

ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ 3 ΚΑΙ 4

Κουτίνας Αθανάσιος
Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστημίου Πατρών

Διατροφικά χαρακτηριστικά και rDNA technology

- (i) Η ανάπτυξη οργανισμών με υψηλής διατροφικής αξίας συστατικά αλλά και με βιοϊατρική σημασία είναι στόχος των ερευνητών
- (ii) Έτσι είναι δυνατή η αύξηση σε πρώτες ύλες τροφίμων του β-καροτενίου , των **ω-3** λιπαρών οξέων, μεταβολιτών που δρουν εναντίον ιών ή μεταβολιτών με αντιθρομβωτικές και διουρητικές ιδιότητες
- (iii) **ω-3** λιπαρά οξέα όπως λινολενικό οξύ, εικοσιπεντενοϊκό οξύ και docosaexaenoϊκό οξύ μειώνουν την στεφανιαία νόσο και τα τριγλυκερίδια στο αίμα. Δημιουργούνται οι προσταγλανδίνες που συνδέονται με τα αγγεία, τις αρθρώσεις και το δέρμα
- (iv) Γενετική μετάλλαξη της Canola για αύξηση της απόδοσης σε έλαιο λόγω μεγάλης περιεκτικότητας λινελαϊκού και λινολενικού οξέος
- (v) Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκανών στη βρώμη Avena Sativa μειώνει την χοληστερόλη

Χαρακτηρισμός και τροποποίηση πρωτεϊνών του αραβοσίτου

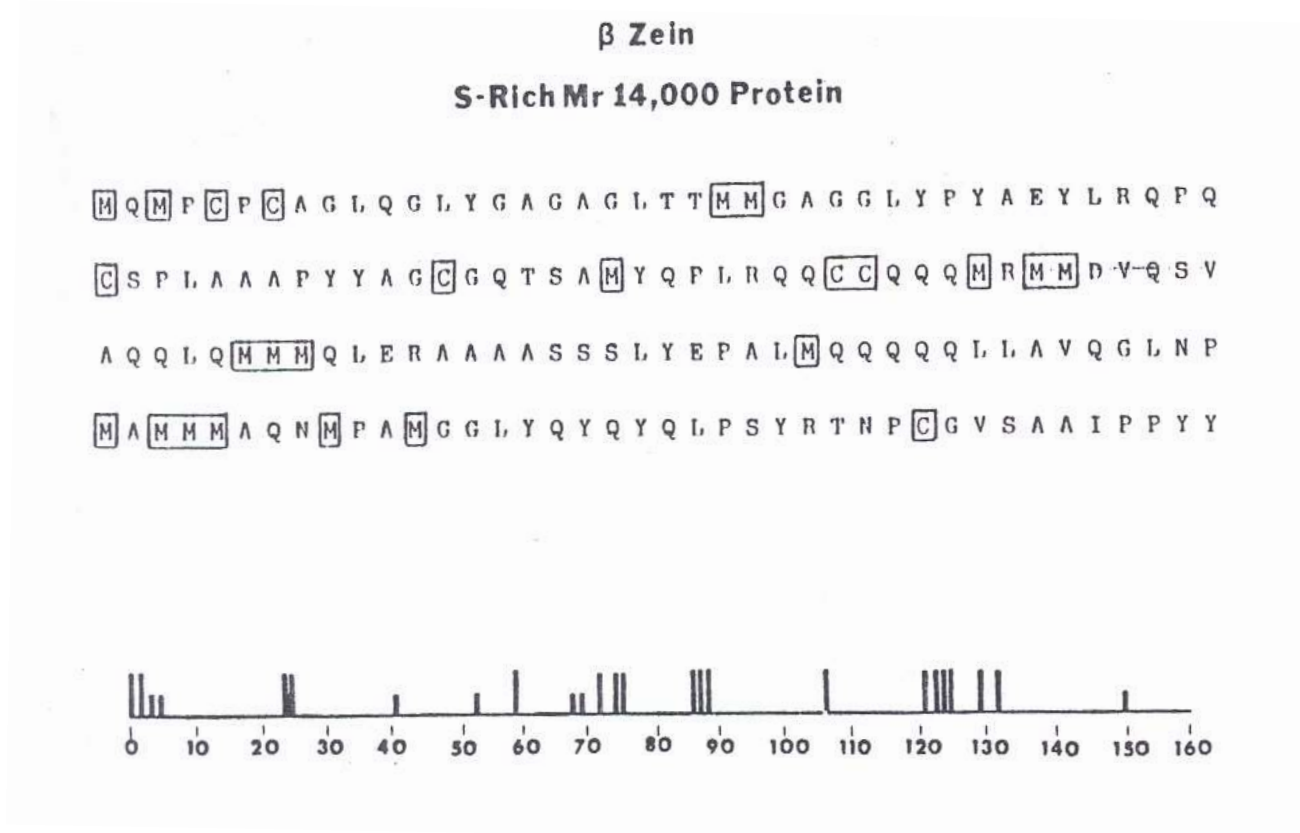
- (i) Οι πρωτεΐνες των δημητριακών δεν περιέχουν λυσίνη και θρυπτοφάνη απαραίτητα αμινοξέα, ενώ των όσπριων δεν περιέχουν μεθειονίνη και λυσίνη
- (ii) Στις ζωοτροφές η έλλειψη αυτή αντιμετωπίζονταν με την προσθήκη των αμινοξέων αυτών στα σιτηρέσια
- (iii) Το πρόβλημα της έλλειψης απαραίτητων αμινοξέων μπορεί να αντιμετωπιστεί με γενετική μηχανική γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των δημητριακών και των οσπρίων
- (iv) Έτσι τα γονίδια αυτά έχουν απομονωθεί και έχει διευκρινιστεί η ακολουθία των αμινοξέων (sequence). Με ανάπτυξη vectors και μεθόδων μετάλλαξης των φυτών έχει γίνει γίνει η σχετική τροποποίηση των δημητριακών
- (v) Η τροποποίηση των γονιδίων θα πρέπει να γίνεται έτσι ώστε τα αμινοξέα που εισέρχονται στη sequence να μην αλλάζουν τη σύσταση και το ποσοστό της πρωτεΐνης στο δημητριακό

Ζεΐνες του αραβοσίτου

- (i) Είναι οι διαλυτές πρωτεΐνες του αραβοσίτου στην αλκοόλη και αποτελούν το 50% των πρωτεϊνών του ενδοσπερμίου
- (ii) Εκχυλίζονται με 70% αιθανόλη
- (iii) Διακρίνονται σε αλφα (60%) με 22,000 και 19,000 Mr, βήτα (Mr 14,000), γάμμα (Mr 27,000 και 16,000), δέλτα (Mr 10,000)
- (iv) Η αλφα ζεΐνη καταλήγει σε μια αμινοομάδα στο τέλος μιας αλύσου με 40 αμινοξέα που ενώνεται με οκτώ επαναλαμβανόμενα πεπτίδια των 20 περίπου αμινοξέων το καθένα . Τα επαναλαμβανόμενα πεπτίδια διπλώνουν μέσα σε μια μεγαλύτερης διαμέτρου ράβδο και έτσι σχηματίζουν την άλφα έλικα

Ζείνες του αραβοσίτου

- (i) Η βήτα ζείνη είναι πλούσια σε αμινοξέα που περιέχουν θείο. Δεν έχει επαναλαμβανόμενα πεπτίδια και έχει πρωτοταγή (Primary) στερεοδομή



