. Jackson, E.A. (1976). Brazil's national alcohol programme, *Process Biochem.*, 29-30.
7. Mattoon, J.R. & Laluce, C. (1987). The application of genetics to the development of starch-fermenting yeasts, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 5, 195-204.
8. Steyn, A.J.C. & Pretorius, I.S. (1990). Expression and secretion of amylolytic enzymes by *Saccharomyces cerevisiae*, *Acta Varia*, 5, 76-126.
9. Zobel, H.F. (1988). Molecules to granules: A comprehensive starch review, *Stärke*, 40, 44-50.
10. Vihtinen, M. & Mäntsälä, P. (1989). Microbial amylolytic enzymes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24, 329-418.
11. Rombouts, F.M. & Pilnik, W. (1980). In *Economic Microbiology*, Rose, A.H. ed. (Academic Press, London) pp. 227-282.
12. Béguin, P. & Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 25-58.
13. Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.H. & Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components (Springer-Verlag, Heidelberg), pp. 191-224.
14. Goksöyr, J. & Eriksen, J. (1980). In *Microbial enzymes and bioconversions*, Rose, A.H. ed. (Academic Press, London) pp. 283-329.
15. Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P. (1993). *Hemicellulose and hemicellulases* (Portland Press, London).
16. Thomson, J.A. (1993). Molecular biology of xylan degradation, *FEMS Microbiol. Rev.*, 104, 65-82.
17. Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review, *Yeast*, 8, 423-488.
18. Pretorius, I.S., Lambrechts, M.G. & Marmur, J. (1991). The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: An overview, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26, 53-76.
19. Pretorius, I.S., Chow, T. & Marmur, J. (1986). Identification and physical characterization of yeast glucoamylase structural genes, *Mol. Gen. Genet.*, 203, 36-41.
20. Pretorius, I.S. & Marmur, J. (1988). Localization of yeast glucoamylase genes by PFGE and OFAGE, *Curr. Genet.*, 14, 1-8.
21. Erratt, J.A. & Nasim, A. (1986). Cloning and expression of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Bacteriol.*, 166, 484-490.
22. Pretorius, I.S., Chow, T., Modena, D. & Marmur, J. (1986). Molecular cloning and characterization of the *STA2* glucoamylase gene of *Saccharomyces diastaticus*, *Mol. Gen. Genet.*, 203, 29-35.
23. Yamashita, I. (1993). In *Recombinant microbes for industrial and agricultural applications*, Murooka, A. & Imanaka, T. eds. (Marcel Dekker Inc., New York) pp. 341-357.
24. Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., Sollitti, P. & Marmur, J. (1991). Primary structure and regulation of a glucoamylase-encoding gene (*STA2*) from *Saccharomyces diastaticus*, *Gene*, 100, 95-103.
25. Kuchin, S.V., Kartasheva, N.N. & Benevolensky, S.V. (1993). Genes required for derepression of an extracellular glucoamylase gene, *STA2*, in the yeast *Saccharomyces*, *Yeast*, 9, 533-541.
26. Polaina, J. & Wiggs, M.Y. (1983). *STA10*: a gene involved in the control of starch utilization by *Saccharomyces*, *Curr. Genet.*, 7, 109-112.
27. Pretorius, I.S., Modena, D., Vanoni, M., Englund, S. & Marmur, J. (1986). Transcriptional control of glucoamylase synthesis in vegetatively growing and sporulating *Saccharomyces* species, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 3034-3041.
28. Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., Sollitti, P. & Marmur, J. (1994). Multiple positive and negative cis-acting elements regulate glucoamylase expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 146, 137-144.
29. D'Aguanno, V.S. & Pretorius, I.S. (1994). Optimization of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.*, 16, 727-732.
30. Pretorius, I.S., De Kock, M.J., Britz, T.J., Potgieter, H.J. & Lategan, P.M. (1986). Numerical taxonomy of  $\alpha$ -amylase producing *Bacillus* species, *J. Appl. Bacteriol.*, 60, 351-360.
31. Pretorius, I.S., Laing, E., Pretorius, G.H.J. & Marmur, J. (1988). Expression of the *Bacillus*  $\alpha$ -amylase gene in yeast, *Curr. Genet.*, 14, 9-13.
32. Southgate, V.J., Steyn, A.J.C., Pretorius, I.S. & Van Vuuren, H.J.J. (1993). Expression and secretion of a *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase using the yeast pheromone  $\alpha$ -factor promoter and leader sequence in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1253-1258.
33. Janse, B.J.H., Green, D.A. & Pretorius, I.S. (1990). Structure and regulation of genes involved in pullulan utilization in *Klebsiella pneumoniae*, *Acta Varia*, 5, 29-68.
34. Janse, B.J.H. & Pretorius, I.S. (1993). Expression of the *Klebsiella pneumoniae* pullulanase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, 24, 32-37.
35. Janse, B.J.H., Steyn, A.J.C. & Pretorius, I.S. (1993). Regional sequence homologies in starch-enzymes, *Curr. Genet.*, 24, 400-407.
36. Janse, B.J.H. & Pretorius, I.S. (1994). One-step enzymatic hydrolysis of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* encoding  $\alpha$ -amylase, glucoamylase and pullulanase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in druk).
37. Steyn, A.J.C. & Pretorius, I.S. (1991). Co-expression of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase-encoding gene and a *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 100, 85-93.
38. Laing, E. & Pretorius, I.S. (1992). Synthesis and secretion of an *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase by *Saccharomyces cerevisiae* regulated by different combinations of bacterial and yeast promoter and signal sequences, *Gene*, 121, 35-45.

39. Laing, E. & Pretorius, I.S. (1993). A note on the primary structure and expression of an *Erwinia carotovora* polygalacturonase-encoding gene (*peh1*) in *Escherichia coli* and yeast, *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 149-158.
40. Laing, E. & Pretorius, I.S. (1993). Co-expression of an *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase-encoding gene (*pelE*) and an *Erwinia carotovora* polygalacturonase-encoding gene (*peh1*) in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 181-188.
41. Kuranda, M.J. & Robbins, P. (1987). Cloning and heterologous expression of glycosidase genes from *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2585-2589.
42. Mrsa, V., Klebl, F. & Tanner, W. (1993). Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo- $\beta$ -1,3-glucanase, *J. Bacteriol.*, 175, 2102-2106.
43. Nebreda, A.R., Villa, T.G., Villanueva, J.R. & Del Rey, F. (1986). Cloning of genes related to exo- $\beta$ -glucanase production in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an exo- $\beta$ -glucanase structural gene, *Gene*, 47, 246-259.
44. Larriba, G. (1993). Translocation of protein across the membrane of the endoplasmic reticulum: a place for *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 9, 441-463.
45. Klebl, F & Tanner, W (1989). Molecular cloning of a cell wall exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, 171, 6259-6264.
46. Vázquez, E. & Del Rey, F. (1991). Nucleotide sequence of the exo-1,3- $\beta$ -glucanase-D-glucanase-encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 97, 173-182.
47. Van Rensburg, P., Van Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. (1994). Expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-1,4- $\beta$ -glucanase gene together with *Erwinia pectate lyase* and polygalacturonase genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* (in druk).