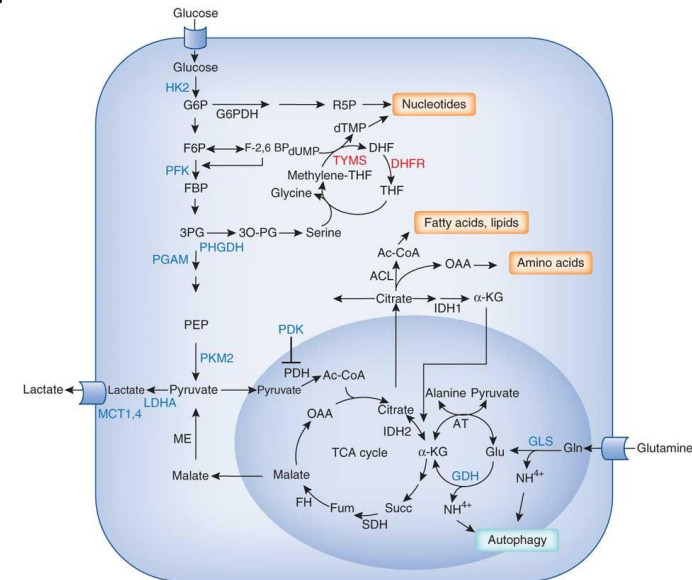




Παραδείγματα μεταβολικής χειραγώγησης - η μεταβολική μηχανική στην πράξη

Καθηγητής
Δημοσθένης Σαρηγιάννης



Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής



- Η φύση έχει προβλέψει μια αξιόλογη σειρά από μεταβολικές οδούς, όπως αποδεικνύεται από την ποικιλία των υπαρχόντων οργανισμών. Σε ορισμένες περιπτώσεις ο συντονισμός των διαφορετικών μεταβολικών οδών σε ένα συγκεκριμένο οργανισμό μπορεί να του προσδώσει εμπορικό ενδιαφέρον
- Στις περισσότερες περιπτώσεις, ωστόσο, οι γενετικές βελτιώσεις που απαιτούνται για την κατευθυντοποίηση των αντιδράσεων μεταβολής των κινητικών ιδιοτήτες ενός κυττάρου ώστε να καταστεί κατάλληλο για πρακτική χρήση είναι χρονοβόρες και με το τελικό αποτέλεσμα αμφίβολο
- Οι βελτιώσεις καθοδηγούνται από την τρέχουσα κατανόηση του μικροβιακού μεταβολισμού και της μοριακής γενετικής και υλοποιούνται με χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας και τις τεχνολογίες ανασυνδυασμού του DNA. Η ορθολογική μεταβολή κάποιων μεταβολικών μονοπατιών έχει δημιουργήσει νέες και επιθυμητές λειτουργίες και δυνατότητες στα κύτταρα οι οποίες αξιοποιούνται προς όφελος:
 - της φαρμακευτικής,
 - της γεωργίας,
 - των τροφίμων,
 - των χημικών, και
 - του περιβαλλοντικού τομέα.



Σκοπός κεφαλαίου

- Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζονται οι εφαρμογές της μεταβολικής χειραγώγησης. Σκοπός της χειραγώγησης μπορεί να είναι
 - (α) Απόδοση και βελτίωση της παραγωγικότητας των προϊόντων που παράγονται από μικροοργανισμούς,
 - (β) Την επέκταση του εύρους μεταβολισμού ενός οργανισμού,
 - (γ) Παραγωγή νέων προϊόντων
 - (δ) Βελτίωση των κυτταρικών ιδιοτήτων, και
 - (ε) Αποικοδόμηση ξενοβιοτικών μορίων.



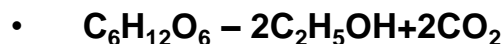
Αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης προϊόντων

- Η αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης αποτελούν στόχο κάθε βιομηχανικής παραγωγής μεταβολικών προϊόντων
- Η βελτίωση των δυο αυτών παραγόντων απαιτεί διαφορετική στρατηγική. Η απόδοση μπορεί να βελτιωθεί μέσω της
 - Ανακατεύθυνση (redirection) των μεταβολικών ροών προς την κατεύθυνση του σχηματισμού του επιθυμητού προϊόντος
 - Ενίσχυσης των μεταβολικών ροών (amplification of metabolic fluxes)
- Η παραγωγικότητα εξαρτάται πρωτίστως από την ειδική ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος, όπου για τους περισσότερους βιομηχανικούς οργανισμούς κυμαίνεται από 0.2-0.5 μmol του υποστρώματος ανά γραμμάριο βιομάζας ανά ώρα.
- Αν η ειδική ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος, στα πλαίσια μιας βιοδιεργασίας, κυμαίνεται στα παραπάνω όρια, τότε η παραγωγικότητα θεωρείται οικονομικά αποδεκτή (με την προϋπόθεση ότι ο σχηματισμός παραπροϊόντων έχει ελαχιστοποιηθεί). Στην περίπτωση αυτή η μεθοδολογία για την βελτίωση της απόδοσης και της παραγωγικότητας μπορεί να ταυτιστεί. Αντίθετα, στην περίπτωση όπου η ταχύτητα κατανάλωσης είναι μικρή, τότε η βελτίωση της παραγωγικότητας θα πρέπει να ξεκινά με την ενίσχυση του συστήματος μεταφοράς του υποστρώματος ακολουθούμενο από την ανακατεύθυνση των ροών όπως επιβάλλουν οι στρατηγικές βελτίωσης της απόδοσης.



Το παράδειγμα της αιθανόλης

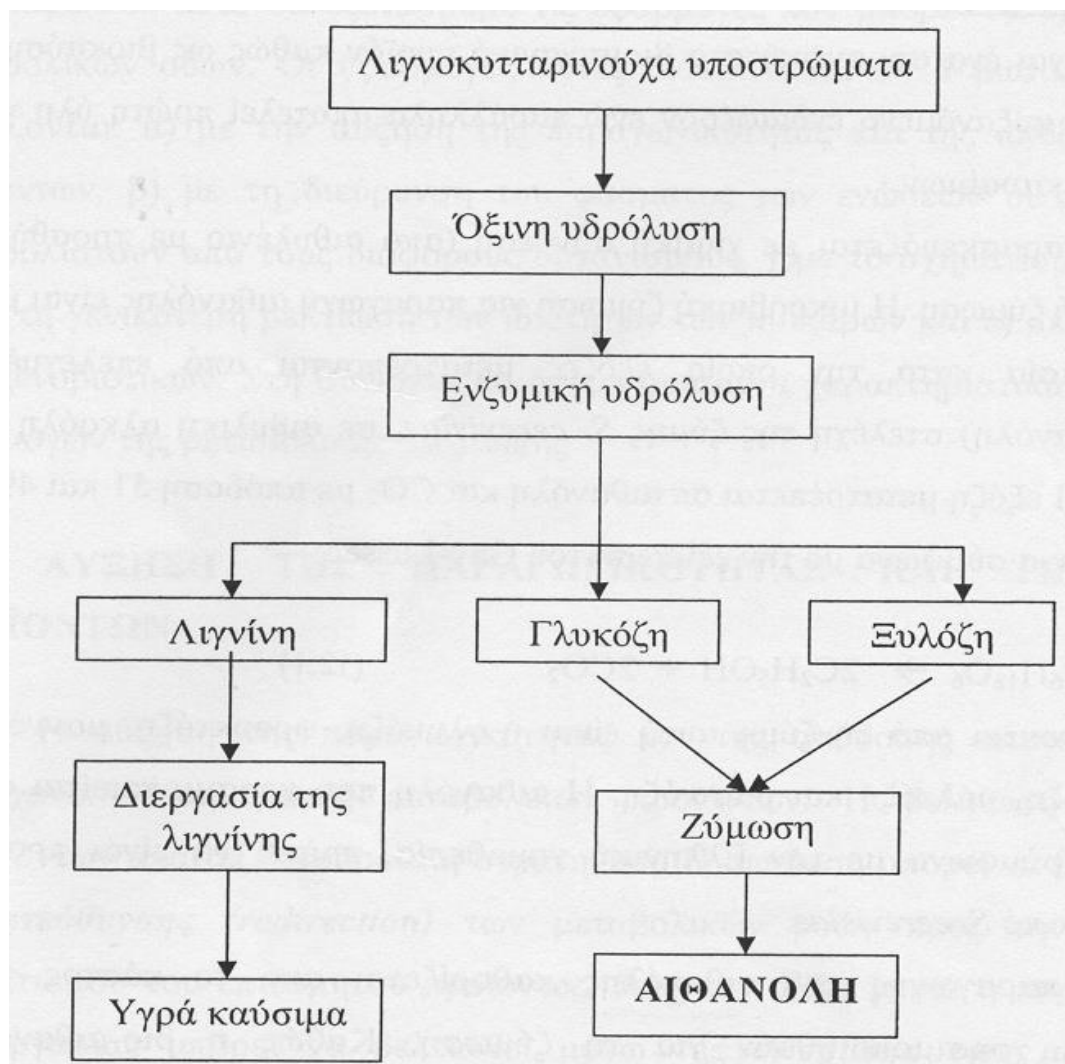
- Η αιθανόλη είναι ένα σημαντικότερο βιομηχανικό προϊόν καθώς ως βιοκαύσιμο παρουσιάζει συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον ενώ παράλληλα αποτελεί πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων καυσίμων.
- Η αιθανόλη παρασκευάζεται με χημική σύνθεση (από αιθυλένιο με προσθήκη νερού) και μικροβιακή ζύμωση. Η μικροβιακή ζύμωση για παραγωγή αιθανόλης είναι μια παραδοσιακή διεργασία κατά την οποία εξόζες μετατρέπονται από επιλεγμένα (ανθεκτικά στην αιθανόλη) στελέχη της ζύμης *S. cerevisiae*, σε αιθυλική αλκοόλη με αναερόβια ζύμωση. Η εξόζη μετατρέπεται σε αιθανόλη και CO₂ με απόδοση 51 και 49% κατά βάρος, αντίστοιχα σύμφωνα με την εξίσωση του Gay-Lussac