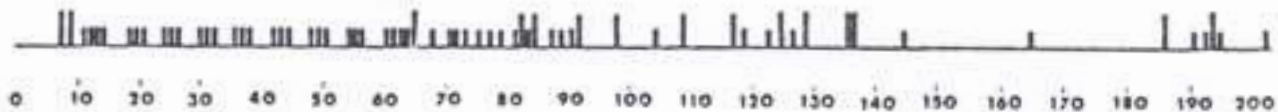
Ζεΐνες του αραβοσίτου

- (i) Η δομή της γάμα ζεΐνης διακρίνεται από τη σημαντική περιεκτικότητα προλίνης. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα το μισό μόριο έχει περισσότερο από 50% προλίνη
- (ii) Η δομή της πρωτεΐνης είναι πρωτοταγής και στο παρακάτω σχήμα στην οριζόντια γραμμή οι μεγαλύτερες κάθετες γραμμές δίνουν την κυστεΐνη και οι μικρότερες την προλίνη

γ Zein
Proline-Rich Mr. 27,000 Protein

```

T N T S G G [C] [C] Q P P P P V H L P P P V H L P P P V H L P P P V H
L P P P V H L P P P V H L P P P V H L P P P V H L P P P P [C] H Y P T
Q P P R P Q P H P Q P H P [C] P [C] Q Q P H P S P [C] Q L Q G T [C] G V G S
T P I L G Q [C] V E F L R H Q [C] S P T A T P Y [C] S P Q [C] Q S L R Q Q [C]
[C] Q Q L R Q V E P Q H R Y Q A I F G L V L Q S I L Q Q Q P Q S G Q V
A G L L A A Q I A Q Q L T A H [C] G L Q Q P T P [C] P Y A A A G G V P H
    
```



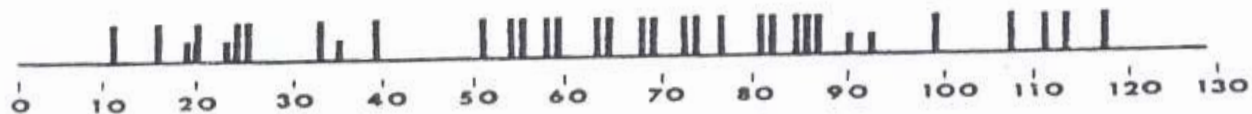
Ζεΐνες του αραβοσίτου

- (i) Η δέλτα ζεΐνη είναι πλούσια σε μεθειονίνη και κυστεΐνη όπως συμβαίνει και στη βήτα ζεΐνη. Η μεθειονίνη στη δέλτα ζεΐνη είναι πολύ συχνότερη από την κυστεΐνη στην αλληλουχία των αμινοξέων
- (ii) Η δέλτα ζεΐνη έχει πρωτοταγή δομή και στο φάσμα των αμινοξέων που δίνεται με την οριζόντια γραμμή στο κάτω σχήμα οι μεγαλύτερες κάθετες γραμμές δίνουν τις θέσεις της μεθειονίνης και οι μικρότερες της κυστεΐνης

δ Zein

Methionine-Rich Mr 10,000 Protein

T H I P G H L P P V **M** P L G T **M** N P **C** **M**
Q Y **C** **M** **M** Q Q G L A S L **M** A **C** P S L **M** L
Q Q L L A L P L Q T **M** P V **M** **M** P Q **M** **M** T
P N **M** **M** S P L **M** **M** P S **M** **M** S P **M** V L P S
M **M** S Q **M** **M** **M** P Q **C** H **C** D A V S Q I **M** L
Q Q Q L P F **M** F N P **M** A **M** T I P P **M** F L
Q Q P F V G A A F



Ζεΐνες του αραβοσίτου

Συμπεράσματα για τη δομή των ζεινών

- (i) Οι πρωτεΐνες του αραβοσίτου έχουν τα απαραίτητα αμινοξέα μεθειονίνη, κυστεΐνη και προλίνη σε σχετικά μεγάλα ποσοστά**

- (ii) Η μεθειονίνη είναι το απαραίτητο αμινοξύ που απαντά στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις πρωτεΐνες του αραβοσίτου**

- (iii) Η άλφα ζεΐνη το μοναδικό απαραίτητο αμινοξύ που περιέχει sequense είναι η λυσίνη**

- (iv) Τα απαραίτητα αμινοξέα που απαντούν στις πρωτεΐνες του αραβοσίτου είναι η μεθειονίνη, η κυστεΐνη, η προλίνη και η λυσίνη**

- (v) Ο αραβόσιτος δεν έχει σημαντική περιεκτικότητα απαραίτητων αμινοξέων και υπολείπεται σε διατροφική αξία σημαντικά από το κρέας**

Protein engineering στην αλφα ζεΐνη

- (i) Οι ζεΐνες έχουν μικρή περιεκτικότητα λυσίνης που είναι αμινοξύ σημαντικής διατροφικής αξίας για τα θηλαστικά ζώα, των οποίων η διατροφή έχει βιομηχανοποιηθεί για την παραγωγή γάλακτος και κρέατος**

- (ii) Επειδή οι ζεΐνες αποτελούν το 50% των πρωτεϊνών του αραβοσίτου, ο οποίος δεν έχει μεγάλη θρεπτική αξία στο βαθμό που αυτή επηρεάζεται από τις πρωτεΐνες του**

- (iii) Για την βελτίωση της περιεκτικότητας των ζεΐνων προτάθηκε η τροποποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεσή τους. Τροποποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την αλφα ζεΐνη έτσι ώστε να εισαχθεί η λυσίνη σε επι πλέον θέσεις στη sequense της πρωτεΐνης**

Βελτιώσεις σε **ω-3** λιπαρά οξέα των φυτών

- **ω-3**



α-λινολενικό οξύ

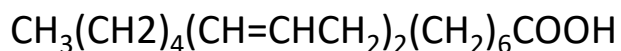


εικοσιπεντενοϊκό οξύ



εικοσιδυ-εξενοϊκό οξύ

- **ω-6**



λινολεϊκό οξύ

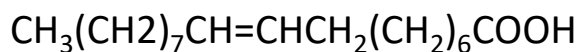


γ-λινολενικό οξύ

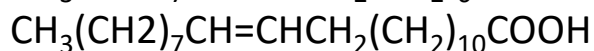


αραχιδονικό οξύ

- **ω-9**



ελαϊκό οξύ



ερουκικό οξύ

Πολυακόρεστα και υγεία

- (i) Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν εξαφάνιση της στεφανιαίας νόσου στους Εσκιμώους, επειδή η διατροφή τους ήταν ψάρια , φάλαινα και φώκια
- (ii) Η σύγκριση ακορέστων λιπαρών οξέων των ψαριών με εκείνα των φυτικών ελαίων έδειξε ότι η διατροφή με ψάρια μειώνει 30-60% την χοληστερίνη και η χοληστερίνη που είναι ενωμένη με High Density Lipoprotein(HDL) περιέχονταν αποκλειστικά στο αίμα
- (iii) Η θετική επίδραση των ιχθυελαίων στην υγεία αποδίδεται στην παρουσία του εικοσιπεντενοϊκού οξέος (20:5) και του εικοσιδυεξενοϊκού οξέος (22:6) τα οποία δεν περιέχονται στα φυτικά έλαια
- (iv) Τα θαλασσινά μικροάλγη παράγουν τα παραπάνω ακόρεστα οξέα των ιχθύων. Συνεπώς για να παράγουν η σόγια και ο αραβόσιτος τα οξέα αυτά θα πρέπει να εισάγουμε το ένζυμο από τα άλγη που θα βιομετατρέψει τις πρόδρομες ενώσεις των λιπαρών οξέων στα παραπάνω πολυακόρεστα οξέα
- (v) Η εισαγωγή του κατάλληλου ενζύμου μπορεί να γίνει με recombinant DNA technology

