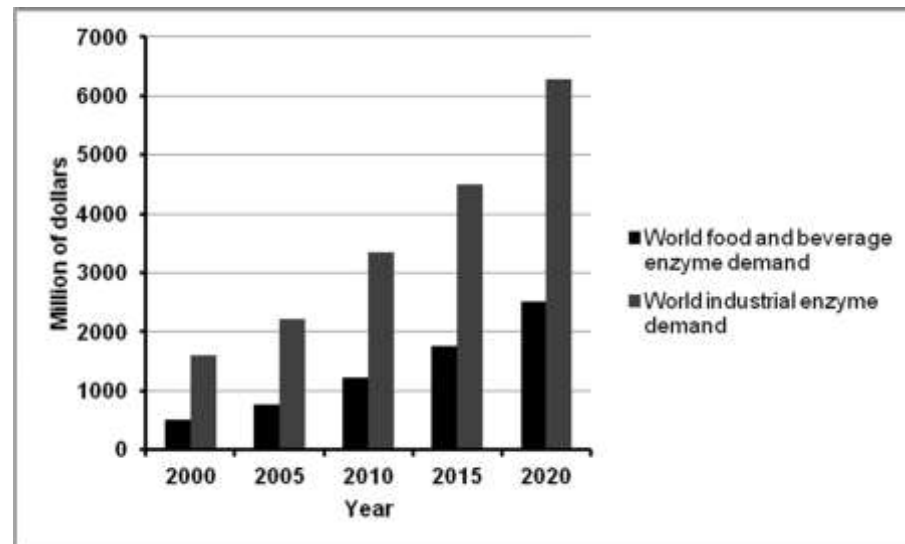


Molekularna biotehnologija:
encimi, pretvorba biomase

Biotehnološka proizvodnja encimov

Svetovno tržišče za encime ocenjujejo na 4,4 mrd USD (2013) in naj bi se širil 8 % letno, tako da naj bi leta 2020 dosegel skoraj 7,7 mrd USD. Največ (45 %) je povpraševanja po encimih za razgradnjo polisaharidov do mono- in disaharidov (,karbohidraza'), sledijo proteaze (27 %), lipaze, polimeraze in nukleaze. Največji potrošnik encimov je živilska industrija, naraščala pa bo poraba proteaz za pripravo močnih krmil. Poraba za pripravo biogoriv in detergentov naj se ne bi bistveno spreminjala.

Največji proizvajalec encimov so ZDA (37 %), najhitreje pa bo v naslednjem obdobju rasla proizvodnja v Azijsko-Pacifiški regiji. Svetovno tržišče danes obvladujejo trije proizvajalci – Novozymes (47 %), Danisco (DuPont; 21 %) in DSM (6 %) –, ki skupaj pokrivajo >70 % potreb po encimih. Polovica proizvedenih encimov izhaja iz GSO.



2013



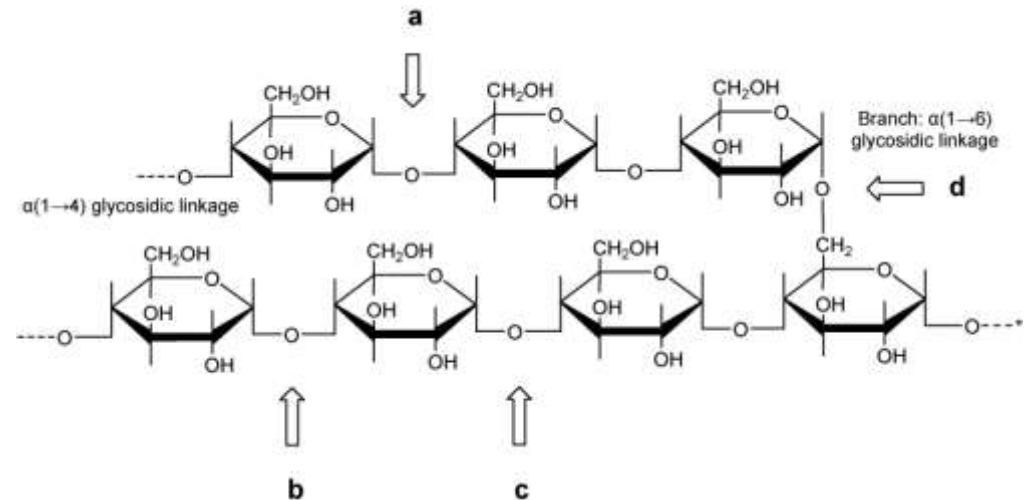
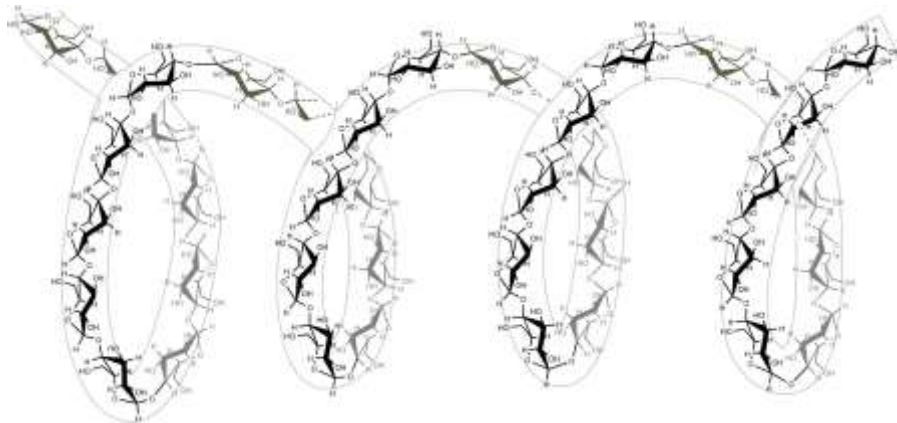
2013

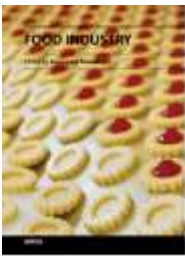
Encimi v pekarski industriji: polisaharidi v kruhu

Izdelki iz moke, kot je na primer kruh, imajo sestavo in izgled, ki ju v veliki meri določajo encimi. Ti izhajajo iz moke same, pa tudi iz kvasovk (pri kvašenem testu). Ker je zanašanje na naravne encime negotovo, v žitne izdelke dodajajo encime v točno določenih koncentracijah, ki omogočajo hitrejše in bolj ponovljive postopke, hkrati pa je (ob vse strožjih predpisih) zaradi encimov v izdelku lahko manj aditivov.

Škrob, glavna sestavina izdelkov iz žita, je sestavljen iz nerazvejane amiloze (do 6000 glukočnih enot, povezanih z alfa-1,4 vezmi) in močno razvejanega amilopektina (10-60 glukočnih enot v verigi, razvejitve dolge 15-45 enot, vezanih preko alfa-1,6 vezi – skupaj do 2 M glukočnih enot). Ta je substrat za več encimov: (a) α -amilaze, (b) amiloglukozidaze; (c) β -amilaze; (d) izoamilaze in pululanaze.

Razen škroba moka vsebuje še nekatere druge polisaharide, od katerih so za lastnosti testa predvsem pomembni arabinoksilani in arabinogalaktani, ki lahko zadržujejo vodo in s tem stabilizirajo testo, povečujejo pa tudi njegovo viskoznost in povečajo prepustnost za pline. S tem povečujejo volumen kruha in podaljšujejo rok trajanja.

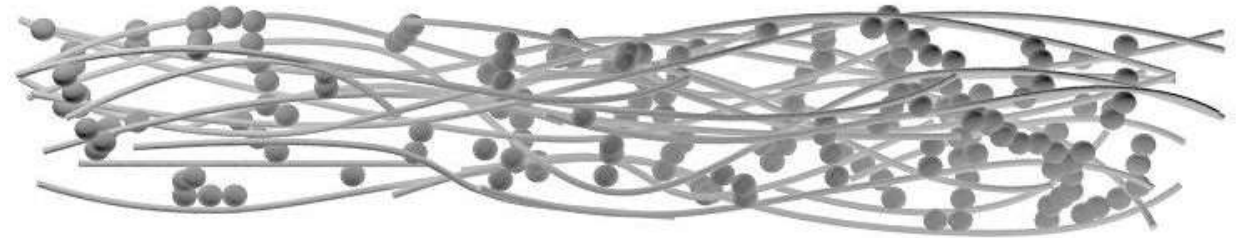
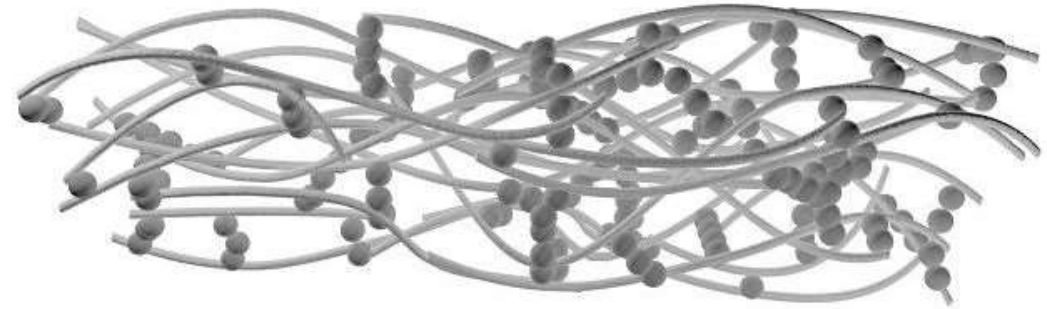




