

## KUATATÁSI BESZÁMOLÓ

2016. augusztus 31.

### 1. A KUTATÁSI TÉMA MEGNEVEZÉSE:

***Magas hozzáadott értékű vegyületek bioszintetikus előállítására a modern anyagcseremérnökség eszközeivel***

### 2. CÉLKITŰZÉSEK:

A kutatási téma célja az 1,4 butándiol glicerinnél/glükóznál történő előállítására alkalmas új bioszintetikus útvonal racionális tervezése, *in silico* és *in vivo* megépítése, az expresszióhoz alkalmazott gazdaszervezetek metabolikus optimalizálása, valamint a bioszintetikus mikrobiális folyamat optimális körülményeinek meghatározása.

### 3. KUTATÁSI TEVÉKENYSÉGEK

A projekt tevékenységi terve alapján, a 2016-os évre tervezett kutatási tevékenységek leírása:

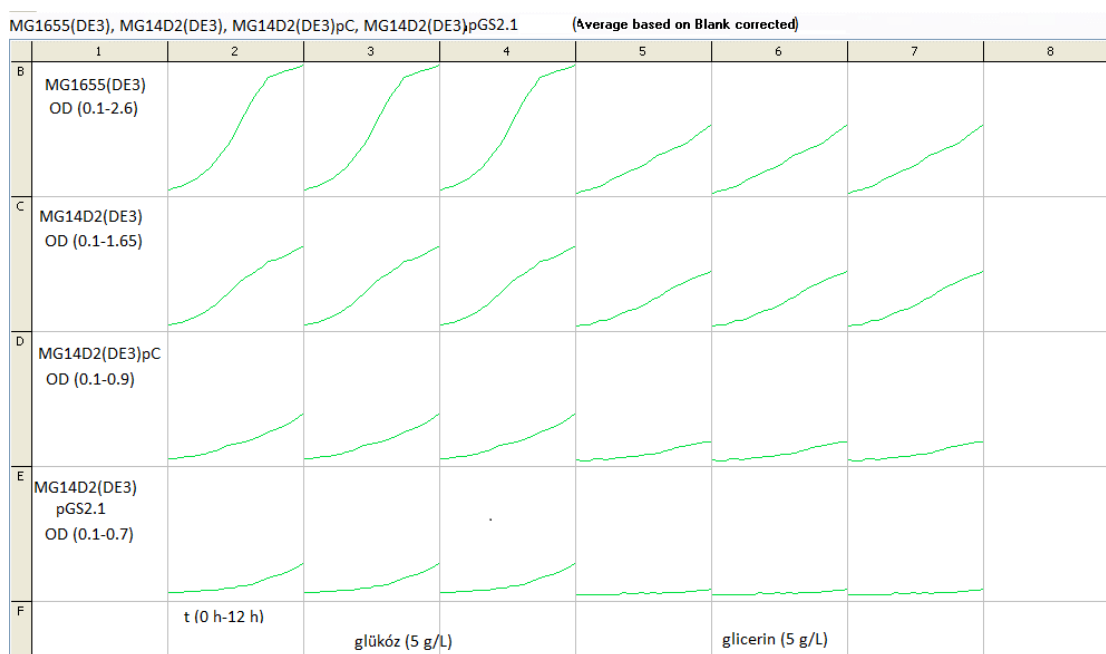
#### 1. A gazdatörzs optimalizálása, versengő útvonalak lezárása

A céltermék hozamának növelésére egyik ígéretes stratégia a gazdatörzs metabolikus hálózatának optimalizálása, a beépített bioszintetikus útvonallal versengő szekunder anyagcsereutak kizárása által. A szénfluxus átirányítása a butándiol bioszintézis felé az előzőekben *in silico* módszerekkel azonosított anyagcsereutak (tejsavtermelés leállítása az *ldhA* deléciójával, hangyasavtermelés leállítása a *pflB* deléciójával) lezárásáért felelős gének eliminációját homológ rekombinációval, a  $\lambda$ -red rekombinációs rendszer alkalmazásával történt. Az új, heterológ bioszintetikus útvonal enzimeit megfelelő termelésének biztosítására az előállított deléciós törzset DE3-lizogénizációnak vetettük alá ( $\lambda$ DE3 Lysogenization Kit – Novagen, Merck Millipore), majd az 1,4-butándiol termeltetéséhez szükséges enzimeket hordozó rekombináns, koexpressziós plazmidokat kémiai úton való transzformálással juttattuk a gazdasejtekbe [14].

