

Bakterije, zelene tovarne antioksidantov

Marina Klemenčič, Aleš Ručigaj

Na kaj najprej pomislite, ko vam kdo omeni bakterije? Na moteče vnetje medličnikom in kočnikom zgoraj desno? Na skisano mleko, ki je nastalo v šalici pozabljene bele kave? Obe asociaciji sta razumljivi, saj sta pogost pojav v našem vsakdanjem življenju. Hkrati pa nam ponazorita, da so bakterije vsenavzoči organizmi, ki se uspejo hitro razrasti v raznovrstnih gojiščih. Čeprav na bakterije ponavadi gledamo kot na zlovesče organizme, pa lahko prav lastnost njihovega uspešnega razraščanja s pridom uporabimo v različne človeku koristne namene. Ali veste, da bakterije lahko spremenimo v celične tovarne? In jih tako uporabimo za sintezo različnih molekul, od zdravil pa celo do gradbenega materiala? V tem prispevku bova opisala, kako smo genetsko spremenili bakterije, da so za nas proizvajale rumene in oranžne pigmente, ter zakaj te molekule lahko dosegaajo stokratno vrednost čistega zlata.

Klorofil, najbolj razširjeni pigment

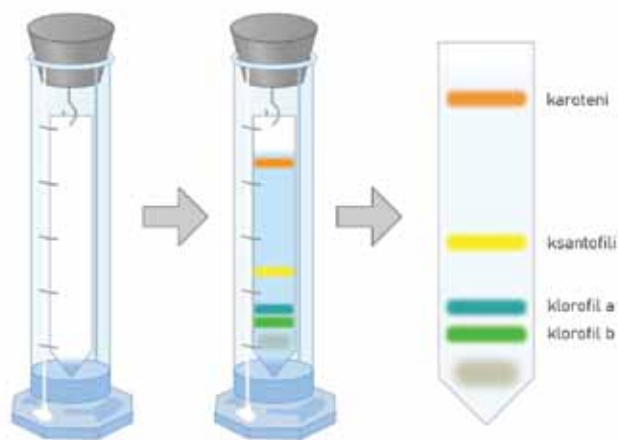
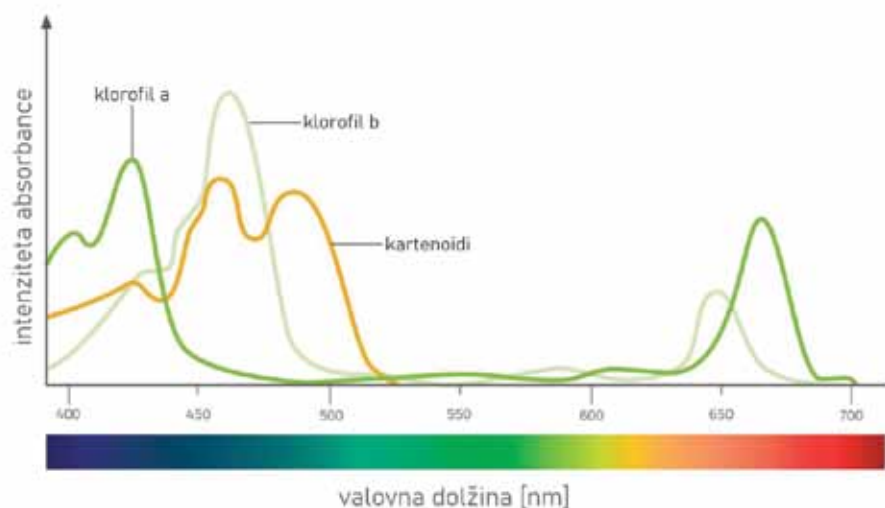
Večina ljudi naravo povezuje z zeleno barvo. A kaj barva sploh je? Z besedo »barva« označujemo lastnost snovi, ki jo zaznajo naše oči, ko na njih posveti svetloba. V slovenščini s to besedo opisujemo tudi snov, ki jo uporabljamo za nanos barvne snovi (»barva za les«). To, da je barva obarvana, pa je posledica vsebnosti pigmentov, pri čemer različni pigmenti določajo različno barvo neke snovi. Če je barva le lastnost snovi, pa so pigmenti molekule. Te molekule so takšne, da odbijajo svetlobo točno določenih valovnih dolžin v vidnem delu spektra, kar zaznamo v različni obarvanosti snovi. Izmed vseh organizmov, ki poseljujejo planet, lahko največ zaslug za barvitost pripišemo rastlinam, ki vsebujejo velik nabor pigmentnih molekul. Izmed vseh naravnih pigmentov, ki obstajajo, je največ klorofila. Ta molekula

