

Molekulární biotechnologie č.10c

Využití poznatků molekulární biotechnologie. Využití škrobu, cukrů a celulózy.

Využití molekulární biotechnologie – v mnoha oblastech

- Molekulární diagnostika
- Bioremediace a využití biomasy
- Využití škrobu a sacharidů, utilizace celulózy
- Mikrobiální insekticidy
- Baktérie stimulující růst rostlin
- Vakcíny a terapeutické proteiny.
- Příprava a využití transgenních rostlin. Nové potraviny.
- Příprava a využití transgenních zvířat.
- Genová terapie lidských somatických buněk.

Využití škrobu, cukrů a celulózy

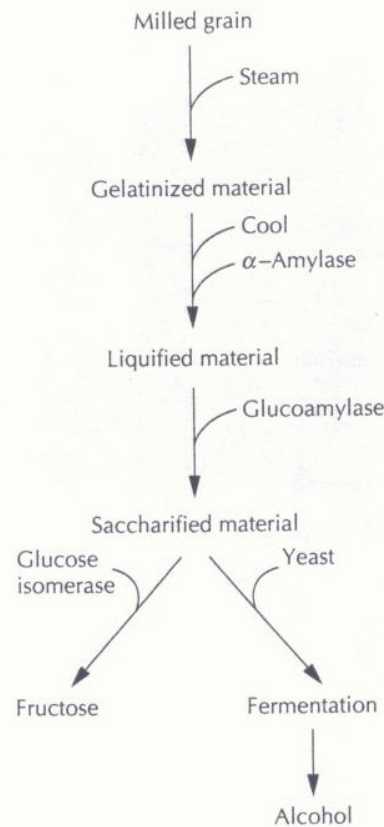
- Zejména v potravinářském průmyslu
- Škrob je hydrolyzován na komponenty o nízké molekulové hmotnosti a nakonec je přeměňován na fruktózu a alkohol

Průmyslová produkce fruktózy a alkoholu

- Využívá enzym alfa-amyláza z *Bacillus amyloliquefaciens* a
- glukoamyláza z houby *Aspergillus niger*

Průmyslová výroba fruktózy a alkoholu ze škrobu (Glick a spol.2003)

Figure 10.10 Industrial production of fructose and alcohol from starch.



Techniky genového inženýrství se využívají

- S cílem snížit náklady na výrobu obou enzymů
- A tím i snížit cenu alkoholu při průmyslové produkci alkoholu z cukru

Rozdíly ve fermentaci tekutého škrobu u různých kvasinek (Glick a spol. 2003)

Table 10.3 Fermentation of soluble starch (25%, w/v) by various yeast strains.

Strain	Carbohydrate utilized (%)	Ethanol produced (g/L)	Ethanol yield (g/g of substrate)
Laboratory	5	<0.1	Nil
Laboratory + plasmid	68	75.6	0.41
Brewer's	<1	3.1	Nil
Brewer's + integrated gene	93	118.2	0.48
<i>S. diastaticus</i>	43	44.2	0.38

Adapted from Cole et al. 1988. *Bio/Technology* 6:417-421.

Genové manipulace

- Jsou prováděné s cílem zvýšit produkci glukózo isomerázy
- *Thermus thermophilus* produkuje xyloso/glukoso isomerázu, která je aktivní a stabilní při vysokých teplotách, ale je produkována v malých množstvích
- Gen byl izolován, klonován v plasmidu a exprimován v *E. coli* a *Bacillus brevis*
- Pod kontrolou různých promotorů a rbs
- Bylo docíleno vysoké produkce pro průmyslové využití

Vysoká produkce enzymu v různých baktériích (Glick a spol. 2003)

Table 10.4 Amount of *T. thermophilus* xylose/glucose isomerase in different bacteria.^a