Πολυακόρεστα και υγεία

- (i) Μοναδική πηγή για ω -3 λιπαρά οξέα είναι τα ιχθυέλαια. Λόγω όμως ότι βρέθηκαν να περιέχουν PCB κρίθηκαν ακατάλληλα για κλινικές μελέτες. Έτσι χρειάζεται ένα φυτικό έλαιο Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με γενετική τροποποίηση μεταφέροντας γονίδια από τα μικροάλγη στη σόγια και τον αραβόσιτο

Μικροάλγη	% λιπαρά οξέα		% Εικοσιπεντενοϊκό οξύ	
	Στη βιομάζα	σε λιπίδια	στη βιομάζα	
<i>Cyclotella cryptica</i>	10.6	23.8	2.5	
<i>C.cryptica, N.deficient</i>	29.6	10.0	3.0	
<i>Phaeodactylum tricornatun</i>	9.2	26.9	2.5	
<i>P. tricornatun, N deficient</i>	21.3	11.4	2.4	
<i>Cylindrotheca fysisiformis</i>	24.4	7.2	1.8	
<i>Navicula pelliculosa</i>	25.4	9.0	2.3	
<i>Nitzschia angularis</i>	7.7	24.7	2.2	

Βιοσύνθεση πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων σε μικρο-άλγη

(i) Οι Mead and Willis το 1988 σχεδίασαν την βιοσυνθετική οδό στα μικρο-άλγη.

(ii) Το λινολενικό οξύ των γλυκεριδίων με την επίδραση της delta-6-desaturase δημιουργεί ένα επιπλέον διπλό δεσμό και γίνεται 18:4. Αυτό αυξάνει σε μεγαλύτερο μόριο 20:4 με το άκυλο-συνένζυμο-A. Μετά έχουμε οξειδωση με το ένζυμο delta-5-desaturase προς εικοσιπεντενοϊκό οξύ



(iii) Το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA) σχηματίζεται στα μικρο-άλγη από πρόδρομες ενώσεις που υπάρχουν στους ελαιούχους σπόρους όπως στα rare seed. Έτσι ο οργανισμός αυτός είναι η πηγή για το γενετικό υλικό της μετάλλαξης ενός παραγωγικού φυτού

(iv) Η βιοσυνθετική οδός στα μικροάλγη για EPA είναι μια επέκταση εκείνης της σόγιας και του αραβοσίτου για μικροτέρας αλύσου λιπαρά οξέα

(v) Η μετάλλαξη της σόγιας μπορεί να γίνει με την απομόνωση και εισαγωγή τριών γονιδίων που κωδικοποιούν την delta-5 και delta-6 desaturases αλλά και το ένζυμο που αυξάνει την

Πολυ-γαλακτουρονάση της τομάτας και **σωματοτροπίνη**

- (i) Το ένζυμο αυτό υδρολύει τις πολυγαλακτουρονικές αλυσίδες των πηκτινών σε μικροτέρου μοριακού βάρους με αποτέλεσμα την απώλεια δυναμικών μηχανικών ιδιοτήτων και την ωρίμανση των φρούτων και των λαχανικών.
- (ii) Η καθυστέρηση της ωρίμανσης απαιτεί την αποφυγή της υδρόλυσης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μετάλλαξη της πρωτεΐνης του ενζύμου για μείωση της καταλυτικής της δράσης
- (iii) Η σωματοτροπίνη είναι μια πρωτεΐνη με 191 αμινοξέα και η δράση της εστιάζεται στη ναάπτυξη των οστών και στη συγκράτηση του αζώτου.
- (iv) Η χοιροτροφία είναι ο κλάδος της βιομηχανίας του κρέατος όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αύξηση του κρέατος με μειωμένο λίπος
- (v) Η τεχνολογία αυτή θα βελτιωθεί με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του Drug delivery

Genetic engineering για τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου

- (i) Το αιθυλένιο των φυτικών ιστών προωθεί την καταλυτική δράση των ενζύμων που καταλύουν τις μεταβολικές οδούς της ωρίμανσης των φρούτων και των λαχανικών
- (ii) Η βιοσύνθεση του αιθυλενίου συνδέεται με τη συνθάση αμινοκυκλοπρόπανο -1-καρβοξυλικό οξύ που έχει απομονωθεί από την τομάτα
- (iii) Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την κλωνοποίηση γονιδίων που επηρεάζουν τη σύνθεση και τη δραστηριότητα του αιθυλενίου
- (iv) Το αιθυλένιο που παράγεται ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ένζυμα που καταλύουν τις βιοχημικές δράσεις της ωρίμανσης
- (v) Περιβαλλοντικά stress αυξάνουν πολύ το αιθυλένιο και χειροτερεύουν αντί να βελτιώνουν την ωρίμανση. Έτσι τα επίπεδα του αιθυλενίου πρέπει να ελεγχθούν.
- (vi) Οι χημικές ενώσεις που παράγουν αιθυλένιο έχουν αποκλειστεί από τη γεωργική παραγωγή λόγω της τοξικότητάς τους

Ρυθμίσεις στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου

- (i) Η βιοσύνθεση του αιθυλενίου περιλαμβάνει την μετατροπή της **S-αδενοσύλο-L-μεθειονίνης** σε ενδιάμεση ένωση **1-αμινοκυκλοπρόπανο-1-καρβοξυλικό οξύ**. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο **1-αμινοκυκλοπρόπανο-1-καρβοξυλικό οξύ συνθάση**
- (ii) Στη συνέχεια η ενδιάμεση ένωση οξειδώνεται σε αιθυλένιο με ένζυμο που σχηματίζει αιθυλένιο
- (iii) Ο σχηματισμός της ενδιάμεσης ένωσης είναι και το καθορίζον την ταχύτητα στάδιο και ο ρυθμός του μηχανισμού εξαρτάται από την συγκέντρωση του αντίστοιχου ενζύμου και τη δραστηριότητά του
- (iv) Η ρύθμιση του ενζύμου σε ότι αφορά τη συγκέντρωσή του και της δραστηριότητάς του μας κάνει να ελέγχουμε τα επίπεδα του αιθυλενίου και κατά συνέπεια την ταχύτητα της ωρίμανσης των φρούτων και λαχανικών
- (v) Η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί το παραπάνω ένζυμο συνθάση οδηγεί σε διάφορες στρατηγικές ρύθμισης σχηματισμού αιθυλενίου. Η εισαγωγή γονιδίου που παρεμποδίζει την παραγωγή του παραπάνω ενζύμου συνθάση οδηγεί στο delay of softening

