

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΤΜΗΜΑ  
ΕΚΔΟΣΕΩΝ & ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

«Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΙΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ»



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΒΑΣΣΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΝΤΑΪΚΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΣΤΕΓ(ΤΕΓΕΠ)  
Π.196

## ι. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα.....	i
Ευχαριστίες.....	ii
Κατάλογος σχημάτων.....	iii
Κατάλογος πινάκων.....	iv
Περίληψη.....	v
Abstract.....	vi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
2. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	12
2.1 Χαρακτηριστικά μικροοργανισμών βιομηχανικών ζυμώσεων.....	12
2.1.1 Βακτήρια.....	12
2.1.2 Ζύμες.....	13
2.1.3 Μικροφύκη.....	13
2.2 Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης μικροοργανισμών.....	14
2.2.1 Μεταλλαξιγένεση.....	14
2.2.1.1 Χημικά μεταλλαξιγόνα.....	15
2.2.1.2 Φυσικοί παράγοντες- Ακτινοβολίες.....	15
2.2.1.3 Μη τυχαίες μεταλλάξεις.....	16
2.2.2 Κατασκευή ανασυνδιασμένου DNA με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής.....	17
2.2.2.1 Στόχευση και απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου (γονίδιο στόχος) από το σύνολο του γονιδιώματος του οργανισμού δότη.....	18
2.2.2.2 Ενσωμάτωση του γονιδίου στόχου σε ένα φορέα (δημιουργία ανασυνδιασμένου DNA).....	19
2.2.2.3 Εισαγωγή του ανασυνδιασμένου DNA σε κύτταρα (προκαρυωτικά π.χ βακτήρια) ή στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων.....	22
3. ΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ.....	23
3.1. Ορισμός και τύποι ζυμώσεων.....	23
3.2 Εφαρμογές μικροβιακών ζυμώσεων.....	24
3.2.1 Παραγωγή μεταβολιτών.....	24
3.2.1.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες.....	25

3.2.1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	26
3.2.2 Ένζυμα.....	29
3.2.3 Βιομετατροπές.....	30
4. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	31
4.1 Γενικά.....	31
4.2 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία τροφίμων.....	32
4.2.1 Έγκριση καταλληλότητας ενζύμων από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς.....	33
4.2.2 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στις βιομηχανικές ζυμώσεις.....	33
4.2.3 Βακτήρια.....	34
4.2.3.1 Είδη του γένους <i>Bacillus</i> .....	34
4.2.3.2 <i>Escherichia coli</i> K-12.....	36
4.2.3.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	36
4.2.3.4 Βακτήρια του γαλακτικού οξέος.....	37
4.2.4 Μύκητες/Ζύμες.....	39
4.2.4.1 <i>Aspergillus oryzae</i> και <i>Aspergillus niger</i> .....	39
4.2.4.2 <i>Fusarium venenatum</i> .....	39
4.2.4.3 <i>Trichoderma reesei</i> .....	40
4.2.4.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
4.2.4.5 <i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i> .....	42
4.3 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία φαρμάκων.....	44
4.3.1 Η διεύρυνση του ρόλου των γ.τ μικροοργανισμών στη βιομηχανία φαρμάκων.....	46
4.4 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων.....	50
4.4.1 Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας.....	52
4.4.2 Ζυμώσεις και καταβολισμός σακχάρων.....	54
4.4.2.1 Μεταβολικό μονοπάτι λιπαρών οξέων.....	56
4.4.2.2 Μεταβολικό μονοπάτι ισοπρενοειδών.....	58

5. ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΗΘΙΚΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	60
5.1 Ασφάλεια χρήσης γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών.....	60
5.2 Η στάση των πολιτών απέναντι στους γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς.....	62
6. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

## **ii. Ευχαριστίες**

*Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε από τη φοιτήτρια Βάσσου Μαρία του Τμήματος Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων του Α.Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ντάικου Ιωάννα για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για τις γνώσεις που μου παρείχε, αλλά και για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράστασή της κατά τη συγγραφή και διόρθωση της παρούσας εργασίας.*

*Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ψυχολογική και ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε.*

### iii. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1:	Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα	Σελ. 16
Εικόνα 2:	Βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής του αμινοξέος θρεονίνη στην <i>E. coli</i>	Σελ. 25
Εικόνα 3:	Συντακτικός τύπος του δευτερογενούς μεταβολίτη του <i>Streptomyces sp</i> Arglomycin A.	Σελ. 27
Εικόνα 4:	Ελάττωση ενέργειας ενεργοποίησης αντιδρώντων, παρουσία ενζύμου	Σελ. 30
Εικόνα 5:	<i>Bacillus subtilis</i>	Σελ. 35
Εικόνα 6:	α) <i>Lactobacillus helveticus</i> και β) <i>Lactococcus lactis</i>	Σελ. 37
Εικόνα 7:	Γενίκευση της στρατηγικής που ακολουθείται από τη μεταβολική μηχανική για τη βιομηχανική παραγωγή φαρμάκων.	Σελ. 45
Εικόνα 8:	Βιοσυνθετικά μονοπάτια για τη σύνθεση δαπτομυκίνης	Σελ. 49
Εικόνα 9:	Διαφημιστική καμπάνια προώθησης βιοκαυσίμων	Σελ. 50
Εικόνα 10:	Καλλιέργεια μικροφυκών	Σελ. 57

## iv. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1:	Δευτερογενείς μεταβολίτες βακτηρίων του γένους <i>Streptomyces</i> και ο ρόλος τους	Σελ. 27
Πίνακας 2:	Ένζυμα από γ.τ βακτήρια με έγκριση από το FDA	Σελ. 35
Πίνακας 3:	Γενετικά τροποποιημένα βακτήρια του γαλακτικού οξέως και τα ένζυμα που παράγουν	Σελ. 38
Πίνακας 4:	Δράση γενετικά τροποποιημένων στελεχών <i>S.cerevisiae</i> στην παραγωγή κρασιού	Σελ. 42
Πίνακας 5:	Παραδείγματα παραγωγής φαρμακευτικών ουσιών με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών	Σελ. 47
Πίνακας 6:	Μέση περιεκτικότητα (%) διαφόρων φυτικών ιστών σε λιγνοκυτταρινούχα συστατικά	Σελ. 51
Πίνακας 7:	Η στάση των ευρωπαϊών πολιτών απέναντι στους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.	Σελ. 63

## **v. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η παρούσα εργασία αναφέρεται στη χρήση των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών στις βιομηχανικές ζυμώσεις.

Παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανικές ζυμώσεις καθώς και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη γενετική τροποποίησή τους.

Αναφέρονται χαρακτηριστικά παραδείγματα βελτιστοποίησης βιομηχανικών ζυμώσεων μέσω γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, ενώ έμφαση δίνεται στους κλάδους της βιομηχανίας τροφίμων, φαρμάκων και βιοκαυσίμων.

Τέλος παρουσιάζονται κάποιες απόψεις σχετικά την ασφάλεια της χρήσης των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών στις βιομηχανικές ζυμώσεις καθώς και οι στάσεις του επιστημονικού κλάδου της Βιοηθικής απέναντι σε αυτούς.



## **vi. ABSTRACT**

This study refers to the use of genetically modified microorganisms in industrial fermentation.

The basic characteristics of the microorganisms that are commonly used in industrial fermentations are described, as well as the methods used in their genetic modification.

Moreover, specific examples of the use of genetically modified microorganisms in food, biofuel and drugs industry are given.

Finally, views concerning the safety of genetically modified microorganisms being used to industrial fermentations are displayed, together with the outlook of the scientific branch of Bioethics on that matter.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο τομέας των βιομηχανικών ζυμώσεων παρουσίασε αλματώδη εξάπλωση κατά τις δεκαετίες 1980 και 1990, όταν για πρώτη φορά προϊόντα μικροβιακής προέλευσης χρησιμοποιήθηκαν ευρέως. Μέχρι και τα τέλη της δεκαετίας του 1970 τα περισσότερα ένζυμα που προορίζονταν για βιομηχανική χρήση, ήταν κυρίως ζωικής και φυτικής προέλευσης. Αυτό όμως ήταν ένα ουσιαστικό εμπόδιο για την εξάπλωση του τομέα των βιομηχανικών ζυμώσεων που πραγματοποιούνταν μέσω ενζύμων προερχόμενων από ανώτερους οργανισμούς, τα οποία παράγονταν σε περιορισμένες ποσότητες, με αποτέλεσμα το κόστος τους να είναι ιδιαίτερα υψηλό. Το σημαντικό αυτό εμπόδιο, ξεπεράστηκε με τα **μικροβιακής προέλευσης ένζυμα**, τα οποία αφενός έχουν μικρότερο κόστος παραγωγής, μιας και οι καλλιέργειες μικροβίων απαιτούν φθηνά θρεπτικά υλικά και αφετέρου ο ρυθμός παραγωγής τους είναι πολύ μεγάλος μιας και ο χρόνος γενεάς των μικροοργανισμών είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτόν των ανώτερων οργανισμών. Επιπλέον, το γενετικό υλικό των μικροβίων μπορεί εύκολα με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής να τροποποιηθεί, με σκοπό την παραγωγή ενζύμων αλλά και άλλων μικροβιακών προϊόντων συγκεκριμένης ποιότητας, σε μεγάλες ποσότητες (Shime, 1999).

Σήμερα, πλήθος μικροβιακών προϊόντων βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους. Στη βιομηχανία των τροφίμων μέσω μικροβιακών καλλιεργειών επιτυγχάνεται η παραγωγή κρασιού, μύρας και γαλακτοκομικών προϊόντων (Olempska-Beer et al., 2006), στη βιομηχανία φαρμάκων, φαρμακευτικές ενώσεις συχνά αποτελούν βασικά ή παραπροϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού (Lee et al., 2008), ενώ σημαντική είναι και η χρήση των μικροοργανισμών για την παραγωγή βιοκαυσίμων, από φτηνές κυρίως φυτικές πρώτες ύλες (Fortman et al., 2008).

Η κυρίαρχη όμως βιομηχανική εφαρμογή των μικροοργανισμών είναι η παραγωγή ενζύμων. Ήδη τη δεκαετία του 1990 για την παραγωγή πολλών ενζύμων εφαρμόζονταν τεχνολογίες ανασυνδιασμένου γενετικού υλικού. Το 1993 το 50% των ενζύμων που χρησιμοποιούνταν στη βιομηχανία ήταν προϊόν μεθόδων γενετικής μηχανικής (Hodgson, 1994). Την ίδια περίοδο φυτικές φυτάσες (phytases) που παράγονταν από γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *Aspergillus niger* χρησιμοποιούνταν ως συστατικό στις ζωοτροφές που λάμβανε το 50% των χοίρων

στην Ολλανδία (Van Hartingsveldt et al., 1993). Λιπάσες που βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία παραγωγής καθαριστικών, σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής (υγρά φακών επαφής), σε καλλυντικές ουσίες για την περιποίηση του δέρματος καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων ως γαλακτωματοποιητές, από τη δεκαετία του 1990 παράγονταν από το *Aspergillus oryzae* που είχε γενετικά τροποποιηθεί για το σκοπό αυτό.

Σήμερα, με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής παρασκευάζονται ένζυμα που ανταποκρίνονται απόλυτα στις απαιτήσεις του κάθε βιομηχανικού κλάδου που σχετίζεται με τις ζυμώσεις. Έτσι οι βιομηχανικές ζυμώσεις δεν εξαρτώνται πλέον απόλυτα από ένζυμα που προέρχονται από φυσικές πηγές.

Ορισμένες από τις σημαντικότερες βιομηχανικές εφαρμογές των μικροβιακών ενζύμων είναι: (1) Οι αμιδάσες (amidases) της *Escherichia coli* για την παραγωγή 6-APA (aminopenicillanic acid) με ετήσια παραγωγή 40.000 τόνων, (2) η ισομεράση της ξυλόζης (xylose isomerase) για τη μετατροπή της D γλυκόζης σε D φρουκτόζη από είδη του γένους *Streptomyces* με ετήσια παραγωγή 100.000 τόνων, (3) το ένζυμο nitrile hydratase του *Pseudomonas chlorapis* για την παραγωγή ακρυλαμίδης από ακριλονιτρίλιο με ετήσια παραγωγή 30.000 τόνους (Jaeger et al. 2002), ενώ η ετήσια παραγωγή αμυλασών για βιομηχανικούς σκοπούς υπολογίζεται σήμερα στους 95.000 τόνους.

Το 2000 το συνολικό κόστος για την παραγωγή βιομηχανικών ενζύμων ήταν της τάξεως των 2 δισεκατομμυρίων δολαρίων, ενώ στις ημέρες μας το κόστος έχει ανέλθει στα 2,5 δισεκατομμύρια δολάρια (Demain et al. 2009). Τα ένζυμα που σχετίζονται με τις βιομηχανικές ζυμώσεις και κατέχουν το μεγαλύτερο μερίδιο σήμερα στην παγκόσμια αγορά είναι οι πρωτεάσες (57%), ενώ ακολουθούν οι αμυλάσες, οι γλυκοαμυλάσες, οι λακτάσες και οι λιπάσες.

Η βιομηχανία τροφίμων είναι ο τομέας με τη μεγαλύτερη κατανάλωση ενζύμων. Περισσότερα από τα μισά ένζυμα σήμερα προέρχονται από ζύμες, ενώ τα ένζυμα βακτηριακής προέλευσης αντιστοιχούν στο 30% περίπου της συνολικής παραγωγής. Τα ένζυμα που προέρχονται από φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς αντιστοιχούν στο 12% της συνολικής παραγωγής (Demain et al., 2009).

## 2. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

### 2.1 Χαρακτηριστικά μικροοργανισμών βιομηχανικών ζυμώσεων

Οι δυο κύριες κατηγορίες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανικές ζυμώσεις είναι τα βακτήρια και οι ζύμες, ενώ συχνά και τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται σήμερα σε πολλούς βιομηχανικούς κλάδους.

#### 2.1.1 Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί, δεν διαθέτουν δηλαδή οργανωμένο πυρήνα. Συνήθως σχηματίζουν αθροίσματα, τις αποικίες που είναι χαρακτηριστικές (σχήμα, υφή, χρώμα) για το κάθε είδος. Ανάλογα με το σχήμα του κυττάρου τους, τα βακτήρια διακρίνονται σε κόκκους (σφαιρικό σχήμα), βάκιλους (ραβδοειδές σχήμα), δονάκια και σπειρύλλια (ελικοειδές σχήμα).

Η πλασματική τους μεμβράνη, περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα που περιέχει πεπτιδογλυκάνη, ενώ ορισμένα διαθέτουν και ένα επιπλέον περίβλημα, την κάψα. Βάση της δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος, τα βακτήρια χρωματίζονται διαφορετικά μετά την εφαρμογή της χρώσης Gram και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Στα Gram θετικά βακτήρια και στα Gram αρνητικά βακτήρια. Τα Gram θετικά βακτήρια που μετά την εφαρμογή της χρώσης χρωματίζονται μπλε, διαθέτουν ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη. Ενώ τα Gram αρνητικά βακτήρια που μετά την εφαρμογή της χρώσης χρωματίζονται κόκκινα, φέρουν μια εξωτερική μεμβράνη που καλύπτει το κυτταρικό τους τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης.

Τα μοναδικά οργανίδια που διαθέτουν στο κυτταρόπλασμα τους είναι τα ριβοσώματα (70S) στα οποία πραγματοποιείται η διαδικασία της πρωτεϊνσύνθεσης.

Το γενετικό υλικό των βακτηρίων εντοπίζεται σε μια ορισμένη περιοχή που ονομάζεται πυρηνοειδές. Είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και περιέχει ένα αντίγραφο του γονιδιώματος. Σε πολλά βακτήρια εκτός από το κύριο κυκλικό μόριο DNA, υπάρχουν και τα πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι δίκλινα κυκλικά μόρια DNA με αριθμό ζευγών βάσεων που ποικίλει από είδος σε είδος. Περιέχουν μικρό ποσοστό της γενετικής πληροφορίας και συνήθως αποτελούν το 1-2% του βακτηριακού DNA. Ένα βακτήριο μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα πλασμίδια, τα οποία

αντιγράφονται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου. Μεταξύ των γονιδίων που περιέχονται στα πλασμίδια, υπάρχουν γονίδια που προσδίδουν στα βακτήρια ανθεκτικότητα απέναντι σε αντιβιοτικά και γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε ένα άλλο. Τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους, όσο και με το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου, καθώς και να μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε ένα άλλο. Τα πλασμίδια αποτελούν πολύτιμο εργαλείο της γενετικής μηχανικής (Κολιάης, 1992).

### 2.1.2 Ζύμες

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι μύκητες (ευκαρυωτικά κύτταρα). Το κύτταρο τους φέρει οργανωμένο πυρήνα, μέσα στον οποίο εντοπίζεται το γενετικό υλικό. Οι ζύμες φέρουν επίσης όλα τα τυπικά οργανίδια (μεμβρανικά ή μη) που φέρει ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο. Το κύτταρό τους μοιάζει με το κύτταρο των ανώτερων φυτών. Διαφέρει όμως προς τη σύσταση της κύριας ουσίας του κυτταρικού τοιχώματος, η οποία στις ζύμες είναι η γλυκάνη ενώ στα φυτικά κύτταρα η κυτταρίνη. Συνήθως τα κύτταρα των ζυμών είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα βακτηριακά κύτταρα και έχουν σχήμα σφαιρικό ή ωοειδές. Μερικές ζύμες παράγουν εκβλαστήσεις, οι οποίες αποτυγχάνουν να αποχωριστούν μεταξύ τους και έτσι δημιουργούν αλυσίδες κυττάρων που ονομάζονται ψευδομυκήλια.

Οι ζύμες δεν φωτοσυνθέτουν και αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών που δεν σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ τους. Σήμερα είναι αναγνωρισμένα περίπου 680 διαφορετικά είδη ζυμών (Barnett et al, 2000).

### 2.1.3 Μικροφύκη

Οι σημαντικότερες κατηγορίες μικροφυκών είναι τα κυανοφύκη, τα προχλωρόφυτα, τα απτοφύκη και τα δινοφύκη. Τα μικροφύκη παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική, δομική και λειτουργική ποικιλότητα. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των κατηγοριών των μικροφυκών, είναι ο φωτοαυτότροφος χαρακτήρας τους και κατά συνέπεια η άμεση εξάρτησή τους από τη φωτεινή ακτινοβολία (~400-700 nm) για την ενεργειακή κάλυψη των αναπνευστικών τους αναγκών.

Τα μικροφύκη προσλαμβάνουν θρεπτικά στοιχεία που βρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται, μέσω διάχυσης ή ενεργής μεταφοράς. Η

χημική σύσταση και ο βασικός μεταβολισμός των μικροφυκών σχετίζεται άμεσα με το περιβάλλον ανάπτυξής τους και εξαρτώνται από το φως, τη θερμοκρασία και τα διαθέσιμα θρεπτικά (Μουστάκα, Γούνη, 1997).

## 2.2 Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης μικροοργανισμών

Για την αύξηση της παραγωγής των μικροβιακών προϊόντων και διεργασιών καθώς και για την καλύτερη ποιότητάς, της ταχύτητας και της απόδοσής τους, οι επιστήμονες τόσο κατά το παρελθόν όσο και σήμερα, εφαρμόζουν μεθόδους γενετικής τροποποίησης των μικροοργανισμών. Τα πρώτα βήματα στον τομέα αυτό έγιναν με τη δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων. Η μέθοδος αυτή παρουσίαζε πολλά μειονεκτήματα (ανεπιθύμητα αποτελέσματα, απώλεια επιθυμητών χαρακτηριστικών και θνησιμότητα των φορέων των μεταλλάξεων). Σήμερα, εφαρμογή βρίσκουν οι κατευθυνόμενες-στοχευμένες μεταλλάξεις, καθώς και ο μετασχηματισμός των μικροοργανισμών με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής.

### 2.2.1 Μεταλλαξιγένεση

Μετάλλαξη ή μεταλλαγή ονομάζεται η αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του νουκλεϊκού οξέως, που αποτελεί το γονιδίωμα ενός οργανισμού ή ιού. Στους οργανισμούς που δεν πολλαπλασιάζονται αμφιγονικά (πχ βακτήρια και ζύμες) οι μεταλλάξεις είναι πάντα κληρονομήσιμες στις επόμενες γενιές κυττάρων.

Ενώ η συχνότητα των αυθόρμητων μεταλλάξεων είναι πολύ χαμηλή (λόγω ύπαρξης ενζύμων που λειτουργούν ως επιδιορθωτικοί μηχανισμοί), υπάρχουν διάφοροι φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί παράγοντες, που μπορούν να αυξήσουν τη συχνότητα αυτή, δηλαδή να επάγουν μεταλλάξεις. Αυτοί οι παράγοντες ονομάζονται μεταλλαξιγόνα. Στο παρελθόν η χρήση μεταλλαξιγόνων για τη βελτίωση των στελεχών που χρησιμοποιούνταν στις βιομηχανικές ζυμώσεις ήταν μια πολύ κοινή πρακτική. Σήμερα οι τεχνικές που οδηγούσαν σε τυχαία μεταλλαξιγένεση έχουν αντικατασταθεί από μη τυχαίες θεσηκατευθυνόμενες μεταλλάξεις (site-directed mutations) (Κουγιουνού, Κουτσούκου et al., 1997).

### 2.2.1.1 Χημικά μεταλλαξιγόνα

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες χημικών μεταλλαξιγόνων. Μια σημαντική κατηγορία τέτοιων ενώσεων είναι τα **ανάλογα βάσεων**, που έχουν δομή όμοια με της πουρίνες και τις πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων (π.χ η ινোসίνη που είναι παράγωγο της γουανοσίνης που αποτελείται από υποξανθίνη και πεντόζη. Η ινোসίνη έχει μια αμινομάδα λιγότερη σε σχέση με τη γουανοσίνη, αλλά παρόλα αυτά μπορεί να υποκαταστήσει τη γουανοσίνη στη διπλή έλικα του DNA. Ανάμεσα στο ζεύγος ινোসίνης-κυτιδίνης σχηματίζονται μόνο 2 δεσμοί υδρογόνου σε αντίθεση με το ζεύγος γουανοσίνης-κυτιδίνης όπου σχηματίζονται 3 δεσμοί υδρογόνου (Martin et al.,1985). Η ινোসίνη αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου της αμινομάδας της γουανοσίνης στην αλληλεπίδραση του DNA με διάφορα φάρμακα (Bailly et al., 2001)) . Τα ανάλογα βάσεων, ενσωματώνονται κατά τη διαδικασία της αντιγραφής στο γενετικό υλικό των κυττάρων, δημιουργώντας στη συνέχεια, κατά τη διαδικασία της μετάφρασης των γονιδίων που τις περιέχουν, τροποποιημένα πρωτεϊνικά προϊόντα.