Strain	Plasmid copy number	Promoter source	Source of ribosome binding site	Enzyme activity (units/L)
<i>T. thermophilus</i>	None	<i>T. thermophilus</i>	<i>T. thermophilus</i>	20
<i>E. coli</i>	200	<i>E. coli-lac</i>	<i>T. thermophilus</i>	190
<i>E. coli</i>	20	<i>E. coli-tac</i>	<i>T. thermophilus</i>	1,790
<i>E. coli</i>	20	<i>E. coli-tac</i>	<i>E. coli</i>	3,260
<i>E. coli</i>	20	Phage T7-f10	<i>E. coli</i>	7,050
<i>B. brevis</i>	20	<i>B. brevis-cwp</i>	<i>T. thermophilus</i>	1,400
<i>B. brevis</i>	20	<i>B. brevis-cwp</i>	<i>B. brevis</i>	25,000

^a The first row presents data from the original enzyme-producing strain. All of the other strains are transformants carrying the *T. thermophilus* xylose/glucose isomerase gene on a multicopy plasmid.

Adapted from Dekker et al. 1992. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:727-732.

Cílená mutagenese byla prováděna

- S cílem zvýšit substrátovou specificitu

Zvýšení katalytické účinnosti xyloso/glukoso isomerázy (Glick a spol. 2003)

Table 10.5 Catalytic efficiency of wild-type and mutant xylose/glucose isomerases from *Clostridium thermosulfurogenes*.

Amino acid changes	Catalytic efficiency (k_{cat}/K_m ; $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$) of enzyme for substrate	
	Glucose	Xylose
None (wild-type)	5.8	97.2
Trp-139 → Phe	15	13.6
Val-186 → Thr	9.7	55.4
Trp-139 → Phe/Val-186 → Thr	32.9	21.6

Adapted from Meng et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4015–4019.

K průmyslovým fermentacím při výrobě ethanolu

- Jsou většinou používány kvasinky
- Ale také G- baktérie *Zymomonas mobilis*
- Tyto baktérie fermentují glukosu, fruktozu a sacharozu a produkují relativně vysoké množství alkoholu rychleji než *S. cerevisiae*
- Proto je studiu této baktérie věnována pozornost

Produkce alkoholu - srovnání

Table 10.6 Comparison of *Zymomonas mobilis* and *S. cerevisiae* as alcohol producers.

Alcohol producer	Conversion of sugar to ethanol (%)	Ethanol productivity rate ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) ^a	Volumetric ethanol productivity rate ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) ^a	pH range for ethanol production	Optimum temperature (°C)
<i>Z. mobilis</i>	96	5.67	200	3.5–7.5	25–30
<i>S. cerevisiae</i>	96	0.67	29	2.0–6.5	30–38

^a The ethanol productivity rate was measured under batch fermentation conditions. The volumetric ethanol productivity rate was measured during continuous culture. Both strains yield the same maximum ethanol concentration (12%) and had the same sugar tolerance (>40%).

Adapted from Buchholz et al. 1987. *Trends Biotechnol.* 5:199–204.

Utilizace celulózy (lignocelulózy)

- Celulóza je nejodolnější biopolymer v biosféře (nerozpustný, odolný vůči hydrolýze)

Jedná se o

- 1) primární celulóзовý materiál z užitkových rostlin (bavlna, stavební dřevo, odpadní materiál ze stromů při těžbě dřeva)
- 2) odpady rostlinné výroby – sláma, seno, plevy, rýžové plevy, stvoly cukrové třtiny, dřevní piliny, hobliny
- 3) městská odpadní celulóza – celulóza z odpadního papíru

Obvyklé složení lignocelulózy

Table 10.7 Typical composition of various lignocellulosic materials.

Raw material	Lignin (%)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)
Pine wood	27.8	44.0	26.0
Birch wood	19.5	40.0	39.0
Sugar cane bagasse	18.9	33.4	30.0
Rice straw	12.5	32.1	24.0
Cotton	None	80–95	5–20

Adapted from Brown, 1983, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **300**:305–322.