- Σάκχαρα που ζυμώνονται από τη ζύμη αυτή είναι η γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη και ραφινόζη. Η αιθανόλη που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα και ποτά, σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, πρέπει να είναι προϊόν ζύμωσης σακχάρων από *S. cerevisiae*.
- Το κόστος παραγωγής της αιθανόλης καθορίζεται από το κόστος των σακχάρων που θα χρησιμοποιηθούν για τη ζύμωση. Καθώς η βιο-αιθανόλη προβλέπεται να αντικαταστήσει, σε κάποιο ποσοστό, τη βενζίνη στο μέλλον, οι απαιτήσεις για άφθονο και φθινό υπόστρωμα βιολογικής παραγωγής αιθανόλης είναι πραγματικά πιεστικές.
- Η μόνη πηγή άνθρακα που παράγεται σε τεράστιες ποσότητες και ανανεώνεται συνεχώς είναι τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά (ξύλο, αγροτικά και δασοκομικά κατάλοιπα, και απόβλητα με βάση το χαρτί..
- Το κόστος παραγωγής της αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχο υπόστρωμα υπολογίζεται σε 0.32\$ ανά L το οποίο θεωρείται ακόμη υψηλό σε σχέση με το κόστος παραγωγής της βενζίνης από ορυκτούς υδρογονάνθρακες



Το παράδειγμα της αιθανόλης

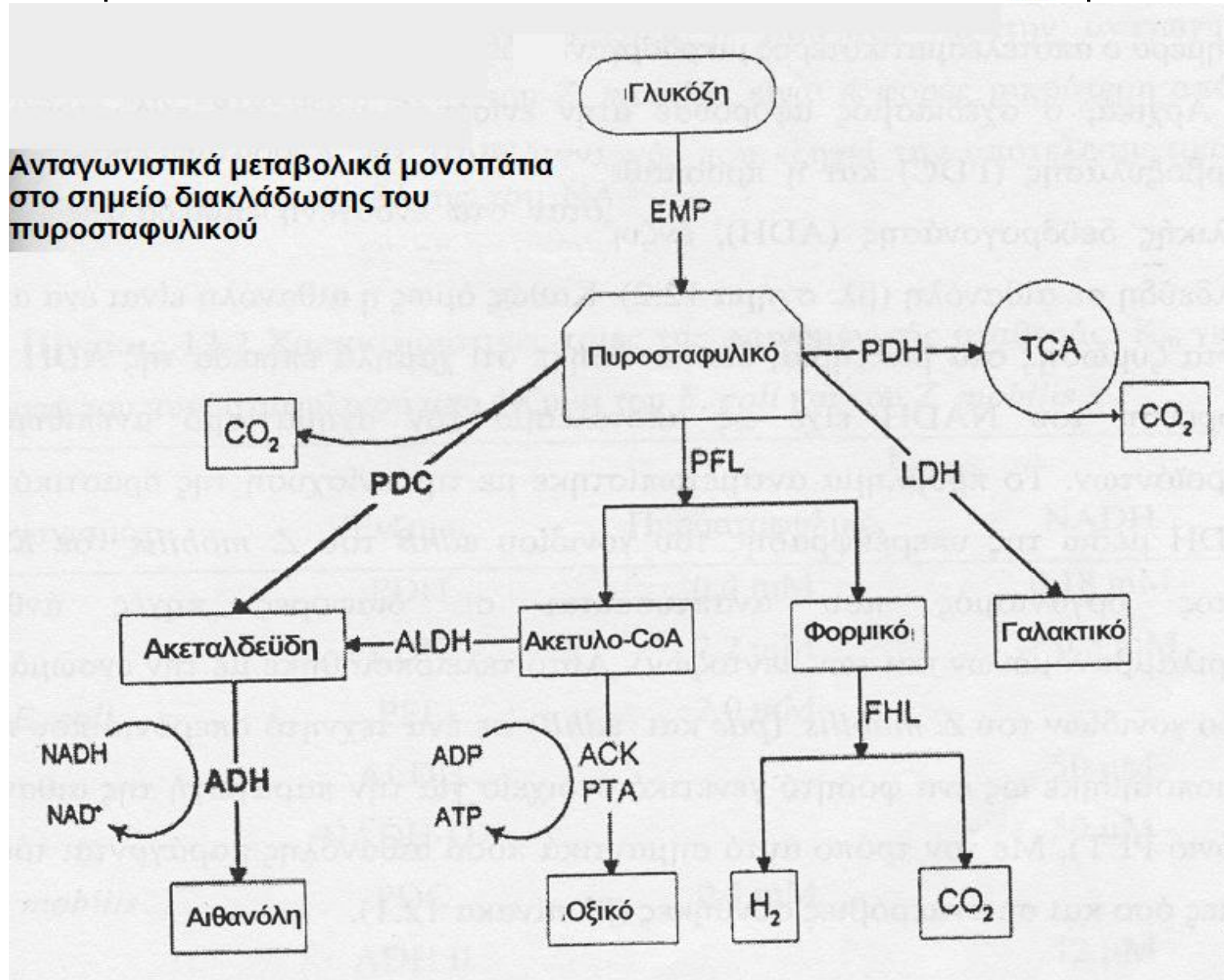




- Οι ζύμες διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης από εξόζες μέσω του ενζυμικού συστήματος αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού-αλκοολική δεϋδρογονάση (PDC-ADH)
- Οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν για τη ζύμωση των μονοσακχαριτών σε αιθανόλη θα πρέπει να διαθέτουν την ικανότητα να ζυμώνουν όλους τους μονοσακχαρίτες αλλά και να επιδεικνύουν αυξημένη αντοχή στην εν δυνάμει ανασταλτική δράση των προϊόντων της υδρόλυσης.
- Ο πλέον γνωστός μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης, ο *Saccharomyces cerevisiae* δεν διαθέτει την ικανότητα ζύμωσης πεντοζών, οι οποίες αποτελούν το 8-28% της πρώτης ύλης.
- Εντούτοις έχει διαπιστωθεί ότι η συσσώρευση της ξυλιτόλης που αποτελεί παραπροϊόν της ζύμωσης της ξυλόζης οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της αιθανόλης. Παράλληλα, η ικανότητα των ζυμών να ζυμώνουν την L-αραβινόζη είναι σημαντικά περιορισμένη. Η αποτελεσματικότητα ζύμωσης των πεντοζών αποτελεί σημείο κλειδί για την ανάπτυξη μιας οικονομικά βιώσιμης διαδικασίας παραγωγής της αιθανόλης από βιομάζα.



Ανταγωνιστικά μεταβολικά μονοπάτια
στο σημείο διακλάδωσης του
πυροσταφυλικού





S. Cerevisiae vs *Zymomonas mobilis*

- Λίγα βακτήρια διαθέτουν μεταβολικό μονοπάτι με το ενζυμικό σύστημα PDC-ADH που να οδηγεί σε αιθανόλη. Ένα τέτοιο βακτήριο είναι το ***Zymomonas mobilis*** που ζυμώνει σάκχαρα με διπλάσια ταχύτητα από εκείνη της ζύμης ***S. Cerevisiae*** δίχως όμως να διαθέτει την ικανότητα να καταβολίζει πεντόζες
- Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή της μεταβολικής μηχανικής έχει δώσει νέα ανασυνδυασμένα βακτήρια και ζύμες ικανά να παράγουν αιθανόλη. Μεταξύ αυτών, το ανασυνδυασμένο *E.Coli* KO1 (το οποίο φέρει στο χρωμόσωμά του τα γονίδια *pdc* και *adhB* από το *Z.mobilis*) είναι σήμερα ο αποτελεσματικότερος μικροοργανισμός για το σκοπό αυτό
- Αρχικά, ο σχεδιασμός αφορούσε στην ενίσχυση μόνο της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (PDC) και η προσπάθεια βασιζόταν στα ενδογενή επίπεδα της αλκοολικής δεϋδρογονάσης (ADH), ένζυμο το οποίο καταλύει την αναγωγή της ακεταλδεϋδη σε αιθανόλη
- Καθώς όμως η αιθανόλη είναι ένα από τα προϊόντα ζύμωσης στα βακτήρια, διαπιστώθηκε ότι χαμηλά επίπεδα της ADH και η συσσώρευση του NADH είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε με την ενίσχυση της δραστηριότητας της ADH μέσω της υπερέκφρασης του γονιδίου *adhB* του *Z. mobilis* σε *E. coli*
- Αυτό τελειοποιήθηκε με την ενσωμάτωση των δύο γονιδίων του *Z. mobilis* (*pdc* και *adhB*) σε ένα τεχνητό οπερόνιο που πλέον χρησιμοποιήθηκε ως ένα φορητό γενετικό στοιχείο για την παραγωγή της αιθανόλης (οπερόνιο PET). Με τον τρόπο αυτό σημαντικά ποσά αιθανόλης παράγονται τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες



S. Cerevisiea vs Zymomonas mobilis

	Ζυμωτικά προϊόντα (mM)				
Ανάπτυξη	Πλασμίδιο	Αιθανόλη	Γαλακτικό	Οξικό	Ηλεκτρικό
Αερόβια	Κανένα	0	0,6	55	0,2
	PET	337	1,1	17	4,9
Αναερόβια	Κανένα	0,4	22	7	0,9
	PET	482	10	1,2	5,0

Παρουσίαση ζυμωτικών προϊόντων σε αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη σε άγριου τύπου και αν συνδυασμένου στελέχους E.Coli

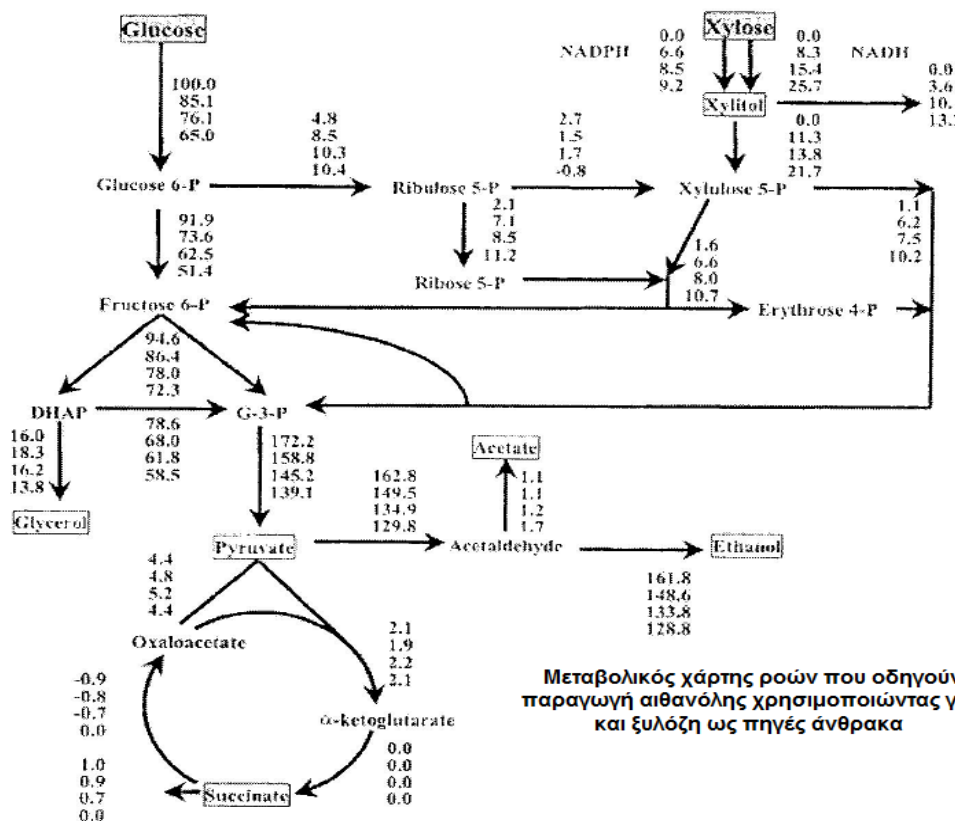


Οργανισμός	Ένζυμα	K_m	
		Πυροσταφυλικό	NADH
E.Coli	PDH	0.4mM	0.18mM
	LDH	7.2mM	>0.5mM
	PFL	2.0mM	
	ALDH		50mM
	NADH-OX		50mM
Z. mobilis	PDC	0.4mM	
	ADHII		12mM

- Στον παραπάνω πίνακα εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές τιμές του K_m διαφόρων ενζύμων που απαντώνται στο μεταβολικό μονοπάτι του *Z.mobilis* και του *E. coli*, για το μεταβολισμό του πυροσταφυλικού.
- Σε αερόβιες συνθήκες το άγριο τύπου στέλεχος του *E.coli* μεταβολίζει το πυροσταφυλικό μέσω των ενζύμων PDH και PFL. .
- Η τιμή K_m για την PDC του *Z.mobilis* είναι παρόμοια με αυτή του PDH και σημαντικά μικρότερη από αυτή των ενζύμων PFL και LDH του *E.coli* γεγονός που εξηγεί την αύξηση της παραγωγής της ακεταλδεύδης.
- Η τιμή K_m για την αναγωγή της ακεταλδεύδης που καταλύει η ADH του *Z.mobilis* είναι 4 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη της οξειδάσης του NADH γεγονός που εξηγεί την αποτελεσματικότερη αναγωγή της ακεταλδεύδης σε αιθανόλη.



- Σε αναερόβιες συνθήκες, το άγριο στέλεχος του *E.coli* μεταβολίζει το πυροσταφυλικό μέσω των ενζύμων LDH και PFL. Οι τιμές K_m για τα δυο αυτά ένζυμα είναι 18 και 5 φορές αντίστοιχα υψηλότερες από την αντίστοιχη τιμή K_m για το το PDC του *Z. mobilis*
- Παρόμοια διαφοροποίηση παρατηρείτε για τα αντίστοιχα ένζυμα (ALDH και ADH II) που καταλύουν την αναγωγή της ακεταλδεύδης σε αιθανόλη.



Μεταβολικός χάρτης ρών που οδηγούν στη παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιώντας γλυκόζη και ξυλόζη ως πηγές άνθρακα

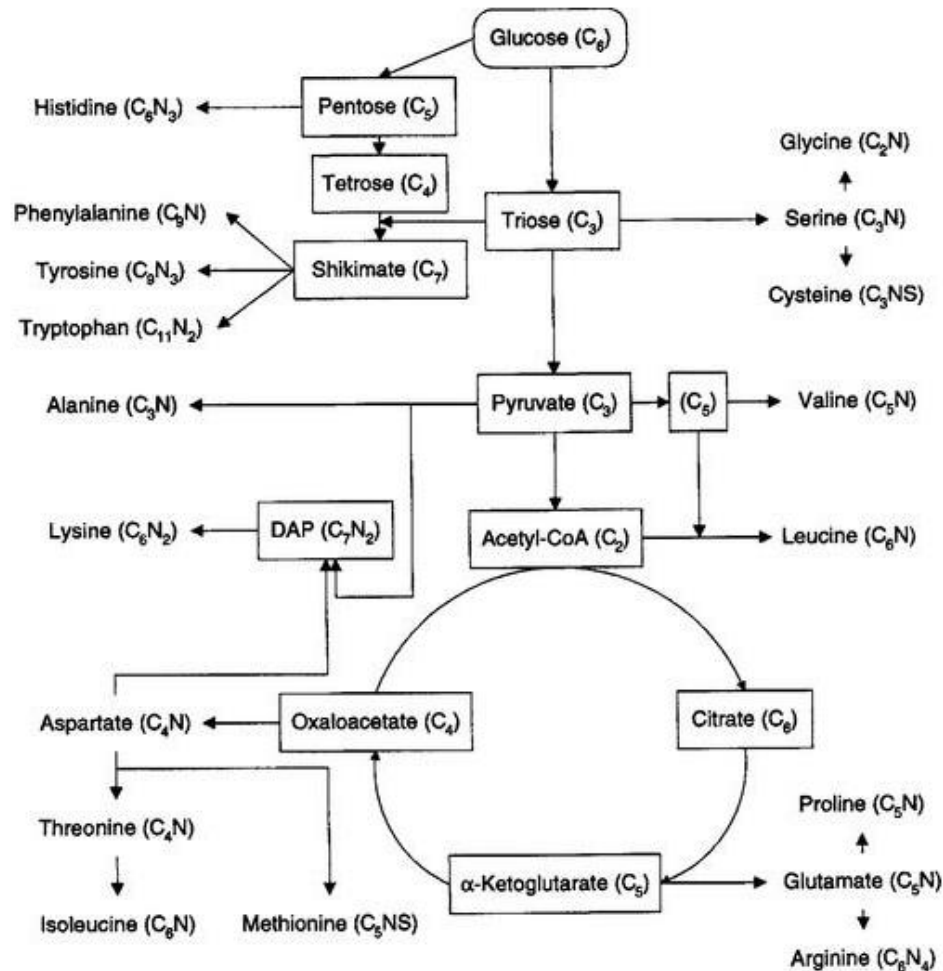


Το παράδειγμα των αμινοξέων

- Τα αμινοξέα προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα εμπορικών χρήσεων ως πρόσθετα τροφίμων, συμπληρώματα διατροφής, θεραπευτικοί παράγοντες αλλά και ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση πεπτιδίων και αγροχημικών.
- Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να συνθέτουν όλα τα βασικά αμινοξέα από άνθρακα και άζωτο.
- Ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να παράγουν, σε υπερβολική ποσότητα, ένα ή μια ομάδα αμινοξέων. Στα μέσα της δεκαετίας του 1950, Ιάπωνες επιστήμονες απομόνωσαν ένα νέο βακτήριο (*Corynebacterium glutamicum*) που παρήγαγε μεγάλες ποσότητες L-γλουταμικού, κοντά στα 100 g L⁻¹ υπό ορισμένες προϋποθέσεις