Άλλη σημαντική κατηγορία χημικών μεταλλαξιγόνων είναι οι **παράγοντες αλκυλίωσης**, που επάγουν μεταλλάξεις με μεγαλύτερη συχνότητα από ότι τα ανάλογα βάσεων. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με το DNA και μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές, ακόμη και στο μόριο μη αντιγραφόμενων DNA.

Μια ακόμη ενδιαφέρουσα ομάδα χημικών ουσιών που επάγουν μεταλλάξεις είναι οι **ακριδίνες**, που δρουν ως παρεμβαλλόμενοι παράγοντες. Αυτά τα μεταλλαξιγόνα εισχωρούν ανάμεσα σε δύο ζεύγη βάσεων DNA, με αποτέλεσμα να τα απωθούν και κατά την αντιγραφή να δημιουργούνται ενθέσεις ή ελλείμματα μικρών αλληλουχιών. Το **βρωμιούχο αιθίδιο** που συχνά χρησιμοποιείται για την παρατήρηση DNA σε ηλεκτροφορήσεις, είναι ένας από τους παρεμβαλλόμενους παράγοντες και δρα ως μεταλλαξιγόνο ακόμη και σε κύτταρα ανώτερων οργανισμών (π.χ ανθρώπου) (Bains, 1998).

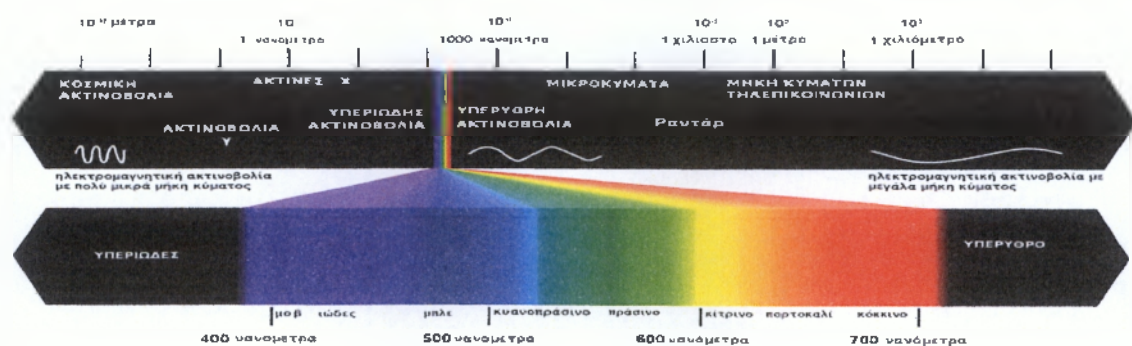
### 2.2.1.2 Φυσικοί παράγοντες- Ακτινοβολίες

Πολλές μορφές ακτινοβολίας είναι ιδιαίτερα μεταλλαξιγόνες. Μπορούμε να υποδιαιρέσουμε τη μεταλλαξιγόνο ακτινοβολία σε δυο κύριες κατηγορίες: την ιονίζουσα και τη μη ιονίζουσα ακτινοβολία (Εικόνα 1).

**Μη ιονίζουσα ακτινοβολία.** Στη μη ιονίζουσα ακτινοβολία ανήκουν οι ακτινοβολίες με μήκη κύματος μεγαλύτερα των 10 nm. Οι αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων, απορροφούν έντονα την υπεριώδη ακτινοβολία με μέγιστη απορρόφηση για το DNA τα 260 nm. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει τη δημιουργία διμερών πυριμιδίνης στο DNA, μια κατάσταση κατά την οποία δυο γειτονικές πυριμιδίνες (κυτοσίνη ή θυμίνη) συνδέονται ομοιοπολικά, οπότε η πιθανότητα ενσωμάτωσης «λανθασμένης» νουκλεοτιδικής βάσης στη θέση αυτή, από τη DNA πολυμεράση, αυξάνεται σημαντικά κατά την αντιγραφή του DNA.

Ο τύπος της πηγής ακτινοβολίας που συχνότερα χρησιμοποιείται για μεταλλαξιγένεση είναι η μικροβιοκτόνος λυχνία, που εκπέμπει UV στην περιοχή των 260nm. Συνήθως χρησιμοποιείται δόση ακτινοβολίας που θανατώνει το 90-95% του πληθυσμού των κυττάρων και ακολουθεί αναζήτηση μεταλλαγμάτων, στα επιζώντα κύτταρα (Bains, 1998).

**Ιονίζουσα ακτινοβολία.** Η ιονίζουσα ακτινοβολία περιλαμβάνει ακτινοβολίες χαμηλού μήκους κύματος, όπως οι ακτίνες X, οι ακτίνες γ και οι κοσμικές ακτίνες. Η ακτινοβολία αυτή προκαλεί ιονισμό στο νερό και σε άλλες ενώσεις, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ελεύθερες χημικές ρίζες, οι οποίες αντιδρούν με τα μακρομόρια και μεταβάλλουν τη δομή ορισμένων αλληλουχιών τους (Bains, 1998).



Εικόνα 1: Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

### 2.2.1.3 Μη τυχαίες μεταλλάξεις (στοχευμένες)

Οι πρώτες προσπάθειες θεσηκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, περιλάμβαναν την επεξεργασία ενός μεταγωγικού βακτηριοφάγου με χημικά μεταλλαξιγόνα και κατόπιν, τη μόλυνση βακτηρίων και τη διαλογή για εντοπισμό μεταλλάξεων. Μια



τέτοια στρατηγική, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού των μεταλλάξεων σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος.

Σήμερα, λόγω του μεγάλου αριθμού απομονωμένων περιοριστικών ενζύμων που διατίθενται, είναι δυνατό να βρεθούν στο υπό μελέτη γονίδιο, διάφορες περιοριστικές θέσεις (MCS). Σε αντίθετη περίπτωση, θέσεις για το κατάλληλο ένζυμο μπορούν να προστεθούν με θεση-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Εάν οι θέσεις περιορισμού βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους, το παρεμβαλλόμενο DNA μπορεί να κοπεί και να αντικατασταθεί από ένα συνθετικό DNA, στο οποίο έχουν αντικατασταθεί μια ή περισσότερες βάσεις. Τα συνθετικά αυτά κομμάτια ονομάζονται κασέτες και η όλη διαδικασία ονομάζεται μεταλλαξιγένεση κασέτας.

Μεταλλάξεις ένθεσης, μπορούν να δημιουργηθούν με απλή εισαγωγή κάποιας κασέτας σε μια θέση. Ιδιαίτερα διαδεδομένες είναι οι κασέτες που περιέχουν αλληλουχίες για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών, που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά (Bains, 1998).

### **2.2.2 Κατασκευή ανασυνδρασμένου DNA με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής**

Η τεχνολογία του ανασυνδρασμένου DNA για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών περιλαμβάνει συνοπτικά τα εξής βήματα (Bains, 1998):

- (1) στόχευση και απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου (γονίδιο στόχος) από το σύνολο του γονιδιώματος του οργανισμού δότη,
- (2) ενσωμάτωση του γονιδίου στόχου σε ένα φορέα (δημιουργία ανασυνδρασμένου DNA),
- (3) εισαγωγή του ανασυνδρασμένου DNA σε κύτταρα (προκαρυωτικά π.χ βακτήρια) ή στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων, π.χ ζύμων,
- (4) καλλιέργεια/διαίρεση των κυττάρων και παράλληλα πολλαπλασιασμός του ανασυνδρασμένου DNA και
- (5) παραγωγή και παραλαβή του προϊόντος του γονιδίου στόχου

### 2.2.2.1 Στόχευση και απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου (γονίδιο στόχος) από το σύνολο του γονιδιώματος του οργανισμού δότη

Τα περισσότερα γονίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών, καθώς και των ιών που τους προσβάλλουν, είναι ασυνεχή ή διακεκομμένα. Δηλαδή η αλληλουχία που μεταφράζεται σε αμινοξέα διακόπτεται από ενδιάμεσες αλληλουχίες, οι οποίες δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα. Οι αλληλουχίες που μεταφράζονται σε αμινοξέα καλούνται εξώνια (exons), ενώ οι ενδιάμεσες που δε μεταφράζονται, καλούνται εσώνια (introns). Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς δεν υπάρχουν ασυνεχή γονίδια (Bains, 1998).

Στη συνέχεια θα αναφερθούν τεχνικές για την απομόνωση τόσο διακεκομμένων όσο και συνεχών γονιδίων.

#### Απομόνωση του συνόλου της αλληλουχίας των γονιδίων στόχων

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή ξένου DNA π.χ DNA φάγων. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Μια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιείται ευρέως, είναι η EcoRI που απομονώθηκε από στελέχη βακτηρίων *Escherichia coli*.

Το ένζυμο αυτό όταν συναντά την αλληλουχία

5'- GAATTC-3'

3'-CTTAAG-5' στο γονιδίωμα οποιουδήποτε οργανισμού, υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που ενώνουν τα νουκλεοτίδια με βάσεις G και A σε κάθε αλυσίδα (με κατεύθυνση 5'- 3'), αφήνοντας μονόκλινα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο.

Η αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, υπάρχουν διάσπαρτες στα γονιδιώματα των διαφόρων ειδών. Έτσι το γονιδίωμα ενός

οργανισμού μπορεί να κοπεί σε πολλά κομμάτια με τη χρήση των ενζύμων αυτών. Κάποιο από τα κομμάτια αυτά, όταν χρησιμοποιείται η κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, περιέχει το γονίδιο στόχο που κωδικοποιεί το προϊόν που μας ενδιαφέρει. Αν το επιθυμητό γονίδιο στόχος είναι ασυνεχές, μετά τη χρήση της κατάλληλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης, το κομμάτι που θα περιέχει το γονίδιο θα περιλαμβάνει τόσο αλληλουχίες εξονίων όσο και αλληλουχίες εσωνίων (Αλεπόρου-Μαρίνου, et al., 2002).

#### **Απομόνωση από ασυνεχή γονίδια στόχους μόνο των αλληλουχιών που κωδικοποιούν αμινοξέα/complementary DNA**

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, πολλά γονίδια μεταγράφονται σε ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους. Αν θέλουμε να μετασηματίσουμε μικροοργανισμούς χρησιμοποιώντας ασυνεχή γονίδια που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, τότε μια από τις μεθόδους που μπορούμε να ακολουθήσουμε είναι η κατασκευή cDNA. Τα cDNA μόρια περιέχουν αντίγραφα των mRNA των γονιδίων στόχων και έχουν το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των εξονίων των συγκεκριμένων γονιδίων.

Για να κατασκευαστεί ένα cDNA μόριο, απομονώνεται αρχικά το ολικό ώριμο mRNA από κύτταρα στα οποία εκφράζεται το γονίδιο στόχος. Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA: complementary DNA). Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αποδιατάσσεται με θέρμανση και τα cDNA χρησιμεύουν σαν καλούπι, για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA, με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράσης. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA που περιέχουν τα γονίδια στόχους (Αλεπόρου-Μαρίνου, et al., 1998).

#### **2.2.2.2 Ενσωμάτωση του γονιδίου στόχου σε ένα φορέα (δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA)**

Αφού απομονωθούν οι αλληλουχίες που περιέχουν τα γονίδια στόχους, ενσωματώνονται σε ειδικούς φορείς. Οι πιο κοινοί φορείς που θα αναφερθούν στη συνέχεια είναι τα πλασμίδια, οι βακτηριοφάγοι, τα κοσμίδια, τα YACs, και τα BACs.

## **Πλασμίδια**

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς έχουν την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση μια μόνο φορά (MCS: Multiple Cloning Site). Έτσι όταν κόβονται από το ένζυμο, δημιουργείται ένα δίκλωνο γραμμικό μόριο με μονόκλιωνα άκρα. Τα δύο είδη DNA, δηλαδή του πλασμιδίου και η αλληλουχία που φέρει το επιθυμητό γονίδιο, αναμιγνύονται και με τη βοήθεια μιας άλλης κατηγορίας ενζύμων, των DNA λιγασών ενώνονται μεταξύ τους. Έτσι δημιουργούνται ανασυνδιασμένα πλασμίδια (Αλεπόρου-Μαρίνου, et al., 1998).

## **Βακτηριοφάγοι**

Οι ιοί που προσβάλλουν βακτήρια, χρησιμοποιώντας τα ως ξενιστές τους, ονομάζονται βακτηριοφάγοι ή απλά φάγοι. Ο πιο κοινός και ευρέως χρησιμοποιούμενος φάγος, είναι ο βακτηριοφάγος λ. Το γονιδίωμα του είναι ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA. Τα γονίδια του φάγου που είναι υπεύθυνα για την έναρξη του λυσιγονικού του κύκλου και επομένως για την παθογένειά του, δεν είναι απαραίτητα στο φάγο για την επιβίωσή του στον ξενιστή και είναι αυτά που αντικαθιστούνται με τα γονίδια στόχους που έχουν απομονωθεί από κάποιο δότη. Το εξωγενές DNA που ενσωματώνεται στο DNA του φάγου, δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 24Kb ώστε το συνολικό γονιδίωμα να μην ξεπερνά τις 50Kb. Η ανάγκη το ανασυνδιασμένο DNA να χωρέσει κατά το πακετάρισμα στην κεφαλή του φάγου (εξωτερικό πρωτεϊνικό κάλυμμα που περιβάλλει το γενετικό υλικό του φάγου), είναι ο κύριος περιοριστικός παράγοντας για το μέγεθος του γενετικού υλικού, που μπορούμε να ενσωματώσουμε στο γονιδίωμα του φάγου (Αλεπόρου-Μαρίνου, et al., 1998).

## **Κοσμίδια**

Τα κοσμίδια είναι τεχνητά μόρια DNA που συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των πλασμιδίων και των φάγων, ως φορέων κλωνοποίησης. Τα κοσμίδια είναι δίκλιωνα μόρια DNA που αποτελούνται από τις εξής κύριες αλληλουχίες: i) τα συνεκτικά άκρα του βακτηριοφάγου λ (cos-cohesive sites), αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για το πακετάρισμα του DNA του φάγου στην κεφαλή του ii) την αλληλουχία που αντιστοιχεί σε περιοχή MCS βακτηριακών πλασμιδίων. Σε αυτή εισάγεται το γονίδιο στόχος του δότη iii) γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα απέναντι σε ορισμένο αντιβιοτικό και iv) την περιοχή έναρξης της αντιγραφής του DNA, ORI (origin of

replication) για την αντιγραφή του ανασυνδιασμένου DNA μέσα στα μετασχηματισμένα μικροβιακά κύτταρα.

Τα κοσμίδια διαθέτουν πολυάριθμα πλεονεκτήματα. Η ύπαρξη των *cos sites* του φάγου, επιτρέπει το πακετάρισμα του κοσμιδίου στην κεφαλή του φάγου και στη συνέχεια η εισαγωγή του ανασυνδιασμένου DNA στα βακτηριακά κύτταρα γίνεται με μεγάλη επιτυχία, μέσω της διαδικασίας της επιμόλυνσης των βακτηρίων από τους φάγους. Επιπλέον, εφόσον το ανασυνδιασμένο κοσμίδιο βρεθεί μέσα στο βακτήριο, συμπεριφέρεται σαν πλασμίδιο, μιας και διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά του πλασμιδίου. Παράλληλα, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους του ( $\approx 8\text{Kb}$ ), μπορεί να ενσωματώσει εξωγενείς αλληλουχίες πολύ μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με τα πλασμίδια και τους φάγους (Bainw, 1998).

### **Τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης (YACs)**

Τα YACs (Yeast Artificial Chromosomes) είναι δίκλιωνα τεχνητά μόρια DNA, που αποτελούνται από αλληλουχίες απαραίτητες για την παραμονή, καθώς και την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων, μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τέτοιες αλληλουχίες είναι τα τελομερή, τα κεντρομερή και το σημείο ή τα σημεία έναρξης αντιγραφής του DNA. Τα YACs φέρουν επίσης ένα γονίδιο που είναι απαραίτητο για την επιλογή των ανασυνδιασμένων κλώνων (π.χ ένα γονίδιο που δημιουργεί την ανάγκη για ύπαρξη ενός συγκεκριμένου θρεπτικού παράγοντα, στο θρεπτικό υλικό που αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός που φέρει τα YACs), καθώς και μια συγκεκριμένη μοναδική θέση αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση (στην περιοχή αυτή γίνεται και η ένθεση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για το επιθυμητό χαρακτηριστικό). Το μέγεθος των γονιδίων που μπορούν να ενσωματωθούν στα YACs είναι της τάξεως των Mb (Bains, 1998).

Το βασικό μειονέκτημα των συγκεκριμένων φορέων είναι η αστάθειά τους, μιας και συχνά κατά την κυτταρική διαίρεση, χάνουν τμήματα της αλληλουχίας τους.

### **Υβριδικά πλασμίδια (BACs)**

Τα BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) είναι δίκλιωνα τεχνητά μόρια DNA, που περιέχουν αλληλουχίες προερχόμενες από τον παράγοντα F (F factor) των βακτηρίων *Escherichia coli* (η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για την επιτυχή ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ βακτηρίων κατά τη διάρκεια της σύζευξής τους). Τα BACs

έχουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης εξωγενούς DNA μεγέθους έως και 300 Kb περίπου.

Σε σχέση με τα YACs τα BACs είναι πολύ πιο σταθερές δομές και δίνουν τη δυνατότητα της αμιγούς διατήρησης του ανασυνδιασμένου DNA από γενιά σε γενιά μετασχηματισμένων κυττάρων (Bains, 1998).

### **2.2.2.3 Εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA σε κύτταρα (προκαρυωτικά π.χ βακτήρια) ή στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων**

Από τους φορείς που προαναφέρθηκαν μόνο οι βακτηριοφάγοι διαθέτουν μηχανισμούς επιτυχούς εισόδου του ανασυνδιασμένου γενετικού υλικού στα κύτταρα που πρόκειται να μετασχηματίσουν. Οι υπόλοιποι φορείς μεταφέρονται στα κύτταρα κυρίως με τις εξής μεθόδους: με ηλεκτροδιάτρηση και με τη χρήση χημικών ουσιών.

#### **Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)**

Η ηλεκτροδιάτρηση, είναι μια τεχνική κατά την οποία τα κύτταρα τοποθετούνται σε ηλεκτρικά παλμικά πεδία, έτσι ώστε να διανοιχθούν μικροί πόροι στις μεμβράνες τους. Κατά τη διάρκεια της εφαρμογής του ηλεκτρικού παλμού, τα μόρια του DNA που βρίσκονται έξω από τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν σε αυτό δια μέσου των πόρων. Η ηλεκτροδιάτρηση απαιτεί ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο σύστημα παροχής ισχύος, διότι οι παλμοί πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά και να διαρκούν μόνο για milliseconds. Η ηλεκτροδιάτρηση επιτρέπει τόσο την είσοδο όσο και την έξοδο μορίων νουκλεϊκών οξέων στα κύτταρα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών (Bains, 1998).

#### **Χημικές ουσίες**

Η τεχνητά επαγώγιμη δεκτικότητα με χημική επεξεργασία των κυττάρων, χρησιμοποιεί μια ποικιλία χημικών ουσιών που σχετίζεται με την τοπική αποδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης, τόσο των ευκαρυωτικών όσο και των προκαρυωτικών κυττάρων, που επιθυμούμε να μετασχηματίσουμε. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν, η χρήση υψηλής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου παρουσία χαμηλής θερμοκρασίας, για την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης σε κύτταρα του βακτηρίου *Escherichia coli*, καθώς και η χρήση λιπόφυλων ουσιών σε κύτταρα ζυμών (δημιουργία λιποσωμάτων) (Bains, 1998).

### 3. ΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ

#### 3.1. Ορισμός και τύποι ζύμωσης

Οι ζυμώσεις είναι καταβολικές διεργασίες κατά τις οποίες παράγεται ενέργεια μέσω της μερικής οξειδωσης ενός οργανικού υποστρώματος, κατά την οποία ενδιάμεσα οργανικά υποστρώματα λειτουργούν ως δότες και δέκτες ηλεκτρονίων. Δεν μετέχουν εξωτερικοί δέκτες ηλεκτρονίων, όπως συμβαίνει κατά την αναπνοή, και όλο το παραγόμενο ATP προκύπτει μέσω φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος.

Υπάρχουν πολλά είδη ζυμώσεων και συχνά ένας μικροοργανισμός ακολουθεί περισσότερα του ενός. Το πρωταρχικό βήμα είναι η γλυκόλυση, μέσω της οποίας παράγεται πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο μεταβολίζεται περαιτέρω προς τα τελικά προϊόντα που είναι οργανικά οξέα και αλκοόλες. Κοινές ζυμώσεις είναι η γαλακτική και αλκοολική ζύμωση που διεξάγονται κυρίως από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος και τις ζύμες αντίστοιχα. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ανάγουν το πυροσταφυλικό οξύ προς γαλακτικό οξύ, ενώ οι ζύμες ανάγουν το πυροσταφυλικό οξύ προς αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Εκτός του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης, μπορεί να προκύψει μια πληθώρα προϊόντων. Κάποια βακτήρια χαρακτηρίζονται από την ικανότητα παραγωγής συγκεκριμένων προϊόντων μέσω ειδικών τύπων ζυμώσεων που επιτελούν. Σημαντικοί τύποι ζυμώσεων είναι οι ακόλουθοι:

- **Ομογαλακτική ζύμωση.** Το γαλακτικό οξύ είναι το μοναδικό τελικό προϊόν. Βακτήρια που επιτελούν αυτόν τον τύπο ζύμωσης είναι όσα ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και οι περισσότεροι στρεπτόκοκκοι. Μέσω της ζύμωσης αυτής παράγονται τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

- **Ζύμωση μικτών οξέων.** Η οικογένεια *Enterobacteriaceae*, με κύριο αντιπρόσωπο το είδος *Escherichia coli* επιτελούν αυτό τον τύπο ζύμωσης κατά την οποία παράγονται τα οξέα γαλακτικό, οξικό, μυρμηκικό και ηλεκτρικό, αιθανόλη, καθώς και CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>.) διαθέτει το ένζυμο διάσπασης του μυρμηκικού οξέος, μυρμηκική αφυδρογονάση.