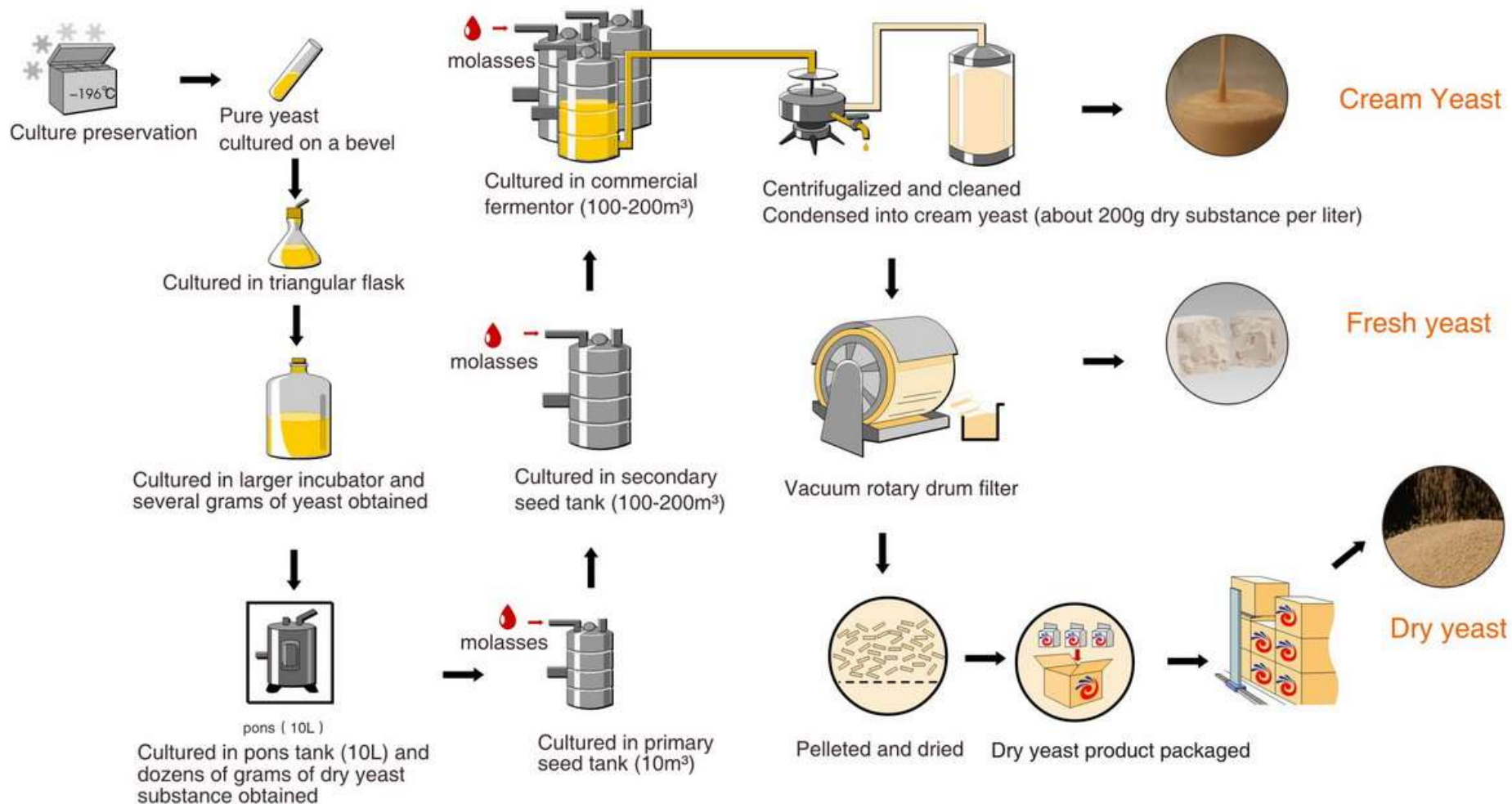
2013

Encimi v pekarski industriji: proteini v kruhu

Za lastnosti testa so najpomembnejši proteini iz skupine glutenov, ki testu dajejo elastičnost in omogočajo zadrževanje plinov v njem. Glede na njihovo topnost v 70-odstotnem etanolu glutene razdelimo na monomerne gliadine (globularni, 30 – 80 kDa) in polimerne glutenine (iztegnjene verige, povezane s S-S; 80 kDa – nekaj M kDa). Gliadini zagotavljajo plastičnost, viskoznost in vlečljivost, glutenini pa elastičnost in povezovano moč. Moke se med seboj razlikujejo po razmerju med različnimi gluteni in dolžini ter strukturi polimerov.



Commercial yeast production process



Priprava kruha in pomen dodanih encimov

Med mešanjem, vzhajanjem in pečenjem poteče več fizikalnih, kemijskih in biokemijskih sprememb, ki jih še vedno ne razumemo v celoti: ekspanzija volumna, evaporacija vode, nastanek porozne strukture, denaturacija proteinov, želatiniziranje škroba, razvoj skroje, reakcije porjavenja. Za vzhajanje uporabljamo kvasovke *S. cerevisiae*, pa tudi nekatere druge vrste, za kisloto testo pa laktobacile.

Dodatek encimov omogoča standardizacijo postopka, vpliva pa na reološke lastnosti testa, zadrževanje plinov, mehkost drobtin in zmanjšuje nastajanje akrilamidov (asparaginaza) med peko. Encime dodajajo ločeno, ali pa kot predpripravljeno mešanico. V fazi mešanja najpogosteje dodajajo alfaamilaze, ki krajšajo polisaharidne verige do oligosaharidov in dekstrinov (razvejani). Encimi pridejo iz slada ali pa jih pridobivajo iz različnih mikroorganizmov. Produkt delovanja betaamilaze je med drugim maltoza, ki je uporabna kot vir ogljika za kvasovke, ostali produkti pa predstavljajo sestavino kruha. Odvisno od temperaturne stabilnosti encimov lahko dosežemo tudi podaljšanje življenjske dobe kruha (najpogosteje uporabljajo srednje obstojno maltogeno alfaamilazo iz bakterije *Bacillus stearothermophilus*).

Za razgradnjo arabinoznih polimerov uporabljajo že ~40 let mikrobne ksilanaze, ki optimizirajo reološke lastnosti testa in okus kruha. Lipaze uporabljajo ~20 let in trenutno uporabljajo inženirske encime 3. generacije. Posledica je podaljšan rok uporabe, bolj mehko testo in kasneje kruh, poveča volumen štruc in naredi debelejšo skorjo. Uporabljajo tudi lipoksigenaze, predvsem iz sojine moke. Produkti teh encimov so razni radikali, ki oksidirajo pigmente in -SH skupine v (poli)peptidih. Hkrati pride do beljenja moke.

Proteaze v moki so večinoma aspartatne proteaze in karboksipeptidaze, ki so aktivne v kislem. Proteaze dodajajo za zmanjševanje čvrstosti testa, skrajšanje časa mešanja, zagotavljajo enotnost mase in izboljšujejo okus. Uporabljajo glivne proteaze, predvsem pri visokoglutenskih mokah. Razen tega preprečujejo krčenje gotovih izdelkov po tem, ko so pečeni.

Glukoza oksidaza odstranjuje glukozo in s tem podaljšuje rok uporabe, hkrati pa odstranjuje kisik, nastali peroksid pa deluje protimikrobno. Ugotovili so tudi vpliv na reološke lastnosti, verjetno preko vpliva na zamreženost proteinov preko S-S.

Uporabljajo tudi transglutaminaze, lakazo.

Enzyme (classification)	Substrate in foods	Reaction	Applications in baked products	References
<i>Amylolytic enzymes</i>	<i>Starch</i>	<i>Hydrolysis of linkages</i>		
α -Amylases (EC 3.2.1.1) or α -(1,4)-glucanhydrolases	Amylose and amylopectin	α (1 \rightarrow 4)-D-glycosidic [endo], liberating α -dextrins		[16,17,22,48,74,174]
β -Amylases (EC 3.2.1.2)	Amylose and amylopectin	α (1 \rightarrow 4)-D-glycosidic [exo], liberating β -dextrins and β -maltose	Generation of fermentable compounds;	[16,17,22,175]
Glucoamylase (EC 3.2.1.3) or amyloglucosidase	Amylose and amylopectin	α (1 \rightarrow 4)- and α (1 \rightarrow 6)-D-glucosidic, liberating β -glucose	Increase in bread volume;	[16,17,22]
Pullulanase (EC 3.2.1.41)	Amylopectin	α (1 \rightarrow 6)-D-glycosidic	Reduction in fermentation time;	[16,17,22]
Isoamylase (EC 3.2.1.68)	Amylopectin	α (1 \rightarrow 6)-D-glycosidic	Improvement in dough viscosity, rheology and bread softness;	[16,17,22]
Maltogenic α -amylase (EC 3.2.1.133)	Amylose and amylopectin	α (1 \rightarrow 4)-D-glycosidic, liberating maltose	Improvement in bread texture;	[16,17,22,74,175]
Maltooligosaccharides forming amylases (glucan 1,4- α -maltotetrahydrolase) (ex., EC.3.2.1.60)	Amylose and amylopectin	Liberation of maltotetraose or maltohexaose	Formation of reducing sugars and subsequent Maillard reaction products, intensifying bread flavor and color;	[16,17,22,175]
Transferases Amylomaltases (EC 2.4.1.25) Amylosucrases (EC 2.4.1.4) Cyclodextrin glycosyltransferases (EC 2.4.1.19)	Amylose, amylopectin and dextrins	Hydrolysis of α (1 \rightarrow 4) glycosidic bonds and transference of a reducing group to a non-reducing acceptor (monosaccharide unit)	Decrease of bread crumb firming rate; Anti-staling effects.	[17]

Table 2. Applications of starch modifying enzymes in baking.