Γενετική τροποποίηση για βελτίωση ενζύμων της βιομηχανίας τροφίμων

- (i) Οι τροποποιήσεις οργανισμών έχουν σαν στόχο την αύξηση της παραγωγής των ενζύμων αλλά και την αλλαγή της δομής τους**
- (ii) Ένζυμα που έχουν παραχθεί με τροποποίηση και έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων είναι οι καρβοϋδρασες, πρωτεάσες και λιπάσες**
- (iii) Η παγκόσμια κατανάλωση ενζύμων στη βιομηχανία τροφίμων είναι το 70% της συνολικής και οι ΗΠΑ παράγαν στην δεκαετία του 1980 το 60%**
- (iv) Η παραγωγή ενζύμων σε Ευρώπη και Ιαπωνία μπήκε πλέον δυναμικά στην αγορά**

Γενετική μηχανική στην παραγωγή ενζύμων

- (i) Στόχοι μεταλλαγών σε ένζυμα που η
 - (1) παραγωγή ενζύμου με γνωστές εφαρμογές είχε μεγάλο κόστος(α-αμυλάση, ρενίνη)
 - (2) Παραγωγή ενζύμου για γνωστές εφαρμογές
 - (3) Παραγωγή τροποποιημένου ενζύμου για νέες εφαρμογές

- (ii) Θερμικά σταθερή(105-110) α-αμυλάση ελήφθη από το *Bacillus stearothermophilus* και *Bacillus megaterium* και γίνεται οικονομικά συμφέρουσα επειδή το ανασυνδυασμένο ένζυμο αυξάνει την απόδοση σε γλυόζη, την ταχύτητα υδρόλυσης, δίνει μικρότερη συγκέντρωση ολιγομερών

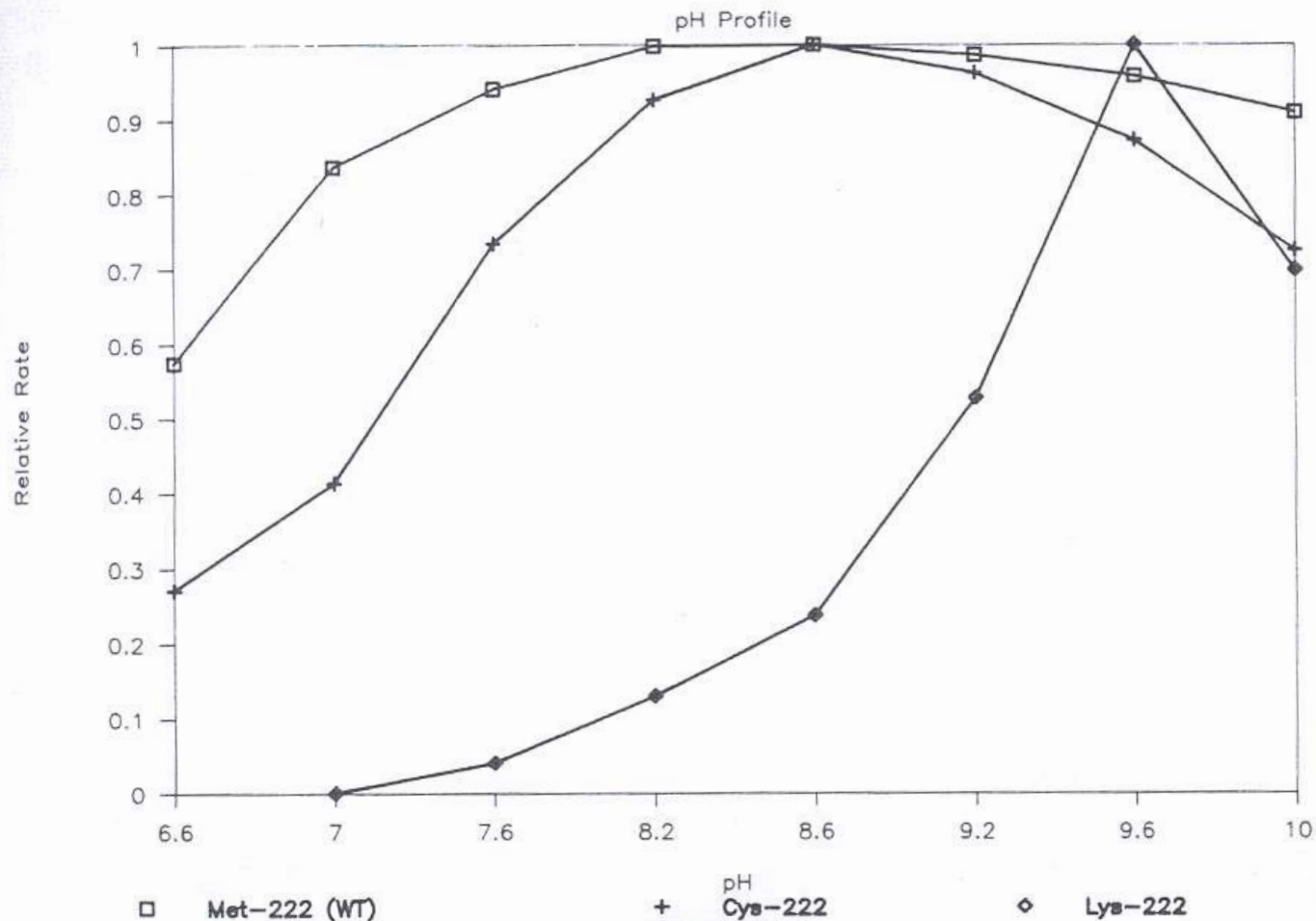
- (iii) Το *Bacillus subtilis* δεν παράγει α-αμυλάση και έχει μεταλαχθεί με μεταφορά γονιδίου α-αμυλάσης από το *B. stearothermophilus*. Όμως η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν χαμηλή 1.5g/L και το ένζυμο βρήκε χρήση λόγω αυξημένης δραστηριότητας

- (iv) Μετάλλαξη του *Bacillus subtilis* με μεταφορά γονιδίου από το *B. megaterium* έδωσε συγκέντρωση ενζύμου 23 g/L