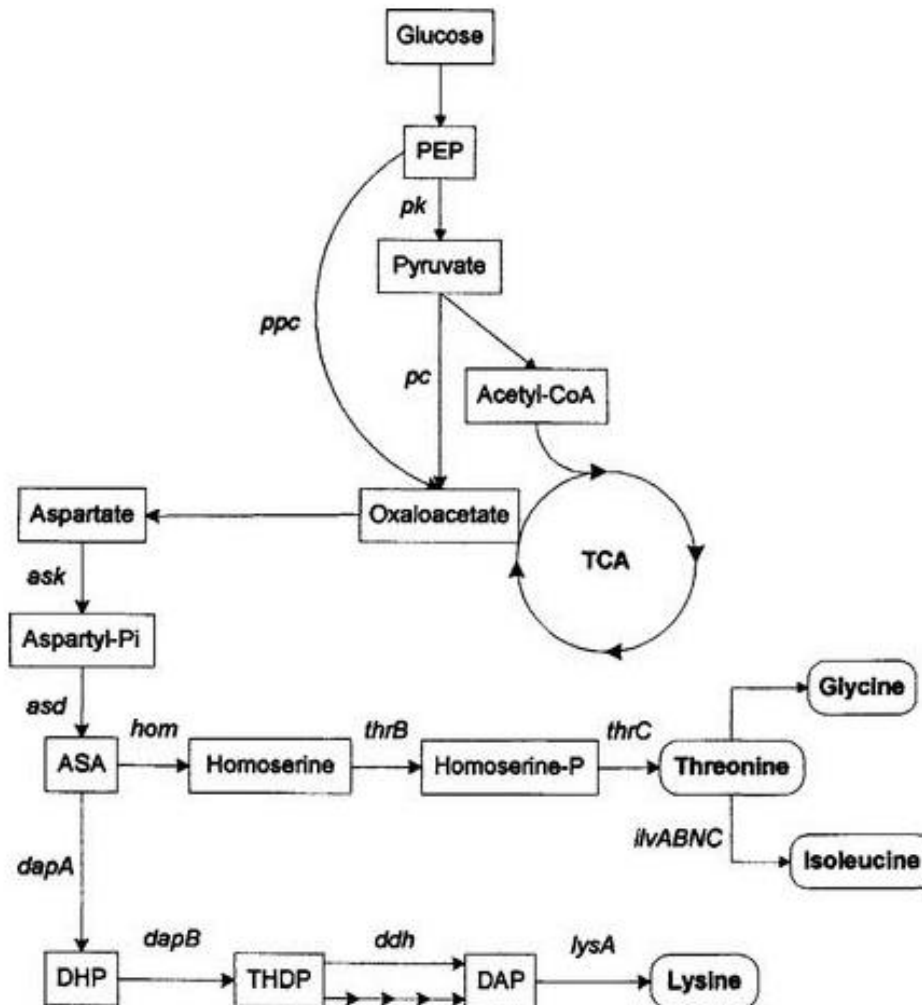


Το παράδειγμα των αμινοξέων





- Η επιτυχία στην βιομηχανική παραγωγή γλουταμικού οξέος διέγειρε περαιτέρω το ενδιαφέρον στην απομόνωση στελεχών ικανών να παράξουν διάφορα αμινοξέα.
- Τα άγρια στελέχη του *Corynebacterium glutamicum* είναι ικανά να παράγουν λίγα αμινοξέα όπως είναι το γλουταμικό οξύ, η βαλίνη, η προλίνη, η γλουταμίνη και η αλανίνη. Για την αύξηση της παραγωγής ενός επιθυμητού αμινοξέου, απαιτείται μεταβολή στον κυτταρικό μεταβολισμό ή / και τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυττάρου
- Για πολλά χρόνια μετά την ανακάλυψη αυτών των βακτηρίων, έγιναν προσπάθειες να προκληθούν αυξοτροφικές ή ρυθμιστικές μεταλλάξεις. Η λογική της χρησιμοποίησης αυξοτροφικών μεταλλάξεων είναι να παρακαμφθεί ο ενδοκυτταρικός έλεγχος της ανάδρασης μέσω την ελαχιστοποίησης της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης αναστολέων ή καταστολέων καθιστώντας έτσι το ένζυμο μη ευαίσθητο.
- Τα περισσότερα αμινοξέα που παράγονται σήμερα με τη χρήση στελεχών που περιέχουν συνδυασμούς αυξοτροφικών και ρυθμιστικών μεταλλάξεων. Περισσότεροι από 500.000 τόνοι L-γλουταμικού που παράγονται ετησίως με χρήση *C. glutamicum*, ενώ παράλληλα η αυξοτροφή μετάλλαξη του είναι υπεύθυνη για την παραγωγή περίπου 400.000 τόνων L-λυσίνης ανά έτος.





Αλανίνη

- Η υπερπαραγωγή αλανίνης από το μικροοργανισμό *Z. mobilis* επιτεύχθει με την εισαγωγή του γονιδίου της αφυδρογονάσης της αλανίνης (ALAD) προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Bacillus sphaericus*.
 - Η απόδοση της αλανίνης έφθασε τα 10 mmol ανά 280 mmol γλυκόζης, η οποία αργότερα αυξήθηκε σε 41 mmol με την προσθήκη 85 mM αμμωνίας που προφανώς αποτελούσε περιοριστικό παράγοντα.
 - Αυτή ήταν και η μέγιστη παραγωγή σε κανονικές συνθήκες, προφανώς λόγω του έντονου ανταγωνισμού για το πυροσταφυλικό μεταξύ της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (PDC) και της αφυδρογονάσης της αλανίνης.
 - Μείωση της θειαμίνης-PP που αποτελεί συμπ παράγοντα του PDC, οδήγησε σε περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης και υψηλότερη απόδοση αλανίνης (84 mmol σε 25 ώρες).



Παραγωγή διαλυτών

- Αν και η ιστορία της παραγωγής της ακετόνης, της βουτανόλης και της αιθανόλης με ζύμωση ξεκινά ήδη από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, εντούτοις η βιομηχανική παραγωγή των διαλυτών αυτών έπαψε να βασίζεται σε ζυμωτικές διεργασίες και βασίστηκε κυρίως στο πετρέλαιο.
- Οι βασικοί λόγοι για την εγκατάλειψη των ζυμωτικών διεργασιών για την παραγωγή των παραπάνω διαλυτών είχαν να κάνουν με τη:
 - χαμηλή τελική συγκέντρωση του προϊόντος,
 - τη μειωμένη απόδοση
 - το σχετικά υψηλό κόστος των υποστρωμάτων.
- Μέσω όμως της εφαρμογής της γενετικής μηχανικής για την τροποποίηση μικροβιακών στελεχών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των διαλυτών αυτών, είναι δυνατή η ανάκαμψη των ζυμωτικών μεθόδων.



- **Η τροποποίηση των στελεχών έχει σαν στόχους:**

- την αύξηση της απόδοσης στο τελικό προϊόν αλλά και τη χρησιμοποίηση εναλλακτικών υποστρωμάτων με βάση τις λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες ή ακόμη και αποβλήτων

- την ανάπτυξη νέων στελεχών τα οποία θα επιδεικνύουν υψηλή παραγωγικότητα τόσο σε συνεχείς διεργασίες όσο και ως ακινητοποιημένα κύτταρα

- την ανάπτυξη στελεχών τα οποία θα δίνουν υψηλή τελική συγκέντρωση του προϊόντος και θα επιδεικνύουν αυξημένη ανοχή στα τελικά προϊόντα.

- την ανάπτυξη στελεχών στα οποία θα επιτελείται εύκολα ο έλεγχος των μεταβολικών δρόμων έτσι ώστε το είδος των διαλυτών να μπορεί να ρυθμιστεί.

- Η επαγωγή ενζύμων που εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με την παραγωγή διαλυτών έδειξε ότι ο γενετικός έλεγχος αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τη βελτίωση της παραγωγής των διαλυτών. Παρά όμως την κλωνοποίηση διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό που σχετίζεται με την παραγωγή διαλυτών, ο έλεγχος της μεταβολικής ροής παραμένει ακόμη ένας μη εφικτός στόχος.