ne absorbira v zelenem delu spektra, kar pomeni, da ga naše oči zaznajo kot zelene-ga, kar daje rastlinam značilno barvo, ki jo povezujemo z naravo.

Klorofil je molekula, ki jo rastline potrebujejo za izvedbo fotosinteze – procesa, kjer iz vode in ogljikovega dioksida ustvarjajo sladkorje. Pri tem kot stranski produkt nastaja kisik, ki ga ostali organizmi tega planeta (glive in živali) porabljamo za dihanje. Fotosinteza je energetsko precej potraten proces, kar pomeni, da rastline potrebujejo precej energije za njeno izvedbo. In prav »lovljenje« svetlobe oziroma natančneje fotonov je glavna naloga klorofila, ki z veza-vo fotonov omogoči delovanje fotosintetskih središč. Zato se zdi razumljivo, da so rastline tako zelene, saj jim le zadostna količina klorofila lahko omogoči ustrezno izvedbo fotosinteze in posledično zadostne količine ustvarjenega sladkorja za preživetje.

Vendar pa tudi klorofil ni tako magična molekula, kot se zdi. Če pogledamo celotni spekter vidne svetlobe (to je med valovnimi dolžinami približno 380 nanometrov in 740 nanometrov), lahko ugotovimo, da klorofil ne uspe ujeti fotonov celotnega spektra, temveč le tiste, ki imajo valovno dolžino okrog 430 oziroma 660 nanometrov, zato večina ostalega dela vidnega spektra ostane neizkoriščena. Da rastline lahko ujamejo tudi fotone nepokritih valovnih dolžin, najdemo v listih tudi dodatne pigmente, ki jim glede na njihov namen rečemo tudi pomožni pigmenti. Njihova naloga je, da ujamejo fotone tistih valovnih dolžin, ki jih klorofil ne more, in jih preusmerijo v fotosintetska središča.

Pomožne pigmente kopenskih rastlin razdelimo v dve večji skupini, ki jih enostavno ločimo po barvi: rumeni pigmenti spadajo v družino ksantofilov (*ksanto* pomeni v grščini rumen), oranžni pa v družino karotenov (kar



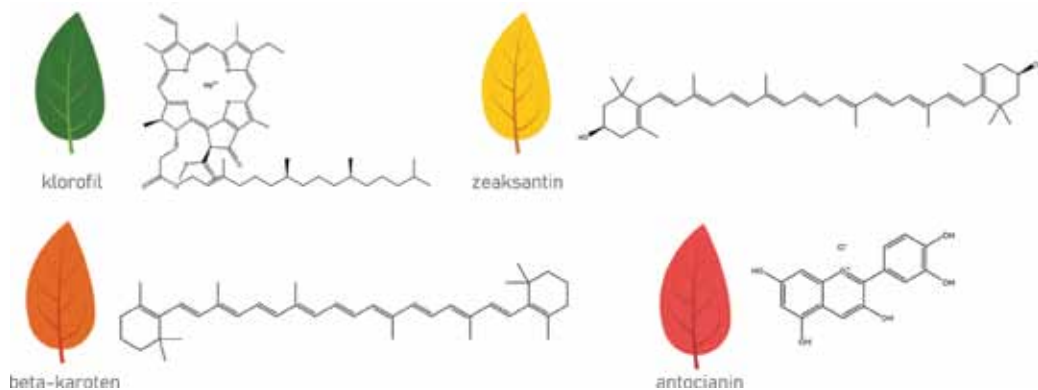
Spekter vidne svetlobe ter absorpcijski spektri obeh klorofilov in karotenoidov, iz katerih je razvidno, da klorofila ne absorbirata pri valovni dolžini okrog 550 nanometrov. Ta valovna dolžina ustreza zeleni barvi, ki se od listov torej odbije, kar rastlinam daje prevladujočo zeleno barvo. Da bi dokazali, da se v rastlinah kljub prevladujoči zeleni barvi nahajajo tudi drugi pigmenti, pa lahko izvedemo tekočinsko kromatografijo, ki bi razkrila še prisotnost pomožnih pigmentov, kot so rumeni ksantofili in organski karoteni.