Celulóza

- Může být hydrolyzována na glukózu, avšak ta musí být uvolněna z komplexu tvořeného ligninem a hemicelulózou

Hydrolýza celulózy

vyžaduje působení silné kyseliny nebo zásady, použití vysoké teploty a tlaku, což je neekonomické

Jsou hledány cesty

- Pro účinnou biotechnologickou degradaci celulózy

Izolace celulolytických genů

- z přírody
- z bakterií
- hub
- rostlin

Celulázová aktivita

- Představuje souhrnnou aktivitu více enzymů, které se nacházejí na povrchu buňky:
- Endoglukanáza – štěpí celulózu uprostřed
- Exoglukanáza – štěpí naštěpený celulózový řetězec na celobiózu, celotriózu a na glukózu
- U hub celobiohydroláza – exoglukanáza, která odštěpuje 10 nebo více glukózových zbytků
- Beta-glukozidáza – přeměňuje celobiózu a celotriózu na glukózu

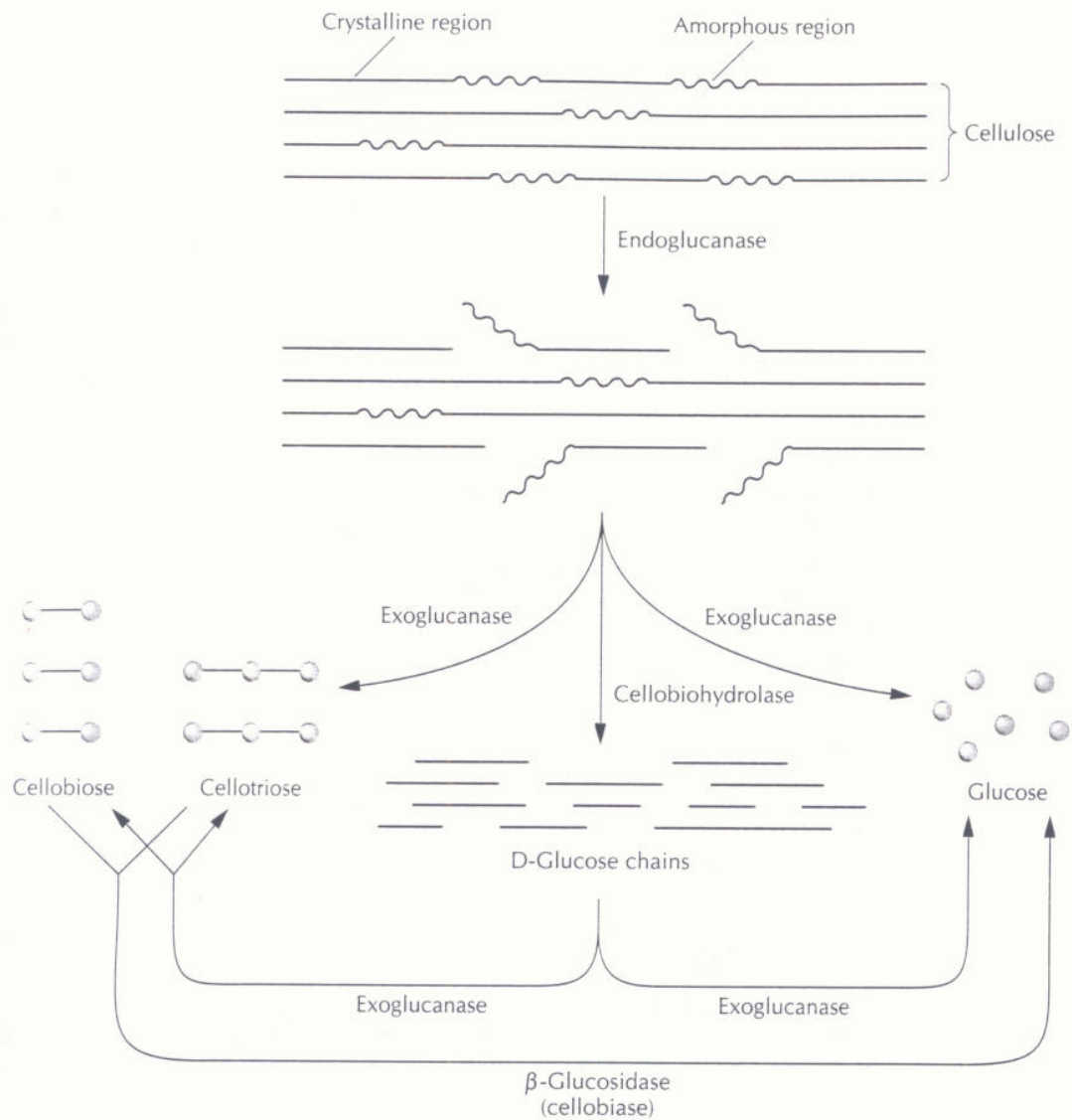


Figure 10.13 Enzymatic biodegradation of cellulose. Cellulose hydrolysis begins with the cleavage of β -1,4-linkages within the accessible amorphous regions of the cellulose chains by endoglucanase(s). This reaction is followed by the removal of oligosaccharides from the reducing ends of the partially cleaved cellulose chains by exoglucanase(s) and cellobiohydrolase(s). The degradation of cellulose is completed when the cellobiose and cellotriose are converted to glucose by β -glucosidase.

Manipulace s celulázovými geny

- S cílem vytvořit organismy s účinnější celulázovou aktivitou
- Prokaryotické celulázové geny byly izolovány z genomových bank konstruovaných v *E.coli* z mnoha bakteriálních rodů (*Clostridium*, *Streptomyces*, *Ruminococcus*, *Cellulomonas*, *Fibrobacter*, *Bacillus*, *Cellvibrio*, *Pseudomonas*)
- A z hub a rostlin (! sekvence eukaryotických genů je odlišná i když funkce je stejná)

Příklad manipulace s celulolytickými geny

- Geny pro endoglukanázu a exoglukanázu byly izolovány z bakteriálních buněk *Cellulomonas fimi*
- vloženy do plasmidu pod kontrolu promotoru *S. cerevisiae* a
- transformovány a exprimovány v buňkách *S. cerevisiae*