Enzyme (classification)	Substrate in foods	Reaction	Applications in baked products	References
<i>Cellulases and Hemicellulases</i>	<i>Non-starch components of cereals</i>	<i>Hydrolysis of linkages</i>		
Cellulase (EC 3.2.1.4)	Cellulose and β -glucan	β (1 \rightarrow 4)-D-glycosidic [endo]	Removal of insoluble arabinoxylans, contributing to gluten network formation;	[30,71,83,95]
Lamarinase (EC 3.2.1.6)	β -glucans	β (1 \rightarrow 3)- and β (1 \rightarrow 4)-D-glycosidic	Increase in dough viscosity, stability, with better moldable form;	[71]
Lichenase (EC 3.2.1.73)	β -glucans	β (1 \rightarrow 3)- and β (1 \rightarrow 4)-D-glycosidic	Improvements on rheological properties of dough;	[30,71,83]
Endo β (1,4)-D-xylanase (EC 3.2.1.8) or endoxylanase	Arabinoxylan	β (1 \rightarrow 4)-D-xylosidic bonds	Reduction in fermentation time;	[71,83,85,95,165,176,177]
α -L-Arabinosidase (EC 3.2.1.55)	Arabinoxylan	Terminal α -L-Arabinofuranoside residues	Increase of bread volume; Synergistic action of glucanases on xylanolytic attack of cereals structure,	[71,83,95,102]
β -D-Xylosidase (EC 3.2.1.37)	Arabinoxylan	β (1 \rightarrow 4)-D-xylosidic bonds (non-reducing end)	providing more soluble dietary fiber in bread products; Production of prebiotic oligosaccharides in bread.	[83,95]

Table 3. Applications of cellulases and hemicellulases in baking.

Enzyme (classification)	Substrate in foods	Reaction	Applications in baked products	References
Proteases (EC 3.4.)	Gluten proteins Gliadin and glutenin	Hydrolysis of peptide bonds	Reduction of dough mixing time; Control of dough rheology or viscoelastic properties of gluten strength in bread; Enhance dough extensibility; Increase loaf or bread volumes; Formation of aminoacids and flavors; Crispness feature on bread crust; Production of gluten-free products.	[78,79,101,178,179,180]
Transglutaminases Protein-glutamine γ -glutamyl-transferase (EC 2.3.2.13)	Gluten Proteins	Acyl-transfer reaction between γ -carboxyamide and primary amines	Cross-link between gluten and other peptides, forming a new protein network; Increase volume and improve structure of breads, better retention of gas; Improve bread crumb strength, height increase in puff pastry and croissants volume; Improve dough stability; Improve properties of gluten-free breads; Protect frozen doughs from damage.	[29,145-150]
Lipases and esterases	Lipids	Hydrolysis of ester bonds		
Lipase (EC 3.1.1.3)	Triacylglycerols	Liberation of free fatty acids	Improvement in bread volume and dough stability; Formation of emulsifiers; Retard staling; Development of flavors.	[59,106,158]
Oxidoreductases	Various	Oxi-reductions		
Glicose oxidase (EC 1.1.3.4) β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase	β -D-glucose	Oxidation of β -D-glucose to gluconic acid	Control on browning for Maillard reaction; Improvements in crumb properties.	[130,131,181]
Lipoxygenase (EC 1.13.11.12) linoleate: oxygen 13-oxidoreductase	Polyunsaturated fatty acids	Oxidation of fatty acids	Bleaching of fat-soluble flour pigments; Hydroperoxides formed can oxidize sulfhydryl groups in proteins.	[79,182]
Laccase (EC 1.10.3.2)	Feruloyl esters of arabinoxylans;	Oxidation of phenol groups	Dough strength, stability and reduced stickiness; Increase in volume; Improved crumb structure and softness.	[155,163]

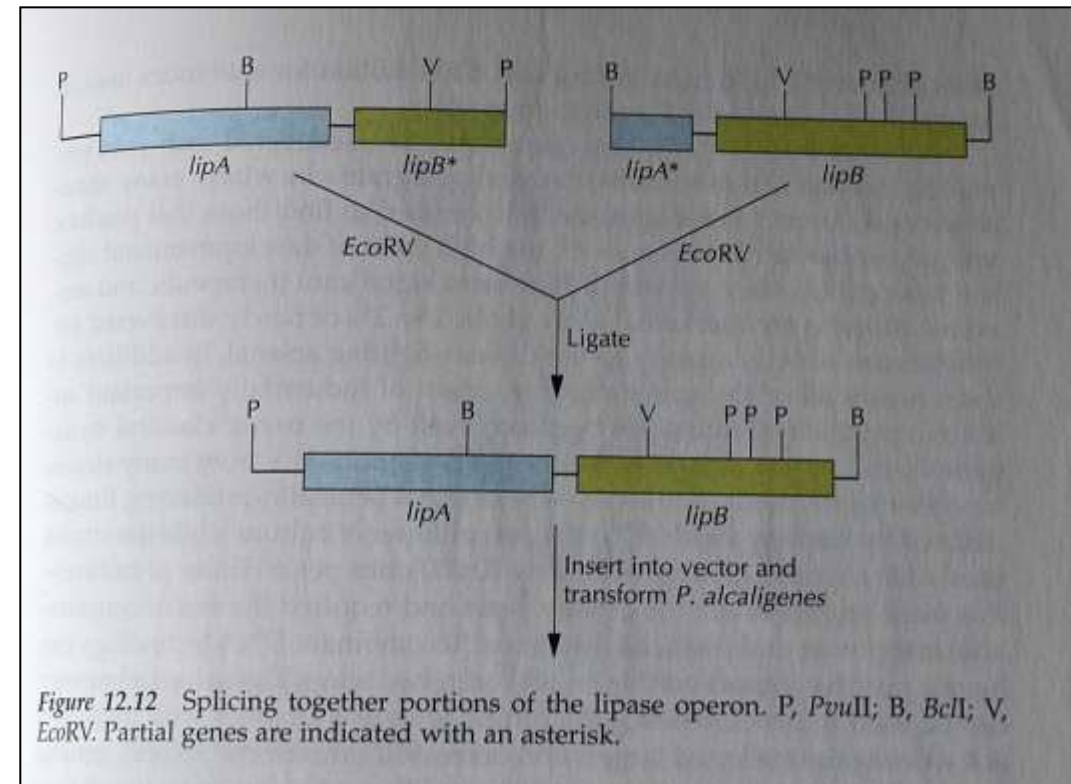
Enzyme (classification)	Substrate in foods	Reaction	Applications in baked products	References
or benzene-diol: oxygen oxidoreductase	sulfhydryl groups in gluten proteins			
Sulfhydryl oxidase	Sulfhydryl groups in proteins	Oxidation of sulfhydryl groups	Help gluten network formation and increase dough stability.	[79,162]

Table 4. Applications of proteases, transglutaminases, lipases and esterases, and oxidoreductases in baking.

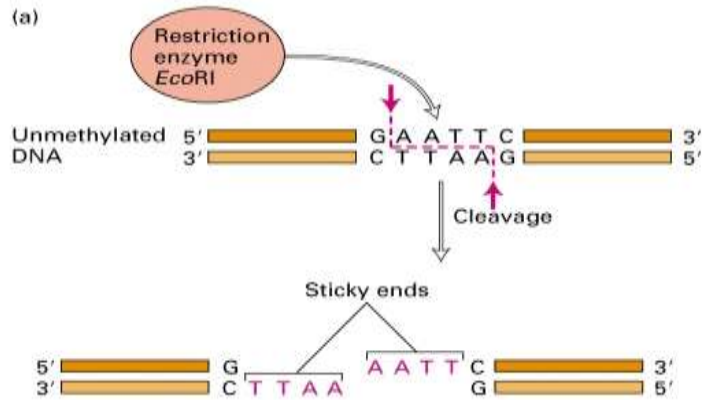
Rekombinantna lipaza

Maščobne madeže lahko odstranimo s povišano temperaturo in alkalnimi detergenti, kar pa skrajšuje življenjsko dobo tkanin in je energetsko potratno. Alternativno predstavlja encimska razgradnja, pri čemer bi lahko izhajali iz bakterijske lipaze *Pseudomonas alcaligenes*. Bakterija ga proizvaja zelo malo, rekombinantnega pa ga ni bilo mogoče prekomerno izraziti, čeprav so preizkusili različne bakterijske in glivne ekspresijske sisteme. Predvideli so, da je za težavo odgovorna odsotnost nekega drugega proteina, ki bi lahko pripomogel k izločanju ali k stabilizaciji lipaze. Vsekakor je bilo treba poiskati najprej zapis za lipazo in potem še za morebitne druge proteine.