izvira iz latinskega izraza za korenje *carota*). Ksantofili so odgovorni za rumeno barvo paprik, koruze in buč, karoteni pa dajejo značilno barvo korenju, sladkemu krompirju in papaji. Čeprav so vsi ti našeti plodovi, pa je treba vedeti, da so ravno ksantofili in karoteni v listih odgovorni za pisano jesen v gozdu.

Od kod barvitost jesenskih gozdov?

Listi večine listopadnih dreves so zaradi prevladujočega pigmenta klorofila zeleni. Najdemo ga v rastlinski celici v organelu, ki mu rečemo kloroplast. Vendar pa rastlina za uspešno lovljenje fotonov vidne svetlobe

poleg klorofila vsebuje še rumene (ksantofile) in oranžne pigmente (karotene). Teh je v listu precej manj kot klorofila, zaradi česar njegova barva pomladi in poleti prevlada nad ostalimi. Ko pa se približuje jesen, mora rastlina poskrbeti, da ima zadostne zaloge hranil za zimske čase, ko je svetlobe precej manj in je zato sinteza sladkorjev s fotosintezo omejena. Posledično pride do razgradnje klorofila in fotosintetskih središč, ne pa tudi do razgradnje oranžnih in rumenih pomožnih barvil. Ti so torej v listih prisotni ves čas, a se njihova barva razkrije šele jeseni in ostane na listih, dokler ti ne padejo z drevesa. Izjema teh barvnih spek-



Barve jesenskih listov in prevladujoče pigmentne molekule.

trov so rdeči listi, ki so posledica prisotnosti barvila antocianina, ki med drugim daje značilno vijolično barvo vijolicam in modro barvo borovnicam. Tega pigmenta listi ne ustvarjajo vse leto, temveč samo jeseni, ko naj bi imel zaščitno vlogo proti mrazu in se z njegovo sintezo rastlina pripravi na zimo (Hughes in sod., 2010).

Pigmenti, človeku koristne molekule

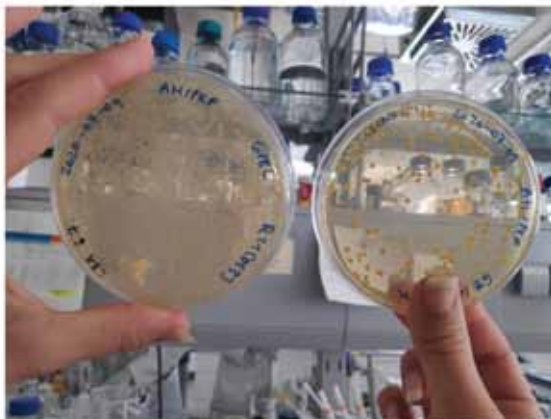
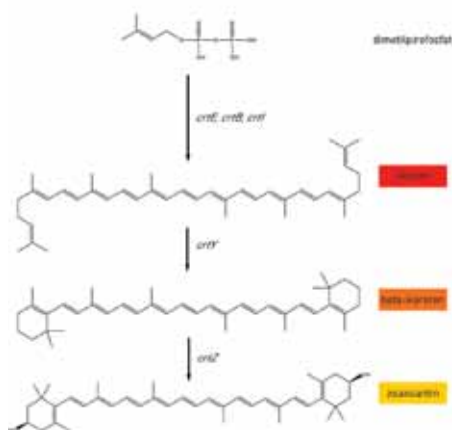
Pigmenti niso le lovci svetlobe pri rastlinah. Te molekule namreč opravljajo podobno vlogo tudi pri človeku. Omenjeni karoten je molekula, iz katere nastane vitamin A. Gre za vitamin, ki si ga naše telo ne more ustvariti samo in prav pomanjkanje vitamina A je v nerazvitih državah glavni razlog za slepoto. Zadostne količine tega vitamina lahko pridobimo le z ustrezno prehrano. Vitamin A se v mrežnici (retini) očesa nahaja v obliki retinala in se povezuje s proteinom opsinom. Kompleksu retinala in opsina rečemo rodopsin, njegova vloga pa je absorbiranje svetlobe.