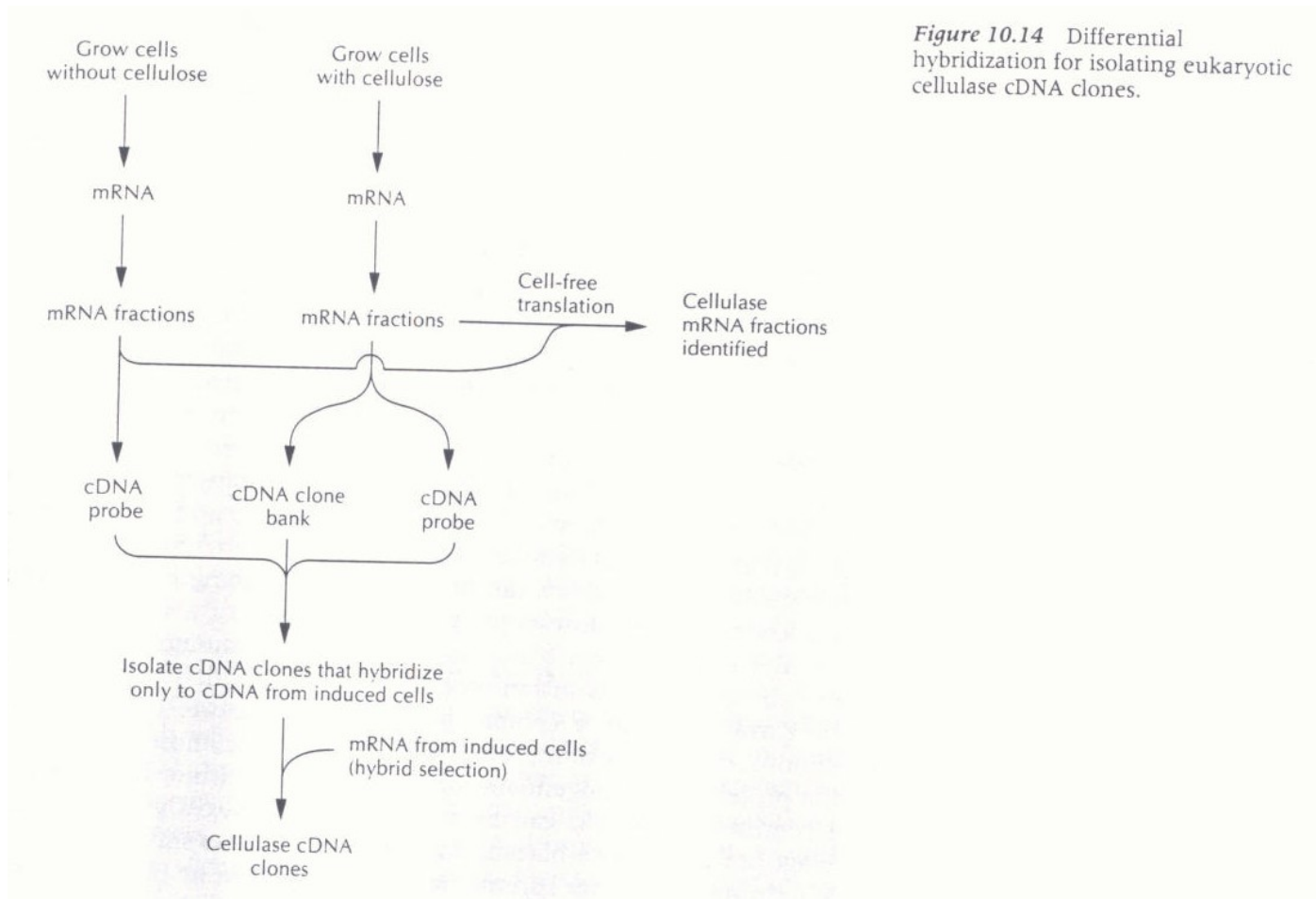
Transformanty

- degradovaly celulózu filtračního papíru a dřevních pilin (hoblin)
- Rychlost hydrolýzy byla zvýšena přidavkem beta-glukozidázy, čímž se snížilo množství celobiózy a zpětná inhibice endo- a exoglukonázy

Využití celulázových enzymů

- V průmyslové biokonverzi odpadního papíru na alkohol
- Odpadní papír byl natráven přidavkem celulólytických enzymů při 45°C
- Uvolněná glukóza byla fermentována *S. cerevisiae* při 37°C
- Bylo získáno 400 l ethanolu/ 1t odpadního papíru.
- Lze tak šetřit spotřebu benzínu a ropy.

Isolace eukaryotických celulázových genů (Glick a spol. 2003) s využitím diferenciacíální hybridisace



Produkce buněčného proteinu

- SCP, single cell protein

SCP

- označuje mikrobiální buňky narostlé v kultuře či veškeré proteiny extrahované z čistých buněčných kultur
- Proteiny jsou používány jako potravinový (krmivový) doplněk lidského (živočišného) proteinu (food-grade, feed-grade)

Mikroorganismy

- obsahují velké množství proteinů – 60-80% suché váhy, vysoké hladiny methioninu, lysinu, vitaminů a esenciálních minerálů
- Nevýhody: vysoký obsah NK, pomalé trávení (alergie), potenciální přítomnost toxických komponent (těžké kovy, mykotoxiny)
- SCP je dražší než jiné zdroje proteinů např. soja