A következő lépésben, a kutatási tervnek megfelelően, az optimalizált, illetve heterológ enzimeket termelni képes gazdatörzsek tenyésztési körülményeinek vizsgálatát végeztük el aerob, illetve oxigén-limitált körülmények között. Az eredeti, deléciós, illetve a kiválasztott útvonal enzimeit tartalmazó plazmidokat hordozó baktériumkultúrákat egyetlen színtelepből kiindulva hoztuk létre, komplex táplevesben (Luria-Bertoni, 50  $\mu$ g/mL ampicillin hozzáadásával a transzformált kultúrák esetében), majd 37°C hőmérsékleten, 160 rpm-on rázatva növeltük. A termelő kultúrák létrehozásához a megfelelő optikai denzitást elért kultúrákkal oltottunk be megfelelő térfogatú ásványi, meghatározott összetételű, glükóz vagy glicerinnel szénforrást tartalmazó táplevest (M9 mineral medium, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,05 mM FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0,02 mM CaCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 0,01 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,01 mM ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,002 mM CoCl<sub>2</sub>, 0,002 mM CuCl<sub>2</sub>, 0,002 mM NiCl<sub>2</sub>, 0,002 mM Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0,002 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), majd 37°C hőmérsékleten, 160 rpm-on rázatva növeltük. A termelő (plazmidot hordozó) törzsek esetében a

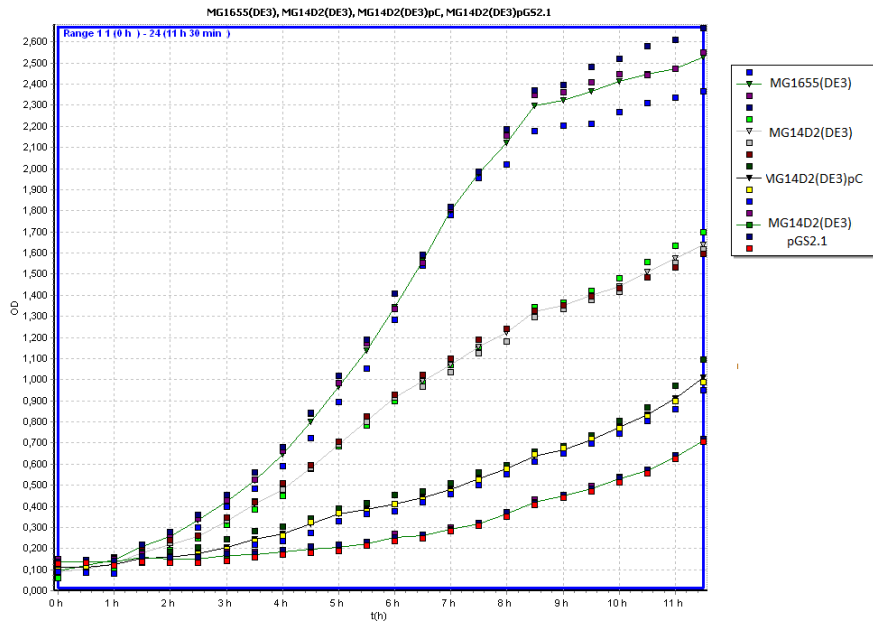
heterológ gének expressziójának indukálása a laktóz analóg IPTG hozzáadásával történt 0.5 mM koncentrációban. Oxigén-limitált kultúrák esetében speciális fóliával lezárt mikrotitráló lemezekben, illetve légmentesen lezárt üvegedényekben végeztük a tenyésztést. Az optikai denzitás értékek meghatározása spektrofotometriásan történt (CamSpec M330, BMG Fluostar Optima mikroplate olvasó).

A baktériumkultúrák populációdinamikai, illetve fitnessz-vizsgálatának eredményeként, különböző szénforrás (glükóz, glicerín) mellett, illetve O<sub>2</sub>-ellátottsági körülmények között nyert kísérleti adatok megfelelő támpontot nyújtottak a további, bioraktorban végzett kísérletekhez. Az 1. ábrán bemutatott kísérleti eredmények alapján elmondhatjuk, hogy aerob körülmények között, populációdinamikai szempontból különbség mutatkozik az eredeti, deléciós, illetve a heterológ enzimeket (mcr, sucCD) tartalmazó kultúrák növekedési profilja, illetve stabilitása tekintetében.