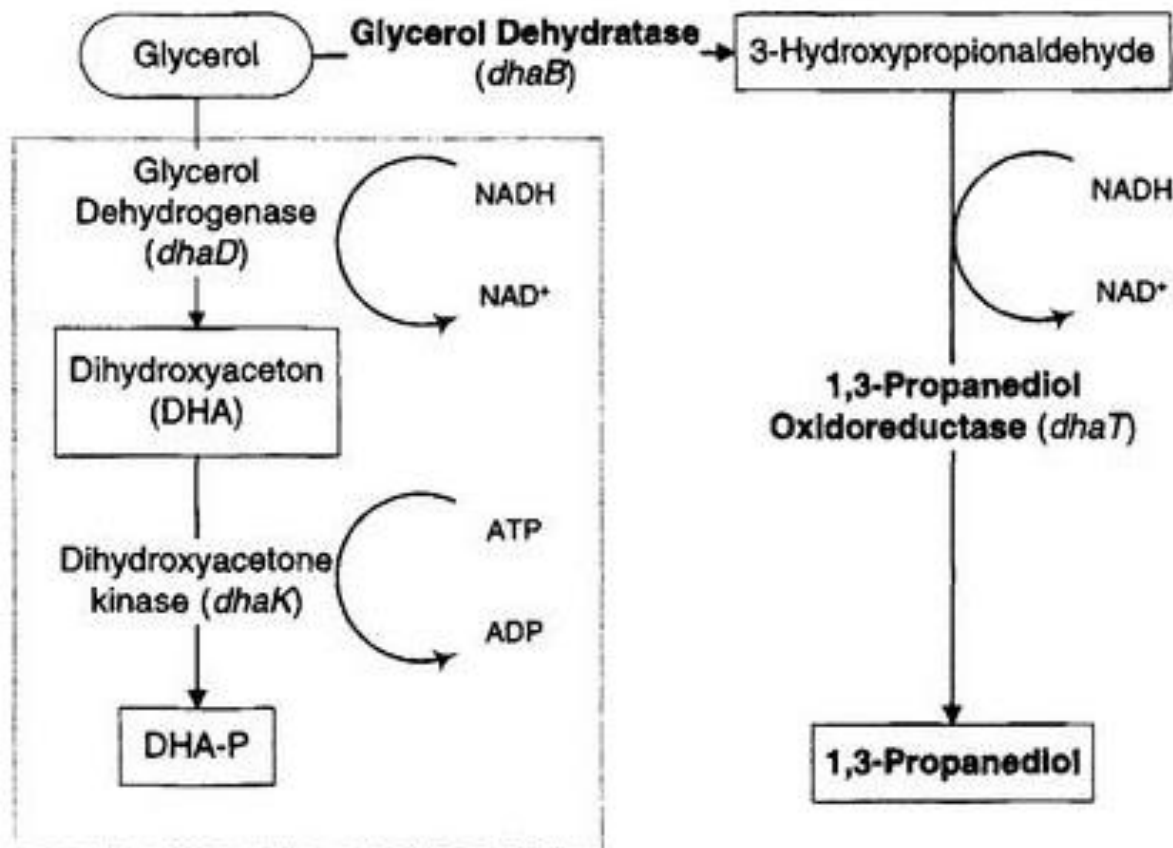


1, 3 - προπανοδιόλη

- Η 1, 3 - προπανοδιόλη (1,3-PD) είναι ένα ενδιάμεσο στη χημική σύνθεση πολυμερών, π.χ., στη σύνθεση της πολυουρεθάνης και του πολυεστέρα.
 - Σήμερα παράγεται με βάση το πετρέλαιο δια μέσω μιας ιδιαίτερα ακριβής παραγωγικής διεργασίας.
 - πρόσφατα παρασκευάστηκε ένα προπανοδιολπαραγωγό στέλεχος *E.Coli* που φέρει γονίδια από το DHA ρεγγουλόνιο του οργανισμού *Klebsiella pneumoniae*. Ο ρυθμιστής DHA στο *Klebsiella pneumoniae* επιτρέπει στον οργανισμό να αναπτυχθεί αναερόβια σε γλυκερόλη και παράγουν 1,3-PD.
 - Το *E. coli* στην άγρια μορφή του δεν έχει σύστημα DHA και αρά δεν είναι ούτε σε θέση να αναπτυχθεί αναερόβια σε γλυκερόλη αλλά ούτε και να παραξει 1,3-PD.
- Στο πρώτο στάδιο, γλυκερίνη μετατρέπεται σε 3-υδροξυπροπιοναλδεΰδη με ένα εξαρτώμενο συνένζυμο αφυδρατάσης B12, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται προς 1,3-προπανοδιόλη με μία εξαρτώμενη από NAD οξειδοαναγωγή.



1, 3 - προπανοδιόλη





ΔΙΕΥΡΥΝΣΗ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΤΟΥΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

- Δύο είναι οι κύριοι στόχοι προς την κατεύθυνση αυτή:
 - ο πρώτος στόχος έχει να κάνει με τη μηχανική του μεταβολισμού των οργανισμών ώστε να μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ξυλόζη (βασικό συστατικό της ημικυτταρινικής βιομάζας)
 - ενώ ο δεύτερο στόχος επικεντρώνεται στην αξιοποίηση της λακτόζης και του τυρογάλατος που αποτελεί βασικό παραπροϊόν της βιομηχανίας τροφίμων. Καθώς στους περισσότερους μικροοργανισμούς υπάρχει πλήθος κοινών μεταβολικών οδών, η διερεύνηση του φάσματος των υποστρωμάτων μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη λίγων μόνο ενζυμικών σταδίων.

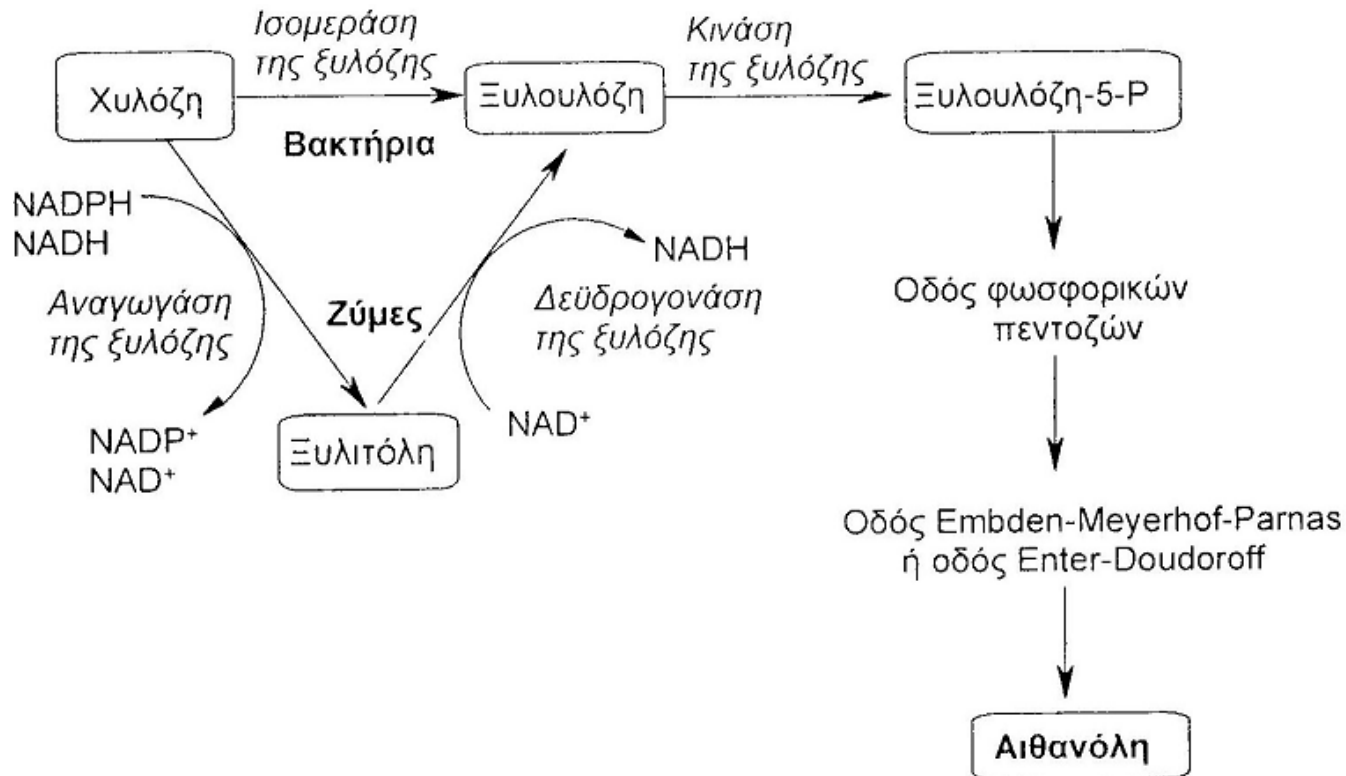


Μεταβολική μηχανική του μεταβολισμού των πεντοζών για την παραγωγή αιθανόλης.