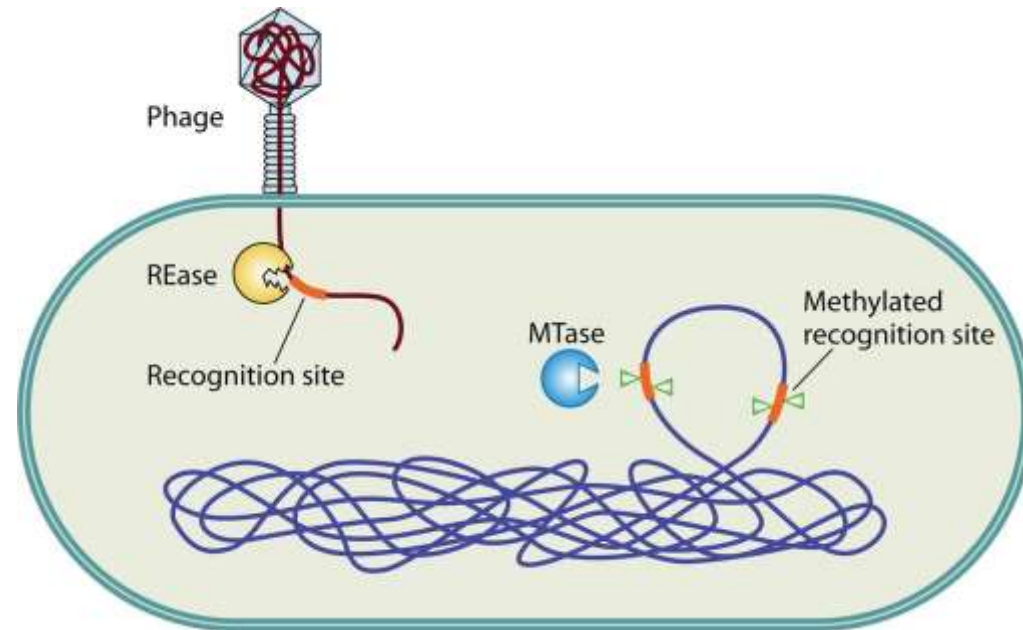
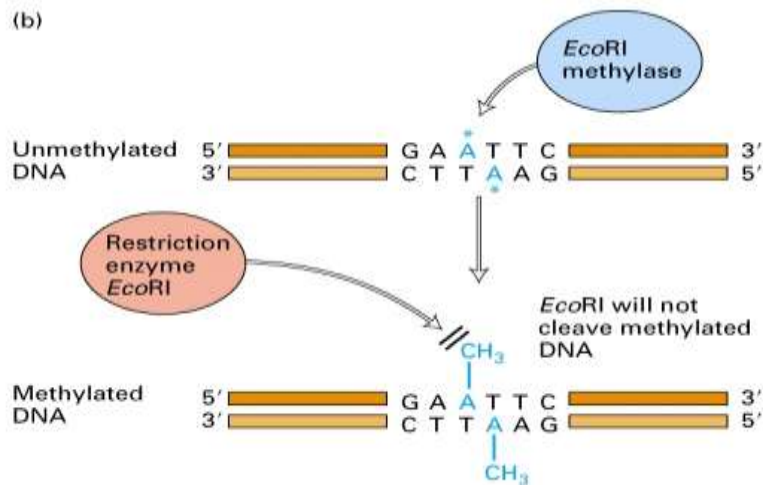
Pot do gena je potekala preko izoliranega encima. Na osnovi N-končnega ak zaporedja so pripravili sondo in pri presejanju genomske knjižnice *P. alcaligenes* našli klon, ki je vseboval celoten gen za lipazo (*lipA*) in del sosednjega gena (*lipB*). Ta klon so uporabili za novo sondo in z njo pregledali drugo gensko knjižnico. Tako so našli še preostanek gena *lipB* in oba dela združili. Sestavljeni produkt so preko ekspresijskega vektorja širokega spektra vnesli v *P. alcaligenes*. Ob uporabi vektorja z majhnim številom kopij je bila aktivnost lipaze 4-5x večja kot pri wt ne glede na vsebnost *lipB*. Z vektorjem z velikim številom kopij je bila aktivnost 20x večja kot pri wt v odsotnosti *lipB*, v prisotnosti *lipB* pa 35x večja. Sekretijski vektorji omogočajo prenos rekombinantnega proteina v gojišče, od koder ga je lažje izolirati kot iz celic – za praške zadošča koncentriranje gojišča brez celic. V 10m³ reaktorju je bila proizvodnja manjša od pričakovane zaradi nastajanja povečane konc. CO₂. S spremembo pogojev obratovanja se je zmanjšala konc. CO₂, s tem pa se je povečala vsebnost lipaze.



Rekombinante restrikcijske endonukleaze



Komercialno dostopnih je nad 600 različnih restriktaz (236 različnih specifičnosti), iz mikroorganizmov z zelo različnimi pogoji rasti za optimalno proizvodnjo. Veliko genov za restriktaze so zato klonirali in jih izrazili v večjem obsegu v *E. coli*. Pri tem pa je treba preprečiti, da bi tuja restriktaza razgradila gostiteljsko DNA. Običajno to dosežejo s koekspresijo gena za metilacijo DNA. Pri tem je treba zagotoviti izražanje metiltransferaze pred izražanjem restriktaze.



Rekombinanti *PstI*

Primer: *PstI* (*Providencia stuartii*) v *E. coli*.

Pripravili so genomsko knjižnico *P. stuartii* v *E. coli*. Transformante so rasle v tekočem gojišču, nato pa so jih inficirali z bakteriofagom λ . Celice, ki so izražale funkcionalni zapis za restriktazo, so preživele, ostale pa je fag liziral. Odporne bakterije so namnožili, jih lizirali in preverili specifičnost restriktaze ter metilazno aktivnost.

V opisanem poskusu so identificirali en sam klon z vključkom dolžine ~4 kb, ki je vseboval gen za restriktazo in metilazo na istem operonu, ki je vključeval skupni promotor. Proizvodnja v *E. coli* je bila ~10x večja kot v *P. stuartii*, restriktazno aktivnost so dokazali v periplazmi, metilazno pa v citoplazmi.

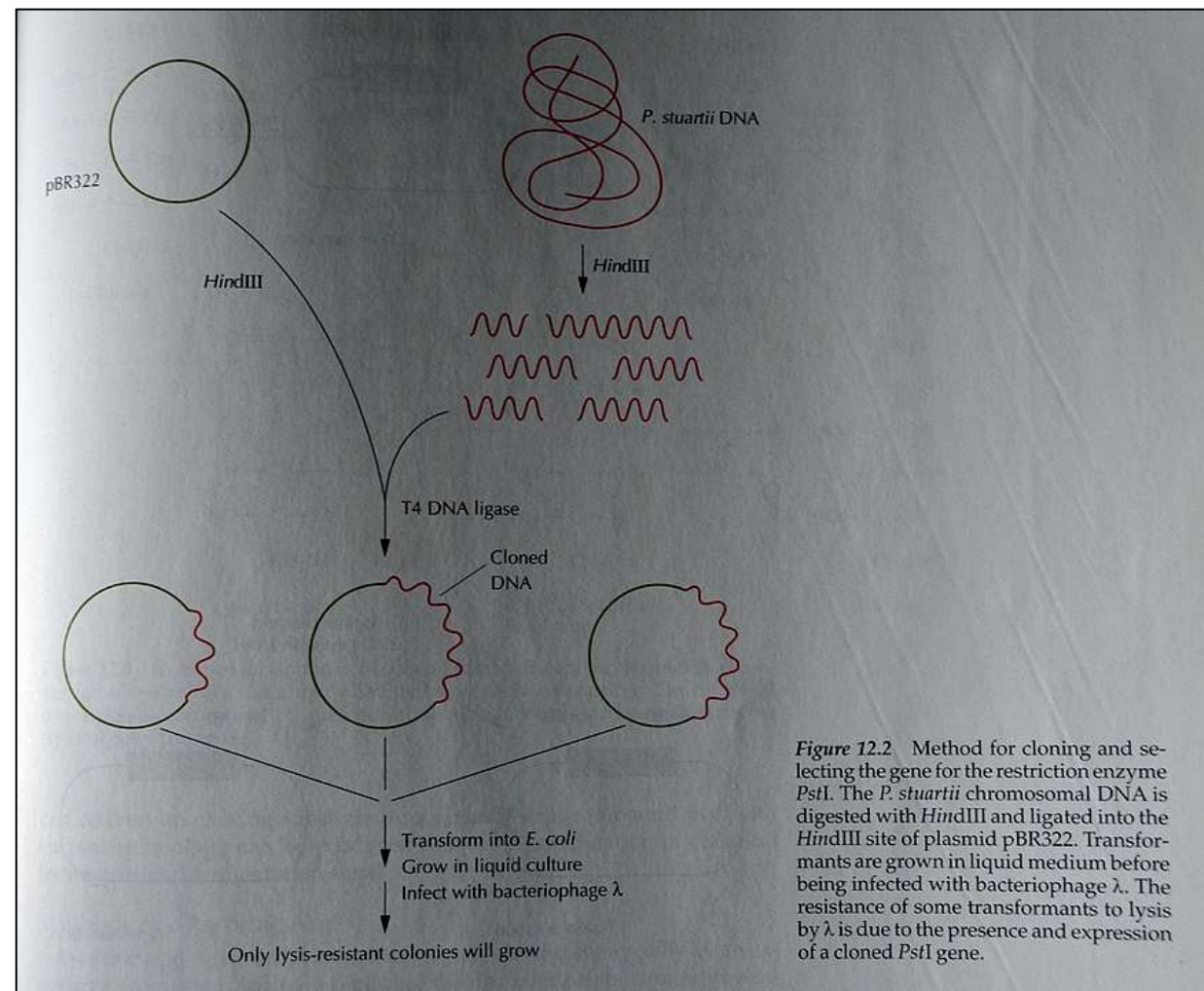


Figure 12.2 Method for cloning and selecting the gene for the restriction enzyme *PstI*. The *P. stuartii* chromosomal DNA is digested with *HindIII* and ligated into the *HindIII* site of plasmid pBR322. Transformants are grown in liquid medium before being infected with bacteriophage λ . The resistance of some transformants to lysis by λ is due to the presence and expression of a cloned *PstI* gene.

