



Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2017 – 2020, 3. odpiranje, za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

1. Polni naslov projekta:

Od betakarotena do zeaksantina: bakterije kot zelene tovarne antioksidantov

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni KLASIUS-P-16 se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovo:

07 - Tehnika, proizvodne tehnologije in gradbeništvo

2. V sodelovanju z:

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Acies Bio d.o.o.

3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

Zeaksantin je biotehnološko zanimiva tarčna molekula. Vse več raziskav potrjuje njegovo pomembno vlogo za zdravje človeka, saj deluje kot antioksidant. Zaradi strmega naraščanja svetovnega povpraševanja po zeaksantinu se povečuje nujna potreba po novih in izboljšanih sistemih sinteze te molekule. Zeaksantin iz betakarotena pretvarja encim betakaroten hidroksilaza (BCH), ki jo najdemo pri fotosintetskih organizmih od bakterij do rastlin. Rešitev za pretvorbo betakarotena v zeaksantin nam ponuja torej že narava, kar pa ne pomeni, da je že encim dokončno optimiran za opravljanje te pretvorbe. Glavna problema, ki onemogočata enostavno izrabo procesa sinteze zeaksantina v bakterijah, sta dva: prvi je vsebinski in ga predstavlja nizka stopnja pretvorbe betakarotena v zeaksantin, drugi pa je tehničen in povezan z načinom detekcije nastalega produkta v celicah ter z zasnovo eksperimenta. Tako betakaroten kot zeaksantin sta v maščobah topni molekuli, ki imata enak barvni spekter, kar pomeni, da za določevanje njunih koncentracij ne moremo uporabiti detekcijskih metod na osnovi spektrometrije. Uvesti smo morali sistem, ki bo omogočal enostavno ter učinkovito izvedbo večjega števila presejalnih testov z namenom identifikacije bakterijskega seva z najboljšim izkoristkom sinteze zeaksantina pod zelenimi eksperimentalnimi pogoji.

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

Projekt smo razdelili na pet aktivnosti v skladu z doseganjem ciljev projekta. Te so bile:

1. Priprava bakterijskih celic *Escherichia coli*, ki bodo proizvajale betakaroten.
2. Izbor, priprava in vnos zapisa za encim betakaroten hidroksilazo v *E. coli*.
3. Razvoj metode za spremljanje količine betakarotena in zeaksantina v celicah *E. coli*.
4. Karakterizacija in optimizacija pretvorbe betakarotena v zeaksantin.
5. Analiza najbolj obetavnih optimiranih sistemov, prenos iz laboratorijske na pilotno serijo.

Pri vsaki od teh aktivnosti je sodeloval vsaj en študent, ki je bil odgovoren za izvedbo in doseg rezultatov. Tekom dela so študentje med seboj tudi sodelovali, saj so si aktivnosti med seboj tako metodološko kot tudi vsebinsko povezane. Delo je sicer vključevalo več različnih metodoloških pristopov (molekularna biologija, biotehnologija, mikrobiologija, kemijsko inženirstvo), ki so jih študentje uporabljali za doseg ciljev posameznih aktivnosti.

- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

Rezultati projekta:

1. Pripravili smo bakterijske celice *Escherichia coli*, ki so proizvajale betakaroten.

To smo naredili tako, da smo v celice vnesli rekombinantno pripravljen vektor, ki je vseboval zapise za štiri encime, ki jih bakterija potrebuje, da sintetizira betakaroten. Količina sintetiziranega betakarotena je znašala nekaj mg/liter bakterijske kulture. V primerjavi s celicami, ki ne proizvajajo beta karotena, so bile te vidno oranžno obarvane.

2. Izbrali in pripravili smo vnos zapisa za encim betakaroten hidroksilazo v *E. coli*.

Da bi iz betakarotena lahko dobili zeaksantin potrebujemo encim betakaroten hidroksilazo (CrtZ). Izbrali smo CrtZ iz organizma *Erwinia herbicola*. S tehnikami molekularne biologije smo zapis pomnožili in ga vstavili v različne vektorje, ki so omogočali izražanje tega encima pod različnimi pogoji. Ugotovili smo, da naš encim uspešno pretvarja betakaroten v zeaksantin, ki se kopiči v membranah celic.

3. Razvili smo metodo za spremljanje količine betakarotena in zeaksantina v celicah *E. coli*.

Zaradi prej omenjene problematike spektrofotometričnega določanja koncentracij betakarotena in zeaksantina v celicah smo morali optimizirati: (i) čas in pogoje rasti bakterij za največjo količino obeh molekul v celicah, (ii) ekstrakcijo obeh molekul iz membran celic, (iii) detekcijo. Ugotovili smo, da se največ obeh molekul kopiči v stacionarni fazi rasti, ter da se najbolje ekstrahirajo z metanolom in detektirajo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

4 in 5. Karakterizirali in optimizirali smo pretvorbo betakarotena v zeaksantin, ter analizirali najbolj obetavne optimirane sisteme.

Da bi še povečali količino sintetiziranega zeaksantina v celicah, smo uporabili dva pristopa: naključno mutagenozo celic in dodatek zapisa za protein GSTP1, ki je topen citosolen protein in lahko veže zeaksantin. Za naključno mutagenozo smo uporabili obsevanje celic, ki že sintetizirajo zeaksantin, s svetlobo UV in pa določanje vsebnosti z metodo HPLC. V drugem primeru pa smo naročili sintezni gen *gstp1*, ki smo ga vstavili v vektor, ki omogoča konstitutivno izražanje tega proteina v celicah, ki proizvajajo zeaksantin. Medtem ko bistvenih razlik pri obsevanih in neobsevanih celicah (torej mutageneza z naključnim pristopom) ni bilo, pa smo z uvedbo proteina GSTP1 ustvarili celice, ki ne samo proizvajajo več zeaksantina, temveč ga izražajo tudi v citoplazmo, kar bistveno olajša izolacijo te molekule in predstavlja nov koncept za pripravo teh barvil. Prenosa na pilotno skalo v podjetju Acies Bio žal zaradi razmer o omejevanju stikov nismo izvedli.

Doprinos k družbeni koristnosti:

Razvili in optimizirali smo način sinteze tako betakarotena kot zeaksantina, dveh molekul, ki postajata vse bolj pomembni v prehrabeni ter kozmetični industriji tako kot končna molekula kot tudi kot vir za nadaljnjo sintezo drugih molekul z visoko biološko vrednostjo. Naš način sinteze poteka v bakterijskih celicah in ne vključuje uporabe topil in kemikalij. To pomeni, da smo s tem pristopom pokazali, da se da sintezo izvesti na trajnosten ter okolju prijazen način. Poleg tega je naš pristop odprl možnosti za dodatne načine izrabe takšnih produktov z nizkim energetskega odtisom. Uporaba le-teh bi lahko odprla nova delovna mesta in hkrati tudi povečala dodano vrednost takšnih proizvodov.