- Σε γενικές γραμμές οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν την ξυλόζη σε ξυλουλόζη μέσω δύο διαφορετικών οδών
 - Ο πρώτος δρόμος περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο που καταλύεται από την ισομεράση της ξυλόζης και απαντάται στα βακτήρια,
 - ενώ ο δεύτερος δρόμος περιλαμβάνει δύο στάδια που καταλύονται από την αναγωγή της ξυλόζης και τη δεϋδρογονάση της ξυλόζης και απαντάται συνήθως στις ζύμες.
- Στη συνέχεια, η ξυλουλόζη φωσφορυλιώνεται με ATP και διαμέσου του δρόμου των φωσφορικών πεντοζών και του μεταβολικού δρόμου Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), (ή του μεταβολικού δρόμου Enter-Doudoroff (ED) σε μικροοργανισμούς όπως ο *Z. mobilis*).
- Με σκοπό την αξιοποίηση της ξυλόζης για την παραγωγή αιθανόλη αρχικά η προσπάθεια επικεντρώθηκε στην απομόνωση φυσικών μικροβιακών στελεχών που παράγουν αιθανόλη και τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την ξυλόζη. Καθώς η προσπάθεια αυτή απέτυχε, οι νέες προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην εισαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην αξιοποίηση της ξυλόζης σε μικροοργανισμούς (ζύμες και βακτήρια όπως ο *Z. mobilis*) που παράγουν αιθανόλη και κατά συνέπεια εμφανίζουν μεγάλη ανοχή σε αυτή. Τα γονίδια αυτά μάλιστα απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε *E. coli*



Μεταβολική μηχανική του μεταβολισμού των πεντοζών για την παραγωγή αιθανόλης.





- Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην κλωνοποίηση των παραπάνω γονιδίων στο βακτήριο *Zygotomonas mobilis*, το οποίο εμφανίζει σημαντικότερα πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μικροοργανισμών (συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών) για την παραγωγή αιθανόλης, όπως

Χιμαιρικός φορέας ονομάζεται ένας ανασυνδυασμένος οργανισμός που περιέχει ακολουθίες DNA προερχόμενες από διαφορετικούς οργανισμούς

- Η ζυμογένεση των πεντοζών και η ισομεράση της ζυλόζης για την παραγωγή αμύλης δεν συνοδεύτηκε από ιδιαίτερη επιτυχία, καθώς αργότερα διαπιστώθηκε ότι αυτό οφείλεται στην απουσία δύο ενζύμων (της τρανσκετολάσης και της τρανσαλδολάσης) τα οποία είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση της λειτουργίας του μεταβολισμού των πεντοζών.
- Τη λύση στο πρόβλημα φάνηκε να δίνει η δημιουργία ενός χιμαιρικού φορέα ο οποίος φέρει δύο ανεξάρτητα οπερόνια: το ένα αποτελείται από τα γονίδια *xyI* και *xyIB* από *E. coli* και το άλλο από τα γονίδια τρανσκετολάσης (*tktA*) και της τρανσαλδολάσης (*tal*) και της ισομεράσης της ζυλόζης (*xyIA*) επίσης από *E. coli*. Το ανασυνδυασμένο στέλεχος είναι ικανό να αναπτυχθεί σε ζυλόζη (ως πηγή άνθρακα) και να μετατρέψει την ζυλόζη σε αιθανόλη με ποσοστό 86% της θεωρητικής απόδοσης.

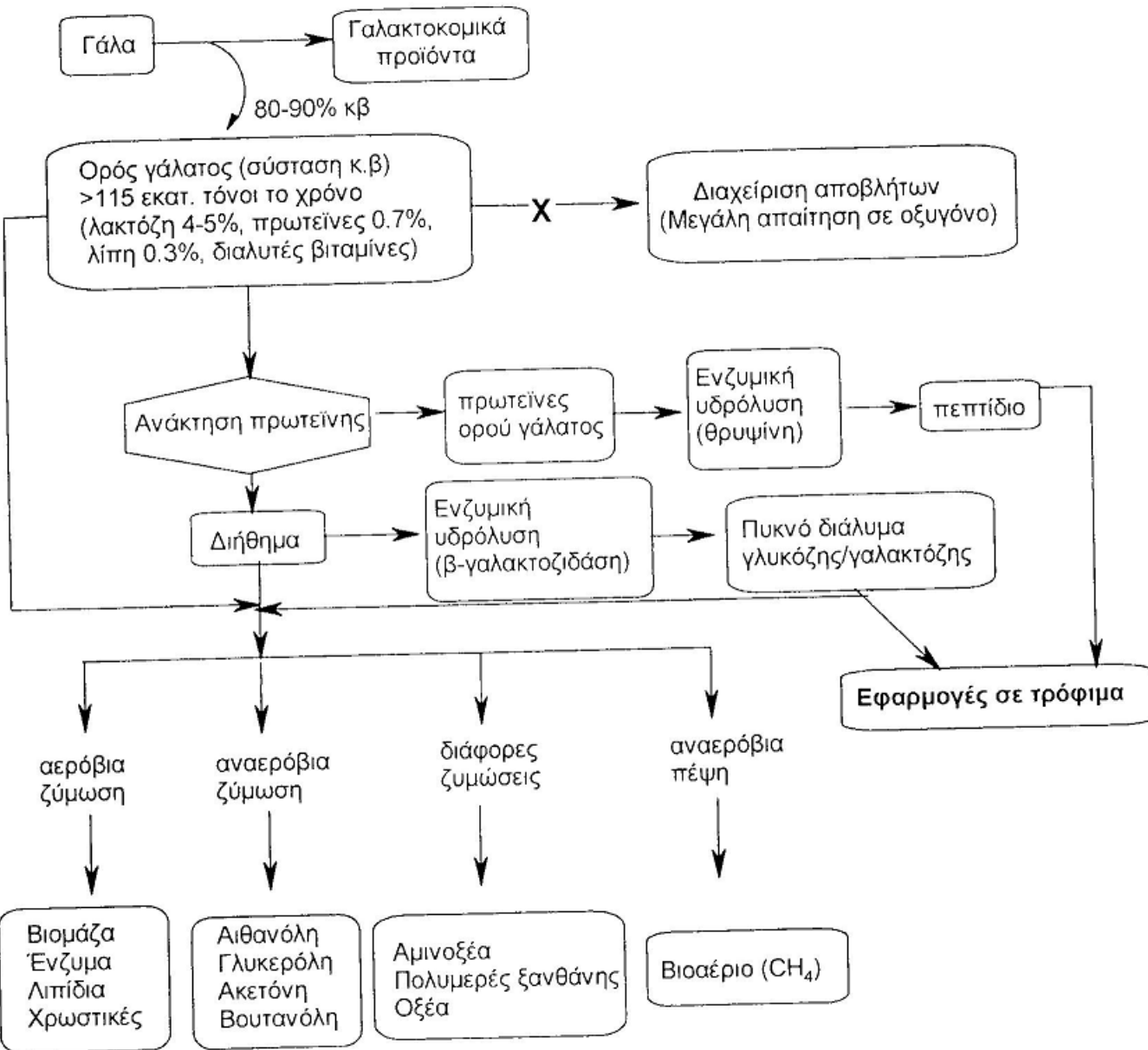


Αποτελέσματα της ζυμωτικής παραγωγής αιθανόλης

- Η στοιχειομετρία της παραγωγής αιθανόλης σε ανασυνδυασμένα στελέχη του γένους *Zygomonas*.



- Σύμφωνα με το παραπάνω η θεωρητική απόδοση για την αιθανόλη είναι 0.51g αιθανόλης / g ξυλόζης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η εφαρμογή της μεταβολικής μηχανικής έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή 1 mol ATP ανά mol ξυλόζης μέσω της μεταβολικής οδού Enter-Doudoroff (*ED*) η οποία είναι ενεργοποιημένη σε αναερόβιες συνθήκες μόνο στα στελέχη του γένους *Zygomonas*,
- Μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών και της οδού Embden-Meyerhof-Parnas(*EMP*) παράγονται 5/3 ATP ανά mol ξυλόζης. Το ενεργειακό αυτό έλλειμμα έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής βιομάζας και έτσι την αποτελεσματικότερη μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν.



- Ο ορ
αποτ
- Αν κ
δυστ
βιομι
- Η αξ
γαλα
λακτι
αποτ
οδών
- Όταν
σύστ
σε αι
δυνα
ζυμ

να
ασίες..

5

ση της
λικών

ο διέθετε
πόδοση
ό ήταν
ια
ρεύεται

και να αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.



ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

- Το πεδίο αυτό παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον για τη μεταβολική μηχανική. Η ορθολογική έκφραση ετερόλογων γονιδίων είναι δυνατό να επεκτείνει τους υπάρχοντες μεταβολικούς δρόμους για την υπερπαραγωγή τόσο γνωστών όσο και νέων ενώσεων με επιθυμητές ιδιότητες όπως αντιβιοτικά, βιταμίνες, βιοπολυμερή, χρωστικές ενώσεις, υδρογόνο κ.ά..