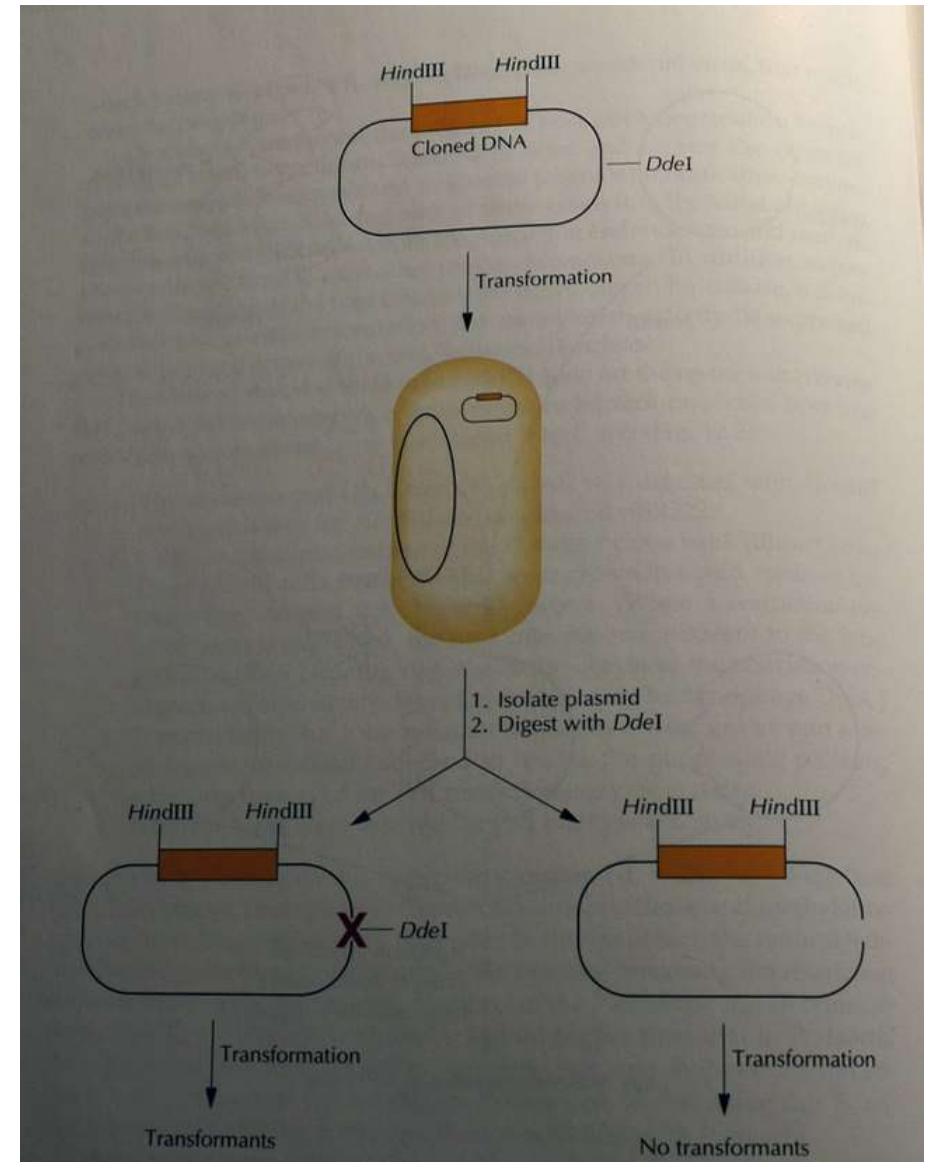
Rekombinante restrikcijske endonukleaze /2

Alternativna pot za iskanje genov za metilazo in restriktazo:

Iz seva, za katerega so vedeli, da proizvaja restriktazo, so pripravili genomsko knjižnico v *E. coli*, pri tem pa so uporabili vektor, ki vsebuje prepoznavno zaporedje za to restriktazo (predpostavljamo, da bo na vključku tudi gen za metilazo in da imata oba gena lastni promotor).

Iz kolonij so izolirali plazmidno DNA in jo rezali s predhodno izolirano restriktazo (pBR322 vsebuje 8 prepoznavnih mest za *DdeI*), s tako obdelano plazmidno DNA pa so transformirali bakterijske celice. Metilaza bi morala zaščititi plazmidno DNA pred rezanjem, zato bi plazmid ostal nerazrezan, s takim pa se bakterije zlahka transformirajo.

Zraslim transformantom določijo le še restriktazno aktivnost (da imajo metilazno, že vedo). Tak pristop je uporaben v vseh tistih primerih, ko sta gena za metilazo in restriktazo en ob drugem, to pa je v večini primerov.



Pretvorba sestavin biomase: škrob

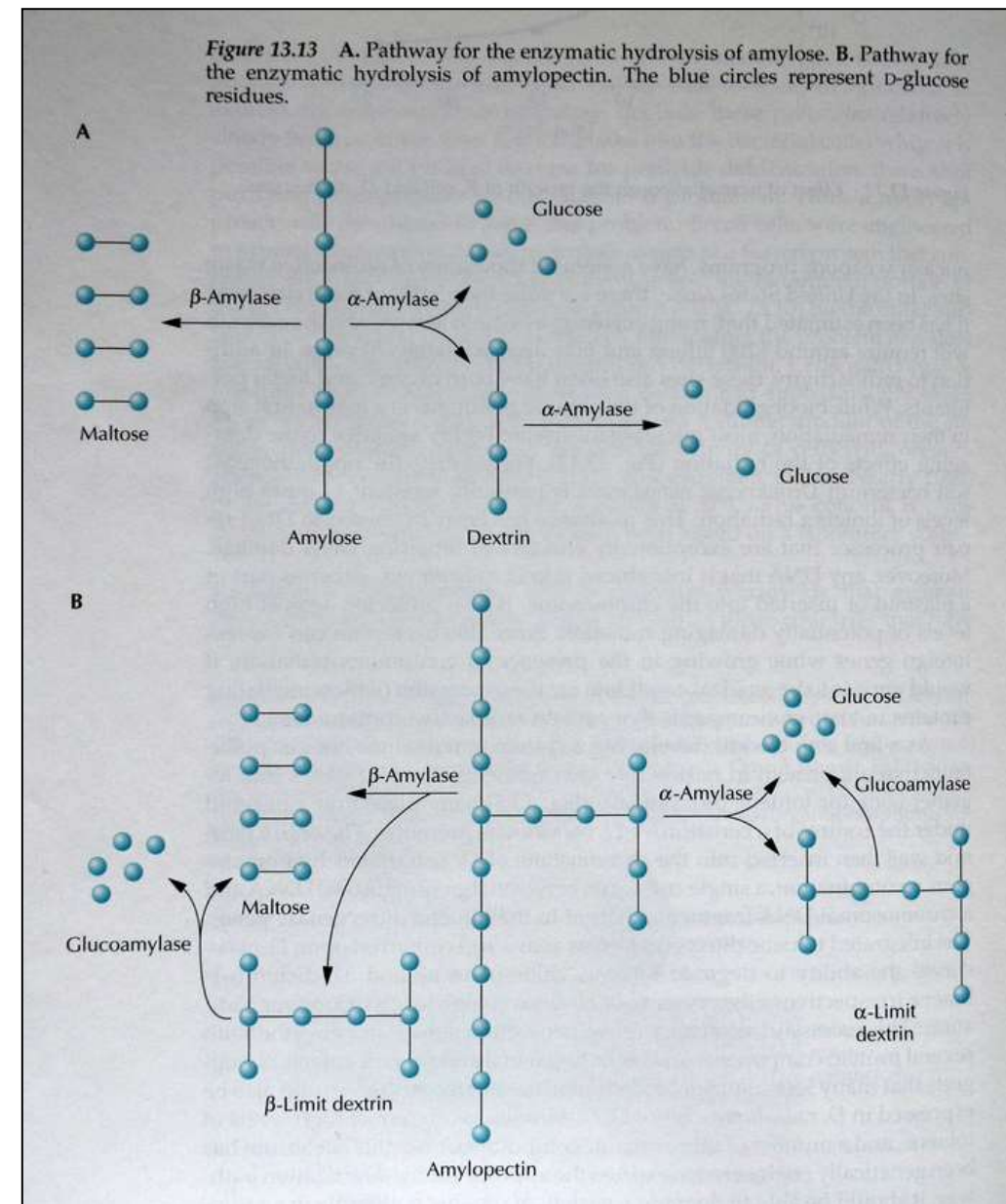
Škrob je pogosta zaloga energije pri rastlinah in jo sestavlja mešanica amiloze (linearni homopolimer) in amilopektina (razvejani homopolimer D-glukoze). Dolžina / razvejanost je različna, odvisna od vira in starosti škroba. Iz škroba npr. lahko v biotehnološkem postopku proizvedemo fruktozo, lahko pa tudi alkohol (primer biogoriva).

Pri pretvorbi v prvi stopnji uporabljajo α -amilazo, nato pa glukoamilazo in glukoza izomerazo. Ti trije encimi po vrednosti predstavljajo 30 % vseh industrijsko uporabljenih encimov.

Pretvorba škroba vključuje encimske in neencimske reakcije. Pogosta surovina je koruzno zrnje, ki vsebuje 40 % škroba.

Encim α -amilaza cepi vezi tako v amilozi kot v amilopektinu, kar privede do nastanka glukoze, maltoze, maltotrioze in dekstrinov (pri cepitvi amilopektina razvejanih dekstrinov). Vir α -amilaze je običajno *Bacillus amyloliquefaciens*. Včasih uporabijo dodatno še β -amilazo, ki odceplja disaharide s koncev verig.

Glukoamilaza sicer cepi α -1,3, α -1,4 in α -1,6 vezi, a α -1,4 manj učinkovito kot α -amilaza. Uporabljajo jo npr. za lahka suha piva, ker hidrolizira razvejane dekstrine. Industrijski encim pridobivajo predvsem iz glive *Aspergillus niger*.



Postopek pretvorbe škroba

Zrnje zmeljejo, nato ga želatinizirajo s kuhanjem pod povišanim tlakom – s tem se izpostavi površina škroba za lažjo encimsko razgradnjo. Ko se želatinasta masa ohladi na 50 – 60 °C, dodajo α -amilazo, ki cepi α -1,4 vezi in s tem hidrolitično skrajša verige, to pa povzroči utekočinjenje mase. Dodajo glukoamilazo, s katero poteče popolna hidroliza polisaharida: saharificirana masa, ki jo predstavlja večinoma glukoza.

Glukozo lahko encimsko pretvorijo v fruktozo (glukoza izomeraza), ali pa poteče alkoholna fermentacija, s katero v anaerobnih pogojih nastane etanol.