- **Ζύμωση βουτανοδιόλης** Κατά τον τύπο αυτό, παράγονται τα οξέα και τα αέρια που χαρακτηρίζουν την ζύμωση μικτών οξέων καθώς επίσης και την 2,3 βουτανοδιόλη από την ένωση δύο μορίων πυροσταφυλικού οξέος. Τον τύπο αυτό ζύμωσης ακολουθούν τα μη κοπροειδή εντεροβακτηρίδια όπως είναι το *Klebsiella* και το *Enterobacter*.

- **Ζύμωση βουτυρικού οξέος.** Ο τύπος αυτός ζύμωσης είναι αντιπροσωπευτικός των κλωστριδίων. Εκτός του βουτυρικού οξέος παράγονται επίσης οξικό οξύ, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> και ενδεχομένως αιθανόλη και ισοπροπανόλη.

- **Ζύμωση βουτανόλης-ακετόνης.** Η βουτανόλη και η ακετόνη αποτελούν τα κύρια τελικά προϊόντα της ζύμωσης που χαρακτηρίζει το *Clostridium acetobutylicum*, και ανακαλύφθηκε κατά τον 1<sup>ο</sup> Παγκόσμιο Πόλεμο, λύνοντας το πρόβλημα παραγωγής ακετόνης.

- **Ζύμωση προπιονικού οξέος.** Η ζύμωση αυτή χαρακτηρίζει τα βακτήρια *Propionibacterium* και *Bifidobacterium*. Το παραγόμενο προπιονικό οξύ δεν προκύπτει από την απ' ευθείας κατανάλωση σακχάρων, αλλά από την περαιτέρω ζύμωση του γαλακτικού οξέος. Επίσης παράγονται οξικό οξύ και CO<sub>2</sub>. Συνολικά, 3 mol γαλακτικού μετατρέπονται σε 2 mol προπιονικού, 1 mol οξικού και 1 mol CO<sub>2</sub> ενώ παράγεται επίσης 1 mol ATP (Gottshalk, 1986).

### 3.2 Εφαρμογές μικροβιακών ζυμώσεων

#### 3.2.1 Παραγωγή μεταβολιτών

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο για να παράγουν μια μεγάλη ποικιλία από μικρού μοριακού βάρους συστατικά. Τα συστατικά αυτά όταν συμμετέχουν στους μηχανισμούς ανάπτυξης του κυττάρου, ονομάζονται **πρωτογενείς μεταβολίτες**. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες διαχωρίζονται περαιτέρω στα προϊόντα που παράγονται σε μικρές ποσότητες και χρησιμοποιούνται μόνο για την ανάπτυξη του κυττάρου (π.χ αμινοξέα, νουκλεοτίδια) και σε αυτά που είναι τελικά προϊόντα του μεταβολισμού και παράγονται σε μεγάλες ποσότητες (π.χ αιθανόλη, γαλακτικό οξύ). Τα συστατικά τα οποία συνθέτονται μετά τη συμπλήρωση της ανάπτυξης του κυττάρου ονομάζονται **δευτερογενείς μεταβολίτες**.

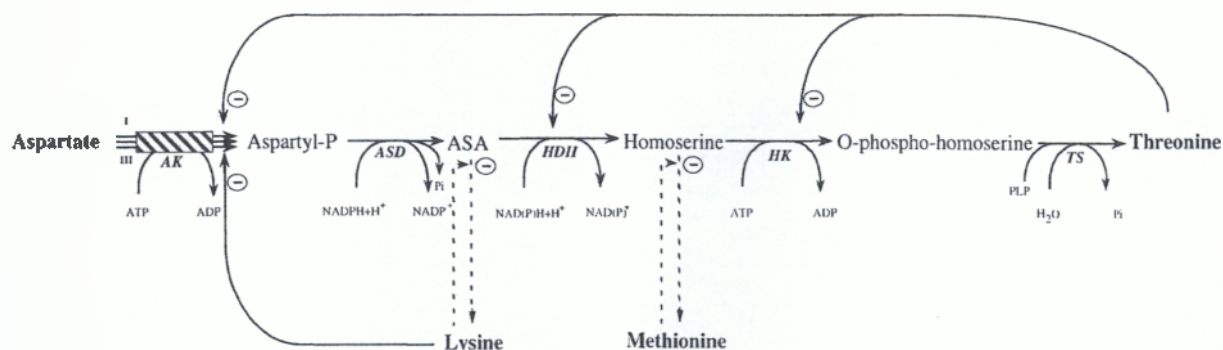


Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται και για χημικό μετασχηματισμό ορισμένων υποστρωμάτων, σε προϊόντα χρήσιμα για τον άνθρωπο. Η διαδικασία αυτή που ονομάζεται βιομετασχηματισμός (ή βιομετατροπή) γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων ενζύμων που οι μικροοργανισμοί παράγουν, σε μη συνήθη υποστρώματα που βρίσκονται στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας τους (Κολιάης, 1992).

### 3.2.1.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες

Οι πρωτογενείς μεταβολίτες είναι συστατικά τα οποία παράγει ο μικροοργανισμός και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή του. Στη φύση οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να παράγουν μόνο τις αναγκαίες ποσότητες πρωτογενών μεταβολιτών, πλεονεκτούν έναντι αυτών, που παράγουν πρωτογενείς μεταβολίτες σε μεγάλες ποσότητες. Η υπερπαραγωγή των πρωτογενών μεταβολιτών απαιτεί κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων άνθρακα και ενέργειας, που αφαιρούνται από την αύξηση της βιομάζας. Αντίθετα στις βιομηχανικές ζυμώσεις είναι πιο χρήσιμοι οι μικροοργανισμοί που υπερπαράγουν κάποιο πρωτογενή μεταβολίτη που παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον (Κολιάης, 1992).

Σήμερα, πραγματοποιείται συχνά μετασχηματισμός συγκεκριμένων στελεχών μικροοργανισμών, σε υπερπαραγωγείς πρωτογενών μεταβολιτών. Αυτό επιτυγχάνεται με πλήθος διαφορετικών μεθόδων που σκοπό έχουν να μεταβάλουν κυτταρικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Παραδείγματα των μηχανισμών αυτών αποτελούν η αναδρομική παρεμπόδιση της δραστηριότητας κάποιου ενδιάμεσου ενζύμου από το τελικό προϊόν (π.χ παραγωγή θρεονίνης από ασπαρτικό οξύ στην *E.coli*: Εικ.2) και η καταστολή σύνθεσης κάποιου ή κάποιων ενζύμων που μετέχουν σε συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια (Chassagnole et al., 2001).



**Εικόνα 2:** Βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής του αμινοξέος θρεονίνη στην *E. coli*. Τα διαφορετικά μονοπάτια καταλύονται από κινάσες του ασπαρτικού οξέως (AK I-III), ασπαρτική ημιαλδεύδη (ASD), δευδρογονάση της ομοσερίνης (HDH), κινάση της ομοσερίνης (HK) και σύνθετάση της θρεονίνης (TS). ASA, D,L ασπαρτική β ημιαλδεύδη, P-ασπαρτικό οξύ, β P-ασπαρτικό οξύ και (-) : μόρια καταστολής βιοχημικών μονοπατιών (Chassagnole et. al. 2001).

Ένας άλλος τρόπος μεταβολής των ρυθμιστικών μηχανισμών του κυττάρου είναι η αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης του μικροβιακού κυττάρου (π.χ αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης λόγω της ελάττωσης της βιοτίνης, μιας υδατοδιαλυτής βιταμίνης, συστατικού απαραίτητου για τη σύνθεση λιπαρών οξέων που συμμετέχουν στη δομή των μεμβρανών). Αυτό επιτρέπει την εκροή του μεταβολίτη από το κύτταρο ελαττώνοντας έτσι τα ενδοκυτταρικά του επίπεδα.

Η τροποποίηση των φυσιολογικών ρυθμιστικών μηχανισμών του κυττάρου ή κάποιων ανταγωνιστικών βιοχημικών μονοπατιών μπορεί να επιτευχθεί και με συμβατικές, μη κατευθυνόμενες μεθόδους όπως π.χ χρήση χημικών μεταλλαξιγόνων, υπερϊώδους ακτινοβολίας κ.α.

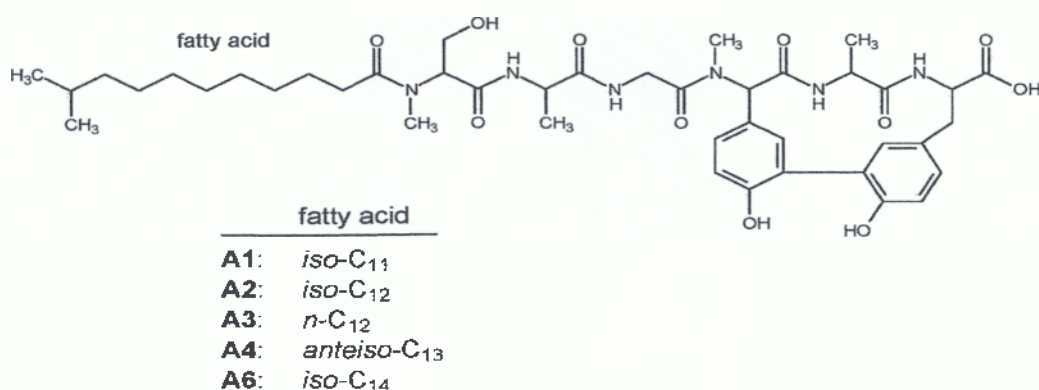
Με την ανάπτυξη των μεθόδων της γενετικής μηχανικής, είναι δυνατή η κατευθυνόμενη τροποποίηση των ρυθμιστικών μηχανισμών του κυττάρου. Παράδειγμα αποτελεί η ενσωμάτωση στο γενετικό υλικό των μικροβιακών κυττάρων, πολλών αντιγράφων ενός γονιδίου που κωδικοποιεί κάποιο ένζυμο που συμμετέχει σε συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής των τελικών προϊόντων του συγκεκριμένου βιοχημικού μονοπατιού. Επιπλέον, η κλωνοποίηση γονιδίων που η έκφρασή τους βρίσκεται κάτω από τη ρύθμιση γνωστού προαγωγέα, επιτρέπει το χειρισμό της σύνθεσης του τελικού προϊόντος κατά βούληση (Chassagnole et al., 2001).

### 3.2.1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται αργά κατά την ανάπτυξη του κυττάρου. Δεν συμμετέχουν στους μηχανισμούς ανάπτυξης του κυττάρου, ενώ η βιολογική δράση αρκετών από αυτών δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί. Παράδειγμα δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν τα αντιβιοτικά που παράγονται από ορισμένους μικροοργανισμούς, κυρίως μύκητες και βακτηρία. Τα αντιβιοτικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών διαφορετικών από αυτών που τα παράγουν και έτσι προσδίδουν σε ορισμένες περιπτώσεις οικολογικό πλεονέκτημα στο μικροοργανισμό

που τα παράγει. Άλλες γνωστές κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν οι διάφορες χρωστικές, οι φερομόνες, οι καταστολείς ενζυμικών συστημάτων (π.χ. Arylomycin στο *Streptomyces sp.*; Εικ. 3), ουσίες με παρασιτοκτόνο δράση, καθώς και οι μυκοτοξίνες. Στον πίνακα 1 που ακολουθεί παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Streptomyces* καθώς και ο λειτουργικός τους ρόλος στις περιπτώσεις που αυτός έχει αποσαφηνιστεί (Demain, 1998).

### Arylomycin A series



Εικόνα 3: Συντακτικός τύπος του δευτερογενούς μεταβολίτη του *Streptomyces sp* Arylomycin A. (Schimana et. al 2002)

Πίνακας 1: Δευτερογενείς μεταβολίτες βακτηρίων του γένους *Streptomyces* και ο ρόλος τους

Δευτερογενής Μεταβολίτης	Μικροοργανισμός	Δράση	Αναφορά
<b>Echinoserine</b>	<i>Streptomyces tendae</i>	Αντιβακτηριακή	Blum <i>et al.</i> , 1995
<b>Dioxolides A, B and D</b>	<i>Streptomyces tendae</i>	Δεν έχει βρεθεί βιολογική δράση	Blum <i>et al.</i> , 1995
<b>Kanchanamycins A, C and D</b>	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Αντιβακτηριακή Μυκητοκτόνος	Fiedler <i>et al.</i> , 1996
<b>Spirofungin</b>	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	Μυκητοκτόνος	Höltzel <i>et al.</i> , 1998
<b>Decadienoic acid</b>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Επαγωγική	Maier <i>et al.</i> , 1999

<b>Decadienoic acid</b>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Επαγωγική	Maier <i>et al.</i> , 1999
<b>Simocyclinones A~D:</b>	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Αντιβακτηριακή – ογκοκατασταλτική – καταστολέας βακτηριακής γυράσης (gyrase)	Schimana <i>et al.</i> , 2000, 2001, Holzenkämpfer <i>et al.</i> , 2002
<b>Streptocidins A~D</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	Αντιβακτηριακή	Gebhardt <i>et al.</i> , 2001, Höltzel <i>et al.</i> , 2001
<b>Phenalinolactones A~D:</b>	<i>Streptomyces</i> sp	Ενεργή έναντι των Gram θετικών βακτηρίων	Gebhardt, 2001
<b>Bagremycins A and B</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	Αντιβακτηριακή - Μυκητοκτόνος	Bertasso <i>et al.</i> , 2001
<b>Ripromycin</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	Αντιβακτηριακή - ογκοκατασταλτική	Bertasso <i>et al.</i> , 2003
<b>Arylomycin A and B series</b>	<i>Streptomyces</i> sp	Καταστολέας βακτηριακών πεπτιδασών	Schimana <i>et al.</i> , 2002
<b>Spiridionic Acid</b>	<i>Streptomyces</i> sp	Δεν έχει βρεθεί βιολογική δράση	Textor <i>et al.</i> , 2007
<b>Natoxazole</b>	<i>Streptomyces</i> sp	Ογκοκατασταλτική	Sommer <i>et al.</i> , 2008

Οι πρωτεϊνικές σύστασης δευτερογενείς μεταβολίτες, καθώς και τα ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή των μη πρωτεϊνικών δευτερογενών μεταβολιτών, κωδικοποιούνται στα βακτηριακά κύτταρα, συνήθως από γονίδια οργανωμένα σε οπερόνια ή μη, καθώς και λιγότερο συχνά από γονίδια που εδράζονται σε πλασμίδια.

Συχνά σε βιοσυνθετικά μονοπάτια που σχετίζονται με δευτερογενείς μεταβολίτες, παίζουν σημαντικό ρόλο και ορισμένοι πρωτογενείς μεταβολίτες. Στις περιπτώσεις αυτές οι πρωτογενείς μεταβολίτες ή αποτελούν απλώς ενδιάμεσα προϊόντα των βιοσυνθετικών μονοπατιών, είτε επάγουν τη δράση ενός ή περισσότερων ενζύμων που είναι απαραίτητα για την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η λυσίνη η οποία επάγει τη δράση της αμινοτρασφεράσης της λυσίνης (lysine aminotransferase), στο βιοσυνθετικό μονοπάτι

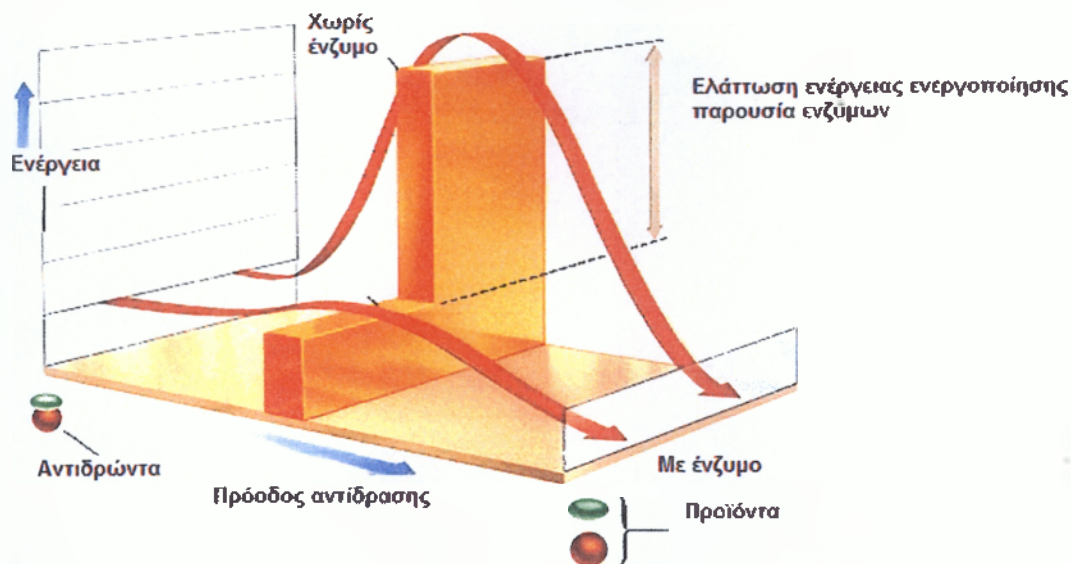
της κεφαμυκίνης (cephamycin) στο *Streptomyces clavuligerus* (Rius et al., 1996), καθώς και η βαλίνη, για τη δευδρογονάση της βαλίνης, στο βιοχημικό μονοπάτι της τυλοσίνης (tylosine) στο *Streptomyces fradiae* (Nguyen et al., 1995).

### 3.2.2 Ένζυμα

Για να πραγματοποιηθεί μια χημική αντίδραση, είναι απαραίτητο τα αντιδρώντα να διεγερθούν, να περάσουν δηλαδή από μια ενδιάμεση κατάσταση, η οποία έχει υψηλότερη ενέργεια από τα αντιδρώντα και τα προϊόντα. Η διαφορά μεταξύ της ενέργειας των αντιδρώντων και της ενέργειας της ενδιάμεσης κατάστασης ονομάζεται ενέργεια ενεργοποίησης.

Σε πολλές χημικές αντιδράσεις η ενέργεια η οποία απαιτείται προκειμένου να φτάσουν τα αντιδρώντα στην ενδιάμεση κατάσταση και να προχωρήσει η αντίδραση, μπορεί να δοθεί με τη μορφή θερμότητας. Ένας άλλος τρόπος επιτάχυνσης των χημικών αντιδράσεων είναι η κατάλυση. Οι καταλύτες είναι ουσίες που μεταβάλλουν την ταχύτητα της αντίδρασης, χωρίς να επηρεάζουν τη θέση της τελικής ισορροπίας. Με τη βοήθεια του καταλύτη μειώνεται η ενέργεια ενεργοποίησης και η αντίδραση προχωράει με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα. Μέσα στα κύτταρα πραγματοποιούνται ακατάπαυστα χημικές αντιδράσεις. Όλες οι αντιδράσεις πρέπει να πραγματοποιηθούν σε περιορισμένο χρονικό διάστημα, χωρίς η θερμοκρασία να υπερβεί το όριο στο οποίο είναι λειτουργικά τα κύτταρα κάθε οργανισμού. Πολύτιμη βοήθεια στη διεξαγωγή των αντιδράσεων αυτών δίνουν οι βιολογικοί καταλύτες, τα ένζυμα.

Τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικής φύσεως μόρια, που μπορεί να είναι ενωμένα και με άλλες μη πρωτεϊνικές ουσίες. Επιταχύνουν τις αντιδράσεις στα κύτταρα, ελαττώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδρώντων, χωρίς να χρειαστεί αύξηση της θερμοκρασίας (Εικ. 4). Πολλά ένζυμα για να δράσουν χρειάζονται και ένα πρόσθετο, μη πρωτεϊνικό μόριο. Στην περίπτωση που το μη πρωτεϊνικό μόριο είναι οργανικό, καλείται συνένζυμο. Η ενζυμική πρωτεΐνη χωρίς το συνένζυμο ονομάζεται αποένζυμο, ενώ το αποένζυμο μαζί με το συνένζυμο συνιστούν το ολοένζυμο (Γεωργάτσος, 1991).



Εικόνα 4: Ελάττωση ενέργειας ενεργοποίησης αντιδρώντων, παρουσία ενζύμου

### 3.2.3 Βιομετατροπές

Η έννοια της βιομετατροπής είναι πολύ ευρεία και περιλαμβάνει στην πραγματικότητα κάθε χημική μετατροπή που πραγματοποιείται είτε από κάποιον οργανισμό ή από ένζυμο. Στο παρρόν κεφάλαιο η έννοια της βιομετροπής χρησιμοποιείται για να περιγράψει ζυμωτικές διεργασίες που πραγματοποιούνται από μικροοργανισμούς και δεν αποσκοπούν στην παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών ή ενζύμων αλλά στην **βιοεπεξεργασία συγκεκριμένων υποστρωμάτων**. Σε αυτές μπορούν να ενταχθούν η **αναερόβια επεξεργασία υγρών και στερεών αποβλήτων και ρυπαντών**, η **βιοεξυγίανση (bioremediation)** και η **αποτοξικοποίηση αγροτοβιομηχανικών καταλοίπων και αποβλήτων**.

## 4. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

### 4.1 Γενικά

Ένας μεγάλος αριθμός γενετικά τροποποιημένων ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, χρησιμοποιείται στις ημέρες μας για παραγωγή ενζυμικών πρωτεϊνών με εφαρμογή στις βιομηχανικές ζυμώσεις. Μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες, παράγονται κυρίως σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες εκφράζονται κυρίως μέσω προκαρυωτικών μεταβολικών συστημάτων. Στις περιπτώσεις που απαιτείται γλυκοσυλίωση του πρωτεϊνικού μορίου ώστε αυτό να γίνει λειτουργικό, επιλέγονται ευκαρυωτικοί οργανισμοί (κυρίως κύτταρα θηλαστικών καθώς και ζυμών και μυκήτων).

Η πλέον οικονομική, εύκολη και γρήγορη παραγωγή μικροβιακών προϊόντων πραγματοποιείται σε κατάλληλα γενετικά τροποποιημένα βακτηριακά κύτταρα. Παρόλα αυτά, στα βακτηριακά κύτταρα συχνά υπάρχουν περιορισμοί που σχετίζονται με την παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί παραγωγή πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους ή πρωτεϊνών που συχνά στο μόριό τους παρατηρούνται δισουλφιδικοί δεσμοί (S - S). Επιπλέον στα βακτηριακά κύτταρα δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν μετά – μεταφραστικές τροποποιήσεις όταν αυτές απαιτούνται λόγω έλλειψης κατάλληλων ενζυμικών συστημάτων.