Ábra 1. Az eredeti, deléciós, illetve a heterológ enzimeket (mcr, sucCD) tartalmazó *E. coli* kultúrák dinamikája glicerín, illetve glükóz szénforrás használatára esetén.

Aerob körülmények között az exponenciális növekedési szakasz időtartama az MG1655 törzs esetében ~5 óra, a becsült növekedési sebesség ~0,26/h, a generációs idő pedig 2.67 óra (2. ábra). Mindezek ellenére, az *in silico* szimulációkban kapott elméleti növekedési sebesség (0.59/h) eléréséhez további, hosszútávú adaptációs kísérletek szükségesek, melyek szakirodalmi adatok szerint elvezethetnek az *in silico* predikciókhoz hasonló növekedési eredményekhez, ugyanakkor a termékképzés javítása szempontjából is elengedhetetlennek tűnnek.

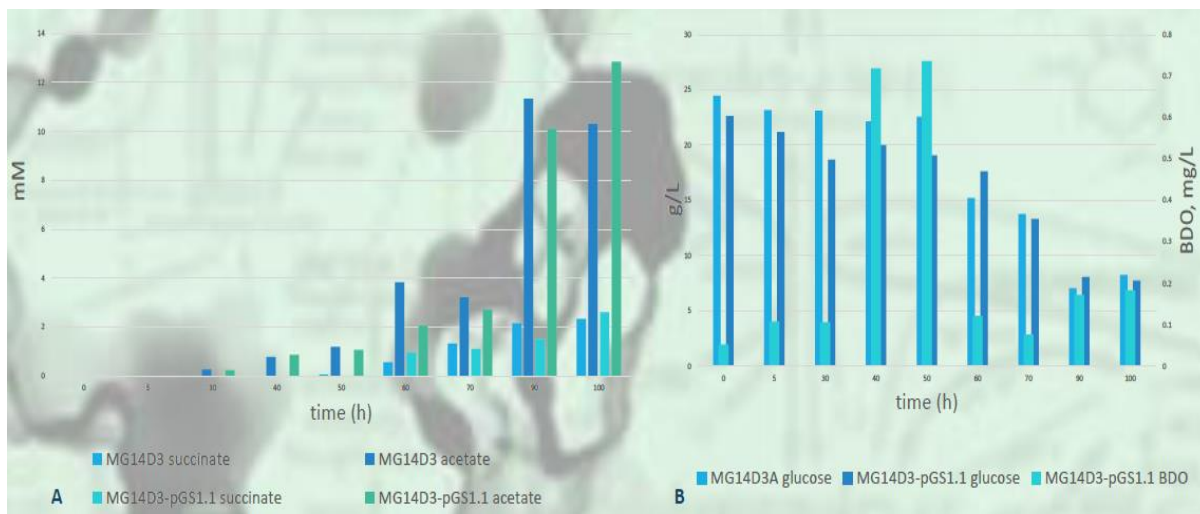


Ábra 2. Az eredeti, deléciós, illetve a heterológ enzimeket (mcr, sucCD) tartalmazó E. coli kultúrák dinamikája glükóz szénforrás esetében. (Folytonos vonallal a hármasszoros ismétlésben mért minták normalizált átlaga jelölve.)

## 2. Az 1,4-butándiol glükózból, illetve glicerinnél történő fermentációs körülményeinek optimalizálása

A megfelelő tenyésztési körülmények, illetve a termelő törzsek különböző körülményeken meghatározott növekedési jellemzőinek meghatározása után, állandó paramétereken, bioraktorban vizsgáltuk ezen törzsek metabolikus termékeit változásokat oxigén-limitált körülmények között. Ennek megfelelően, a termelő törzsből létrehozott kultúrákat M9 ásványi tápoldatban, glükóz szubsztrát adagolásával neveltük 37 °C, pH 7 és 350 rpm kezdeti keverés mellett (Sartorius Biostat®A Plus 2 L ösztérfogat, BioPAT® MFCS/DA vezérlő, és adatfeldolgozó szoftver). Az oldott oxigén mennyiségének szabályozását a reaktor légterében létrehozott levegőárammal biztosítottuk, követve a pO<sub>2</sub>, OD<sub>600</sub>, szubsztrát, termék, illetve néhány kulcsmetabolit változását meghatározott időpontokban. A metabolikus termékek meghatározását HPLC Agilent Infinity 1260 folyadékromatográfiai rendszerrel végeztük (DAD és RID detektorok, auto.sampler, Coregel 87H3 oszlop, 50°C, folyadékfázisként 0.008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-t használva, 0.6 mL/min térfogatárammal).