Proizvodnja fruktoze po zgornjem postopku je cenejša od proizvodnje sladkorja (saharoz), zato saharozo kot sladilo v živilski industriji nadomeščajo s fruktozo – visokofruktozni (koruzni) sirup, ki pa sicer vsebuje še okrog 50 % glukoze.

Znana so kodirajoča zaporedja iz več mikroorganizmov, ki omogočajo pripravo rekombinantnih organizmov (največkrat kvasovk) z izboljšanimi lastnostmi. Z mutacijami v genu za glukoza-izomerazo so ob zamenjavi 2 ak, ki sodelujeta pri vezavi substrata, uspeli dobiti seve, ki so bistveno bolj učinkoviti pri biosintezi fruktoze.

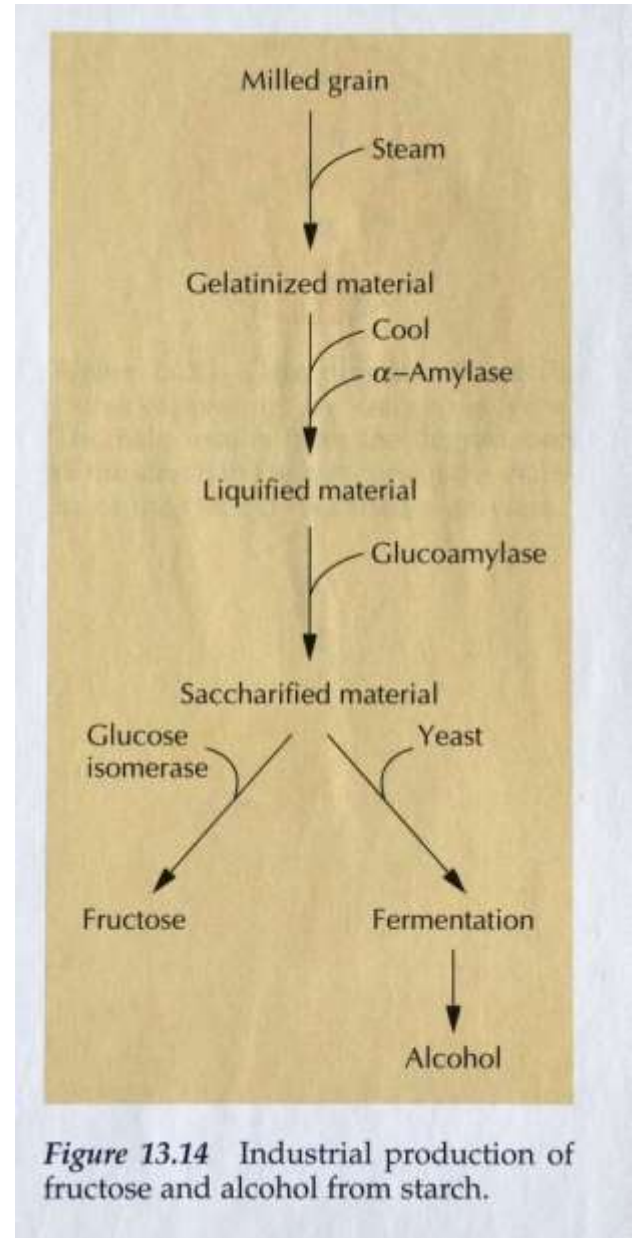


Figure 13.14 Industrial production of fructose and alcohol from starch.

Možnosti za cenejšo pretvorbo škroba

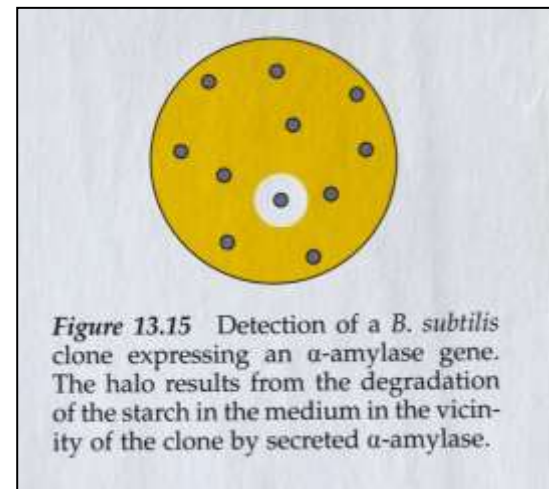
Pri proizvodnji fruktoze in alkohola največji strošek predstavlja cena encimov, ki jih uporabijo samo enkrat. Potrebni so novi pristopi za pripravo cenениh encimov. Možne rešitve bi bile:

- prekomerno izražanje rekombinantnih encimov v mikrobih, ki hitro rastejo na cenениh substratih;
- priprava izboljšane α -amilaze, ki bi bila aktivna pri visoki temperaturi (80 – 90 °C), s čimer bi odpadli stroški hlajenja mase, postopek pretvorbe pa bi se pospešil;
- priprava takih encimov, da bi imeli temperaturni in pH-optimum enak, tako da bi lahko utekočinjenje in saharifikacija potekla pri enakih pogojih;
- razvoj encimov, ki bi lahko razgrajevali škrob, ne da bi bila potreba stopnja želatinizacije;
- razvoj fermentacijskega mikrobnega seva, ki bi izločal glukoamilazo in je s tem ne bi bilo treba dodajati.

Gen za α -amilazo so izolirali iz različnih organizmov, npr. *B. amyloliquefaciens* in bolj termofilne *B. stearothermophilus* idr.

Genomsko knjižnico bacilusa so pripravili v *B. subtilis*, ki nima gena za α -amilazo, ter preverili, ali kateri od klonov proizvaja in izloča α -amilazo. Gojišče s škrobom, na katerem so zrasle transformante, so izpostavili hlapom joda. Ker so kolonije, ki so proizvajale encim, razgradile škrob, so na gojišču opazili neobarvan kolobar okrog kolonije.

Iz *Aspergillus awamori* so izolirali cDNA za glukoamilazo in jo vstavili v vektor za *S. cerevisiae* pod kontrolo kvasovkega promotorja za enolazo (ENO1). Kvasovke so hkrati pretvarjale oligosaharide in izvajale fermentacijo, tako kot so pričakovali, a učinkovitost ni bila velika.



Problemi pri izražanju glukoamilazne cDNA v *S. cerevisiae* za sočasno pretvorbo oligosaharidov in alkoholno fermentacijo:

- sev mora biti odporen na visoko koncentracijo etanola (laboratorijski sevi niso);
- izražanje cDNA je bilo nizko;
- izgubljanje plazmidov iz celic v odsotnosti selekcijskega pritiska.

Rešitve:

- uporaba seva iz pivovarniške industrije, ki je odporen na povišane koncentracije etanola;
- delecija 175 bp iz promotorske regije ENO1 (delovalo kot negativni regulatorski element);
- zamenjava ori z regijo za homologno rekombinacijo → integrativni vektor.

Tako so pridobili dva nova seva, ki sta bila po svojih lastnostih boljša od naravne amilolitične kvasovke *S. diastaticus* in boljša od izhodiščnih sevov *S. cerevisiae*.

Table 13.4 Fermentation of soluble starch (25%, wt/vol) by various yeast strains

Strain	Carbohydrate utilized (%)	Ethanol produced (g/L)	Ethanol yield (g/g of substrate)
Laboratory	5	<0.1	0
Laboratory + plasmid	68	75.6	0.41
Brewer's	<1	3.1	0
Brewer's + integrated gene	93	118.2	0.48
<i>S. diastaticus</i>	43	44.2	0.38

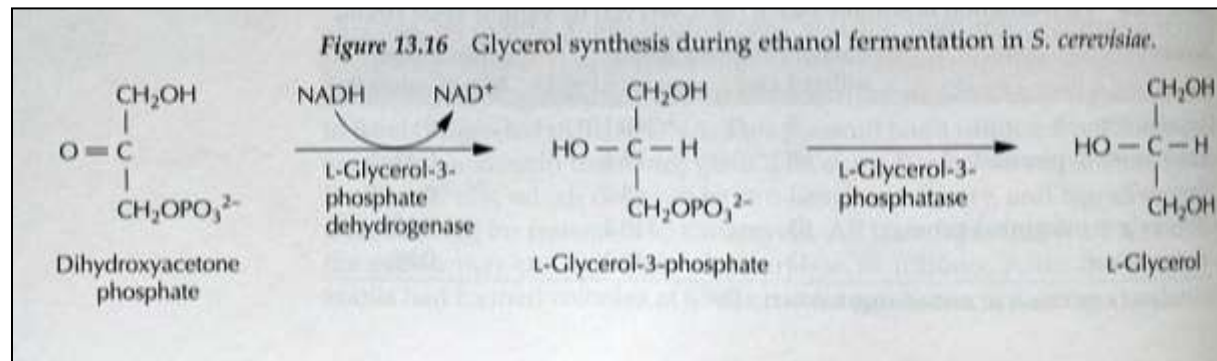
Adapted from Cole et al., *Bio/Technology* 6:417-421, 1988.

Poskusili so tudi pripraviti seve *A. niger* s povečanim številom kopij gena za glukoamilazo. Ugotovili so, da izražanje ni bilo povezano s številom vnesenih kopij, pač pa predvsem z mestom vstavitve ene ali več dodatnih kopij.

Kvasovke za slajše vino

Sladkost vina je do neke mere odvisna od vsebnosti glicerola in znaša 4-9 g/l. Da bi dobili lažja in slajša vina, so pripravili sev *S. cerevisiae*, ki prekomerno izraža gen GPD1, ki zapisuje glicerol-3-fosfat dehidrogenazo. Med alkoholno fermentacijo se prebitih NADH z GPD1 pretvori v NAD⁺, hkrati pa isti encim pretvarja dihidroxiaceton v glicerol-3-fosfat, tega pa glicerol-3-fosfataza pretvori v glicerol.