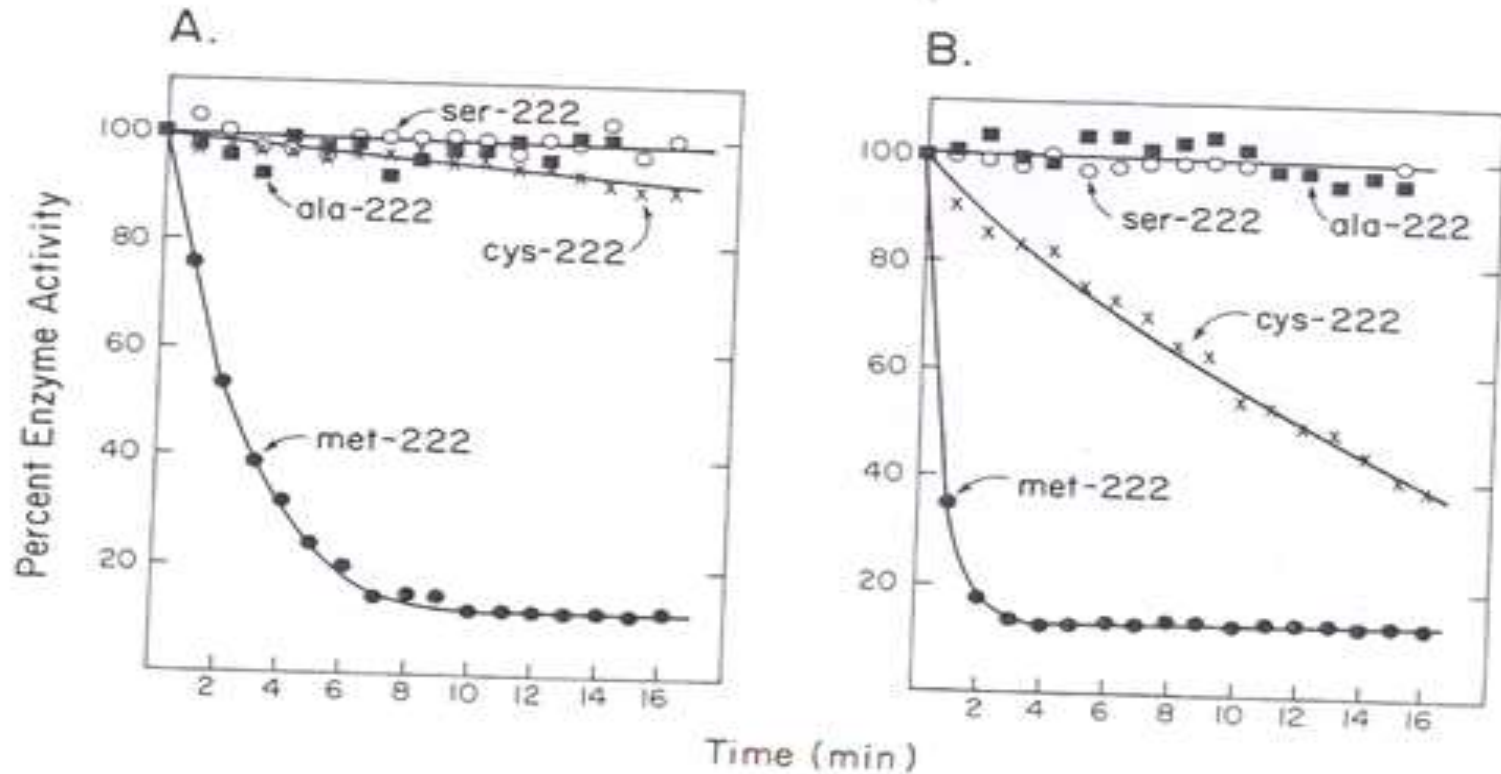
- (v) Αύξηση της παραγωγής της ρενίνης έγινε με μετάλλαξη μικροοργανισμών όπως *Aspergillus awamori*, *S.cerevisiae*, *E. coli*

Τροποποιημένα ένζυμα για γνωστές εφαρμογές

- (i) Η σουμπιλισίνη είναι βακτηριακή πρωτεάση που τροποποιήθηκε με στόχο τη βελτίωση της από το ένζυμο καταλυομένης αντίδρασης στο ίδιο pH. Αυτό επετεύχθη με αλλαγή του επιφανειακού ηλεκτρικού φορτίου του ενζύμου μετά από αντικατάσταση αμινοξέος



Τροποποιημένα ένζυμα για γνωστές εφαρμογές



Οι λιπάσες τροποποιούνται δύσκολα. Μια τροποποίηση είναι για λιπάση του βακτηρίου *Pseudomonas* με στόχο την υδρόλυση και την μεθανόλυση του γλυκεριδίου τριοκτανοΐνη με αντικατάσταση αμινοξέος στη θέση 127 και πέτυχαν την εαλλαγή της νουκλεόφιλης εξειδίκευσης του ενζύμου

Τροποποιημένα ένζυμα για γνωστές εφαρμογές

- (i) Για τροποποίηση ενζύμου για νέα χρήση να πληρούνται οι προϋποθέσεις:
 - (1) Το νέο ένζυμο να είναι νομικά αποδεκτό και αποδοχή στην αγορά . (2) Επιτυχής ανάπτυξη της τεχνολογίας τροποποίησης του ενζύμου και (3) να οδηγεί σε GRAS προϊόν

- (ii) Έρευνα για να αποδειχθεί ότι το ένζυμο είναι ασφαλές προϊόν περιλαμβάνει: (1) Μελέτη ασφάλειας για τον μικροοργανισμό απ' όπου παράγεται, (2) τοξικολογική έρευνα για το ένζυμο και (3) εξέταση της φυσικοχημικής σταθερότητας

- (iii) Η μελέτη της ασφάλειας του μικροοργανισμού περιλαμβάνει: (α) απόδειξη χαμηλής τοξικότητας, (β) να μην παράγει αντιβιοτικές ουσίες και (γ) μυκοτοξίνες , (δ) το ένζυμο να μην περιέχει κύτταρα.

- (iv) η τοξικολογική έρευνα για το ένζυμο περιλαμβάνει : (α) την LD-50, (β) Την χορήγηση του ενζύμου σε ποντίκια και (γ) σκυλιά χωρίς τοξική επίδραση, (δ) Την επανάληψη των β και γ, (ε) την εξέταση μεταλλαξιογένεσης σε σαλμονέλα (στ) την κυτταρογενετικότητα σε ποντίκια χωρίς επίδραση στα χρωμοσώματα. (ζ) Η χορήγηση σε πειραματόζωα να μην δίνει τερατογενέσεις. Η εξέταση της **φυσικοχημικής σταθερότητας** περιλαμβάνει την διαρροή του ενζύμου από μακροπορώδεις ιοντοανταλλακτικές ρητίνες

Στόχοι για τροποποίηση ενζύμων

Χημική ουσία	Στόχοι
Φυτικά έλαια	Αύξηση του βαθμού βιοϋδρογόνωσης των ακορέστων χωρίς αύξηση της οξύτητας
Γλυκερίδια	<ul style="list-style-type: none">i) Υδρόλυση τριγλυκεριδίων για Παρασκευή μόνο-και δι-γλυκεριδίων που χρησιμοποιούνται σαν βελτιωτικά στα τρόφιμα.(ii) Ελεγχόμενη σύνθεση γλυκεριδίων από γλυκερίνη και λιπαρά οξέαiii) Ελεγχόμενη αλλαγή ακυλίου για τροποποίηση γλυκεριδίων
Λίπος βουτύρου	Ελεγχόμενη ανάκτηση από σογιέλαιο για να πετύχουμε δραστικότητα βιοδιασπώμενης επιφανειοδραστικής ουσίας.
Λεκιθίνη	Ελεγχόμενη ανάκτηση από σογιέλαιο για να πετύ-χουμε δραστικότητα βιοδιασπώμενης επιφανειοδραστικής ουσίας
Πηκτίνες	Η εστεροποίηση ελευθερων πλευρικών καρβοξυλομάδων των πηκτινών ενώ ταυτόχρονα να αποφεύγουμε την απομάκρυνση των μεθόξυ ομάδων
Κόμμεα γουάρ	Εισαγωγή ή απομάκρυνση πλευρικών αλύσων με α-D-γαλακτόζη
Αλγινικό οξύ	Τροποποίηση της αναλογίας του μανουρονικού οξέος ως προς το φουλουρονικό οξύ