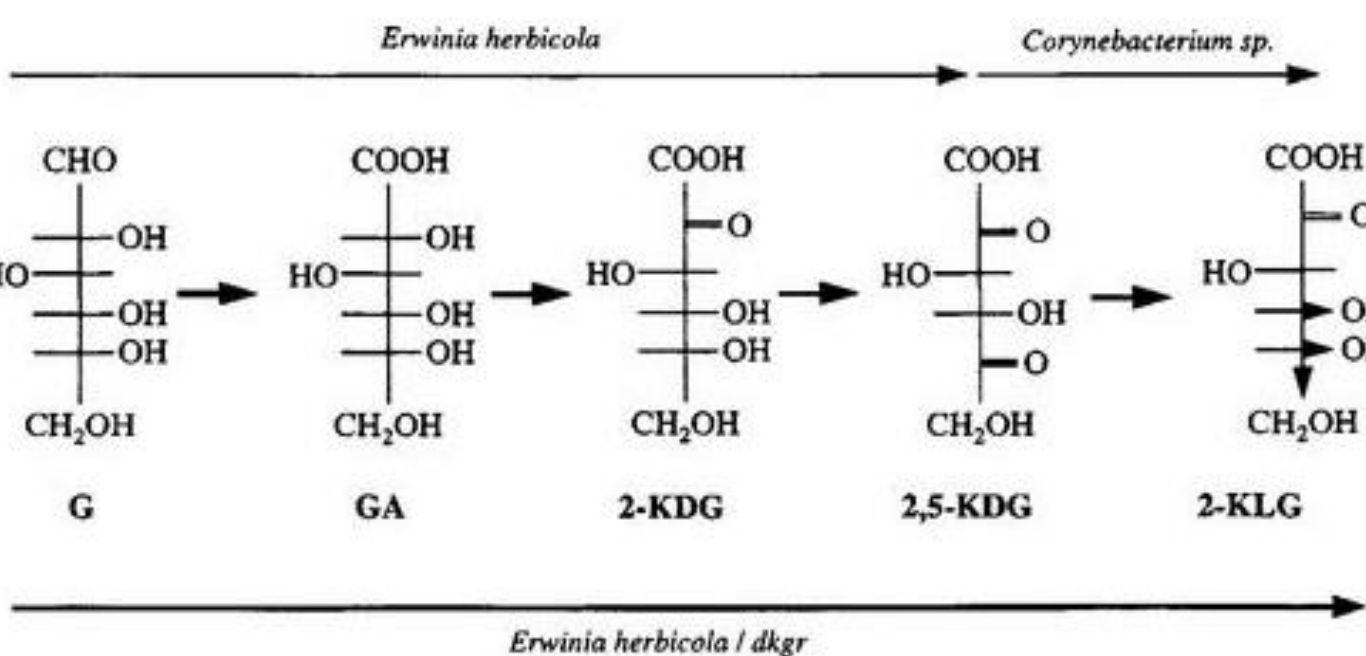
Αντιβιοτικά

- Τα αντιβιοτικά είναι προϊόντα των δευτερευόντων μεταβολικών δρόμων οι οποίοι χρησιμοποιούν τους κοινούς μεταβολίτες με πιο εξειδικευμένο και συχνά πολυπλοκότερο τρόπο από ότι ο πρωτεύον μεταβολισμός.
- Τα τελευταία χρόνια άρχισε να διαφαίνεται ότι η απόδοση της παραγωγής αντιβιοτικών (και γενικότερα προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού) μπορεί να αυξηθεί με την υπερκέρταση ρυθμοκαθοριστικών βιοσυνθετικών σταδίων
- Παράλληλα, τεχνικές της μεταβολικής μηχανικής έχουν βρει εφαρμογή στην
 - τροποποίηση γνωστών αντιβιοτικών,
 - την βελτίωση των ιδιοτήτων τους,
 - την αύξηση της απόδοσης παραγωγής τους αλλά και
 - τη σύνθεση νέων.
- Η εφαρμογή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA προς την κατεύθυνση αυτή βασίστηκε στην ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων συστημάτων σε οργανισμούς που παράγουν αντιβιοτικά και στην κλωνοποίηση των βιοσυνθετικών γονιδίων.
- Τα τελευταία χρόνια, οι βιοσυνθετικοί οδοί βιομηχανικά σημαντικών μικροοργανισμών αποτέλεσαν αντικείμενο χειραγώγησης, ενώ παράλληλα ξεκίνησαν μελέτες που σχετίζονται με την δοσολογία του γονιδίου για κάποιο ρυθμοκαθοριστικό στάδιο ή την απόσπαση γονιδίου για την αλλαγή του τελικού προϊόντος.



Βιταμίνη C

- Η νογλτη



☞ έχει ετο-L-θεση

| μια

ζιicola
όιο με

| ΤΟΥ

- Σε μια προσπάθεια να ενσωματωθούν τα παραπάνω στάδια σε ένα, ο *Erwinia herbicola* τροποποιήθηκε γενετικά με το γονίδιο του *Corynebacterium*, το οποίο κωδικεύει το ένζυμο αναγωγάση του 2,5-δικετο-D-γλυκονικού (dkgr) το οποίο καταλύει την μετατροπή του 2,5-δικετο-D-γλυκονικού (2,5-KDG) σε 2-KLG

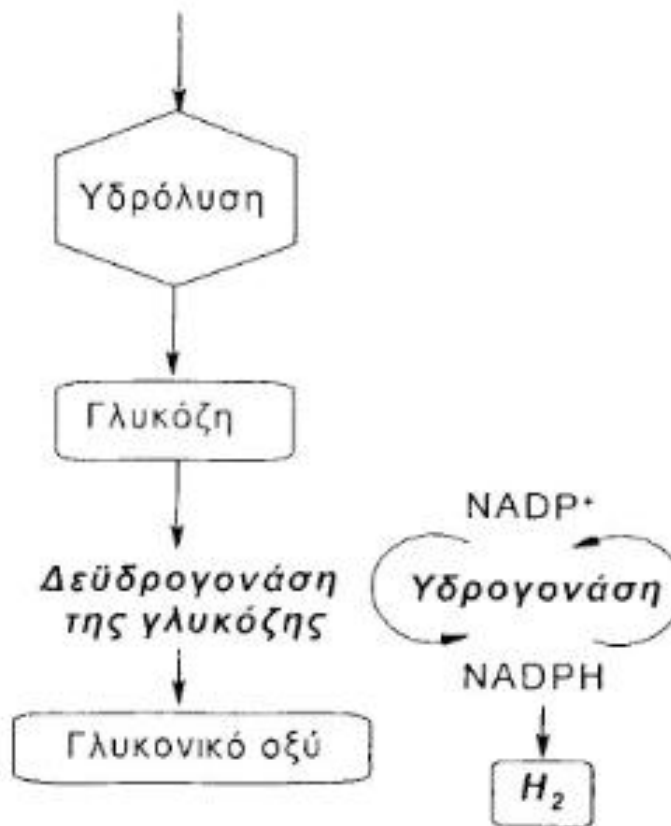


Υδρογόνο

- Το υδρογόνο αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη πηγή ενέργειας, φιλική προς το περιβάλλον το οποίο αναμένεται πως θα διαδραματίσει πρωταρχικό ρόλο τα επόμενα χρόνια ως καύσιμο
- Η ανάπτυξη τόσο ζυμωτικών όσο και ενζυμικών διεργασιών για την παραγωγή υδρογόνου διερευνάται συνεχώς την τελευταία δεκαετία. Πρόσφατα μόλις διερευνήθηκε η δυνατότητα για την *in vitro* παραγωγή υδρογόνου από βιοκαταλυτικό σύστημα αποτελούμενο από δύο ένζυμα από διαφορετικούς μικροοργανισμούς: την δεϋδρογονάση της γλυκόζης από *Thermoplasma acidophilum* και την υδρογονάση από *Pyrococcus furiosus*.
 - Η δεϋδρογονάση της γλυκόζης καταλύει τη μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ χρησιμοποιώντας ως συμπ παράγοντα το NADH ή το NADPH
 - Η υδρογονάση του συστήματος αυτού χρησιμοποιεί τον συμπ παράγοντα ως δότη ηλεκτρονίων και έτσι το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την *in vitro* παραγωγή υδρογόνου από γλυκόζη και κατ'επέκταση από ανανεώσιμες πηγές με βάση την κυτταρίνη & το άμυλο
- Είναι γνωστό ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί παράγουν υδρογόνο ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού τους. Με βάση την παραπάνω παρατήρηση, οι τεχνικές της μεταβολικής μηχανικής αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την ανακατεύθυνση του κυτταρικού μεταβολισμού προς την παραγωγή του υδρογόνου σε μεγαλύτερα επίπεδα από το φυσιολογικό. Έτσι πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση του υδρογόνου (όπως αυτά των υδρογονασών) έχουν απομονωθεί.