Σε αντίθεση με τα βακτηριακά κύτταρα, στα κύτταρα των γενετικά τροποποιημένων ζυμών μπορούν να πραγματοποιηθούν στο σύνολό τους οι τροποποιήσεις που απαιτούνται σε ένα πρωτεϊνικό μόριο ευκαρυωτικής προέλευσης (Demain et al., 2009).

Σήμερα η χρήση των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών στις βιομηχανικές ζυμώσεις, βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς όπως η βιομηχανία τροφίμων και ποτών, η φαρμακοβιομηχανία και η βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων. Εν τούτης η νομοθεσία που διέπει τη χρήση των γενετικά

τροποποιημένων μικροοργανισμών στους διάφορους βιομηχανικούς τομείς, διαφέρει μεταξύ των χωρών ίδιων ή διαφορετικών ηπείρων.

#### **4.2 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία τροφίμων**

Η μαζική παραγωγή ενζύμων για τη χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή τροφίμων ξεκινά το 1874 όταν ο Δανός επιστήμονας Christian Hansen χρησιμοποιεί ρεννίνη (χυμοσίνη) από στομάχια μοσχαριών για παρασκευή τυριού (Nielsen et al.,1994). Σήμερα, η χυμοσίνη παράγεται από μικροοργανισμούς που περιέχουν το βόειο γονίδιο της προχυμοσίνης, το οποίο έχει εισαχθεί στο γονιδίωμά τους με μεθόδους χρήσης rDNA. Η χυμοσίνη των βοοειδών που εκφράστηκε στην *Escherichia coli* K-12 αποτέλεσε το πρώτο ένζυμο που παράχθηκε από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς και πήρε έγκριση για χρήση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτιών της Αμερικής (FDA) (Flamm, 1991).

Στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων ένα πλήθος ενζύμων προέρχεται από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς. Οι επιστήμονες χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες τεχνικές τροποποιούν όπου απαιτείται και στη συνέχεια παράγουν ένζυμα που εξυπηρετούν τις απαιτήσεις της βιομηχανίας. Τα ένζυμα αυτά συχνά προέρχονται από μικροοργανισμούς που δεν μπορούν εύκολα να καλλιεργηθούν υπό εργαστηριακές ή βιομηχανικές συνθήκες. Με συνδυασμό όμως συγκεκριμένων τεχνικών μπορούν να επιλεγούν μικροοργανισμοί, που μετά τη γενετική τροποποίησή τους, δίνουν κλώνους που είναι σε θέση, αφενός να παράγουν το επιθυμητό ενζυμικό προϊόν και αφετέρου να μην παράγουν μη επιθυμητά παραπροϊόντα (ενζυμικά προϊόντα ή άλλους μεταβολίτες).

Η διαρκής ανάπτυξη της βιομηχανίας των τροφίμων δημιουργεί νέες απαιτήσεις για εξειδικευμένα ένζυμα. Για παράδειγμα οι κοινές γλυκαντικές ουσίες όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη σε μορφή σιροπιών, παράγονται με διάσπαση του αμύλου καλαμποκιού με τη χρήση υδρολυτικών ενζύμων. Στο πρώτο στάδιο της υδρόλυσης το άμυλο υγροποιείται με τη βοήθεια α-αμυλασών σε θερμοκρασία 105°C για 2 έως 5 λεπτά και στη συνέχεια στους 90-100 °C για 1 με 2 ώρες. Με τη χρήση τεχνικών rDNA έγινε δυνατή η παραγωγή α-αμυλασών με αυξημένη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, χωρίς να επηρεάζεται η συμβατότητά τους με τους υπόλοιπους παράγοντες που λαμβάνουν μέρος στην υδρόλυση του αμύλου. Αυτό επιτεύχθηκε με



αλλαγές στο μόριο των α-αμυλασών που προέκυψαν μετά από κατάλληλες αλλαγές, στις αλληλουχίες του DNA που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα ένζυμα (Olempska - Beer et al., 2006).

Για την εξασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων που παράγονται με τη χρήση ενζύμων που προέρχονται από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς έχουν απορριφθεί από την παραγωγική διαδικασία παθογόνοι μικροοργανισμοί, καθώς και μικροοργανισμοί που παράγουν ουσίες τοξικές. Εξαιρέση αποτελούν ορισμένα είδη μυκήτων τα οποία παράγουν σε μικρές ποσότητες τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι όμως παύουν να παράγονται μετά τη γενετική τροποποίηση των μικροοργανισμών (Olempska - Beer et al., 2006) .

#### **4.2.1 Έγκριση καταλληλότητας ενζύμων από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς**

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες ο FDA έχει δεχθεί ένα μεγάλο αριθμό αιτήσεων για έγκριση της καταλληλότητας ενζύμων από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς που προορίζονται για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Στον Πίνακα 8 που ακολουθεί παρουσιάζονται ορισμένα από τα ένζυμα που έχουν λάβει έγκριση, καθώς και ο μικροοργανισμός από τον οποίο προέρχονται.

Όσον αφορά την Ευρώπη, ο Οργανισμός Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) αναμένεται σύμφωνα με τον 1332/2008 κανονισμό του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου να παρουσιάσει το Δεκέμβριο του 2010 αναλυτικές λίστες ενζύμων που προέρχονται από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς και επιτρέπεται να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες τροφίμων.

#### **4.2.2 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στις βιομηχανικές ζυμώσεις**

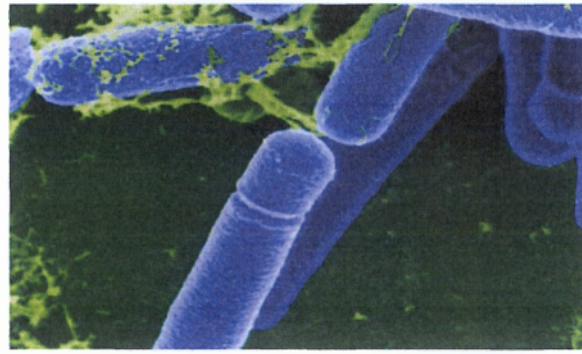
Οι μικροοργανισμοί που κυρίως χρησιμοποιούνται στις βιομηχανικές ζυμώσεις είναι τα βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες. Στη συνέχεια παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα γ.τ μικροοργανισμών καθώς και οι εφαρμογές τους στη βιομηχανία τροφίμων.

### 4.2.3 Βακτήρια

#### 4.2.3.1 Είδη του γένους *Bacillus*

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 8 πολλά ένζυμα σημαντικά για τη βιομηχανία των τροφίμων, προέρχονται από γενετικά τροποποιημένα Gram θετικά βακτήρια του γένους *Bacillus*. Είδη όπως ο *B. subtilis* και ο *B. licheniformis* χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παραγωγή κυρίως α-αμυλασών και πρωτεασών. Σύμφωνα με πλήθος αναφορών σε επιστημονικές εργασίες (de Boer and Diderichsen, 1991, de Boer et al., 1994, Pedersen et al., 2002) τα ένζυμα αυτά παρουσιάζονται ασφαλή για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Και άλλα είδη όμως του γένους *Bacillus* έχουν πιστοποιηθεί ως ασφαλείς πηγές παραγωγής ενζύμων. Ορισμένα παραδείγματα αποτελούν ο *B. licheniformis*, ο *B. amyloliquefaciens*, και ο *B. stearothermophilus* (μετά από ανακατάταξη αναφέρεται πλέον ως *Geobacillus stearothermophilus*, Nazina et al., 2001). Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούνται επίσης, κυρίως για την παραγωγή α-αμυλασών. Την τελευταία δεκαετία έγινε πλήρης χαρτογράφηση του γενετικού υλικού δύο βιομηχανικά χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών του *B. licheniformis* και βρέθηκε σε μεγάλο βαθμό ομολογία με το γενετικό του *B. subtilis*. Αντίθετα σε σύγκριση με το γενετικό υλικό των *B.cereus* και *B.anthrax* που αποτελούν παθογόνους μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο (ο *B.cereus* παράγει τοξίνες που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις και ο *B.anthrax* προκαλεί την ασθένεια του άνθρακα) το γενετικό υλικό του *B. licheniformis* βρέθηκε να παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια (Ray et al., 2004, Veith et al., 2004).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης γενετικά τροποποιημένων ειδών του γένους *Bacillus* για την παραγωγή ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών σε βιομηχανική κλίμακα, είναι ότι εκκρίνουν τα προϊόντα αυτά κατευθείαν στο υπόστρωμα που πρόκειται να ζυμωθεί (Simonen και Palva, 1993). Το γεγονός όμως αυτό αποτελεί παράλληλα πρόβλημα σε ορισμένες περιπτώσεις, αφού συχνά οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί παράγουν και πρωτεάσες με εξωκυτταρική δράση, που μπορούν να υδρολύσουν τα υπόλοιπα ένζυμα που εκκρίνονται από τα κύτταρα, καταστρέφοντάς τα. Σε αυτό το πρόβλημα οι επιστήμονες δίνουν λύση παράγοντας γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς, στους οποίους αδρανοποιούνται τα γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή των πρωτεασών (που παρουσιάζουν εξωκυτταρική δράση).



Εικόνα 5: *Bacillus subtilis* (από Image courtesy Waterscan.co.yu)

Μικροοργανισμός	Ένζυμο	Άδειες
<i>Aspergillus niger</i>	Phytase Chymosin Lipase	GRASP 2G0381 21 CFR 184.1685 GRN 158
<i>Aspergillus oryzae</i>	Esterase-lipase Aspartic proteinase Glucose oxidase Laccase  Lipase Pectin esterase Phospholipase	GRASP 7G0323 GRN 34 GRN 106 GRN 122 GRN 43, GRN 75  GRN 103 GRN 8 A1 GRN 142
<i>Bacillus licheniformis</i>	$\alpha$ - amylase  Pullulanase	GRASP 0G0363, GRN 22, GRN 24, GRN 79  GRN 72
<i>Bacillus subtilis</i>	$\alpha$ -acetolactate decarboxylase  $\alpha$ - amylase  Maltogenic amylase Pullulanase	21 CFR 173.115  GRASP 4G0293, GRASP 7G0328 GRASP 7G0326 GRN 20
<i>Escherichia coli</i> K-12	Chymosin	21 CFR 184.1685
<i>Fusarium venenatum</i>	Xylanase	GRN 54
<i>Kluyveromyces</i>	Chymosin	21 CFR 184.1685
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Biovar 1</i>	$\alpha$ - amylase	GRN 126
<i>Trichoderma reesei</i>	Pectin lyase	GRN 32

Πίνακας 2: Ένζυμα από γ.τ βακτήρια με έγκριση από το FDA

α Η αναφορά GRAS (Generally Recognized As Safe), σχετίζεται με την έγκριση ασφάλειας που έχουν λάβει τα ένζυμα. Λίστες αναλυτικές με το σύνολο των ενζύμων, καθώς και με τις απαιτήσεις που ένα ένζυμο πρέπει να πληροί για να λάβει έγκριση βρίσκονται στην επίσημη ιστοσελίδα <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html>.

#### 4.2.3.2 *Escherichia coli* K-12

Το 1990 ο FDA χαρακτήρισε ως GRAS (ασφαλές για χρήση σε τρόφιμα) το ένζυμο χυμοσίνη (chymosin) που προέρχονταν από την *E. coli* K-12. Η χυμοσίνη είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται για την πήξη του γάλακτος και είναι επίσης γνωστό ως ρεννίνη, ενώ η κοινή ελληνική του ονομασία είναι τυτιά. Ο χαρακτηρισμός του ενζύμου αυτού ως GRAS αποτέλεσε πράξη ορόσημο στη βιομηχανία τροφίμων, αφού ήταν το πρώτο ένζυμο από γενετικά τροποποιημένο μικροοργανισμό που χρησιμοποιήθηκε στην Αμερικάνικη βιομηχανία παραγωγής τυριού και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια *E. coli* K-12 διαθέτουν το γονίδιο που παράγει την βόεια προχυμοσίνη. Αφού η προχυμοσίνη συσσωρευτεί στα κύτταρα των βακτηρίων, αυτά λύονται, η προχυμοσίνη συλλέγεται και μετά από επεξεργασία της με οξέα μετατρέπεται σε χυμοσίνη.

Η χρήση της *E. coli* K-12 στη βιομηχανία των τροφίμων θεωρείται ασφαλής μιας και ο μικροοργανισμός χρησιμοποιείται εδώ και 30 χρόνια και δεν έχουν αναφερθεί μολύνσεις από αυτόν. Επίσης δεν σχετίζεται με την παραγωγή τοξινών που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις, όπως για παράδειγμα οι τοξίνες τύπου Shiga που παράγονται από άλλα στελέχη του *E. coli*. Το *E. coli* K-12 αποτελεί έναν από τους πιο καλά μελετημένους μικροοργανισμούς και το γονιδιώμα του έχει πλήρως χαρτογραφηθεί (Blattner et al., 1997).

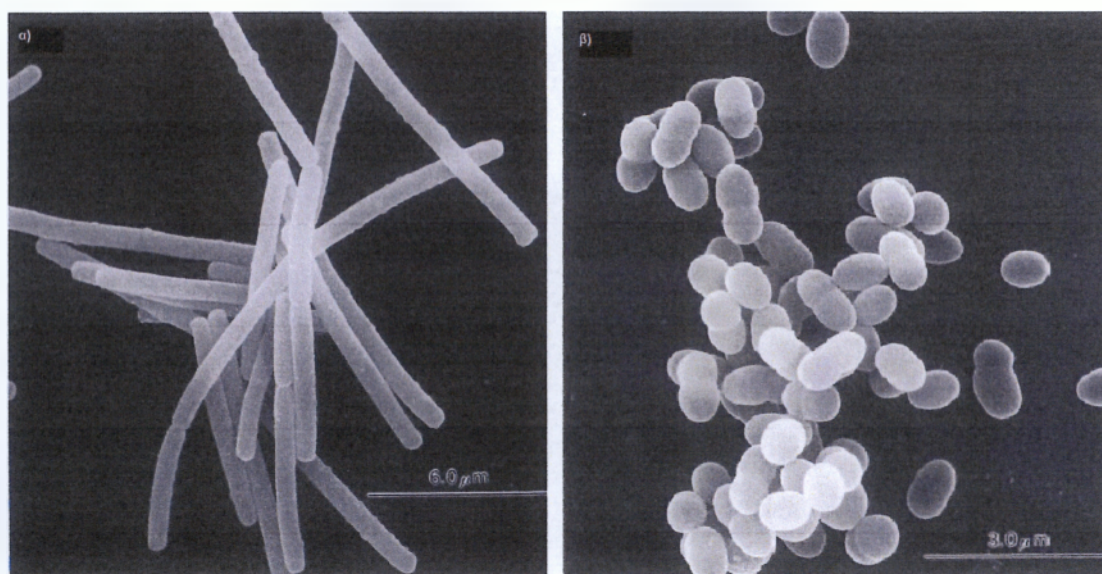
#### 4.2.3.3 *Pseudomonas fluorescens*

Η γενετικά τροποποιημένη *Pseudomonas fluorescens* Βιοvar I χρησιμοποιείται για την παραγωγή α-αμυλασών που παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Είναι ένα Gram θετικό βακτήριο που ζει στο έδαφος και δεν είναι παθογόνο για τον άνθρωπο. Είναι μικροοργανισμός ιδιαίτερα κοινός και συχνά καταναλώνεται από με τον άνθρωπο μαζί με ωμά φρούτα ή λαχανικά. Το γονιδιώμα του έχει πλήρως χαρτογραφηθεί (Paulsen et al., 2005).

Ο άγριος τύπος της *Pseudomonas fluorescens* που τροποποιήθηκε γενετικά για την παραγωγή α-αμυλασών, απομονώθηκε από καλλιέργειες μαρουλιών στην Καλιφόρνια. Μέχρι το 1989 χρησιμοποιήθηκε για τη βιομηχανική παραγωγή της εντομοκτόνου τοξίνης του *Bacillus thuringiensis* (B.t toxin) για χρήση σε αγροτικές καλλιέργειες (Landry et al., 2003).

#### 4.2.3.4 Βακτήρια του γαλακτικού οξέος

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούνται ευρέως από τον άνθρωπο στη βιομηχανία παραγωγής και συντήρησης τροφίμων εδώ και πολλά χρόνια. Είναι Gram θετικά βακτήρια και δεν σχηματίζουν σπόρια. Στη φύση τα συναντάμε σε ωμά θρεπτικά συστατικά καθώς και στο πεπτικό σύστημα των θηλαστικών. Η ομάδα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέως παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και περιλαμβάνει τόσο βακίλους όπως οι lactobacilli όσο και κόκκους όπως streptococci, lactococci, pediococci και leuconostocs. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέως χρησιμοποιούνται συχνά σε καλλιέργειες από τις οποίες ξεκινούν οι ζυμώσεις τόσο στη βιομηχανία του γάλακτος όσο και στη βιομηχανία του κρέατος, καθώς και σε άλλους κλάδους της βιομηχανίας τροφίμων. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων όπως τα διάφορα είδη τυριού, γιαούρτης, προϊόντα ζυμώσεως του γάλακτος, ποτών και ελιών. Από το είδος των βακτηρίων του γαλακτικού οξέως εξαρτάται σε πολλές περιπτώσεις η ασφάλεια, ο χρόνος ζωής, η διατροφική αξία, η γεύση, η υφή και η ποιότητα του τροφίμου. Επιπλέον τα βακτήρια του γαλακτικού οξέως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πρόσθετων τροφίμων και αρωματικών υλών. Ένας αριθμός βακτηρίων του γαλακτικού οξέως χρησιμοποιείται σήμερα στη βιομηχανία παραγωγής προβιοτικών, η κατανάλωση των οποίων συμβάλλει σε ορισμένες περιπτώσεις στην καλύτερη κατάσταση της υγείας. Στον πίνακα 9 που ακολουθεί παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια του γαλακτικού οξέως καθώς και η εφαρμογή των ενζύμων τους στις βιομηχανικές ζυμώσεις (Sybesma, et al., 2006).



Εικόνα 6: α) *Lactobacillus helveticus* και β) *Lactococcus lactis* (από jpke.njau.edu.cn)

Πίνακας 3: Γενετικά τροποποιημένα βακτήρια του γαλακτικού οξέως και τα ένζυμα που παράγουν (Sybesma et al., 2006)

Γενετικά τροποποιημένο βακτήριο	Γονίδια	Ενζύμηση
<i>Lb. Bulgaricus</i>	<i>lacZ</i>	Ελάττωση ζύμωσης λακτόζης
<i>L. lactis</i>	<i>ldh</i>	Αύξηση παραγωγής CO <sub>2</sub>
<i>L. lactis</i>	<i>ldh</i>	Αύξηση παραγωγής διακετυλίου
<i>L. lactis</i>	<i>aldB</i>	Αύξηση παραγωγής διακετυλίου
<i>L. lactis</i>	<i>aldB</i>	Αύξηση παραγωγής διακετυλίου
<i>L. lactis</i>	<i>ribC</i>	Αύξηση παραγωγής ριβοφλαβίνης
<i>S. thermophilus</i>	<i>gal operon</i>	Ζύμωση γαλακτόζης
<i>L. lactis</i>	<i>glk, ell<sup>manvgo</sup></i>	Μη ζύμωση γλυκόζης
<i>L. lactis</i>	<i>aldB</i>	Αύξηση παραγωγής διακετυλίου
<i>L. lactis</i>	<i>popN, popX, popC, popI</i>	Μετατροπή πρωτεολυτικού συστήματος ωρίμανσης τυριού
<i>L. lactis</i>	<i>popI, popL, popW, popG</i>	Μετατροπή πρωτεολυτικού συστήματος ωρίμανσης τυριού
<i>L. lactis</i>	<i>Gdh</i>	Αύξηση παραγωγής α κετογλουταρικού
<i>L. lactis</i>	υποκινητής φάγου	Έκφραση cassette L1aIR + ,
<i>L. lactis</i>	anti sense φάγου	Αδρανοποίηση γονιδίων φάγου
<i>L. lactis</i>	anti sense φάγου	Αδρανοποίηση δομικών γονιδίων φάγου
<i>L. lactis</i>	<i>rip</i>	Αδρανοποίηση μολυσματικών πρωτεϊνών φάγου
<i>L. lactis strains</i>	γονίδιο λακτίνης	Παραγωγή λακτίνης
<i>L. lactis strains</i>	γονίδιο λακτίνης	Παραγωγή λακτίνης
<i>L. lactis</i>	<i>abiA, abiG</i>	Παρεμπόδιση δράσης γονιδίων φάγου
<i>L. lactis</i>	<i>lcnO, lcnD</i>	Παραγωγή λυσίνης
<i>L. lactis</i>	<i>lytA, lytH</i>	Παραγωγή λυσίνης και χολίνης
<i>L. lactis</i>	EPS γονίδιο	Μεταβολή παραγωγής EPS
<i>L. lactis</i>	EPS γονίδιο	Μεταβολή παραγωγής EPS
<i>Lb. gasseri</i>	folate gene	Ενεργοποίηση βιοσυνθετικού μονοπατιού folate
<i>S. thermophilus</i>	<i>pgmA, galU</i>	Απενεργοποίηση φωσφογλυκομουτάση
<i>L. lactis</i>	<i>idh, alaD, alr</i>	Αλλαγή βιοσυνθετική μετατροπής πυροσταφυλικού σε L αλανίνη
<i>L. lactis</i>	γονίδιο ριβοφλαβίνης	Υπερέκφραση ριβοφλαβίνης
<i>L. lactis</i>	folate γονίδιο	Υπερέκφραση βιοσυνθετικού μονοπατιού folate
<i>L. lactis</i>	<i>gik, pfnABCD, pfcBA,</i>	Αδρανοποίηση ζυμοτικού συστήματος γλυκόζης
<i>L. lactis</i>	<i>gal A, aga</i>	Εισαγωγή δράσης α γαλακτοσιδάσης
<i>Lb. plantarum</i>	<i>phyC</i>	Δράση φωτάσης
<i>Lb. plantarum</i>	<i>a myA</i>	Εισαγωγή δράσης α αμυλάσης
<i>Lb. plantarum</i>	α-αμυλάση γονίδιο, <i>celA</i>	Εισαγωγή δράσης α- αμυλάσης και α-κυτταρινάσης

<i>S. Thermophilus</i>	<i>glyA</i>	Αύξηση παραγωγής ακεταλδεύδης
<i>Lb. termentum</i>	<i>IdhD, IdhL</i>	Αύξηση παραγωγής μαννιτόλης
<i>Lb. helveticus</i>	<i>IdhD</i>	Παραγωγή L-(+) λακτικού οξέως
<i>Lb. delbrueckii</i>	γονίδιο EPS	Μεταβολή παραγωγής EPS
<i>S. Thermophilus</i>	γονίδιο ελικάσης	Αδρανοποίηση γονιδίων φάγου
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Idh, adh</i>	Πρόληψη κατά τερηδόνας
<i>Lb. delbrueckii</i>	γονίδιο β-γαλακτοσιδάσης	Αύξηση δράσης β-γαλακτοσιδάσης

#### 4.2.4 Μύκητες/Ζύμες

##### 4.2.4.1 *Aspergillus oryzae* και *Aspergillus niger*

Ο *Aspergillus oryzae* και ο *Aspergillus niger* είναι μύκητες που σχηματίζουν υφές. Και οι δύο έχουν μεγάλη παρουσία στη βιομηχανία τροφίμων αφού χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία, στη ζυθοποιία και σε άλλους τομείς. Το γονιδίωμα του *Aspergillus oryzae* έχει πλήρως χαρτογραφηθεί από Ιάπωνες επιστήμονες (Machida et al., 2005).