Poleg dobro znanega vitamina A pa človeku niso koristni le karoteni, temveč tudi ksantofili. Eden izmed najbolj znanih ksantofilov je molekula zeaksantin. Povpraševanje po tej rumeno obarvani molekuli se strmo povečuje, saj vse več raziskav potrjuje njegovo pomembno antioksidativno vlogo. Upo-

rabljajo ga kot aditiv v živilski industriji in kot aditiv živalski krmi (na primer kot ojačevalec barve ribjega mesa ali pigmentacije jajčnega rumenjaka), pa tudi v kozmetiki in farmacevtski industriji. Zeaksantin postaja tudi popularni prehrambeni dodatek, zelo veliko ga je v jagodah »goji« (navadna kustovnica, *Lycium barbarum*). Vrednost trga zeaksantina v letu 2020 naj bi znašala več deset milijonov ameriških dolarjev. Za primerjavo: en gram zelo čistega karotena ima ceno okrog sto evrov, medtem ko bi morali za enako čisti gram zeaksantina odšteti več tisoč evrov. Zeaksatin sicer lahko izoliramo iz zelenjave, a so izkoristki s tehnološkega vidika prenizki, organska sinteza pa zahteva uporabo topil in procesov, ki so okolju in končnemu potrošniku neprijazni. Vprašanje torej je, kako pridobiti velike količine zeaksantina?

Prenos genov iz paprik v bakterije

Do odgovora na zastavljeno vprašanje lahko pridemo z uporabo metod in znanj molekularne biologije in tehnologije rekombinantne DNA. Najprej moramo sicer vedeti, kako pride do »priprave« zeaksantina v paprikah ali pa jagodah »goji«. Za sintezo molekul so v celici največkrat odgovorne specializirane beljakovine (proteini), ki jim rečemo encimi. Ti delujejo kot katalizatorji kemijskih reak-



Bakterije naravno vsebujejo molekulo dimetilpirofosfat, ki pa jo z dodatkom treh genov (*crtE*, *crtB* in *crtI*) lahko pretvorimo v rdeče obarvani likopen. Tega encim *crtY* lahko pretvori v beta karoten, prisotnost gena *crtZ* pa omogoči sintezo zeaksantina. Kopičenje beta karotena je tako vidno že na agarni plošči, na katerih rastejo bakterije *E. coli*. Na levi so vidne kolonije bakterij brez genov, ki omogočajo proizvodnjo beta karotena. Na desni plošči pa rastejo bakterije, ki imajo dodane gene za sintezo beta karotena. Ta se sintetizira v tolikšni meri, da se kolonije obarvajo značilno oranžno.

cij in iz začetnih snovi (reaktantov) pripravljajo končne molekule (produkte). Bakterije, kot je na primer najpogostejše uporabljeni laboratorijski sev *Escherichia coli*, same ne znajo proizvesti zeaksantina, vsebujejo pa že nekaj reaktantov, ki se porabljajo pri drugih metabolnih poteh. Bakterijo moramo torej reprogramirati tako, da ji dodamo encime, ki bodo v celici naravno prisotne reaktante spreminjale v želeni produkt (v našem primeru zeaksantin).

Tega sicer ne naredimo tako, da dodamo celicam kar encime v obliki proteinov, ampak jim v celice vrinemo zapis za te encime na ravni DNA, torej gene. To naredimo tako, da zapise za encime vključimo v krožno DNA, ki ji rečemo vektor, saj omogoča prenos zelene dedne informacije v gostiteljsko celico. Bakterije, ki imajo sedaj poleg svoje kromosomske DNA še našo, vektorsko, so gensko spremenjene. Ko bakterije rastejo in se delijo, prepisujejo tako svojo DNA kot tudi našo, na kateri je zapis za gene za sintezo zeaksantina. Na ta način se v velikih količinah v celicah ustvarjajo encimi, ki

omogočajo nastanek tega produkta.