Υδρογόνο

Ανανεώσιμες πηγές
(Κυτταρίνη, Άμυλο, Λακτόζη)





ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Ο κλάδος αυτός της μεταβολικής μηχανικής που έχει ως αντικείμενο τη συνολική λειτουργία του κυττάρου είναι γνωστός με τον όρο *κυτταρική μηχανική*. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα επιτυχούς εφαρμογής της κυτταρικής μηχανικής τα οποία περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα οργανισμών από βακτήρια έως ζωικά κύτταρα.
 - Οι εφαρμογές αυτές έχουν σαν στόχο την βελτίωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης
 - καθώς και της απόδοσης της ανάπτυξης,
 - την αύξηση της ανθεκτικότητας σε τοξικούς παράγοντες,
 - την βελτίωση έκκρισης συγκεκριμένων προϊόντων,
 - την αύξηση της ανθεκτικότητας φυτικών κυττάρων σε περιβάλλον αυξημένης αλατότητας κ.ά.
- Η πρώτη εφαρμογή της μεταβολικής μηχανικής σε βιομηχανική κλίμακα, σχετίζεται με την αλλαγή του μεταβολισμού του αζώτου στο βακτήριο *Methylophilus methlotrohus* το οποίο χρησιμοποιείται για τη βιομηχανική παραγωγή μονοκύτταρης πρωτεΐνης από μεθανόλη, καθώς εμφανίζει αξιοσημείωτη αντοχή στη μεθανόλη.
- Η μεταβολική οδός που σχετίζεται με την αφομοίωση της αμμωνίας παρουσιάζει ένα σοβαρό μειονέκτημα καθώς χρησιμοποιεί το σύστημα της συνθετάσης της γλουταμίνης (GD) και της συνθετάσης του γλουταμικού, το οποίο απαιτεί 1 mol ATP ανά mol αμμωνίας που μεταφέρεται στο κύτταρο. Σε αντίθεση με αυτό, το αντίστοιχο σύστημα αφομοίωσης του αζώτου στο *E. coli* χρησιμοποιεί την δεϋδρογονάση του γλουταμινικού, το οποίο δεν απαιτεί κατανάλωση ATP.
- Έτσι, το γονίδιο της δεϋδρογονάσης του γλουταμινικού (*gdh*) του *E. coli* κλωνοποιήθηκε στον κατάλληλο φορέα για την εισαγωγή του στον *Methylophilus methlotrohus*. Με τον τρόπο αυτό, ο τροποποιημένος μικροοργανισμός χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την μετατροπή της μεθανόλης.



Τροποποίηση της λήψης του υποστρώματος

- Η διαδικασία λήψης του υποστρώματος που επιτελείται με μεταφορά διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης είναι σημαντικότερο χαρακτηριστικό για κάθε ζωντανό οργανισμό. Οι εξόζες όπως η γλυκόζη, ημανιτόλη, η φρουκτόζη μεταφέρονται στο κύτταρο με τη δράση του συστήματος της φωσφοτρανσφεράσης (PTS-phosphotransferase system) το οποίο εξαρτάται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Η συνολική διαδικασία που καταλύεται από το PTS μπορεί να γραφεί ως εξής :



- Η παραπάνω έκφραση ισχύει ανεξάρτητα από το μικροοργανισμό ή το είδος του υδατάνθρακα. Το σύστημα αυτό πραγματοποιεί τόσο την μετατόπιση όσο και την φωσφορυλίωση του υδατάνθρακα σε μια σειρά βημάτων που περιλαμβάνουν τόσο κυτταροπλασματικές όσο και μεμβρανικές πρωτεΐνες.
- Το φωσφοενολοπυροσταφυλικό εμπλέκεται όχι μόνο στην μεταφορά των σακχάρων αλλά και πολλών άλλων ενώσεων. Αν η διαδικασία μεταφοράς γίνει με ένα εναλλακτικό μηχανισμό θα μπορούσε να εξοικονομηθεί 1 mol φωσφοενολοπυροσταφυλικού για κάθε γλυκόζη που δαπανάται. Το σημείο κλειδί στην έρευνα που επιτελέστηκε προς την κατεύθυνση αυτή έχει να κάνει με την διαγραφή των γονιδίων *ptsH*, *ptsI* και *crr*) που εμπλέκονται στην μεμβρανική μεταφορά της γλυκόζης με το σύστημα PTS από στέλεχος *E. Coli* έτσι ώστε η γλυκόζη να μην μπορεί πια να μεταφερθεί.

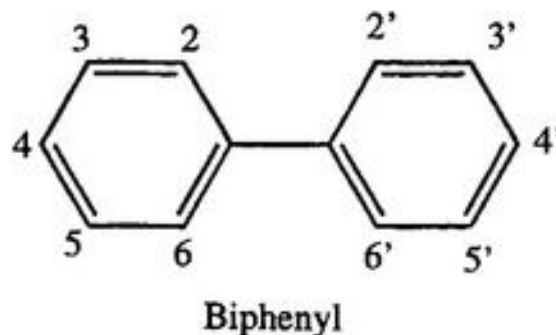


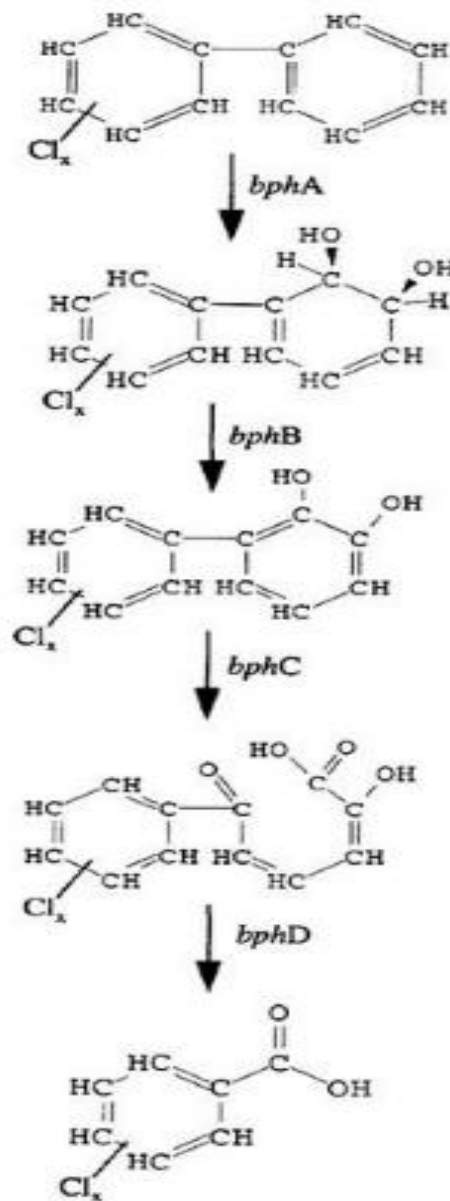
Αποικοδόμηση ξενοβιοτικών

- Οι φυσικές διεργασίες, τόσο οι βιολογικές όσο και οι γεωχημικές παράγουν ένα μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων.
 - Κατά τη διαδικασία της εξέλιξης διάφοροι μικροοργανισμοί ανέπτυξαν την ικανότητα να αποικοδομούν τις ενώσεις αυτές και να χρησιμοποιούν τη διαδικασία αυτή για την ανάκτηση άνθρακα και ενέργειας.
 - Αντίθετα με τις φυσικές ενώσεις, πολλές από τις τεχνητές οργανικές ενώσεις που παράγονται από τον άνθρωπο με σκοπό τη χρήση τους στη βιομηχανία και στη γεωργία δεν υπάρχει η αντίστοιχη συσχέτιση με τον μικροβιακό κόσμο. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές με τον όρο **ξενοβιοτικά**. Τα ξενοβιοτικά είναι σταθερές οργανικές λιποδιαλυτές ενώσεις και για το λόγο αυτό η συγκέντρωσή τους βαθμιαία αυξάνεται καθώς κινούνται στην τροφική αλυσίδα.
- Η αποικοδόμηση των ξενοβιοτικών είναι μια γοργά αναπτυσσόμενη περιοχή έρευνας στην οποία η μεταβολική μηχανική μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο. Αυτό περιλαμβάνει πρωτίστως τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση ρύπων (από στερεά και υγρά απόβλητα βιομηχανιών κλπ) γνωστή με τον όρο **βιοαποκατάσταση**. Πέρα όμως από τις κλασικές μεθόδους απομόνωσης μικροοργανισμών που να αποικοδομούν ξενοβιοτικά, η προσπάθεια που επιτελείται τα τελευταία χρόνια αφορά στον ορθολογικό σχεδιασμό καταβολικών οδών.



- Ενδιαφέρον παρουσιάζει το παράδειγμα αποικοδόμησης των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (polychlorinated biphenyls, PCB). Τα PCB, αποτελούν μια οικογένεια 209 διαφορετικών ενώσεων των οποίων η παραγωγή ανέρχεται σε χιλιάδες τόνους εκ των οποίων ένα σημαντικό ποσοστό διοχετεύεται στο περιβάλλον. Τα γονίδια (*bphA*, *-B*, *-C*, *-D*) από στέλεχος *Pseudomonas* που εμπλέκονται στην αποδόμηση των PCB, απομονώθηκαν και εκφράστηκαν σε στέλεχος *E. coli* το οποίο χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για το σκοπό αυτό. Παράλληλα με την εισαγωγή ειδικών γονιδίων σε στελέχη *Pseudomonas* είναι δυνατή η δημιουργία στελεχών ικανών να αποικοδομήσουν μίγματα αρωματικών ενώσεων που εντοπίζονται σε απόβλητα χημικών βιομηχανιών







***Thank you for your kind
attention***



www.enve-lab.eu

A connectivity perspective to environmental health