Konstrukte so vstavili v 6 različnih sevov kvasovk za vinarstvo in s tem pridobili v vinu glicerol namesto 7-9 g/l → 12-18 g/l, hkrati pa se je vsebnost alkohola znižala z 9,5-10 % na 8,5-9 %. Vsebnost acetata se ni spremenila.



Izboljšana proizvodnja fruktoze

Glukoza izomeraza je pravzaprav ksiloza/glukoza izomeraza. Ob pretvorbi (5C) ksiloze v ksilulozo v stranski reakciji pretvarja (6C) glukozo v fruktozo. Encim ima za nižjo vrednost k_{cat} in višjo K_m (vezavno konstanto) za glukozo kot za ksilozo, zato se ksiloza na encim veže tesneje kot glukoza in se pretvarja hitreje.

Glukoza izomeraza je citoplazemski encim, zato ga je težje izolirati v čisti obliki kot encime, ki se izločajo iz celic, hkrati pa je proizvodnja dražja. Zato bi bilo smiselno uporabiti ta encim večkrat, kar je možno, če je encim v pretvorbenem postopku imobiliziran na trden nosilec, kar tudi stabilizira encim.

Izomerizacijska reakcija je reverzibilna, vsebnost fruktoze pa je odvisna od temperature. V industrijskih postopkih je ta običajno 60 °C. Učinkovitost bi bilo mogoče izboljšati s pripravo bolj temperaturno obstojnih encimov s višjim temperaturnim optimumom. Tak encim najdemo pri bakteriji *Thermus thermophilus* ($T_{opt}=95$ °C), a ga celice proizvedejo zelo malo, zato so gen zanj prestavili v različne vektorje in ga izrazili v *E. coli* oz. *Bacillus brevis*. V enem od primerov je bilo izražanje 1000-krat večje kot v termofilni bakteriji, iz katere izhaja gen.

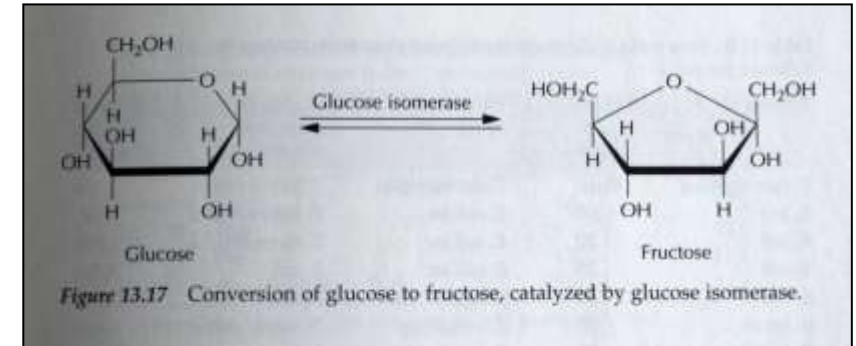


Table 13.5 Amounts *T. thermophilus* xylose/glucose isomerase in different bacteria

Species	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 cup</i>	<i>T. thermophilus</i>	1,400
<i>B. brevis</i>	20	<i>B. brevis cup</i>	<i>B. brevis</i>	25,000

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

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

Izboljšana glukoza izomeraza

Substratno specifičnost so izboljšali z usmerjeno mutagenezo gena iz bakterije *Clostridium thermosulfurogenes*, pri katerem so najprej mutirali eno od dveh ak, ki sodelujeta pri vezavi substrata in s tem dosegli do 2,6x večjo katalitično aktivnost na glukozo in do 7x manjšo aktivnost na ksilozo.

Če so zamenjali obe ak, je bila aktivnost na glukozo 5,7x večja, na ksilozo pa 4,5x manjša. Ker je v izhodišču encim 17-krat bolj aktiven na ksilozo, je zdaj 1,5-krat bolj reaktiven na glukozo.

Table 13.6 Catalytic efficiency of wild-type and mutant xylose/glucose isomerases from *C. thermosulfurogenes*

Amino acid changes	Catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$) toward:	
	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., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4015–4019, 1991.

Zymomonas kot alternativa za Saccharomyces

Zymomonas mobilis je gramnegativna bakterija, ki lahko fermentira glukozo, fruktozo in saharozo ter proizvaja dokaj visoke koncentracije etanola. Pri tem ne raste intenzivno in torej ne porablja veliko substrata za lastno rast. Energetski metabolizem (1 mol ATP/1 mol glukoze) poteka drugače kot pri kvasovki (2 mol ATP/1 mol glukoze).

Zymomonas uporabljajo ponekod v tropih za pripravo alkoholnih pijač (npr. pulque iz agave v Mehiki; 3-5 % alkohola). Hitrost sinteze etanola je večja kot pri kvasovki, zato bi bila dobra alternativa, vendar ima nekatere slabosti:

- uporablja manj različnih virov ogljika;
- vektorji za te bakterije niso dovolj stabilni;
- bakterije so odporne proti številnim antibiotikom, ki jih uporabljamo v genski tehnologiji.

Table 13.7 Comparison of *Z. mobilis* and *S. cerevisiae* as alcohol producers

Attribute	Value for:	
	<i>Z. mobilis</i>	Yeast
Conversion of sugar to ethanol (%)	96	96
Maximum ethanol concentration (%)	12	12
Ethanol productivity rate (g g ⁻¹ h ⁻¹)	5.67	0.67
Volumetric ethanol productivity rate (g L ⁻¹ h ⁻¹)	200	29
Sugar tolerance (%)	>40	>40
pH range for ethanol production	3.5–7.5	2–6.5
Optimum temperature (°C)	25–30	30–38

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

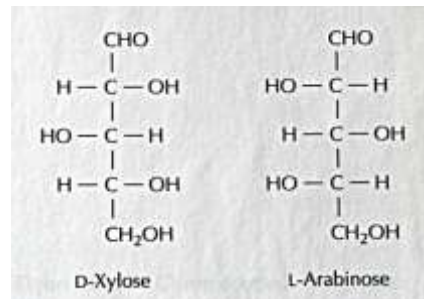
The ethanol productivity rate was measured under batch fermentation conditions. The volumetric ethanol productivity rate was measured during continuous culture. Both strains yielded the same maximum ethanol concentration (12%) and had the same sugar tolerance (>40%).

Optimizacija sevov bakterije *Zymomonas*

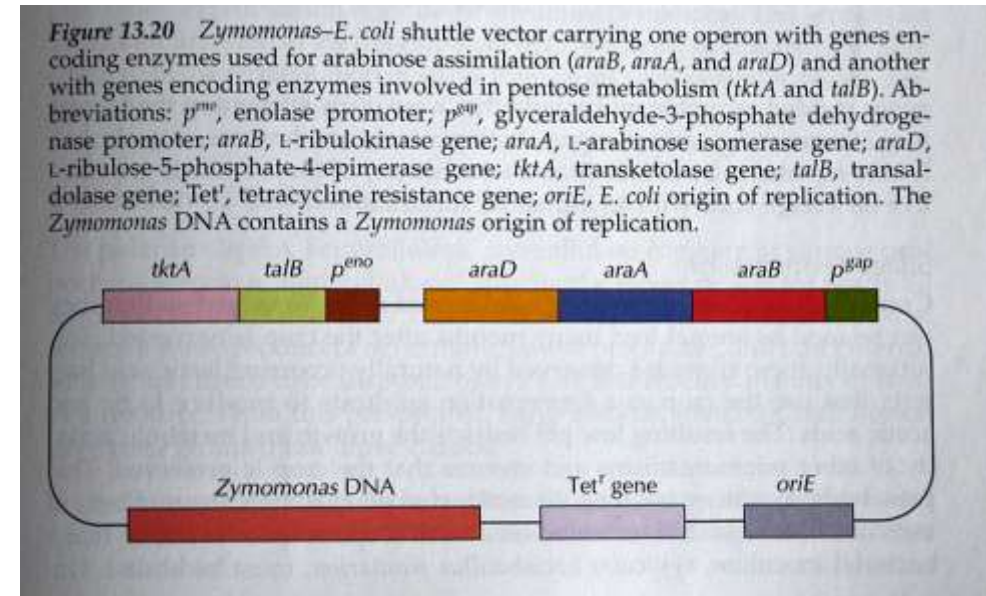
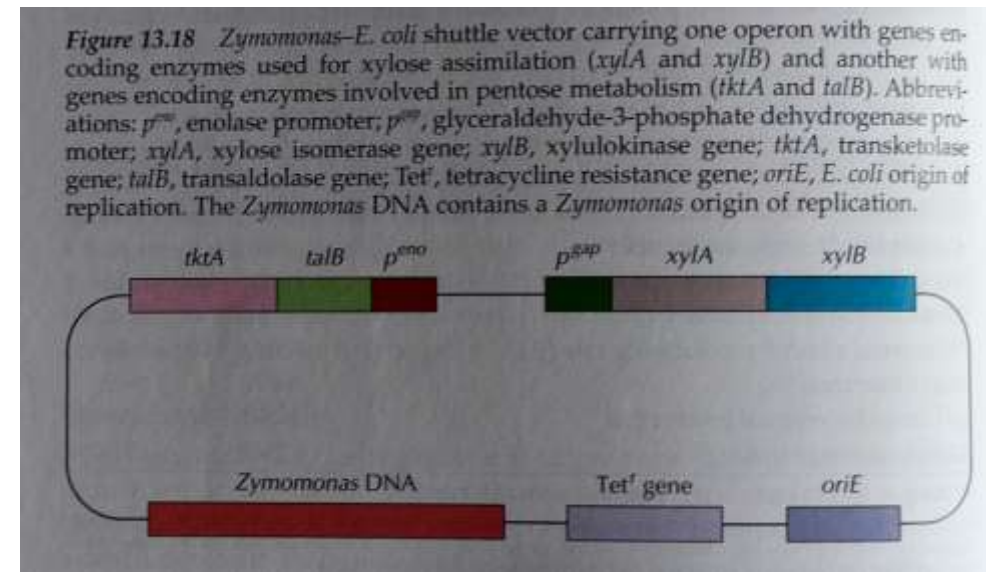
V bakterijo *Zymomonas mobilis* so vstavili gene, ki omogočajo razgradnjo laktoze, škroba, celuloze, ksiloze in celobioze. Ti geni so se izrazili, niso pa omogočali, da bi bakterija določen vir ogljika izrabljala kot edinega. Izjema je ksiloza (npr. odpadki pri izdelavi celuloze).