Στόχοι για τροποποίηση ενζύμων

- (i) Αντικατάσταση της βιομηχανικής μεθόδου υδρόλυσης των λιπών με ατμό με την ενζυμική μέσω λιπασών θερμοσταθερών και χαμηλού κόστους**
- (ii) Η παραγωγή μονο και διγλυκεριδίων ως γαλακτοματοποιητών φιλικών προς τον άνθρωπο και η βιοϋδρογόνωση των λιπών είναι σημαντικοί παράγοντες για την βελτίωση της διατροφικής αξίας**
- (iii) Τροποποιημένα ένζυμα για για κατεργασία πολυσακχαριτών που βρίσκουν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων σαν πηκτοματογόνα**
- (iv) Τέτοιες είναι η ανάπτυξη ενζυμικής δραστικότητας για εστεροποίηση πλευρικών καρβοξυλίων στα μακρομόρια των πηκτινών, η απομάκρυνση πλευρικών ομάδων σε κόμια, η αλλαγή της αναλογίας μανουρονικού/γουλουρονικού οξέος στο αλγινικό οξύ**
- (v) Τροποποίηση για βελτίωση των κελλουλασών και αμυλασών στη υδρόλυση της κυτταρίνης και του αμύλου**

ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΑΛΕΞΗ 4

A.A.κουτίνας

Ομότιμος Καθηγητής

Χημείας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Τμήμα χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Τηλ: 2610.997104, Fax: 2610.997105

e-mail: A.A.Koutinas@upatras.gr

Τροποποίηση αρχικών καλλιεργειών

- (1) Η βιοτεχνολογία των αρχικών καλλιεργειών για τα γαλακτοκομικά περιλαμβάνει (i) την παραγωγή βιομάζας, (ii) κλασικές γενετικές βελτιώσεις, καθώς και (iii) τεχνικές κλωνοποίησης γονιδίων για κατάλληλα γαλακτικά βακτήρια
- (2) Οι τεχνικές περιλαμβάνουν την ανάπτυξη vectors για πλασμίδια αλλά και βελτίωση γονιδίων που ενδιαφέρουν τις μονάδες γαλακτοκομικών τροφίμων
- (3) Τα πλασμίδια τροποποιούν *Streptococci* και εκφράζονται η ζύμωση της λακτόζης, η υδρόλυση πρωτεϊνών, η χρήση κιτρικού οξέος, η παραγωγή εξωπολυμερών αλλά και η παραγωγή αντιμικροβιακών πρωτεϊνών
- (4) Μεταλλάξεις για την βιομετατροπή της λακτόζης γίνονται στους *Streptococcus lactis* και *Streptococcus cremoris*. Τα ένζυμα που βιομετατρέπουν τη λακτόζη είναι **φωσφοροτρανσφεράσες** για τον σχηματισμό του **φωσφο-ενολ-πυροσταφυλικού οξέος**, **ξεκινώντας τον μηχανισμό** από **φωσφορική λακτόζη**.
- (5) Τα ένζυμα του μηχανισμού είναι τα **II-Lac**, **III-Lac** και **Phospho-β-galaktosidase**. Η φωσφορική λακτόζη υδρολύεται σε γλυκόζη και **6-φωσφορική γαλακτόζη**. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα παραπάνω ένζυμα υπάρχουν στο DNA του *Streptococci*. Με **κλωνοποίηση** των γονιδίων επιτυγχάνουμε μεγάλο αριθμό πλασμιδίων και μεγάλο αριθμό γονιδίων που αυξάνουν την ταχύτητα της βιομετατροπής της λακτόζης **2**

Τροποποίηση αρχικών καλλιεργειών

- (i) Η κλωνοποίηση γονιδίων έγινε σε αυξημένο αριθμό πλασμιδίων στο *Streptococcus lactis*
- (ii) Το θερμόφιλο *Streptococcus thermophilus* μεταβολίζει τη λακτόζη υδρολύοντάς την σε γλυκόζη και γαλακτόζη με το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση που εκφράζεται με γονίδιο σε χρωμόσωμα των βακτηρίων
- (iii) Η τεχνολογική σημασία της υδρόλυσης είναι επειδή η λακτόζη (i) προκαλεί δυσανεξία σε ανθρώπους, (ii) έχει μικρή διαλυτότητα, (iii) και δεν έχει επαρκή γλυκαντική ικανότητα.

Παραγωγή αντιμικροβιακών πρωτεϊνών

- (iv) Οι *Streptococci* της γαλακτοκομίας παράγουν αντιμικροβιακά συστατικά όπως οργανικά οξέα, υπεροξειδίο του υδρογόνου, **βακτηριοσίνες και νισίνη**. Η νισίνη του *Streptococcus lactis* χρησιμοποιήθηκε σαν συντηρητικό 'εναντι του *Streptococcus aureus* και των κλωστηριδίων.
- (v) Αναπτύχθηκε κλωνοποίηση γονιδίων για παραγωγή βακτηριοσινών και νισίνης για αρχικές καλλιέργειες που παρεμποδίζουν τα παθογόνα

Αρχικές καλλιέργειες ανθεκτικές σε βακτηριοφάγους

- (i) Οι βακτηριοφάγοι είναι σημαντικό πρόβλημα της γαλακτοκομίας. Οι γαλακτικοί στρεπτόκοκοι έχουν πλασμίδια που κωδικοποιούν την αντίσταση έναντι των βακτηριοφάγων. Οι μηχανισμοί είναι η απορρόφηση των φάγων, η ανεπιτυχής μόλυνση των βακτηρίων, συστήματα περιορισμού των φάγων καθώς και τροποποίησης

- (ii) Έτσι έχουν τροποποιηθεί ο *Streptococcus cremonis* και *Streptococcus lactis* για αρχικές καλλιέργειες ανθεκτικές σε βακτηριοφάγους

Παραγωγή εξωπολυμερών

- (iii) Γαλακτικοί στρεπτόκοκοι παράγουν εξωπολυμερή που αυξάνουν το ιξώδες των προϊόντων ζύμωσης του γάλακτος. Όμως χάνουν την ικανότητα αυτή και έτσι δημιουργείται πρόβλημα στην τυποποίηση

- (iv) Μεταφορά του πλασμιδίου από τον *Streptococcus cremonis* που αυξάνει το ιξώδες σε στελέχη *Streptococci* που δεν παράγουν εξωπολυμερή δίνει αρχικές καλλιέργειες που παράγουν εξωπολυμερή

Vectors για τροποποίηση αρχικών καλλιεργειών της γαλακτοκομίας

- (i) Οι πρώτοι vectors που παρασκευάστηκαν για άλλους στρεπτόκοκους ήταν οι pGB301 και pSA3. Απεδείχθη ότι ήταν κατάλληλοι και για τους στρεπτόκοκους της γαλακτοκομίας
- (ii) Ένα καλό αποτέλεσμα ήταν ο εντοπισμός στο *S. cremoris* πλασμιδίου που μπορούσε να εισαχθεί στο *Bacillus subtilis*. Αυτό οδήγησε σε υποδοχείς κατάλληλους για μικροοργανισμούς όπως τα γαλακτικά βακτήρια, *Bacillus subtilis* και *E. coli* και σε θετικά κατά gram βακτήρια
- (iii) Έτσι οι υποδοχείς αυτοί χρησιμοποιούνται για κλωνοποίηση γαλακτοκομικών βακτηρίων

Παραγωγή προσθέτων τροφίμων με rDNA technology

- (i) Εφαρμογή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA για παραγωγή αντιμικροβιακού πεπτιδίου, χαμηλής θερμιδομετρικής αξίας γλυκαντική ύλη και μερικών ενζύμων για παραγωγή τροφίμων