Kako spremljati koncentracije nastalega produkta, optimizirati rast bakterij ter še dodatno gensko spremeniti bakterije za dosego večjih izkoristkov, je bil cilj projekta, ki smo ga to pomlad in poletje v partnerstvu s podjetjem *AciesBio* iz Ljubljane izvajali na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Pet genov in milijarda oranžnih bakterij

Seveda nismo bili prvi, ki smo si želeli ustvariti bakterije, ki bi proizvajale zeaksantin. Zato smo lahko vektor, ki je vseboval gene za gene, ki sintetizirajo zeaksantin, kar naročili. Vektor je vseboval pet genov, ki so potrebni za sintezo zeaksantina: gen za pirofosfat sintazo (*crtE*), likopen ciklazo (*crtY*), fitoen dehidrogenazo (*crtI*), fitoen sintazo (*crtB*) in beta karoten hidroksilazo (*crtZ*) (Sun in sod., 1996). Poleg tega vektorja smo uporabili tudi vektor brez zapisa za zadnji encim: ta v *E. coli* omogoča sintezo in kopičenje beta karotena. Oba vektorja smo s postopkom transformacije vnesli v ce-

lice *E. coli*, ki smo jih nato gojili na agarnih ploščah pri sobni temperaturi.

Da je bil prenos genov uspešen in da so bakterijske celice sintetizirale beta karoten in zeaksantin v velikih količinah, je bilo vidno že po nekaj dneh. Namesto blede rumenih kolonij gensko nespremenjenih *E. coli* so bile na ploščah vidne oranžne kolonije tistih celic, ki so sintetizirale beta karoten, in intenzivno rumene kolonije tistih, ki so sintetizirale zeaksantin.

Tako kot vsi ostali pigmenti sta tudi beta karoten in zeaksantin molekuli, ki sta slabo topni v vodi in se zato v celici kopičita predvsem v membranah, ki jih tvori lipidni dvosloj. In prav to je eden izmed bistvenih omejujočih dejavnikov takih molekul v bakterijah. Obe molekuli se kopičita v membranah, vgradnja zeaksantina v lipidni dvosloj pa poleg tega povečuje rigidnost celične membrane. To pomeni, da je njegovo kopičenje omejeno, ko membrana doseže maksimalno rigidnost. Da bi zaobšli to težavo, smo si zamislili sistem, v katerem se zeaksantin ne kopiči le v membrani, temveč tudi v citoplazmi, ki je vodotopno okolje. Da bi to dosegli, smo morali v bakterijske celice, v katere smo vnesli biosintezno pot do zeaksantina, dodati še gen za človeški protein glutation S-transferazo Pi (GSTP1), ki se pri človeku nahaja v rumeni pegi in veže dve molekuli zeaksantina (Bhosale in sod., 2004) Na ta način smo želeli doseči, da se del sintetiziranega zeaksantina z veza-vo na ta protein prenese tudi v citoplazmo, s čimer se poveča celična kapaciteta za kopičenje tega pigmenta in posledično njegova celokupna koncentracija v celici.

Povečanje vsebnosti zeaksantina smo v celicah poskušali doseči tudi z naključno mutagenezo z ultravijolično svetlobo in dodatnimi zapisi za beta karoten hidroksilazo. Vzporedno pa smo razvijali in optimizirali metodo za ekstrakcijo ter kvantifikacijo koncentracije obeh pigmentov z uporabo različnih pipet.

Naravni gensko spremenjeni organizmi in biotehnologija

Če dobro pomislimo, sta zeaksantin in beta karoten nadvse posebni molekuli in pigmenta za človeka. Oba imata namreč pomembno vlogo v vidu in nam tako pravzaprav omogočata, da ju vidimo. Kljub njuni pomembni vlogi tudi pri ostalih živalih pa je zanimivo, da teh molekul tudi živali ne znajo sintetizirati same, temveč jih lahko pridobimo le s hrano. Kot povsod pa tudi tu obstajajo posebne izjeme: žuželke, ki so gene za sintezo beta karotena uspele »prekopirati« od gliv s tako imenovanim procesom horizontalnega prenosa genov (Altincicek in sod., 2012). Nismo torej samo ljudje tisti, ki vidimo dodano vrednost v teh molekulah! Ker pa nam horizontalni prenos genov (zaenkrat) še ni uspel, ostaja tako biotehnologija mikroorganizmov ključno področje nadaljnjega razvoja za pridobivanje teh pomembnih barvnih molekul.