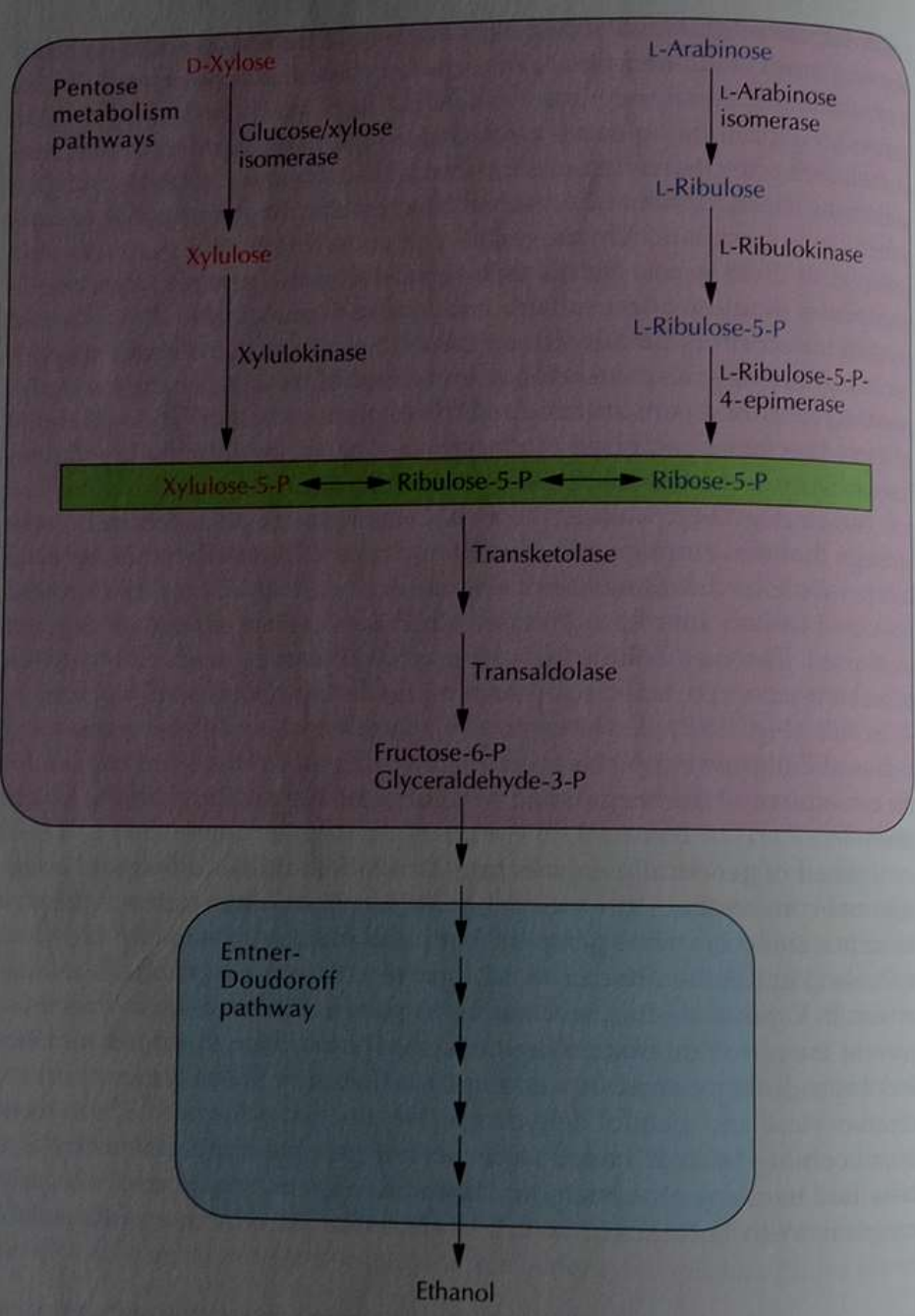
Za rast na ksilozi so v bakterije vstavili gena za glukoza/ksiloza izomerazo in ksilulokinazo pod kontrolo močnega konstitutivnega promotorja *gap*. Nastajale so fosforilirane pentoze, njihova pretvorba pa je bila počasna. Zato so vstavili še dodaten operon, ki je omogočal porabo pentoz (gena za transketolazo in transaldolazo pod kontrolo gena za enolazo).

Pri pretvorbi zelenih rastlin je najpogostejša pentoza arabinoza. Zato so v *Z. mobilis* vstavili gene za uporabo arabinoze: ribulokinazo, arabinoza izomerazo, ribuloza-5-fosfat-4-epimerazo iz *E. coli* pod kontrolo promotorja *gap* ter oba gena za pretvorbo pentoz.



Alternativa bi bila, da pa bi iz *Z. mobilis* izolirali gene, ki omogočajo sintezo etanola in jih predstavili v *E. coli*, ki je sama sposobna pretvarjati in uporabljati tako ksilozo kot arabinozo. Ključno je, kako preusmeriti piruvat v sintezo alkohola. Uporabili so gena za piruvat dekarboksilazo in alkohol dehidrogenazo iz *Z. mobilis*. Enako so naredili z bakterijo *Klebsiella oxytoca*.





Silažna fermentacija

Trave in deteljo za krmo je treba shraniti za zimo, kar je mogoče z naravnimi mlečnokislinskimi bakterijami, ki rastlinski material pretvarjajo v mlečno in ocatno kislino, zaradi znižanja pH pa ne pride do kvarjenja silaže. Ker je včasih naravnih mlečnokislinskih bakterij malo, jih je smiselno dodajati – največkrat je to *Lactobacillus plantarum*.

Naravni sevi so precej neučinkoviti v primerih, ko je vsebnost vodotopnih ogljikovih hidratov nizka. Zato so pripravili GS bakterije, ki sintetizirajo α -amilazo iz *L. amylovorus* (ki pa ne omogoča siliranja). Gen so s homologno rekombinacijo vstavili v genom na mesto gena za hidrolazo *cbh* – tega bakterija ne rabi, če raste na silažnem rastlinskem materialu (rabi pa ga, če se naseli v živalskih prebavilih).

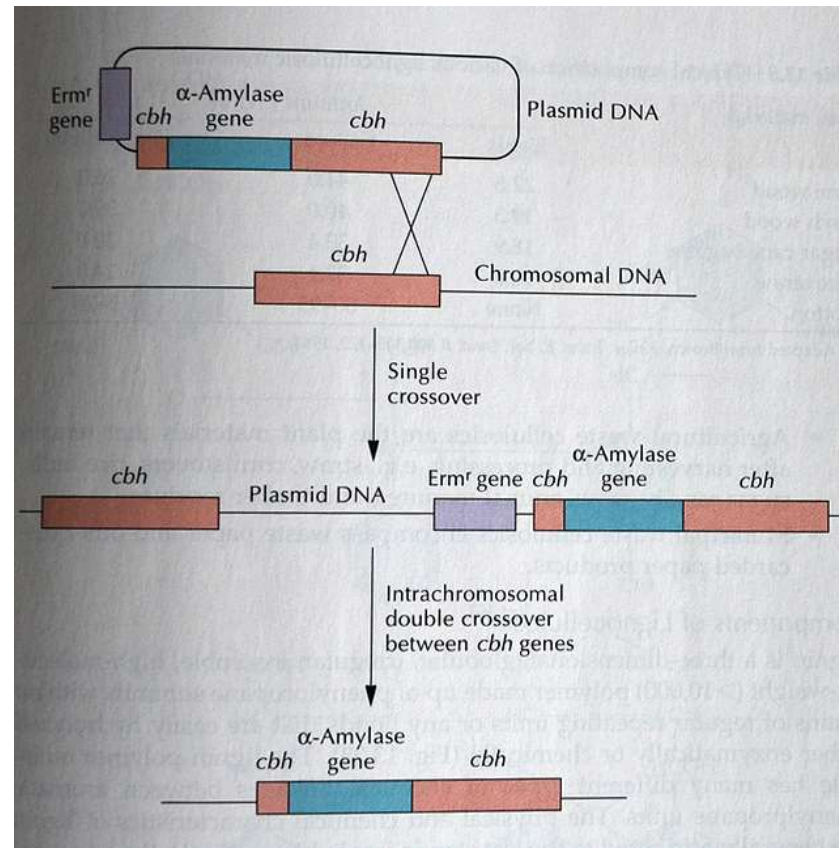


Figure 13.22 Chromosomal integration of an α -amylase gene into *L. plantarum*. The α -amylase gene is cloned into the *L. amylovorus cbh* gene on an *E. coli*-*L. plantarum* shuttle vector, which is then used to transform *L. plantarum*. Erythromycin-resistant and α -amylase-positive clones of *L. plantarum* result from a single crossover between the chromosomal and plasmid DNA at the *cbh* locus. After the growth of transformed *L. plantarum* for approximately 30 generations in the absence of selective pressure, intrachromosomal recombination resulted in the excision of the erythromycin resistance (Erm^r) gene, the chromosomal copy of the *cbh* gene, and the plasmid DNA. The final engineered *L. plantarum* carries only an α -amylase gene and no selectable marker genes.