Αντιμικροβιακό πεπτίδιο Cecropin

- (ii) Πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί με αντιμικροβιακή δράση είναι η νισίνη, η πλασμίνη, η μελιτίνη, η αμγαινίνη, η ντεφενσίνη και η κεκροπίνη.
- (iii) Η νισίνη είναι η καταλληλότερη και έχει δραστηριότητα στα θετικά κατά gram βακτήρια. Για την διεύρυνση της αντιμικροβιακής δράσης χρειάζεται να εφαρμοστεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες μόνο η **κεκροπίνη** μπορεί να παραχθεί με rDNA και μάλιστα σε μεγάλες σχετικά ποσότητες.
- (iv) Η επιλογή της βασίστηκε στα πλεονεκτήματα
 - (1) έχει ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα
 - (2) Δεν είναι τοξική
 - (3) Είναι πλούσια σε λυσίνη και αργινίνη και αφομοιώνεται εύκολα
 - (4) Είναι σταθερή στο pH
 - (5) Διατηρεί το 90% της δραστηριότητας στους 100C για 30min

Παραγωγή προσθέτων τροφίμων με rDNA technology

- (i) Το γονίδιο A της κεκροπίνης έχει παρασκευαστεί in vitro και μπορεί να κλωνοποιηθεί μέσω του πλασμιδίου **pING3** που εκφράζει την παραγωγή κεκροπίνης και ελήφθη από *Salmonella typhimurium*
- (ii) Το γονίδιο εκφράζει την μεθειονίνη στο σημείο της ακολουθίας που επιθυμούμε και εκφράζει επίσης και την παραγωγή πρωτεΐνης αντί ενός απλού πεπτιδίου για τον εξής λόγο
 - (1) Τα μικρά μόρια των πρωτεϊνών (πεπτίδια) είναι ασταθή στο βακτήριο
- (iii) Η μεθειονίνη στην πρωτεΐνη αποτελεί το τελευταίο άκρο του μορίου της και ελευθερώνεται ενεργή πρωτεΐνη με κατεργασία με BrCN. Για να αποφευχθεί η τοξικότητα του BrCN η μεθειονίνη αντικαταστάθηκε με με ακολουθία ασπαρτικού οξέος και προλίνης

Παραγωγή κεκροπίνης με ζύμωση

Here put diagram 8 of page 51

Παραγωγή κεκροπίνης με ζύμωση

- (i) Η κεκροπίνη εξετάστηκε σε κύτταρα ανθρώπου και προβάτου. Τα κύτταρα δεν υπέστησαν λύση και δεν παρουσίασαν βλάβη σε δόση 300μg/ml . Σε ποντίκια χορηγήθηκε 1.5g/Kgβάρους σώματος αύξηση του βάρους και η εντερική χλωρίδα δεν παρουσίασε διαφορές
- (ii) Η φυσικής προέλευσης κεκροπίνη από *cecropia moth* έχει αμιδική ομάδα στο τελευταίο άτομο άνθρακα ενώ η ανασυνδυασμένη έχει καρβοξύλιο που δίνει αντιμικροβιακή δράση στα αρνητικά κατά gram βακτήρια και μειωμένη στα θετικά
- (iii) Η τροποποίηση της κεκροπίνης συνεπάγεται την εισαγωγή μιας τελικής ομάδας αιθυλενοδιαμίνης με αντιμικροβιακή δράση στα θετικά αλλά και στα αρνητικά κατά gram βακτήρια και είναι γνωστή σαν κεκρομυκίνη
- (iv) Ένα εναλλακτικό προϊόν είναι μείγμα νισίνης και μη τροποποιημένης κεκροπίνης A. Ο συνδυασμός δίνει αντιμικροβιακή δράση τόσο σε αρνητικά κατά gram (μη ανασυνδυασμένη κεκροπίνη), όσο και σε θετικά κατά gram βακτήρια (νισίνη)

Παραγωγή κεκροπίνης με ζύμωση

Here put Table 3 of the page 52 of notes

Αντιμικροβιακή δράση νισίνης

Here put Table 4 of the page 53 of notes

Γλυκαντική πρωτεΐνη θωματίνη

- (i) Η θωματίνη με εμπορικό όνομα Talin είναι γλυκαντική πρωτεΐνη με χαμηλή θερμιδομετρική απόδοση και έχει γλυκαντική ικανότητα 5000 φορές μεγαλύτερη από τη ζάχαρη
- (ii) Η φυσική της προέλευση είναι τα φρούτα του θαμνώδους φυτού της Αφρικής *Thaumatococcus danielli* που έχουν χρησιμοποιηθεί σαν γλυκαντικό πρόσθετο σε ξυνούς χυμούς φρούτων, άρτο αραβοσίτου και σε οίνους από χουρμάδες
- (iii) Έχει εγκριθεί από UK, Japan and Australia etc, σαν πρόσθετη γλυκαντική ουσία και έχει υψηλό κόστος παραγωγής. Η φυσικής προέλευσης θωματίνη περιέχει πέντε πρωτεΐνες με παραπλήσια δομή, ίδιο μοριακό βάρος, ίδια σύσταση αμινοξέων και γλυκαντική ικανότητα
- (iv) Οι πρωτεΐνες αυτές διαφέρουν στο ηλεκτρικό φορτίο γι αυτό και διαχωρίζονται με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Έχει 207 αμινοξέα και οκτώ δισουλφιδικούς δεσμούς. Αν ένας δισουλφιδικός δεσμός διασπαστεί, τότε χάνει τη γλυκαντική της ιδιότητα
- (v) Γνωρίζουμε την ακολουθία των αμινοξέων στην πρωτεΐνη και τα γονίδια στο DNA που εκφράζουν τις πρωτεΐνες που συνυπάρχουν στη θωματίνη είναι δυνατή η τροποποίηση μικροοργανισμών. Προσπάθειες στον *E. coli* και *Kluyveromyces laktis* απέτυχαν. Γι αυτό εστράφησαν στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*

Πηκτικά ένζυμα στα τρόφιμα

Here put Figure 8 of the page 55 of notes

Δομή πηκτίνης και πηκτικά ένζυμα ανάλογα με τη δράση τους

Πηκτικά ένζυμα στα τρόφιμα

- (i) Οι πηκτινάσες έχουν σαν στόχους (1) την επιτάχυνση της διαύγασης του οίνου και των χυμών, (2) την μείωση του ιξώδους των συμπυκνωμένων χυμών και (3) την αύξηση της απόδοσης κατά την εκχύλιση και την διήθηση των χυμών
- (ii) Τα ένζυμα που παράγονται έχουν διαφορές από batch σε batch και ταυτόχρονα χρειάζεται ένζυμα με διαφορετική δραστικότητα ανάλογα με τον βαθμό ωρίμανσης της πρώτης ύλης για να πετύχουμε την ίδια ποιότητα τροφίμου
- (iii) Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με cloning για να έχουμε τη δραστικότητα που απαιτείται κάθε φορά, με δεδομένο ότι η δραστικότητα του ενζύμου μπορεί να ρυθμιστεί με αντικατάσταση αμινοξέων στην ακολουθία αμινοξέων της πρωτεΐνης
- (iv) Για να γίνει αυτό χρειάζεται θα πρέπει να τροποποιηθεί η ακολουθία νουκλεοτιδίων του γονιδίου που εκφράζει την παραγωγή του ενζύμου ή τα γονίδια που εκφράζουν την παραγωγή μίγματος ενζύμων έτσι ώστε να επηρεαστεί η δραστικότητα τους αλλά και η μετατροπή τους σε εξωκυτταρικά ένζυμα για τη μείωση του κόστους παραγωγής τους