Literatura:

- Altincicek, B., Kovacs, J. L., Gerardo, N. M., 2012: *Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae*. *Biology Letters*, 8 (2): 253–257. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0704>.
- Bhosale, P., Larson, A. J., Frederick, J. M., Southwick, K., Thulin, C. D., Bernstein, P. S., 2004: *Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye*. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (47): 49447–49454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405334200>.
- Hughes, N. M., Reinhardt, K., Field, T. S., Gerardi, A. R., Smith, W. K., 2010: *Association between winter anthocyanin production and drought stress in angiosperm evergreen species*. *Journal of Experimental Botany*, 61 (6): 1699–1709. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq042>.
- Sun, Z., Gantt, E., Cunningham, F. X., 1996: *Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (40): 24349–24352. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24349>.

Slovarček:

Pigment. Molekula, ki zaradi svoje strukture odbija svetlobo določene valovne dolžine, kar oko zazna kot spremembo v barvi.

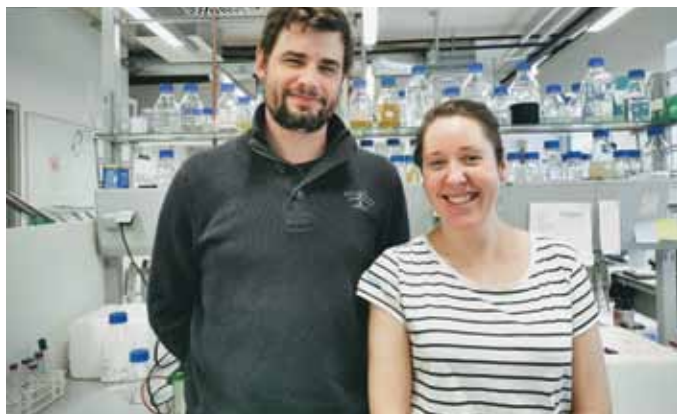
Kloroplast. Organel, prisoten samo v rastlinskih celicah, kjer poteka proces fotosinteze, s katerim rastline iz ogljikovega dioksida in vode ustvarjajo sladkorje. Pri tem procesu kot stranski produkt nastaja kisik.

Tehnologija rekombinantne DNA. Nabor tehnik, ki jih lahko uporabimo, da združujemo genski material različnih organizmov, na primer bakterijskega in živalskega oziroma rastlinskega, s čimer ustvarimo zapise DNA, ki jih narava ne bi mogla ustvariti sama.

Gen. Del DNA, ki se med prepisovanjem v katerikoli živi celici prepiše v RNA. Ponavadi z besedo gen označujemo dele DNA, ki zapisujejo za protein.

Plazmid. Krožna molekula DNA, ki jo nekatere bakterije vsebujejo poleg kromosomske DNA. V laboratoriju plazmide lahko uporabljamo kot vektorje, prenašalce dednih informacij, med različnimi celicami.

Citoplazma. Del celice, ki ga zaobjema celična membrana. V bakterijskih celicah v citoplazmi najdemo DNA, morebitne plazmide, ribosome ter veliko ostalih proteinov. Pri živalih in rastlinah pa citoplazma vsebuje tudi organele, ki v celicah opravljajo posebne funkcije (mitohondrij, endoplazemski retikulum in podobno).



Dr. Marina Klemenčič in

dr. Aleš Ručigaj sta docenta na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Marina Klemenčič je biokemik in raziskuje, kako potekajo molekularni mehanizmi, ki povzročijo nadzorovano smrt celic enostavnih organizmov, kot so bakterije in enocelične alge.

Aleš Ručigaj je kemijski inženir in raziskuje, kako različne strukturne lastnosti hidrogelov, pripravljenih iz biopolimerov, vplivajo na hitrost sproščanja zdravilnih učinkovin iz njih.