Λόγω της μακράς ιστορίας τους σε διαδικασίες ζυμώσεων για παραγωγή τροφίμων και ποτών τόσο ο *Aspergillus oryzae* όσο και ο *Aspergillus niger* θεωρούνταν μη παθογόνοι μύκητες. Εν τούτοις βρέθηκε ότι κυτταρικές σειρές και των δύο ειδών μπορεί να παράγουν σε μικρές ποσότητες τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες όπως οι μυκοτοξίνες. Έτσι με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής παράγονται πλέον γενετικά τροποποιημένοι μύκητες προερχόμενοι από άγριους τύπους και των δύο ειδών, που δεν παράγουν μυκοτοξίνες με αποτέλεσμα να θεωρούνται ασφαλείς για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων (βλ. Πίνακα 8).

##### 4.2.4.2 *Fusarium venenatum*

Το 2001 ο FDA χαρακτήρισε ως GRAS το ένζυμο ξηλανάση (xylanase) που προέρχονταν από γενετικά τροποποιημένο μύκητα του είδους *Fusarium venenatum*, ο οποίος περιείχε το γονίδιο για την παραγωγή της ξηλανάσης από το μύκητα *Thermomyces lanuginosus*. Η κυτταρική σειρά του *Fusarium venenatum* που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του γονιδίου της ξηλανάσης προήλθε από κύτταρα άγριου τύπου (A3/5) τα οποία βρέθηκαν σε δείγμα εδάφους στο Ηνωμένο Βασίλειο. Αρχικά οι μικροοργανισμοί του άγριου τύπου είχαν προσδιοριστεί ως μύκητες του είδους *Fusarium graminearum*, αργότερα όμως οι επιστήμονες στηριζόμενοι σε

μορφολογικά και μοριακά δεδομένα, καθώς και σε δεδομένα που προέκυπταν από τις αναλύσεις των μυκοτοξινών που παρήγαγαν οι μύκητες, τους κατέταξαν στο είδος *Fusarium venenatum* (O'Donnell et al., 1998, Yoder και Christianson, 1998).

Ο μύκητας *Fusarium venenatum* χρησιμοποιείται επίσης και για την παραγωγή μυκοπρωτεΐνης ενός διατροφικού προϊόντος πλούσιου σε πρωτεΐνες που μέχρι το 1985 κυκλοφορούσε στο Ηνωμένο Βασίλειο με την εμπορική ονομασία «Quorn». Σήμερα η μυκοπρωτεΐνη κυκλοφορεί τόσο σε ευρωπαϊκές χώρες όσο και στην Αμερική κυρίως ως υποκατάστατο πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης. Οι γενετικά τροποποιημένοι μύκητες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της πρωτεΐνης έχουν προέλθει όλοι από τους μύκητες άγριου τύπου A3/5 (Wiebe, 2002).

Ο *Fusarium venenatum* δεν θεωρείται παθογόνος μύκητας για τον άνθρωπο. Μελέτες όμως έχουν δείξει ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες οι γενετικά τροποποιημένοι μύκητες που έχουν προέλθει από τους άγριου τύπου A3/5 μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες, τριχοθισίνες (trichothecenes) καλμορίνες (calmorins) και φουσαρίνες (fusarines) καθώς και ένα κυκλικό εννιαπεπτίδιο B, που δεν αποτελούν ουσίες κατάλληλες για κατανάλωση από τον άνθρωπο (O'Donnell et al., 1998, Miller και MacKenzie, 2000, Song et al., 2004). Η παραγωγή των παραπάνω ουσιών μπορεί να εμποδιστεί με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών της ζύμωσης.

Εκτός από ξηλανάση ο *Fusarium venenatum* χρησιμοποιείται και για την παραγωγή άλλων ενζύμων όπως καρβοξυπεπτιδάση της σερίνης του *A.oryzae* (Blinkovsky et al., 1999), αμινοπεπτιδάση του *A.oryzae* (Blinkovsky et al., 2000), γλυκοαμυλάση του *A.niger* (Gordon et al., 2001), και οξειδάση της λακτόζης του *Microdochium nivale* (Ahmad et al., 2004).

#### 4.2.4.3 *Trichoderma reesei*

Ο μύκητας *Trichoderma reesei* είναι ιδιαίτερα γνωστός για την παραγωγή ενζύμων που υδρολύουν κυτταρίνη και ημικυτταρίνες. Σήμερα, έχει τροποποιηθεί γενετικά με γονίδιο που προέρχεται από το μύκητα *A.niger var. awamory* για τη βιομηχανική παραγωγή του ενζύμου λυάση της πεκτίνης.

Ο *Trichoderma reesei* πρώτη φορά απομονώθηκε από βαμβακερό караβόπανο στα Νησιά του Σολομώντα το 1944. Ο γνήσιος άγριος τύπος που απομονώθηκε αποτελεί σήμερα τον πρόγονο όλων των κυτταρικών σειρών που τροποποιήθηκαν γενετικά και χρησιμοποιούνται για τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι ο μύκητας *Trichoderma reesei* αποτελεί την αγνή μορφή ενός



τροπικού μύκητα, του *Hypocrea jecorina* (Kuhls et al., 1996). Ο μύκητας θεωρείται μη παθογόνος για τον άνθρωπο. Κυτταρινάσες του έχουν χρησιμοποιηθεί στις βιομηχανίες ποτών, τροφίμων, ζωοτροφών και φαρμάκων από τη δεκαετία του 1960.

#### 4.2.4.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Στην αρτοποιία αλλά και στη βιομηχανία παραγωγής κρασιού και μύρας χρησιμοποιείται ευρύτατα η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Το αλεύρι, η πρώτη ύλη για τη δημιουργία αρτοπαρασκευασμάτων, περιέχει σε μεγάλες ποσότητες των πολυσακχαρίτη άμυλο. Στο σιτάρι περιέχονται ένζυμα, τα οποία διασπούν το άμυλο στο δισακχαρίτη μαλτόζη και σε γλυκόζη. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη ζυμών που διασπούν αναερόβια τη γλυκόζη σε αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση), με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται CO<sub>2</sub> που προκαλεί τη διόγκωση (φούσκωμα), των αρτοπαρασκευασμάτων. Τα αποτελέσματα της αλκοολικής ζύμωσης εξαρτώνται από το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται. Ο λόγος που ο *Saccharomyces cerevisiae* παρουσιάζεται ιδιαίτερα πλεονεκτικός για τη διεξαγωγή των ζυμώσεων τόσο στην οινοποιία όσο και στην αρτοποιία είναι το γεγονός ότι μεταξύ των άλλων απελευθερώνει κατά τις ζυμωτικές διαδικασίες μεγάλα ποσά CO<sub>2</sub>.

Κατά την παραγωγή κρασιού γίνεται συλλογή ώριμων σταφυλιών που η συγκέντρωση των σακχάρων τους είναι υψηλή. Μετά την παραγωγή μούστου με συνθλιπτικές διαδικασίες, ακολουθεί η ζύμωσή του σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο ακολουθούνται αερόβιες διαδικασίες, ενώ στο δεύτερο αναερόβιες οπότε και παράγεται η αιθυλική αλκοόλη (Αλεπόρου-Μαρίνου, et al., 1997).

Το στέλεχος της ζύμης που θα χρησιμοποιηθεί για τις ζυμωτικές διαδικασίες έχει σημαντική επίδραση τόσο στην ποιότητα του κρασιού που θα παραχθεί όσο και στη γεύση του. Για το λόγο αυτό οι οινοποιοί εδώ και πολλές δεκαετίες είναι ιδιαίτερα επιλεκτικοί όσον αφορά το στέλεχος της ζύμης που θα χρησιμοποιήσουν (Fleet, 1993). Επιπλέον, επιστημονικές μελέτες κατευθύνονται προς τη δημιουργία νέων στελεχών, με τη χρήση κλασικών μεθόδων, όπως ο υβριδισμός, η επαγόμενη μεταλλαξιγένεση και η χρήση σφαιροπλαστών. Οι κλασικές όμως μέθοδοι,

αδυνατούν να παράγουν ζύμες με τα ακριβή επιθυμητά χαρακτηριστικά λόγω της εν μέρη τυχειότητας των αποτελεσμάτων που δίνουν οι πρακτικές αυτές.

Ένα πλήθος στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* έχει τροποποιηθεί με μεθόδους γενετικής και μεταβολικής μηχανικής και οι επιστημονικές έρευνες υποστηρίζουν την καταλληλότητα για χρήση των στελεχών αυτών στην παραγωγική διαδικασία. Παρόλα αυτά δύο μονό από τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη έχουν μέχρι σήμερα χαρακτηριστεί ως GRAS: το ML 01 (υπερπαραγωγή ενζύμων για αυξημένη διάσπαση μαλικού οξέος), και το ECMo01 (παραγωγή ενζύμων για αυξημένη διάσπαση ουρίας). Στον πίνακα 10 που ακολουθεί παρουσιάζονται αναφορές για γενετικά τροποποιημένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και τα πλεονεκτήματα που προσδίδουν. Οι αναφορές σχετίζονται με ζύμες που δεν έχουν ακόμη λάβει έγκριση για βιομηχανική χρήση.

Πίνακας 4: Δράση γενετικά τροποποιημένων στελεχών *S.cerevisiae* στην παραγωγή κρασιού

Γενετική τροποποίηση	Αποτέλεσμα	Αναφορά
Αλλαγή της δράσης της εστεράσης (ATF1)	Γεύση περισσότερο φρουτώδης	Lilly, et al., 2000
Αλλαγή δράσης του ενζύμου GPD1	Αύξηση εκχύλισης γλυκερόλης	Michnik et al., 1997
Αύξηση διάσπασης μαλτόζης και παραγωγής λακτόζης	Ισορροπημένη οξύτητα	Dequin et al., 1999
Αύξηση δράσης πεκτινασών	Βελτίωση διηθήσεως, εναλλακτική δράση έναντι χρήσεως μπεντονίτη	Gonzales-Candelas et al., 1995
Αύξηση δράσης γλυκολιτικών ενζύμων	Βελτίωση διηθήσεως	Perez-Gonzales et al., 1993
Παραγωγή αντιβακτηριδιακών πρωτεϊνών	Μικρότερες απαιτήσεις σε SO <sub>2</sub>	Shoeman et al., 1999

#### 4.2.4.5 *Kluyveromyces marxianus var.lactis*

Το 1992 ο FDA χαρακτήρισε ως GRAS το ένζυμο χυμοσίνη (chymosn) που προέρχονταν από τη γενετικά τροποποιημένη ζύμη *Kluyveromyces marxianus var.lactis*. Ο μικροοργανισμός αυτός χρησιμοποιήθηκε ως φορέας έκφρασης του βόειου γονιδίου της προχυμοσίνης λόγω της ικανότητάς του να παράγει μεγάλες

ποσότητες προχυμοσίνης τις οποίες και εκκρίνει στο εξωκυτταρικό του περιβάλλον. Η προχυμοσίνη μετατρέπεται σε χυμοσίνη σε όξινο περιβάλλον.

Η ζύμη *Kluyveromyces marxianus var.lactis* χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή λακτάσης ενός ενζύμου που διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη και χρησιμοποιείται στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Ο μικροοργανισμός θεωρείται μη παθογόνος για τον άνθρωπο και η χρησιμοποίησή του για την παραγωγή χυμοσίνης και λακτάσης που προορίζονται για βιομηχανικές ζυμώσεις, θεωρείται ασφαλής. (Olempska-Beer et al., 2006).

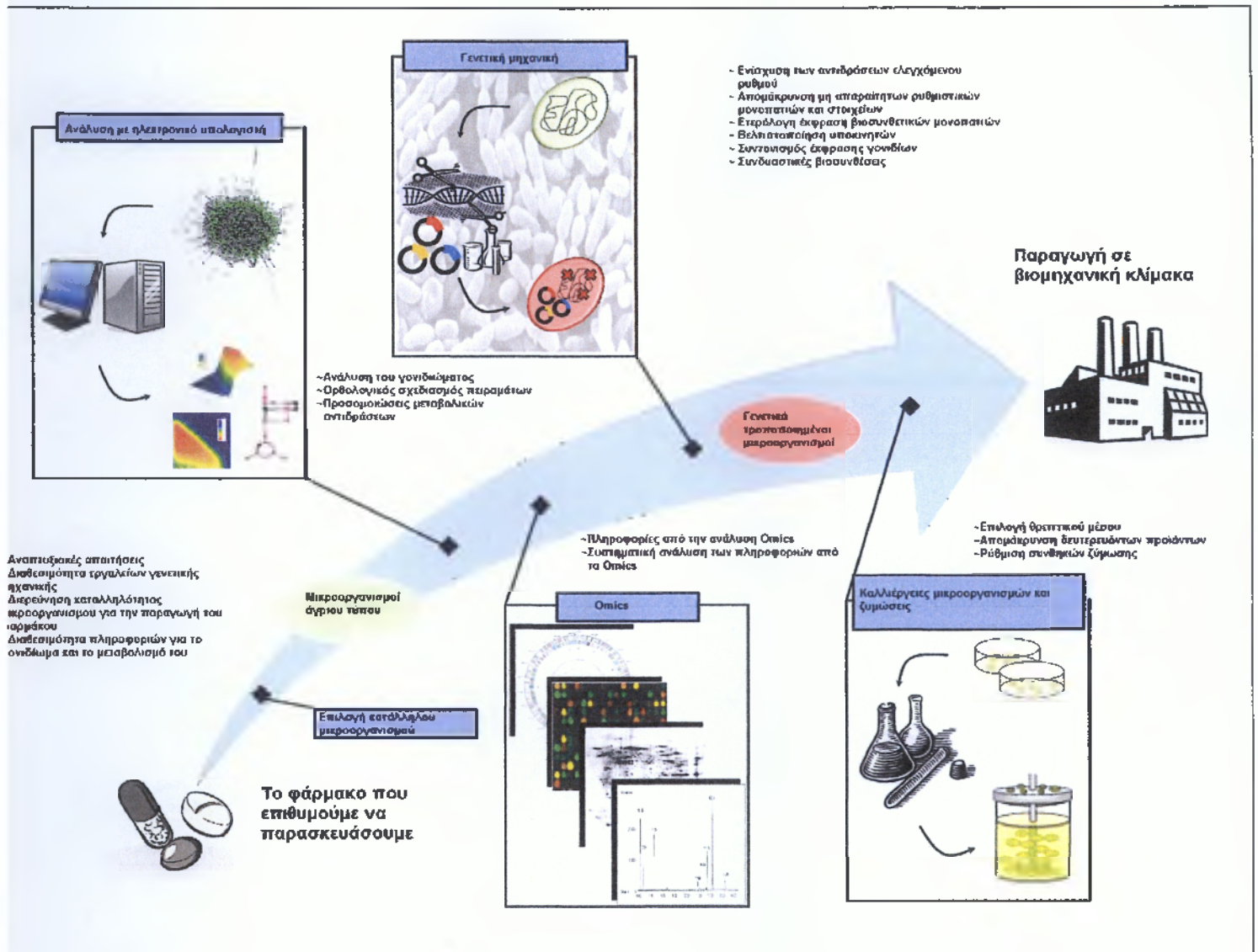
### 4.3 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία φαρμάκων

Πολλές χημικές ενώσεις και βιολογικά μακρομόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία των φαρμάκων προέρχονται από μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα. Οι ενώσεις όμως αυτές, παράγονται σε μικρές ποσότητες στα κύτταρα των οργανισμών και έτσι οι ποσότητες που απαιτούνται για να καλύψουν τις ανάγκες στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας δεν μπορούν να απομονωθούν από φυσικές πηγές.

Η γενετική μηχανική και συγκεκριμένα οι εφαρμογές της που σχετίζονται με τη μετατροπή των μεταβολικών μηχανισμών των κυττάρων έχει δώσει λύσεις για την παραγωγή μιας πληθώρας φαρμακευτικών ουσιών. Η ανάπτυξη νέων μεθόδων, καθώς και η ολοένα αυξανόμενη γνώση των επιστημόνων σχετικά με τη ρύθμιση της λειτουργίας των μεταβολικών μονοπατιών στα κύτταρα των οργανισμών, οδήγησε στη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, ικανών να παράγουν με μεγάλη πιστότητα χημικά μόρια που χρησιμοποιούνται είτε ως φάρμακα είτε ως συστατικά φαρμάκων (Εικόνα 9) (Lee et al., 2008).

Η παραγωγή φαρμάκων από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την εξολοκλήρου χημική παρασκευή τους (όταν αυτό είναι δυνατό) ή την παραλαβή τους από φυσικές πηγές. Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φαρμάκων συχνά έχουν σύνθετη δομή (π.χ ύπαρξη εναντιομερών) και είναι ιδιαίτερα δύσκολο να κατασκευαστούν με τις υπάρχουσες συμβατικές χημικές μεθόδους. Επίσης η παραλαβή χημικών ενώσεων από φυσικές πηγές μπορεί να προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, είτε μειώνοντας τους οργανισμούς που αποτελούν τις φυσικές πηγές, είτε υποβαθμίζοντας τις περιοχές που αποτελούν το φυσικό περιβάλλον για την ανάπτυξη των οργανισμών αυτών (Chang and Keasling, 2006).

Από την άλλη, φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να παραχθούν μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με απλές και οικονομικές πρώτες ύλες. Η ταχεία ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των μικροβιακών κυττάρων είναι ένα βασικό πλεονέκτημα που λαμβάνουν υπόψη τους οι βιομηχανίες παραγωγής φαρμακευτικών ενώσεων. Επιπλέον με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής και μεταβολικής, μπορούμε πλέον να επέμβουμε στα μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων, παράγοντας τα προϊόντα που επιθυμούμε, σε ποσότητες ικανές να καλύψουν τις ανάγκες μας.



**Εικόνα 7:** Γενίκευση της στρατηγικής που ακολουθείται από τη μεταβολική μηχανική για τη βιομηχανική παραγωγή φαρμάκων. Αρχικά επιλέγεται το φάρμακο που θα παραχθεί. Στη συνέχεια η κατάλληλη κυτταρική σειρά επιλέγεται με γνώμονα πολλές παραμέτρους κυρίως μεταβολικές, καθώς και την ικανότητα για παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, την ικανότητα καλλιέργειας του σε συγκεκριμένα μέσα, καθώς και τη δυνατότητα τροποποίησής του με συγκεκριμένες τεχνικές. Με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού πραγματοποιούνται αναλύσεις για το σύνολο του γονιδιώματος των κυττάρων (Large-scale genome-wide analysis: omics) και βάση αυτών γίνονται προσομοιώσεις σε μεταβολικό επίπεδο, που σχετίζονται με διαδικασίες μετάφρασης για παραγωγή πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Από τις πληροφορίες που προκύπτουν από αυτή τη σειρά διαδικασιών, σχεδιάζεται η παρέμβαση στο γονιδίωμα με μεθόδους γενετικής μηχανικής. Ξεκινώντας από τα μεταβολικά μονοπάτια που εξυπηρετούν τον άγριο τύπο κύτταρων, πραγματοποιείται ο σχεδιασμός νέων μεταβολικών μονοπατιών. Αφού δημιουργηθούν οι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί που μπορούν να παράγουν την επιθυμητή φαρμακευτική ουσία, ξεκινά η διαδικασία της παραγωγής των προϊόντων μέσω αντιδράσεων ζυμώσεων. Αν το προϊόν της ζύμωσης χρειάζεται μετατροπές για να δώσει την τελική μορφή της φαρμακευτικής ουσίας, μπορούν να πραγματοποιηθούν επιπλέον αλλαγές στα κύτταρα σε επίπεδο μεταβολικών μονοπατιών, ώστε να δημιουργηθούν κύτταρα κατάλληλα για βιομηχανική παραγωγή του φαρμάκου (Lee et al., 2008).

#### 4.3.1 Η διεύρυνση του ρόλου των μικροοργανισμών στη βιομηχανία φαρμάκων

Στον Πίνακα 11 συνοψίζονται πρόσφατα, χαρακτηριστικά επιτεύγματα της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής στην παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών από μικροοργανισμούς.

Ουσίες όπως πολυκετίδια, σημαντικές χημικές ενώσεις που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία, καθώς και φυτικής προέλευσης προϊόντα, έχουν παραχθεί από μεταβολικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι μικροοργανισμοί και κυρίως τα βακτήρια, στο άμεσο μέλλον θα αντικαταστήσουν σε μεγάλο βαθμό στις βιομηχανίες φαρμάκων, τις κυτταροκαλλιέργειες φυτικών κυττάρων και κυττάρων που προέρχονται από θηλαστικά (Zhang et al., 2004, Mazor, 2007).

Αντιδράσεις ή μετασχηματισμοί που στο παρελθόν δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν σε μικροβιακά κύτταρα, μπορούν πλέον να πραγματοποιηθούν με επιτυχία σε πολλούς γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς. Για παράδειγμα είναι πλέον δυνατό να πραγματοποιηθεί από βακτήρια γλυκοσυλύωση πρωτεϊνών, μια σημαντική μετά-μεταφραστική διαδικασία απαραίτητη για να μετατραπούν οι φαρμακευτικές πρωτεΐνες σε λειτουργικές. Ακόμη μπορούν σήμερα να παραχθούν από μικροοργανισμούς, πλήρη τόσο σε δομικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο αντισώματα. Μεταξύ των πρώτων μορίων που παρασκευάστηκαν είναι η ινσουλίνη και η αυξητική ορμόνη, ενώ σήμερα παράγονται και ιντερφερόνες με αντική δράση.