Ανίχνευση βακτηρίων σε τρόφιμα με μοριακές τεχνικές

- (i) Στόχος είναι η ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα ή κλινικά δείγματα *Salmonella*, *Listeria*, *Pathogen E. coli*, *Campylobacter*, *versinia*
- (ii) Στην παράγραφο αυτή θα εξετάσουμε την μέθοδο διασταύρωσης νουκλεϊνικών οξέων (Nucleic Acid Hybridization Technic) .
- (iii) Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να σχηματίσει διπλή έλικα μόνο με μια ειδική συμπληρωματική αλληλουχία (Sequence) που ενώνεται με δεσμούς υδρογόνου. Με ραδιενεργή επισήμανση της μιας ακολουθίας δημιουργούμε μια probe για να ελεγχθεί η έκταση σχηματισμού μιας έλικας αλλά και να προσδιοριστεί η παρουσία της συμπληρωματικής ακολουθίας έλικας στόχου σε άγνωστο δείγμα.
- (iv) Οι probe είναι μόρια DNA επισημασμένα με ραδιενεργά ισότοπα καθώς και με χημικές ουσίες φθορίζουσες όπως η φλουορεσκεΐνη. Μόρια στόχοι μπορεί να είναι σχετικό με το μικροοργανισμό DNA, mRNA, rRNA ή πλασμίδιο.
- (v) Μια μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων στα τρόφιμα περιλαμβάνει την ανάπτυξη μιας hybridization probe που είναι επισημασμένο DNA ομόλογο με μια περιοχή του προς αναζήτηση μικροοργανισμού.

Ανίχνευση βακτηρίων σε τρόφιμα με μοριακές τεχνικές

- (i) Ο σχηματισμός μιας διπλής έλικας μεταξύ του επισημασμένου και μη αλλά ομόλογου DNA θα μας δώσει τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε το είδος του κυττάρου που αναζητούμε
- (ii) Για την αμύχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* παρασκευάστηκε η **32P-labeled DNA probe**, που ήταν ομόλογη με περιοχή χρωμοσώματος του DNA *Salmonella*.
- (iii) Επίσης παρασκευάστηκε η **32P-labeled oligonucleotide probe** για την ανίχνευση της *listeria*. Έτσι το επισημασμένο DNA σχηματίζει διπλή έλικα με DNA του προς αναζήτηση μικροοργανισμού και ο εντοπισμός γίνεται με ανίχνευση ραδιενέργειας.
- (iv) Όμως επειδή η DNA probe με ραδιενεργά δεν ήταν επιθυμητή τεχνολογία αντικαταστάθηκε με επισήμανση με φθορίζουσες ουσίες ή με ουσίες που επιτρέπουν τον χρωματομετρικό προσδιορισμό

Colorimetric Hybridization assay

- Step 1.** Εμπλουτισμός του δείγματος του τροφίμου με κύτταρα. Μικρή ποσότητα δείγματος μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα, υφίσταται λύση του κυτταρικού τοιχώματος και ελευθερώνεται το r RNA
- Step 2.** Προσθήκη capture probe και reporter probe με ομόλογα νουκλεοτίδια προς το στόχο rRNA target που ενώνονται (Hybridization) με το rRNA target και δίνουν το Poly-dA
- Step 3.** Το διάλυμα έρχεται σε επαφή με επιφάνεια από ομοπολυμερές δεσοξυθυμιδίνης Poly-dT που μπορεί να ενωθεί με το Poly-dA
- Step 4.** Ακολουθεί πλύση για απομάκρυνση των υπολειμμάτων του κυτταρικού τοιχώματος και των άλλων νουκλεοτιδίων και το RNA-DNA μένει ενωμένο στην επιφάνεια του στερεού μέσω των Poly-dA και Poly-dT
- Step 5.** Ανίχνευση της reporter probe που έχει την φλουορεσκεΐνη με την προσθήκη αντισώματος αντ-φλουορεσκεΐνης που είναι ενζυμικό παρασκεύασμα (complex enzyme)
- Step 6.** Παραμονή σε θερμοθάλαμο και πλύση για απομάκρυνση του ενζύμου
- Step 7.** Προσθήκη αντιδραστηρίου για να δώσει το χρώμα και χρωματομετρικός προσδιορισμός

Παραστατική λειτουργία της μεθόδου Colorimetric DNA Hybridization

Here put figure of the page 58 of notes

Παραστατική λειτουργία της μεθόδου Colorimetric DNA Hybridization

Here put Figure of the page 59 of notes

Ανάπτυξη probe

1. Πρέπει να βρούμε την ακολουθία νουκλεοτιδίων (sequence) του 16 S ριβοσώματος RNA (rRNA) για κάθε μικροοργανισμό *E.coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Versinia* etc.
2. Σύγκριση από μια βάση δεδομένων για κάθε μικροοργανισμό την ακολουθία του rRNA
3. Σύνθεση ολιγομερούς συμπληρωματικού DNA
4. Προσδιορισμός εξειδίκευση ς του συμπληρωματικού DNA με dot-plot Hybridization με τη χρήση κατάλληλης συλλογής από αρνητικά και θετικά κατά gram βακτήρια σύμφωνα με τις Standard μεθόδους Klinger et al., 1988.

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) method

1. Η μέθοδος ανιχνεύει έναν μικροοργανισμό και προσδιορίζει το ποσοστό των κυττάρων σε μείγμα μικροοργανισμών.
2. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε batch αλλά και σε συνεχούς λειτουργίας συστήματα αν γίνει σύνδεση με κυτόμετρο ροής
3. Στηρίζεται στη σύνθεση ολιγομερούς συμπληρωματικού DNA με επισήμανση με μια φθορίζουσα ουσία
4. Από βάση δεδομένων βρίσκουμε πρώτα την ακολουθία νουκλεοτιδίων στο ολιγονουκλεοτίδιο που συνθέσαμε που αντιστοιχεί στον μικροοργανισμό που αναζητούμε
5. Συνθέτουμε ολιγομερές συμπληρωματικό DNA στο οποίο εισαγάγουμε φθορίζουσα χημική ένωση και παρασκευάζουμε την probe ανίχνευσης του μικροοργανισμού
6. Η probe DNA είναι συμβατή με το rRNA του μικροοργανισμού που αναζητούμε και σχηματίζει διπλή strand και έτσι έχουμε την φθορίζουσα ουσία στο σύμπλεγμα DNA-RNA το οποίο και φθορίζει

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) method

1. Μετά βάζουμε στο μικροσκόπιο ένα διάφραγμα που επιτρέπει να περάσει μόνο το μήκος κύματος της φθορίζουσας ουσίας
2. Η παρατήρηση φθορίζόντων κυττάρων σημαίνει την παρουσία του μικροοργανισμού που αναζητάμε
3. Στη συνέχεια μετράμε τον συνολικό αριθμό των κυττάρων χωρίς το διάφραγμα χωρίς το διάφραγμα. Αν βάλουμε το διάφραγμα μετράμε μόνο τα φθορίζοντα κύτταρα
4. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε τον αριθμό των κυττάρων του μικροοργανισμού που αναζητάμε στο μείγμα των μικροοργανισμών