Mikroorganismy použité pro produkci SCP

- *Sacharomyces cerevisiae* (kvasinka) – melasa zdroj C, amonné soli zdroj N (1. světová válka, pro zvýšení výživné hodnoty polévek a omáček)
- *Kluyveromyces fragilis* (kvasinka) – syrovátka
- *Candida lipolytica* (kvasinka) – ropa, rafinérské výrobky (alkany) (cena ropy dnes vysoká)
- *Chaetomium cellulolyticum* (houba) – buničina, celulóza
- *Methylophilus methylotrophus* (baktérie) – methan, methanol
- A další

Tabulka

Table 10.8 Substrates and organisms used for SCP production.

Raw material	Microorganism	Type of organism
Carbon dioxide	<i>Spirulina maxima</i>	Cyanobacterium
Whey (lactose)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Yeast
Petroleum alkanes	<i>Candida lipolytica</i>	Yeast
Cellulosic wastes	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Fungus
Methane (methanol)	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	Bacterium

Největší kontinuální fermentor na světě pro komerční produkci SCP

- 50 000 t SCP/rok (firma Imperial Chemistry Industry)
- *Methylophilus methylotrophus*
- Produkce od r. 1987 neekonomická

Dnes SCP

- Pomocí genově modifikovaných organismů
- Nadějná je produkce SCP jako vedlejšího produktu likvidace odpadů
- Musí být ekonomické