Μικρομοριακές φαρμακευτικές ουσίες, καθώς και πρόδρομες φαρμακευτικές ενώσεις, αποτελούν πιο εύκολα πραγματοποιήσιμους στόχους για τη γενετική καθώς και τη μεταβολική μηχανική. Δεδομένου της ταχείας προόδου που έχει πραγματοποιηθεί στη μικροβιακή μεταβολική μηχανική δεν είναι δύσκολο να κατανοήσουμε ότι τα μικροβιακά συστήματα παραγωγής θα παρουσιάσουν στο μέλλον ακόμη μεγαλύτερη ανάπτυξη.

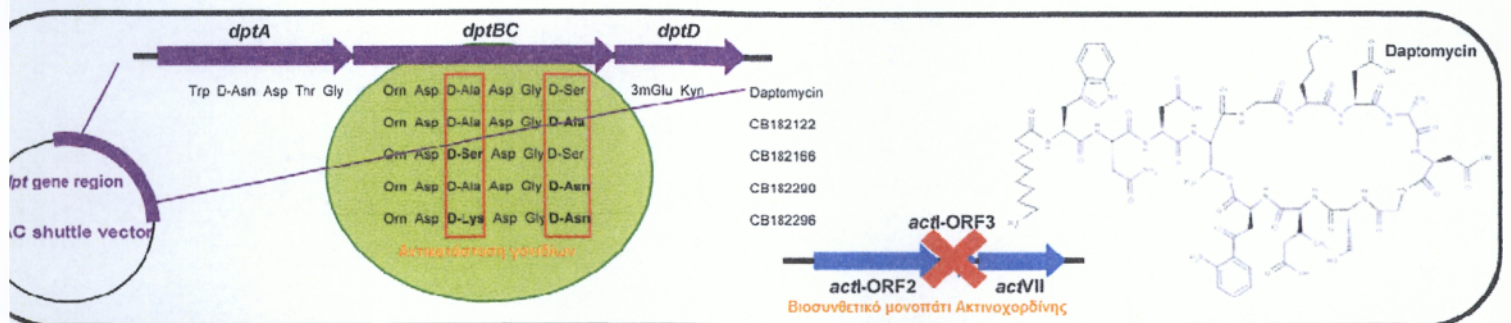
**Πίνακας 5:** Παραδείγματα παραγωγής φαρμακευτικών ουσιών με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών

Φαρμακευτική ουσία	Ιδιότητα φαρμακευτικής ουσίας	Μικροοργανισμός	Εφαρμογή Γενετικής Μηχανικής	Αναφορά
Κλαβουλανικό οξύ (Clavulanic)	Αντιβιοτικό	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Αδρανοποίηση του <i>gar1</i> και του <i>gar2</i> και της ενδιάμεσης σε αυτά αργινίνης για τη βελτίωση της δράσης του φαρμάκου	Li, R. and Townsend, C. (2006)
Δαπτομυκίνη (Daptomycin)	Αντιβιοτικό	<i>Streptomyces lividans</i>	Ετερόλογη παραγωγή δαπτομυκίνης στο <i>S.lividans</i> , αδρανοποίηση της ακτινοχορδίνης (actinorhodin) και βελτιστοποίηση του θρεπτικού υλικού με προσθήκη επιπλέον φωσφορικών αλάτων	Penn, J. et al. (2006)
Παράγωγα Δαπτομυκίνης (Daptomycin)	Αντιβιοτικά	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Χρήση γονιδίων του φάγου λ για τη μετατροπή ενζυμικών πεπτιδικών αλυσίδων (συνθασών) (Εικόνα10)	Nguyen, K.T. (2006)
Ερυθρομυκίνη (Erythromycin A)	A Αντιβιοτικό	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Υπερέκφραση των γονιδίων <i>eryK</i> και <i>eryG</i> στο <i>S.erythraea</i>	Chen, Y. et al. (2008)
Φωσφομυκίνη (Fosfomycin)	Αντιβιοτικό	<i>Streptomyces lividans</i>	Κλωνοποίηση των γονιδίων της φωσφομυκίνης από το γονιδίωμα του <i>Streptomyces fradiae</i> και ετερόλογη παραγωγή του φαρμάκου στο <i>S. lividans</i>	Woodyer, R.D. et al. (2006)
Lantibiotic subtilin	Αντιβιοτικό	<i>Bacillus subtilis</i>	Υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες της σαμπτιλίνης (subtilin)	Heinzmann, S. et al. (2006)
Macrolide 6-δεοξυερυθρομυκίνη D	Αντιβιοτικό	<i>Escherichia coli</i>	Ετερόλογη παραγωγή της 6-δεοξυερυθρομυκίνης D στην <i>E. coli</i>	Lee, H.Y. and Khosla, C. (2007)
Magnoflorine and (S)-scoulerine	Αντιβιοτικό	<i>Escherichia coli</i> και <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ετερόλογη παραγωγή benzylisoquinoline αλκαλοειδών από <i>E. coli</i> και <i>S. cerevisiae</i> χρησιμοποιώντας γονίδια μικροβιακής και φυτικής προέλευσης	Minami, H. et al. (2008)

Tylactone	Αντιβιοτικό	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Ετερόλογη παραγωγή της συνθάσης των πολικετιδίων της τυλοσίνης στο <i>S. venezuelae</i>	Jung, W.S. et al. (2006)
Carvone	Αντιμικροβιακό, αντικαρκινικό	<i>Escherichia coli</i>	Αυξημένη παραγωγή ετερόλογων γονιδίων για τη βιοσύνθεση (-)-carvone	Carter, O.A. et al. (2003)
Astaxanthin	Αντιοξειδωτικό	<i>Escherichia coli</i>	Υπερέκφραση της ισομεράσης της ισοπενλικής διφωσφατάσης στην <i>E. coli</i>	Wang, C.W. et al. (1999)
Lycopene	Αντιοξειδωτικό	<i>Escherichia coli</i>	Ετερόλογη έκφραση γονιδίων καρτενοιδών των <i>Pantoea agglomerans</i> και <i>Pantoea ananatis</i>	Yoon, S.H. et al. (2007)
Εχινομυκίνη	Ογκοκατασταλτικό	<i>Escherichia coli</i>	Ετερόλογη έκφραση των γονιδίων της εχινομυκίνης στην <i>E. coli</i>	Watanabe, K. et al. (2006)
Indolocarbazole compounds	Ογκοκατασταλτικό	<i>Streptomyces albus</i>	Ετερόλογη έκφραση διαφορετικών συνδιασμών γονιδίων που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της ρεββεκαμυκίνης στο <i>S. albus</i>	Sanchez, C. et al. (2005)
Ανθρώπινη α-αιμογλοβίνη	Στοιχείο του ανθρώπινου αίματος	<i>Escherichia coli</i>	Υπερέκφραση α αιμογλοβίνης μέσω μοριακών μετατροπών στο charagon της α αιμογλοβίνης	Vasseur-Godbillon, C. (2006)
Νικοτιναμίνη (Nicotianamine)	Καρδιοαγγειοδραστικό	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ετερόλογη έκφραση του Arabidopsis AtNAS2 γονιδίου στο <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wada, Y. (2006)
Ανθρώπινη αυξητική ορμόνη	Ορμόνη	<i>Escherichia coli</i>	Ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου PL του φάγου λ με ρύθμιση της θερμοκρασία για παραγωγή ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης	Soares, C.R. et al. (2008)
Ανθρώπινη παραθυρεοειδική ορμόνη	Ορμόνη	<i>Escherichia coli</i>	Χρήση της γενετικά τροποποιημένης <i>E. coli</i> BL21 (DE3) για έκφραση γονιδίων που βρίσκονται στο πλασμίδιο pET32aB11 για παραγωγή θυροξίνης και της παραθυρεοειδικής ορμόνης	Fu, X.Y. et al. (2005)



Valencene, cubebol, και patchoulol	Αντικαρκινικά, αντικά και αντιμικροβιακά	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ετερόλογη έκφραση γονιδίων φυτικής προέλευσης, μείωση ρυθμού παραγωγής του ERG9 και προσθήκη μεθειονίνης στο θρεπτικό μέσο	Asadollahi, M.A.. (2008)
IgG Αντισώματα	Αντισώματα	<i>Escherichia coli</i>	Έκφραση των αντισωμάτων IgG στο περίπλασμα της <i>E. coli</i> και συνδιασμός τους με Fc-binding πρωτεΐνες στο εσωτερικό τις πλασματικής τους μεμβράνης	Mazor, Y. (2007)
Συκμικό οξύ (Shikimic acid)	Αντικό	<i>Escherichia coli</i>	Ετερόλογη έκφραση της κινάσης της γλυκόζης του <i>Zymomonas mobilis</i>	Chandran, S.S. et al. (2003)



Εικόνα 8: Βιοσυνθετικά μονοπάτια για τη σύνθεση δαπτομυκίνης. Αρχικά, το 128 kb γονίδιο της δαπτομυκίνης (*dpt*) εκφράστηκε στον ετερόλογο ξενιστή *S. lividans*. Για επιπλέον βελτιστοποίηση επισήμανση και καθαρισμό της δαπτομυκίνης το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ακτινοχορδίνης *n* and purification of daptomycin, (*act*) απενεργοποιήθηκε. Το θρεπτικό μέσο βελτιστοποιήθηκε με την προσθήκη σημαντικής ποσότητας φωσφορικών αλάτων. Η γονιδιακή έκφραση της δαπτομυκίνης μπορεί επιπλέον να βελτιωθεί όπως στην περίπτωση του *S. roseosporus*. Τα αμινοξέα στα κόκκινα πλαίσια μεταβάλλονται λόγω αντικατάστασης γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό παράγονται ουσίες όμοιες δομικά και λειτουργικά με τη δαπτομυκίνη όπως: 3,4-DHPAA, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, '4OMT, '3-hydroxy-N-methylcoclaurine-'4-O-methyltransferase, 6OMT, norcoclaurine 6-O-methyltransferase; ADS, amorphadiene synthase, AtoB: acetoacetyl-CoA thiolase, BAC, bacterial artificial chromosome, BBE, berberine bridge enzyme, cDNA of CYP71, CYP71AV1, CNMT, coclaurine-N-methyltransferase, CPR, cytochrome P450 oxidoreductase, CYP80G2, corytuberine synthase, DMAPP, dimethylallyl diphosphate, ERG20, FPP synthase, FPP, farnesyl pyrophosphate, HMGS, HMG-CoA synthase, IDI, IPP-DMAPP isomerase, IPP, isopentenyl diphosphate, MAO, monoamine oxidase, NCS, norcoclaurine synthase, SS, squalene synthase, tHMGR, truncated form of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, TIGR, tunable intergenic regions, (S)-NLDS, (S)-norlaudanoline, (S)-HCL, (S)-30-hydroxycoclaurine, (S)-HNMCL (Lee et al., 2008).

#### 4.4 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων

Τα εναλλακτικά καύσιμα κίνησης για τα μέσα μεταφοράς, αποτελούν αντικείμενο ιδιαίτερης επιστημονικής μελέτης. Η εξάντληση των παγκόσμιων αποθεμάτων πετρελαίου, η ανάγκη για καύσιμα που δεν επιδεινώνουν το πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής, καθώς και η ανάγκη για την μελλοντική εξασφάλιση του πλανήτη σε ενέργεια εντείνουν τις προσπάθειες για αύξηση της παραγωγής βιοκαυσίμων (Stephanopoulos, 2007 και Kerr, 2007).

Σήμερα σε παγκόσμιο επίπεδο, τα βιοκαύσιμα που χρησιμοποιούνται περισσότερο, είναι η αιθανόλη που προέρχεται από άμυλο καλαμποκιού ή από ζαχαροκάλαμα και το βιοντίζελ που παράγεται από φυτικά έλαια ή ζωικά λιπαρά (Fortman et al, 2008). Παρόλα αυτά η αιθανόλη δεν θεωρείται ως το ιδανικό καύσιμο, αφού παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα που σχετίζονται τόσο με τη δυσκολία στην αποθήκευσή της όσο και με τη διανομή της, λόγω της μεγάλης υγροσκοπικότητάς και διαβρωτικότητάς της (Stephanopoulos, 2007 και Atsumi et al. 2008). Το βιοντίζελ εμφανίζει παρόμοια μειονεκτήματα μιας και αφενός δεν μπορεί με ευκολία να μεταφερθεί στους διαθέσιμους αγωγούς και αφετέρου η αξιοποιήσιμη ενέργεια του είναι κατά 11% λιγότερη από ότι στο πετροντίζελ.



Εικόνα 9: Διαφημιστική καμπάνια προώθησης βιοκαυσίμων ([www.fullflex.co.uk](http://www.fullflex.co.uk))

Συνεχώς, τα τελευταία χρόνια, κερδίζει έδαφος η παραγωγή βιοκαυσίμων από λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά μέσα σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Το ξύλο, το γρασίδι, τα διάφορα γεωργικά και δασικά υπολείμματα που είναι άφθονα στη φύση και δύνανται να βιοανικοδομηθούν, αποτελούν τις κύριες πηγές λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά αποτελούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό (30-60%) από κυτταρίνη (πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από γλυκόζες ενωμένες μεταξύ τους με β 1,4 γλυκοζυτικούς δεσμούς), σε ποσοστό 20-40% από ημικυτταρίνες (πολυμερή αποτελούμενα από πεντόζες και εξόζες) και λιγνίνη (φαινολικό πολυμερές) σε ποσοστό 10-30%. Η συγκέντρωση των συστατικών αυτών ποικίλει στις διάφορες πηγές λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Πίνακας 12).

Πίνακας 6: Μέση περιεκτικότητα (%) διαφόρων φυτικών ιστών σε λιγνοκυτταρινούχα συστατικά (Peters, 2007).

Πηγή	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Ξυλεία φυλλοβόλων δέντρων	43-47	25-35	16-24
Ξυλεία κωνοφόρων δέντρων	40-44	25-29	25-31
Σιτάρι	30	50	15
Στελέχη από αραβόσιτο	45	35	15
Βαγγάση (Ζαχαροκαλαμόσχονη)	40	30	20

Η παραγωγή καύσιμων υλών για μέσα μεταφοράς από μικροοργανισμούς, μέσω λιγνοκυτταρινούχων πηγών, παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Η λιγνοκυτταρίνη είναι το πλέον άφθονο βιοπολυμερές στη γη. Ωστόσο λίγοι ζυμωτικοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να παράγουν τα απαραίτητα ένζυμα για την διάσπαση της κυτταρίνης προς γλυκόζη και της ημικυτταρίνες προς πεντόζες. Μέσω της γενετικής τροποποίησης μικροοργανισμών καθίσταται εφικτή η ταυτόχρονη αποδόμηση των σύνθετων υδατανθράκων και η ζύμωση των παραγόμενων ολισακχαριτών και μονοσακχαριτών προς βιοκαύσιμα όπως υδρογόνο, αιθανόλη και μεθάνιο. Ένα άλλο μειονεκτημα της λιγνοκυτταρίνης ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι η σύνθετη δομή της. Η λιγνίνη

που είναι εξαιρετικά δύσκολα αποδομήσιμη πρέπει να διαχωριστεί από τους σύνθετους υδατάνθρακες της λιγνοκυτταρίνης προκειμένου να είναι εφικτές ζυμωτικές διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων υψηλών αποδόσεων. Και πάλι μέσω της γενετικής μηχανικής καθίσταται δυνατή η ενσωμάτωση γονιδίων που παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα (λακάσες, περοξειδάσες κ.λπ.) που οξειδώνουν τους σύνθετους χημικούς δεσμούς της λιγνίνης οδηγώντας στην απαομάκτρωσή της από το πλέγμα της λιγνικυτταρίνης. Επιπλέον μέσω της μεταβολικής μηχανικής, βιοσυνθετικά μονοπάτια μικροοργανισμών μπορούν να τροποποιηθούν με σκοπό την παραγωγή ποικίλων ενώσεων, όπως π.χ οργανικών ενώσεων με ολιγανθρακικές αλυσίδες, αλκοόλες, αλκάνια, αλκένια, εστέρες και αρωματικές ενώσεις, για χρήση τους ως συστατικών βιοκαυσίμων (Ntaikou et al, 2010).

#### **4.4.1 Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας.**

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελεί ένα σημαντικό πόρο που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Η λιγνοκυτταρίνη αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και λιγνίνη.

Η κυτταρίνη είναι πολυμερές της γλυκόζης, αποτελεί το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, καθώς και τον υδατάνθρακα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε βιομάζα φυτικής προέλευσης. Οι ημικυτταρίνες αποτελούνται κυρίως από διακλαδισμένες αλυσίδες πεντοζών και εξοζών ορισμένες από τις οποίες είναι συχνά ακετυλιωμένες. Εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα η οποία σχετίζεται με το είδος των κυττάρων που απαντώνται, καθώς και με το είδος των φυτών στο οποίο απαντώνται τα κύτταρα (Nevoigt, 2008) .

Η λιγνίνη αποτελεί μόριο τρισδιάστατο στο χώρο που σχηματίζεται από φαινυλοπροπανοειδή μεθυλιωμένα ή μη που ενώνονται μέσω αιθερικών ή ανθρακικών δεσμών. Η λιγνίνη παρουσιάζεται ιδιαίτερα ανθεκτική τόσο στις ενζυμικές επιδράσεις βιολογικών συστημάτων όσο και στην επίδραση τη χημικών ενώσεων και είναι υπεύθυνη για τη μηχανική ανθεκτικότητα του ξύλου (Martinez et al., 2005).

Σε αντίθεση με την κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες τα μονομερή της λιγνίνης δεν μπορούν να μετατραπούν σε καύσιμα ή χρήσιμες εμπορικά χημικές ενώσεις μέσω ζυμωτικών διαδικασιών, μπορεί όμως να γίνουν εκμεταλλεύσιμα για την παραγωγή θερμότητας μέσω καύσης καθώς και για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας (Galbe et al., 2007).

Η παρουσία της λιγνίνης σε λιγνοκυτταρινούχες ενώσεις που μετέχουν ως υποστρώματα σε ζυμωτικές διαδικασίες έχει και ορισμένες αρνητικές επιπτώσεις όπως (i) παρεμπόδιση των κυτταρινασών (Chandra et al., 2007) και (ii) παραγωγή φαινολικών υποπροϊόντων που παρεμποδίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη (Ando et al., 1986, Larsson et al., 2000)

Ο ιδανικός μικροοργανισμός για την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα θα πρέπει να μπορεί να υδρολύει πολυμερή σακχάρων, να αξιοποιεί όλα τα μονομερή που μπορούν να υποστούν ζύμωση και να τα μετατρέψει σε αιθανόλη με υψηλή συγκέντρωση και αυξημένη παραγωγή.

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποιος μικροοργανισμός που να συγκεντρώνει όλα αυτά τα χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα ο *S. cerevisiae* που αποτελεί τον πιο κοινό μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται σε ζυμωτικές διαδικασίες για την παραγωγή αιθανόλης δεν μπορεί να διασπάσει υδρολυτικά κυτταρίνες και ημικυτταρίνες. Επιπλέον δεν μπορεί να αξιοποιήσει διάφορες χημικές ενώσεις που παράγονται κατά τη διάρκεια των υδρολυτικών διασπάσεων της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας όπως π.χ την ξυλόζη, την αραβινόζη και τα γλυκουρονικά οξέα.

Ένα επιπλέον πρόβλημα που δημιουργείται κατά την εξέλιξη των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται για τη διάσπαση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων είναι η παραγωγή ουσιών που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των ζυμών. Τέτοιες ουσίες είναι για παράδειγμα διάφορα οργανικά οξέα, φαινολικές ενώσεις και ανόργανα άλατα (Nevoigt, 2008) .

Η τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA μπορεί να μας βοηθήσει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που χρησιμοποιούνται για την ενζυμική διάσπαση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών καθώς και στη δημιουργία μικροοργανισμών κατάλληλων για την πλήρη αξιοποίηση των υλικών αυτών. Επιπλέον θα μπορούσε να συνεισφέρει στην κατανόηση της δράσης εξειδικευμένων ενζύμων όπως οι κυτταρινάσες και οι λιγνάσες και να βοηθήσει στην ανάπτυξη συστημάτων για την οικονομική μετατροπή των ουσιών που απομένουν ως απόβλητα μετά τη μετατροπή της βιομάζας σε προϊόντα με οικονομική αξία. Για να έχουν άριστη εφαρμογή σε επίπεδο βιομηχανικών ζυμώσεων οι κυτταρινάσες θα πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα υπό την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας, να παρουσιάζουν μεγάλη προσροφητική ικανότητα, υψηλή καταλυτική δραστηριότητα και μειωμένη παρεμποδιστική δράση έναντι αντιδράσεων που συχνά οδηγούνται στον τερματισμό με την επίδραση των κυτταρινασών. Για τους λόγους αυτούς θα ήταν επιθυμητό να

πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση γονιδίων με δυνατότητα παραγωγής κυτταρινάσων με συγκεκριμένες ιδιότητες, σε ορισμένους μικροοργανισμούς που λαμβάνουν μέρος σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων βακτηριακής ή μυκητιακής προέλευσης έχει τα τελευταία χρόνια κλωνοποιηθεί στο *E.coli* (Feng et al., 2007, Wulff et al., 2006). Επιπλέον γονίδια που κωδικοποιούν κυτταρινάσες έχουν εκφραστεί αποτελεσματικά και σε μεταβολικά συστήματα και άλλων μικροοργανισμών όπως π.χ *Penicillium crysogenum*, *Trichoderma reesei*, *Pseudomonas Xuorescens* και σε ορισμένες ζύμες (Hong et al., 2007, Hou et al., 2007, Li et al., 2006, Ouyang et al., 2006).

Η κλωνοποίηση και η ανάλυση της αλληλουχίας μια ποικιλίας γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταρινάσες μελλοντικά θα βοηθήσει στην ανάπτυξη καταλληλότερων συστημάτων για την αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων (Kumar, 2008).

#### **4.4.2. Ζυμώσεις και καταβολισμός σακχάρων**

Τα λιγνοκυτταρινικά προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυση φυτικών πρώτων υλών περιλαμβάνουν κυρίως γλυκόζη, ξυλόζη καθώς και μικρές ποσότητες αραβινόζης, γαλακτουρονικού οξέως και ραμνόζης. Για την οικονομική μετατροπή των ενώσεων αυτών σε χημικές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα πρέπει η σύσταση των αντιδρώντων να έχει υψηλή συγκέντρωση μονοσακχαριτών.

Μολονότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης πραγματοποιείται στα κύτταρα των περισσότερων οργανισμών, η ικανότητα των μικροοργανισμών να μεταβολίζουν άλλα σάκχαρα και κυρίως μονοσακχαρίτες, παρουσιάζει μεγάλο εύρος στα διάφορα είδη και για το λόγο αυτό, η κατανόηση του μηχανισμού των μεταβολικών μονοπατιών καταβολισμού μονοσακχαριτών, έχει αποτελέσει σημαντικό στόχο για τους επιστήμονες που ασχολούνται με τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, ιδανικών για παραγωγή βιοκαυσίμων.

Τα γονίδια που ελέγχουν τα μεταβολικά μονοπάτια της ξυλόζης και της αραβινόζης πρόσφατα με μεθόδους της γενετικής μηχανικής ενσωματώθηκαν στο γενετικό υλικό των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* (Hahn-Hagerdal, 2001, Van Maris et al. 2007) και *Zyotomonas mobilis* (Mohagheghi, 2002).

Για την παραγωγή αιθανόλης από μικροοργανισμούς έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες αναφορές (Dien et. al, 2003 Jarboe et. al, 2007). Η *S. cerevisiae*, είναι ο πιο κοινός μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για παραγωγή αιθανόλης. Η *Z. mobilis* χρησιμοποιείται επίσης σε ζυμώσεις για παραγωγή αιθανόλης, όπως άλλωστε και ο άγριος τύπος της *Escherichia coli* που με ζυμωτικές διαδικασίες μετατρέπει σάκχαρα σε ένα μείγμα αιθανόλης και οργανικών οξέων.

Με τη γενετική και μεταβολική τροποποίηση της *E. coli* επιτυγχάνεται αυξημένη παραγωγή καθαρής αιθανόλης μέσω ζυμωτικών διαδικασιών. Ο Ingram και οι συνεργάτες του περιγράφουν τη γενετική τροποποίηση του άγριου τύπου της *E.coli* με τη χρήση του οπερονίου της αιθανόλης (PET) του *Z. mobilis*. Τα στελέχη KO11 που δημιουργήθηκαν είναι κατάλληλα για παραγωγή ενώσεων της ομόλογης σειράς της αιθανόλης σε αυξημένες ποσότητες (Ingram, et al. 1987). Μια βελτιωμένη μορφή αυτού του στελέχους πρόσφατα εξετάστηκε για την ικανότητα του να παράγει αιθανόλη για εμπορικούς σκοπούς (Service, 2007) ενώ ο Kim και οι συνεργάτες του περιγράφουν την ικανότητα του στελέχους SE2378 της *E. coli* παραγωγής σημαντικών ποσοτήτων αιθανόλης μέσω ζυμωτικών διαδικασιών, από πρώτες ύλες γλυκόζη και ξυλόζη (Kim et al., 2007)

Οι ζυμώσεις αποτελούν βασική πηγή παραγωγής πολυάριθμων προϊόντων σχετικών με καύσιμα. Η ποικιλότητα των τελικών προϊόντων των ζυμώσεων, εξαρτάται από τις αντιδράσεις μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέως και μετατροπής του NADH σε NAD. Τα δύο είδη βιοκαυσίων που προκύπτουν από ζυμωτικές διαδικασίες και κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος τα τελευταία χρόνια, είναι το υδρογόνο και η βουτανόλη.

Σύμφωνα με τον Yoshida και τους συνεργάτες του (Yoshida et. al, 2006) πρόσφατα αναλύθηκε η δομή γονιδιώματος ενός στελέχους της *E.coli* ικανού να παράγει ικανοποιητικές ποσότητες υδρογόνου στα τελικά προϊόντα ζύμωσης της γλυκόζης. Στο συγκεκριμένο στέλεχος έχουν αδρανοποιηθεί τα βιοσυνθετικά μονοπάτια lactate- και σουκινικού οξέως και αυτό οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή υδρογόνου λόγω της υπερέκφρασης του συμπλέγματος της λύασης του υδρογόνου (FHL). Το αποτέλεσμα είναι το στέλεχος αυτό να παράγει μεγαλύτερες ποσότητες υδρογόνου σε σχέση με τα άγριου τύπου άτομα (1.82 mol/mol glucose έναντι 1.08 mol/mol glucose).

Η βουτανόλη έχει προταθεί ως το εναλλακτικό καύσιμο για την αιθανόλη μιας και αποδίδει μεγαλύτερα ποσά ενέργειας και είναι λιγότερο υδατοδιαλυτή. Μπορεί να μεταφερθεί μέσω αγωγών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τα

καύσιμα ντίζελ και τη βενζίνη. Παραδοσιακά η βιολογική παραγωγή της βουτανόλης γίνεται από το *Clostridium acetobutylicum*. Το *Clostridium beijerinckii* BA101 χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή βουτανόλης μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού ακετόνη – βουτανόλη – αιθανόλη (ABE) λόγω της μεγάλης του απόδοσης στο συγκεκριμένο βιοκαύσιμο (Ezeji, et al. 2007). Τα περισσότερα από τα στελέχη του *Clostridium* που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως κατά το παρελθόν για παραγωγή βουτανόλης, προήλθαν μέσω διαδικασιών πρόκλησης τυχαίων μεταλλάξεων (Rogers, et al. 2006). Η συνολική παραγωγή βουτανόλης από τα στελέχη *C. beijerinckii* BA101, *C. Acetobutylicum* PJC4BK και *C. acetobutylicum* P260 κυμαίνεται από 25 έως 33 g/L (Ezeji, et al. 2007), ενώ στο *C. beijerinckii* BA101 η παραγωγή είναι 11.9–14.3 g/L (Ezeji, et al. 2005).

Στους μελλοντικούς στόχους των επιστημόνων είναι η αύξηση της παραγωγής βουτανόλης μέσω γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών (σημαντικές έρευνες πραγματοποιούνται σε στελέχη *E. coli* και *S. cerevisiae*) καθώς και η μερική τροποποίηση του μορίου της με σκοπό την ελάττωση της τοξικότητας της.

#### 4.4.2.1 Μεταβολικό μονοπάτι λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από αλυσίδες υδρογονανθρακών οι οποίες καταλήγουν σε μια καρβοξυλική ομάδα. Ανάλογα με τη φύση της ανθρακικής αλυσιδάς τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε κορεσμένα και ακόρεστα. Σήμερα για την παραγωγή βιοντίζελ χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη, κυρίως φυτικά έλαια (Fukuda, et al. 2001). Η τρανσεστεροποίηση λιπαρών οξέων (π.χ μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων: FAME και εθυλεστέρες λιπαρών οξέων: FAEE) οδηγούν στο σχηματισμό οργανικών ενώσεων - βιοκαυσίμων που είναι συμβατές με μηχανές ανάφλεξης με συμπίεση.

Διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια που οδηγούν στη βιοσύνθεση ποικίλων λιπαρών οξέων σε μικροβιακά κύτταρα έχουν μελετηθεί και αναλυθεί επαρκώς (White, et al. 2005). Το μικροβιακό λίπος, γνωστό ως Single cell oil (SCO), αφορά στο λίπος που παραλαμβάνεται από ένα μικροοργανισμό, ενώ παρουσιάζει συνηθέστερα σύσταση ομοιάζουσα με εκείνης των ελαίων φυτικής ή και ζωικής προέλευσης. Η συσσώρευση λίπους δεν επιτελείται από όλους τους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν λίπος πάνω από το 20% της βιομάζας τους ονομάζονται ελαιογόνοι. Οι κύριοι μικροοργανισμοί που παράγουν λίπος είναι οι μύκητες, οι ζύμες και ορισμένα



μικροφύκη.



Εικόνα 10: Δεξαμενές καλλιέργειας μικροφυκών στην Αργεντινή.( Mdr.utn.edu.ar)

Το μικροφύκος *Botryococcus braunii* αποτελεί μια σημαντική πηγή ελαίων, μιας και πάνω από το 40% του ξηρού βάρους του αποτελείται από λιπαρά οξέα (Chisti, 2007). Σε άλλα μικροφύκη παρατηρούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων που κυμαίνονται από 40 έως 70 % της βιομάζας τους.

Μεταβάλλοντας τις συνθήκες καλλιέργειας των μικροφυκών όπως π.χ τη συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> και των αζωτούχων ενώσεων, καθώς και την ένταση του φωτός, η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων μπορεί να αυξηθεί (Metzger and Largeau, 2005).

Για την αύξηση της παραγωγής των λιπαρών οξέων που προορίζονται για βιοκαυσίμα χρησιμοποιούνται επίσης γενετικά ή μεταβολικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί. Παράδειγμα αποτελεί ένα στέλεχος της *E.coli* που λόγω της τροποποίησης πολλών βιοσυνθετικών μονοπατιών του με μεταβολή της ενεργότητας ενζύμων όπως, η καρβοξυλάση του ακέτυλοσυνενζύμου, η συνθάση των λιπαρών οξέων και η θειοεστεράση, αύξησε την παραγωγή ελευθέρων λιπαρών οξέων (Voelker και Davies, 1994). Επίσης, η αύξηση της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων στους μικροοργανισμούς, επιτυγχάνεται και μέσω της μείωσης του ρυθμού καταβολισμού τους. Για την ελάττωση του καταβολισμού των λιπαρών οξέων γονίδια όπως το *yfcYXydiD* στην *E. coli* (Campbell, 2003), και τα *faa1*, *faa2* και *faa3* στο *S. cerevisiae* (Michinaka, 2003) αδρανοποιήθηκαν. Επίσης η απενεργοποίηση τεσσάρων γονιδίων σχετικών με την παραγωγή ουδέτερων λιπιδίων στη *S. cerevisiae* (i.e. *are1*, *are2*, *dga1* και *lrg1*) οδήγησε στο διπλασιασμό της παραγωγής ελευθέρων

λιπαρών οξέων κατά την εκθετική και τη στατική φάση ανάπτυξης των ζυμών (Mullner and Daum, 2004).

#### 4.4.2.2 Μεταβολικό μονοπάτι ισοπρενοειδών

Τα ισοπρενοειδή είναι μια οικογένεια φυσικών προϊόντων που συντίθενται από μονομερή του πυροφωσφορικού ισοπρενηλίου (IPP) και του ισομερούς του, πυροφωσφορικού διμεθυλίου (DMAPP) (Kuzuyama, 2002). Μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των ισοπρενοειδών είναι δυνατό να συντεθούν αλκοόλες, αλκάνια, αλκένια, καθώς και κυκλικοί υδρογονάνθρακες και για το λόγο αυτό εδώ και δεκαετίες, πραγματοποιούνται έρευνες για την παραγωγή βιοκαυσίμων από τα ισοπρενοειδή (Metzger and Largeau, 2005).

Επιπλέον εκτός από τους διακλαδισμένης αλυσίδας υδρογονάνθρακες, το βιοσυνθετικό μονοπάτι των ισοπρενοειδών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ισοπεντανόλης καθώς και του οξικού της εστέρα, ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα καυσίμων, κατάλληλα για μηχανές έναυσης με σπινθήρα (spark ignition) (Hull, 2006).

Πηγές ισοπρενοειδών αποτελούν μεταξύ των άλλων τα μικροφύκη του είδους *B. braunii* που εκτός από μεγάλες ποσότητες ισοπρενοειδών παράγουν και μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων (Banerjee, 2002).

Τα ισοπρενοειδή παράγονται είτε από το ακετυλοσυνένζυμο α μέσω του μεβαλονικού οξέως είτε από το πυροσταφυλικό οξύ και την 3-φωσφογλυκεραλδεύδη μέσω της φωσφατάσης της δεοξειξυλουλόζης (DXP) (Kuzuyama, 2002, Withers και Keasling, 2007).

Πολλές από τις πληροφορίες που σχετίζονται με το σχεδιασμό της παραγωγής βιοκαυσίμων έχουν προκύψει από μελέτες σχετικές με την παραγωγή χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στις φαρμακοβιομηχανίες, όπως π.χ το λυκοπένιο, τα καροτενοειδή, οι στερόλες και το αρτεμισινικό οξύ (Chang και Keasling, 2006). Σημαντική παραγωγή (IPP) έχει επιτευχθεί σε γενετικά τροποποιημένα άτομα *E. coli* και *S. cerevisiae*, και ποικιλία ισοπρενοειδών παράγεται από τα παραπάνω στελέχη (Martin, 2003, Chang, 2007).

Επίσης, πρόσφατες έρευνες αναφέρονται στη δυνατότητα παραγωγής ουσιών μέσω του μεταβολικού μονοπατιού των ισοπρενοειδών που δρουν ως ενισχυτικά ποιότητας στην βενζίνη. Τέτοιες ουσίες για παράδειγμα η ισοεπτανόλη και η

ισομυλαακετάση (Hull, 2006). Για παράδειγμα η πυροφωσφατάση του *Bacillus subtilis* μπορεί να αποφωσφορυλιώσει IPP προς σχηματισμό ισοεπτανόλης (Withers, 2007). Τέλος η ακετυλίωση της ισοεπτανόλης από γενετικά τροποποιημένα στελέχη *E. coli* αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα παραγωγής ουσιών από μικροοργανισμούς χρήσιμων στη βιομηχανία παραγωγής καυσίμων (Horton, 2003 Singh, 2008).

## **5. ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΗΘΙΚΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

Η ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής και οι δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών συνοδεύτηκε από μια σειρά προβληματισμών, οι οποίοι αφορούσαν τις συνέπειες που συνοδεύουν την ανάπτυξη του νέου αυτού επιστημονικού κλάδου. Οι προβληματισμοί δεν περιορίζονται στις πιθανές αρνητικές συνέπειες των εφαρμογών των επιτευγμάτων της γενετικής μηχανικής, τόσο στον άνθρωπο όσο και στο περιβάλλον, αλλά σχετίζονται και με την ανάλυση θεμάτων υπό την σκοπιά της ηθικής. Το ρόλο αυτό αναλαμβάνουν κυρίως επιστήμονες ενός νέου επίσης επιστημονικού κλάδου, αυτόν της Βιοηθικής. Η χρονική περίοδος κατά την οποία εμφανίζεται η Βιοηθική, είναι η δεκαετία του 1960 στις Η.Π.Α (ο όρος βιοηθική προτάθηκε από τον Van Rensselaer Potter το και προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «βίος» και «ηθική»). Την εποχή εκείνη είχαν λειτουργήσει οι πρώτες μηχανές υποστήριξης των νεφροπαθών, οι οποίες όμως ήταν πολύ λίγες με αποτέλεσμα να έπρεπε να αποφασιστεί ποιοι θα κάνουν την θεραπεία και ποιοι όχι. Αυτή την απόφαση πολλοί την συνέκριναν με το να “υποδύεται κάποιος τον θεό”(Κοϊός, 2003). Τότε, δημιουργήθηκε μια επιτροπή από γιατρούς και επιστήμονες από διάφορα επιστημονικά πεδία για να αποφανθεί σχετικά με το παραπάνω ζήτημα. Από το χρονικό σημείο αυτό κι έπειτα άρχισαν να εμφανίζονται επιτροπές βιοηθικής στα νοσοκομεία και τα πανεπιστήμια, να συγγράφονται άρθρα με θέματα που αφορούν την βιοηθική, να ιδρύονται τμήματα σπουδών με περιεχόμενο βιοηθικού προβληματισμού, αρχικά στις ιατρικές σχολές και αργότερα σε φιλοσοφικές σχολές. Το 1969 ιδρύεται στις Η.Π.Α το Hasting Center, το πρώτο ινστιτούτο βιοηθικών μελετών. Στον ελληνικό χώρο δημιουργήθηκε το 1998 η Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής, η οποία λειτουργεί ως συμβουλευτικό όργανο της πολιτείας για τα θέματα αυτά.

### **5.1 Ασφάλεια χρήσης γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών**

Οι προβληματισμοί που σχετίζονται με την ασφάλεια της χρήσης των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών είναι πολυάριθμοι και απόλυτες απαντήσεις σχετικές με το θέμα, ακόμη και αν στηρίζονται σε έρευνες και επιστημονικά δεδομένα είναι δύσκολο να δοθούν. Στη συνέχεια αναφέρονται ορισμένοι μόνο από

τους πιθανούς κινδύνους που ελοχεύουν από τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών.

**Γονίδια ανθεκτικότητας:** ένας από τους φορείς μεταφοράς γενετικού υλικού σε μικροοργανισμούς είναι τα πλασμίδια. Συχνά όμως τα πλασμίδια εκτός από το γονίδιο ή τα γονίδια που βοηθούν στη βελτίωση των ιδιοτήτων των μικροοργανισμών φέρουν και γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Έτσι οι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί πέραν των νέων ιδιοτήτων που αποκτούν, γίνονται και ανθεκτικοί απέναντι σε αντιμικροβιακές ουσίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί να εμφανίζονται πιο ανθεκτικοί σε σχέση με τους μικροοργανισμούς άγριου τύπου από τους οποίους προήλθαν. Η ενδεχόμενη απελευθέρωση (σκόπιμη ή τυχαία) του γενετικά τροποποιημένου μικροοργανισμού στη φύση, πιθανών να έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση του, έναντι του άγριου τύπου.

**Βιοποικιλότητα:** βιοποικιλότητα καλείται το πλήθος των διαφορετικών έμβιων όντων ενός οικοσυστήματος και σχετίζεται άμεσα με την ισορροπία του. Οι ζωντανοί οργανισμοί ενός οικοσυστήματος είτε ανώτεροι, είτε μικροοργανισμοί κατάφεραν να επικρατήσουν στους διάφορους βιοτόπους και να συμβάλλουν στην ισορροπία τους. Η απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών σε ένα βίοτοπο πιθανών να έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση τους έναντι των υπολοίπων, με αποτέλεσμα την ανατροπή της οικολογικής ισορροπίας της περιοχής, που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στην κατάρρευση του οικοσυστήματος.

**Αλλεργίες:** οι γενετικά ή μεταβολικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών καθώς και στις φαρμακοβιομηχανίες παράγουν συχνά κύρια ή δευτερεύοντα προϊόντα που η μοριακή σύνθεσή τους διαφέρει από αυτή, που παράγουν οι άγριου τύπου μικροοργανισμοί ή οι ανώτεροι μικροοργανισμοί από τους οποίους προέρχονται τα γονίδια. Αυτό μπορεί να έχει ως πιθανό αποτέλεσμα τη δημιουργία αλλεργικών αντιδράσεων.

**Κόστος:** Η αύξηση της παραγωγής και η ελάττωση του κόστους για τις βιομηχανικές μονάδες από τη χρήση ενζύμων από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς δεν συνοδεύτηκε από την παράλληλη ελάττωση της τιμής των προϊόντων για τον καταναλωτή. Αντίθετα οι μονάδες παραγωγής αύξησαν το κέρδος τους και μετατράπηκαν σε οικονομικούς κολοσσούς, με αποτέλεσμα να αυξήσουν την ισχύ

τους και να αποκτήσουν ηγετικό ρόλο στη ρύθμιση του εμπορίου που σχετίζεται με προϊόντα, στον οποίων την παραγωγή εμπλέκονται γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί. Η πιθανή δημιουργία μονοπωλίων σε ορισμένους τομείς θα αφήσει απροστάτευτο και πιθανών χωρίς δυνατότητα επιλογής τον καταναλωτή.

**Αναδιανομή γενετικού υλικού:** τα βακτηριακά πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα, να ανταλλάσσουν αυτόματα γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους όσο και με το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου, καθώς και να μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε άλλο. Η απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών στο περιβάλλον (π.χ για την απορρύπανση εδαφών ή υδάτων) πιθανών να οδηγήσει στην ανταλλαγή τροποποιημένου γενετικού υλικού μεταξύ των γ.τ βακτηρίων και βακτηρίων άγριου τύπου που αναπτύσσονται στο φυσικό περιβάλλον. Σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα σχετίζονται με το σημείο ένθεσης του γενετικού υλικού και πιθανών σε ορισμένες περιπτώσεις να δημιουργηθούν γονιδιακά προϊόντα με αρνητική δράση, απέναντι στον άνθρωπο και το περιβάλλον.

## **5.2 Η στάση των πολιτών απέναντι στους γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς**

"Η γενετική", γράφει ο Steve Jones, "έχει γίνει για τον κοινό νου ένα υποκατάστατο θρησκείας, ένα δόγμα πίστεως. Έτσι, ανάλογα με τις κλίσεις των εκάστοτε πιστών της παρουσιάζεται άλλοτε ως κατάρα και απειλή και άλλοτε ως επαγγελία και λύτρωση" (Jones, 1998). Οι πολίτες σήμερα εμφανίζονται άλλοτε απόλυτα θετικοί και άλλοτε κάθεται αρνητικοί απέναντι στη χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών. Στον Πίνακα 13 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα έρευνας που διεξήχθη στην ευρωπαϊκή ένωση σχετικά με την αποδοχή των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών ή των προϊόντων τους από τους πολίτες διάφορων ευρωπαϊκών κρατών (Gaskell, 2000). Στον πίνακα φαίνεται πως σχεδόν στο σύνολο τους οι πολίτες είναι θετικοί απέναντι στους γ.τ που σχετίζονται με την παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών, ενώ η στάση τους διαφοροποιείται τελείως στα προϊόντα που σχετίζονται με τη διατροφή. Μπορεί λοιπόν κάποιος να διαπιστώσει πως το ορατό όφελος (όπως στην περίπτωση των φαρμάκων) διαμορφώνει θετική στάση, ενώ το μη ορατό όπως στην περίπτωση της χρήσης μικροοργανισμών στην βιομηχανία τροφίμων, δημιουργεί αμφιβολίες και στην περίπτωση που συνοδεύεται από έλλειψη ενημέρωσης, φόβο απέναντι στους πιθανούς κινδύνους που μπορεί να κρίβει η κατανάλωση των προϊόντων.

Πίνακας 7. Η στάση των ευρωπαίων πολιτών απέναντι στους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.

Country Rank (1996)		Negative		Positive			
Austria	Greece	F	Ca	C Ch	B M	---	G Greece
Germany	Austria	---	F C	Ca	Ch B M G	---	--- Austria
Sweden	Luxemburg	---	F C	Ca	B Ch	G M	--- Luxemburg
Denmark	Sweden	---	F	Ca C	B Ch	G M	--- Sweden
Luxemburg	Denmark	---	F	C Ca	---	Ch B G M	--- Denmark
Ireland	Ireland	---	---	F Ca C	Ch	M B G	--- Ireland
Netherlands	United Kingdom	---	---	F C Ca	Ch	B M G	--- United Kingdom
United Kingdom	Germany	---	---	F Ca	C Ch	G M B	--- Germany
France	Belgium	---	---	F C Ca	B	Ch M G	--- Belgium
Belgium	France	---	---	F Ca C		M B Ch	G France
Greece	Italy	---	---	F Ca	C	Ch B M	G Italy
Italy	Netherlands	---	---	F Ca	C	Ch M B	G Netherlands
Finland	Portugal	---	---	F	Ca	C M B	Ch G Portugal
Spain	Finland	---	---	---	Ca F C	M B G	--- Finland
Portugal	Spain	---	---	---	F Ca	C	Ch B M G Spain

F: γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο, C: γενετικά τροποποιημένοι σπόροι, Ch: κλωνοποίηση κυττάρων ανθρώπινων ιστών, Ca: κλωνοποίηση ζώων, B: βιομετατροπές, G: γενετικά τεστ και M: φάρμακα

## 6. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια τα ενζυμικά συστήματα έχουν ένα πλήθος εφαρμογών, τόσο σε επίπεδο βιομηχανικό (χημικές βιομηχανίες, βιομηχανίες τροφίμων, βιομηχανίες υφασμάτων κ.α), όσο και σε επίπεδο βιομεταρποών που πραγματοποιούνται σε φυσικά περιβάλλοντα.

Η βιομηχανία τροφίμων είναι ο τομέας με τη μεγαλύτερη κατανάλωση ενζύμων. Περισσότερα από τα μισά ένζυμα προέρχονται από ζύμες, ενώ τα ένζυμα βακτηριακής προέλευσης αντιστοιχούν στο 30% περίπου της συνολικής παραγωγής. Τα ένζυμα που προέρχονται από φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς αντιστοιχούν στο 12% της συνολικής παραγωγής.

Σήμερα, με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής παρασκευάζονται ένζυμα που ανταποκρίνονται απόλυτα στις απαιτήσεις του κάθε βιομηχανικού κλάδου που σχετίζεται με τις ζυμώσεις. Έτσι οι βιομηχανικές ζυμώσεις δεν εξαρτώνται πλέον απόλυτα από ένζυμα που προέρχονται από φυσικές πηγές.

Η διαδικασία έγκρισης των ενζύμων από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς διαφέρει μεταξύ Η.Π.Α και χωρών Ευρωπαϊκής με τις πρώτες να εμφανίζονται πιο ελαστικές. Μάλιστα όσον αφορά την Ευρώπη δεν έχουν ακόμη εκδοθεί λίστες ενζύμων που θεωρούνται ασφαλή για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων.

Πέραν των σημαντικών πλεονεκτημάτων που προκύπτουν από τη χρήση των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, υπάρχει και έντονος προβληματισμός για την ασφάλεια χρήσης των προϊόντων που προκύπτουν από αυτούς. Έτοιμες λύσεις δεν υπάρχουν στα μεγάλα ερωτήματα που θέτουν οι βιοτεχνολογικές εξελίξεις και φυσικά ούτε η βιοηθική έχει έτοιμες απαντήσεις. Η ηθική όμως μαζί με τη σωστή πληροφόρηση μπορούν να μας προφυλάξουν από τη σύγχυση, την άγνοια και την αδράνεια και να μας μετατρέψουν σε υπεύθυνους πολίτες, με γνώση απέναντι στα βασικά πεδία ενός νέου επιστημονικού κλάδου, της γενετικής μηχανικής.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ando, S., I. Arai, K. Kiyoto, and S. Hanai. 1986. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Technol. 64:567–570.
- Ahmad, S.K., Brinch, D.S., Friis, E.P., Pedersen, P.B. (2004). Toxicological studies on lactose oxidase from *Microdochium nivale* expressed in *Fusarium venenatum*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 39: 256–270
- Asadollahi, M.A. (2008). Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. Biotechnol. Bioeng. 99: 667–677
- Atsumi, S., Hanai, T., Liao, J.C. (2008). Non-fermentative pathways for
- Bailly, C., Waring, M. (2001). Use of DNA molecules substituted with unnatural nucleotides to probe specific drug-DNA interactions, Methods Enzymol., 340: 485-502
- Bains, W. (1998). Biotechnology from A to Z 2<sup>nd</sup> edition. Oxford university press.
- Bajpai, P., Anand, A., Sharma, N., Lachenal, D. (2006). Enzymes in ECF bleaching of pulp. Bioresources. 1:34 - 44
- Banerjee, A. (2002). *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. Crit. Rev. Biotechnol. 22: 245–279
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. (2000). Yeasts: Characteristics and identification. 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge University Press.
- Bertasso, M., Holzenkämpfer, M., Zeek, A., Dall'Antonia, F., Fiedler, H. (2001). Bagremycin A and B, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. Tü 4128. J. Antibiot. 54: 730-736
- Bertasso, M., Holzenkämpfer, M., Zeek, A., Stackebrandt, E., Beil, E., Fiedler, H. (2003). Ripromycin and other polycyclic macrolactams from *Streptomyces* sp. Tü 6239: taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. J. Antibiot. 56: 364-371
- Blattner, F.R. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277: 1453–1462
- Blinkovsky, A.M., Byun, T., Brown, K.M., Golightly, E.J. (1999). Purification, characterization, and heterologous expression in *Fusarium venenatum* of a novel serine carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3298–3303
- Blinkovsky, A.M., Byun, T., Brown, K.M., Golightly, E.J., Klotz, A.V. (2000). A non-specific aminopeptidase from *Aspergillus*. Biochim. Biophys Acta 1480: 171–181.
- Blum, S., Fiedler, H., Groth, I., Kempter, C., Stephan, S., Nicholson, C., Metzger, J., Jung, G. (1995). Biosynthetic capacities of actinomycetes. Echinoserine, a new member of the quinoxaline group, produced by *Streptomyces tendae*. J. Antibiot. 48: 619-625
- Chandra, R. P., R. Bura, W. E. Mabee, A. Berlin, X. Pan, and J. N. Saddler. 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of

- lignocellulosics? Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 108:67–93
- Campbell, J.W. (2003). A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic betaoxidation pathway. Mol. Microbiol. 47: 793–805
- Carter, O.A., Peters, R.J., Croteau, R. (2003). Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. Phytochemistry 64: 425–433
- Chandran, S., Yi, J., Draths, K.M., Von Daeniken, R., Weber, W., Frost, J.W. (2003). Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. Biotechnol. Prog. 19: 808–814
- Chang, M.C., Keasling, J.D. (2006). Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. Nat. Chem. Biol. 2: 674–681
- Chassagnole, C., Rais, B., Quentin, E., Mazat, J.P. (2001). An integrated study of threonine -- pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli*. Biochem J. 356: 415- 423
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25, 294–306
- de Boer, A.S., Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 1-4
- de Boer, A.S., Priest, F., Diderichsen, B. (1994). On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 595-598
- Demain, A. Induction of microbial secondary metabolism. International Microbiol. (1998). 1: 259–264
- Demain, A., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances. 27: 297-306
- Dequin S., Baptista, E., Barre, P. (1999). Acidification of grape musts by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains genetically engineered to produce lactic acid. Am. J. Enol. Vitic. 50:45-50
- Dien, S., Cotta, M., Jeffries, T. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63: 258–266
- Ezeji, T.C. (2005). Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. J. Biotechnol. 115: 179–187
- Ezeji, T.C. (2007) Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Curr. Opin. Biotechnol. 18: 220–227
- Feng Y, Duan CJ, Pang H, Mo XC, Wu CF, Yu Y, Hu YL, Wei J, Tang JL, Feng JX (2007) Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. Appl Microbiol Biotechnol 75:319–328
- Fiedler, H.P., Nega, C. Pfefferle, I., Groth, C., Kempter, H., Stephan, J.W. (1996). Kanchanamycins, new polyol macrolide antibiotics produced by *Streptomyces olivaceus* Tü 4018. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J. Antibiot. 49: 758-764

- Flamm, E.L. (1991). How FDA approved chymosin: a case history. *Bio/Technology* 9: 349–351
- Fleet, G.H. (1993). *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur
- Fortman, J.L., Chhabra, S., Mukhopadhyay, A., Chou, H., Lee, T.S., Steen, E., Keasling, J.D. (2008). Biofuels alternatives to ethanol: pumping the microbial well. *Trends Biotechnol.* 26:375-381
- Fu, X.Y. (2005). Extracellular production of human parathyroid hormone as a thioredoxin fusion form in *Escherichia coli* by chemical permeabilization combined with heat treatment. *Biotechnol. Prog.* 21: 1429–1435
- Fukuda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405–416
- Galbe, M., P. Sassner, A. Wingren, and G. Zacchi. 2007. Process engineering economics of bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108:303–327.
- Gaskell, G. (2000). Agricultural Biotechnology and public attitudes in the European Union. *AgBioForum.* 3:87-96
- Gebhardt, K., Pukall, R., Fiedler, H.P. (2001). Streptocidins A-D, novel cyclic decapeptide antibiotics produced by *Streptomyces* sp. Tü 6071. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* 54: 428-433
- Gonzalez-Candelas, L., Cortel, A., Ramon, D. (1995). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing a fungal pectate lyase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 126: 263-269
- Gordon, C., Thomas, S., GriVen, A., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., Wiebe, M.G. (2001). Combined use of growth rate correlated and growth rate independent promoters for recombinant glucoamylase production in *Fusarium venenatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 194: 229–234
- Gottshalk, G. (1986). Bacterial fermentations. In: *Bacterial Metabolism*. New York Inc, Springer-Verlag. 237-239
- Gutterres, M., Dettmer, A., Amaral, L., Souza, F., Sousa, M. (2009). Applications of Biotechnology in Leather. *Aaqtic 2009 Proceedings*
- Hahn-Hagerdal, B. (2001). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73: 53–84
- Heinzmann, S., Karl-Dieter, E., Stein, T. (2006). Engineering *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for improved production of the lantibiotic subtilin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 532–536
- Hodgson, J. (1994). The changing bulk biocatalyst market. *Bio/Technology.* 12:789-90

- Höltzel, A., Kempter, J.W., Metzger, G., Jung, I., Groth, T., Fiedler, H.P. (1998). Spirofungin, a new antifungal antibiotic from *Streptomyces violaceusniger* Tü 4113. *J. Antibiot.* 51: 699-707
- Höltzel, A., Süssmuth, R.W., Jack, G.J., Nicholson, K., Fiedler, H.P. (2001). Streptocidins A-D, novel cyclic decapeptide antibiotics produced by *Streptomyces* sp. Tü 6071. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* 54: 434-440
- Holzenkämpfer, M., Walker, A., Zeeck, J., Fiedler, H.P. (2002). Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. II. Structure elucidation and biosynthesis. *J. Antibiot.* 55: 301-307
- Hong J, Wang Y, Kumagai H, Tamaki H (2007) Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J Biotechnol* 130:114–123
- Hou Y, Wang T, Long H, Zhu H (2007) Cloning, sequencing and expression analysis of the *Wrst* cellulase gene encoding cellobiohydrolase I from a cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Acta Biochim Biophys Sin* 39:101–107
- Horton, C.E. (2003). Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase genes in *Clostridium acetobutylicum* and *Escherichia coli* for the production of isoamyl acetate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 427–432
- Hull, A. (2006). An alternative fuel for spark ignition engines. *Int. J. Eng. Res.* 7: 203–214
- Ingram, L., Conway, T., Clark, D., Sewell, G., Preston, J. (1987). Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2420–2425
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T., Dijkstra, B.W. (2002). Directed evolution to create enantioselective biocatalysts. *ASM News.* 68: 556-62
- Jarboe, L., Grabar, T., Yomano, L., Shanmugan, K., Ingram, L. (2007). Development of ethanologenic bacteria. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108: 237–261
- Jones, S. (1998). In the Genetic Toyshop. *New York Review of Books Vol. XLV.* 7:14
- Jung, W.S., Sang, K.L., Jay, S. J., Sung, P., Soon, J., Ah, R. H., Jae, K. S., Byung, G. K., Cha, Y. C., David, H. S., Yeo, J.Y. (2006). Heterologous expression of tylosin polyketide synthase and production of a hybrid bioactive macrolide in *Streptomyces venezuelae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 763–769
- Kerr, R. A. (2007). Global warming is changing the world. *Science.* 316:188-190
- Kim, Y., Ingram, O., Shanmugam, T. (2007). Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanologenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1766–1771
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T., Kubicek, C.P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7755–7760

- Kuzuyama, T. (2002) Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1619–1627
- Landry, T.D., Chew, L., Davis, J.W., Frawley, N., Foley, H.H., Stelman, S.J., Thomas, J., Wolt, J., Hanselman, D.S. (2003). Safety evaluation of an  $\alpha$ -amylase enzyme preparation derived from the archaeal order *Thermococcales* as expressed in *Pseudomonas xuorescens* biovar I.Regul. *Toxicol. Pharmacol.* 37: 149–168
- Larsson, S., A. Quintana-Sainz, A. Reimann, N. O. Nilvebrant, and L. J. Jonsson. 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86:617–632.
- Lee, H.Y., Khosla, C. (2007). Bioassay-guided evolution of glycosylated macrolide antibiotics in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 5: 45-55
- Lee, HY., Kim, H., Park, J., Park, J., Kim., T. (2008). Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug discovery today.* 14: 78-88
- Li, R., Townsend, C.A. (2006). Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metab. Eng.* 8: 240–252
- Li YH, Ding M, Wang J, Xu GJ, Zhao F (2006) A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulosedegrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:430–436
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000). Effect of increased alcohol acetyltransferase activity on flavour profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol.* 66: 744-753
- Liu, N., Li, L., Sands, J., Zhang, S., Ru, Y. (2007). Efficacy of Phytases on Egg Production and Nutrient Digestibility in Layers Fed Reduced Phosphorus Diets. *Poult. Sci.* 86:2337-2342
- Machida, M. et al., 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature.* 438: 1157–1161
- Maier, A., J. Müller, P., Schneider, H.-P., Fiedler, I., Groth, F.S.K., Tayman, F., Teltschik, C., Günther, G. (1999). (2E,4Z)-Decadienoic acid and (2E, 4Z, 7Z)-decatrienoic acid, two herbicidal metabolites from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 6105. *Pestic. Science.* 55: 733-739
- Martin, F., Castro, M., Aboulela, F., Tinoco, I. (1985). Base-Pairing Involving Deoxyinosine - Implications for Probe Design, *Nucleic Acids Res.*, 13: 8927-8938.
- Martin, V.J. (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21: 796–802
- Martinez, A. T., M. Speranza, F. J. Ruiz-Duenas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillen, M. J. Martinez, A. Gutierrez, and J. C. del Rio. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of

- the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8:195–204.
- Mazor, Y. (2007). Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 25: 563–565
- Metzger, P., Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 486–496
- Michinaka, Y. (2003). Extracellular secretion of free fatty acids by disruption of a fatty acyl-CoA synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 435–440
- Michnick, S., Roustan, J.L., Remize, F., Barre, P., Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast.* 13: 783-793
- Miller, J.D., MacKenzie, S. (2000). Secondary metabolites of *Fusarium venenatum* strains with deletions in the *Tri5* gene encoding trichodiene synthetase. *Mycologia.* 92: 764–771
- Minami, H., Ju sung, K., Ikezawa, N., Takemura, T., Katayama, T., Sato, F. (2008). Microbial production of plant benzyloisoquinoline alkaloids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 7393–7398
- Mohagheghi, A. (2002). Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 885–898
- Mullner, H., Daum, G. (2004). Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim. Pol.* 51: 323–347
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 433–446
- Nguyen, K.T. (2006). Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 17462–17467
- Nguyen, K.T., Nguyen, L.T., Behal, V. (1995). The induction of valine dehydrogenase activity from *Streptomyces* by L-valine is not repressed by ammonium. *Biotechnol Lett.* 17:31–34
- Nielsen, P.H., Malmos, H., Damhus, T., Diderichsen, B., Nielsen, H.K., Simonsen, M., Oestergaard, A., Olsen, H.S., Eigtved, Nielsen, P. (1994). Enzyme applications (industrial). In: fourth ed. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 9. John Wiley & Sons, Inc, New York, pp. 567–620

- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G. (2010) Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste and Biomass Valorization* 1(1): 21-39
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Casper, H.H. (1998). Molecular phylogenetic, morphological and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genet. Biol.* 23: 57–67
- Olempska-Beer, Z., Robert, M., Ditto, M., Diovi, M. (2006). Food processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45: 144–158
- Ouyang J, Yan M, Kong D, Xu L (2006) A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol J* 1:1266–1274
- Paulsen, I.T. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23: 873–878
- Pedersen, P.B., Bjdrnvad, M.E., Rasmussen, M.D., Petersen, J.N. (2002). Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36: 155–161
- Penn, J. (2006). Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 121–128
- Perez-Gonzalez, J.A., Gonzalez, R., Querol, A., Sendra, J., Ramon, D. (1993): Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2801-2806
- Peters, D. (2007). Raw materials. *Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology.* 105: 1-30
- Rius, N., Maeda, K., Demain, A. (1996). Induction of L-lysine  $\epsilon$ -aminotransferase by L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. *FEMS Microbiol. Lett.* 144: 207–211
- Rogers, P. et al. (2006) Organic acid and solvent production. In *The Prokaryotes* (Dworkin, M., ed.), pp. 511–755, Springer
- Sánchez, C.L., Zhu, A.F. (2005). Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 461–466
- Schimana, J., Fiedler, H.P., Groth, R., Süßmuth, R., Beil, M., Walker, A. (2000). Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 53: 779-787
- Schimana, J., Gebhardt, J., Müller, A., Höltzel, D.G., Schmid, R., Süßmuth, R., Fiedler, H.P. (2002). Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiotics* 55: 565-570
- Schimana, J., Walker, A., Zeeck, H. (2001). Simocyclinones: diversity of metabolites is dependent on fermentation conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 144-148

- Schoeman, H., Vivier, M.A., Du Toit, M., Dicks, L.M.T., Pretorius, I.S. (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647-656
- Service, R.F. (2007). Cellulosic ethanol: biofuel researchers prepare to reap a new harvest. *Science*. 315: 1488–1491
- Shime, J. (1999). Applications of Biocatalysis to Industrial Processes. *J. Chem. Educ.* 76:16-48
- Simonen, M., Palva, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57: 109–137
- Soares, R.J, Ueda, E., Oliveira, T., Heller, S., Bartolini, E. (2008). Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: temperature plays a major role in protein yields. *J. Biotechnol.* 133: 27–35
- Sommer, P.S.M., Almeida, R., Beil, W., Süßmuth, R., Fiedler, R. (2008). Nataxazole, a new benzoxazole derivative produced by *Streptomyces* sp. Tü 6176. *J. Antibiot.*, submitted for publication
- Song, Z., Cox, R.J., Lazarus, C.M., Simpson, T.J., (2004). Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *ChemBio- Chem.* 5: 1196–1203
- Stephanopoulos, G. (2007). Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*. 315:801-804
- Sybesma, W., Hugenholz, J., Vos, W., Smid, E. (2006). Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 Vol.9. No.4  
synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*. 451:86-89.
- Textor, A., Papastavrou, I., Siewert, I., Magull, J., Kulik, A., Fiedler, H., Zezschwitz, P., Grond, S. (2007). Spridionic acid, a novel metabolite from *Streptomyces* sp., part 1: structure elucidation and Diels-Alder-type biosynthesis. *Chem. Eur. J.* 13: 7416-7423
- Van Hartingsveldt, W., Van Zeijl, C.M, Harteeld, G.M., Gouka, R., Suykerbuyk, M.E. (1993). Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene*. 127:87-94
- Van Maris, A.J., Winkler, A.A., Kuyper. (2007). Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108: 179–204
- Vasseur-Godbillon, C. (2006). High-yield expression in *Escherichia coli* of soluble human alpha-hemoglobin complexed with its molecular chaperone. *Protein Eng. Des. Sel.* 19: 91–97
- Voelker, T.A., Davies, H.M. (1994). Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase. *J. Bacteriol.* 176: 7320–7327



- Wada, Y. (2006). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* producing nicotianamine: potential for industrial biosynthesis of a novel antihypertensive substrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 1408–1415
- Wang, C.V., Oh, M.C., Liao, J.C. (1999). Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 235–241
- Wiebe, M.G., (2002). Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 421–427
- Withers, S.T., Keasling, J.D. (2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 980–990
- Withers, S.T. (2007). Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6277–6283
- Woodye, D., Zengyi, S., Paul, T., Kelleher, N., Blodgett, J., Metcalf, W., Donk, A., Zhao, H. (2006). Heterologous production of fosfomycin and identification of the minimal biosynthetic gene cluster. *Chem. Biol.* 13: 1171–1182
- Wulff NA, Carrer H, Pascholati SF (2006) Expression and purification of cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 53:198–203
- Yoder, W.T., Christianson, L.M., (1998). Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. Taxonomic status of the edible “Quorn” fungus reevaluated. *Fungal Genet. Biol.* 23: 68–80
- Yoon, S., Ju, K., Sook, L., Hye, P., Myung, C., Jae, K., Si, L., Yong, C., Jay, D., Seon, K. (2007). Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 131–139
- Yoshida, A. (2006). Enhanced hydrogen production from glucose using ldh- and frd-inactivated *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 67–72
- Yun, C, Wei, D., Jiequn, W., Jiangchao, Q., Ju, C., Yingping, Z., Siliang, Z., Wen, L. (2008). Genetic modulation of the overexpression of tailoring genes eryK and eryG leading to the improvement of erythromycin A purity and production in *Saccharopolyspora erythraea* fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1820–1828
- Zhang, Z. (2004). A new strategy for the synthesis of glycoproteins. *Science.* 303: 371–373
- Αλεπόρου-Μαρίνου, Β., Αργυροκαστρίτης, Α., Κομητοπούλου, Α., Σγουρίτσα, Β. (1997). Βιολογία. Αθήνα, Οεδβ.
- Γεωργάτσος, Ι. (1991). Ενζυμολογία. Εκδόσεις Γιαχούδη –Γιαπούλη. Θεσσαλονίκη.
- Κοϊός, Ν. (2003). Ηθική θεώρηση των Τεχνικών Παρεμβάσεων στο Ανθρώπινο Γονιδίωμα. Αθήνα, Σταμούλη.
- Κολιάης, Σ. (1992). Μικροβιολογία. Θεσσαλονίκη, University studio press.
- Κουγιουνού-Κουτσούκου, Σ., Μοσχονάς, Ν., Κομητοπούλου, Κ., Παπασιδέρη, Ι., Λεγάκις, Τ. (1997). Βιολογία και στοιχεία βιοτεχνολογίας. Αθήνα, ΟεδβΟΕΔΒ.

Μουστάκα, Γούνη, Μ. (1997). Ωκεανογραφία μια βιολογική προσέγγιση. Θεσσαλονίκη, Exin.