A 3. ábrán bemutatott kísérleti eredmények alapján, a kultúrák ecetsavat, szukcinsavat és 1,4-butándiolt kezdtek termelni az anaerob körülmények beállása után, azonban a céltermék koncentrációja (0.76 mg/L) kisebbnek bizonyult az in silico predikciók által becsült termeléshez viszonyítva.



Ábra 3. Szubsztrát, termék illetve néhány metabolit koncentrációjának változása fermentáció alatt. A) Génkiütött, illetve termelő törzsekből létrehozott anaerob kultúrák kulcs-metabolitjainak változása. (B) Szubsztrát, illetve 1,4 BDO koncentrációjának változása.

#### 4. KÖVETKEZTETÉSEK

A kutatási téma 2016-os évre vonatkozó tevékenységei, a fenti beszámoló tükrében, teljesítettnek tekinthetők. A lezárt periódus eredményei:

- a gazdatörzs metabolikus optimalizálását a versengő útvonalak lezárásával valósítottuk meg, és előállítottuk, az 1,4-butándiol előállítására alkalmas *E. coli* MG1655 deléciós, illetve heterológ bioszintetikus útvonalat tartalmazó törzset
- meghatároztuk a termelő törzsek megfelelő tenyésztési körülményeit, illetve extenzív összehasonlító vizsgálatokat végeztünk az eredeti, génkiütött, illetve heterológ útvonalat tartalmazó *E. coli* törzsek növekedési profilja szempontjából
- bioreaktorban végzett fermentációs kísérletek során bizonyítottuk, hogy sikerült egy stabil, 1,4-butándiol termelésére alkalmas *E. coli* törzs létrehozása génmérnökségi és metabolikus mérnökségi módszerek segítségével
- a céltermék hozamának tekintetében eredményeink szerénynek mondhatók, azonban további hosszútávú adaptációs kísérletekkel, génexpressziós szabályozási elemek optimalizálásával a továbbiakban folytatjuk egy ipari alkalmazásokban is használható baktériumtörzs kifejlesztését.

#### 5. A KUTATÁS EREDMÉNYEINEK HASZNOSÍTÁSA

Konferencia részvételek:

1. Triple helix Conference on Bio-based Economy, 2016. július 19-20, Budapest, Magyarország.

Publikációk:

1. **Miklóssy, I.,** Bodor, Z., Sinkler, R., Orbán, K. C., Lányi, S., Albert, B.: *In silico and in vivo stability analysis of a heterologous biosynthetic pathway for 1,4-butanediol production in metabolically engineered E. coli.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2016, <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2016.1198721>. Published on-line 05 Aug 2016.

## BIBLIOGRÁFIA

1. *Designing metabolic engineering strategies with genome-scale metabolic flux modeling.* **Yen, J Y, és mtsai.** 2015., Advances in Genomics and Genetics,, 5. kötet, old.: 93-105.
2. *Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges.* **Raman, K és Chandra, N.** 2009., Brief. Bioinforma, 10. kötet, old.: 435-449 .
3. *A comprehensive genome-scale reconstruction of Escherichia coli metabolism.* **Orth, J D, és mtsai.** 53, 2011., Mol. Syst. Bio., 7. kötet.
4. *Dissection of Malonyl-Coenzyme A Reductase of Chloroflexus aurantiacus results in enzyme activity improvement.* **Liu, C, és mtsai.** 9, 2013., PLOS One, 8. kötet, old.: e75554.
5. *Butanol production from glycerol by recombinant Escherichia coli.* **Zhou, P, és mtsai.** 2014., Annals of Microbiology, 64. kötet, old.: 219-227.
6. *Production of (3S)-acetoin from diacetyl by using stereoselective NADPH-dependent carbonyl reductase and glucose dehydrogenase.* **Gao, C, és mtsai.** 2013., Bioresource Technology, 137. kötet, old.: 111-115.
7. *Metabolic engineering of acetoin and meso-2,3-butanediol biosynthesis in E. coli.* **Nielsen, D.R., Yoon, S-H., Yuan, C. J., Prather, K.L.J.** 2010., Biotechnology Journal, 5. kötet, old.: 274-284.
8. **Li, X.,,**
9. *Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in Escherichia coli.* **Jung, W.S., Kang, J.H., Chu, H.S., Choi, I.S., Cho, K.M.,** 2014., Metabolic Engineering, 23. kötet, old.: 116-122.
10. *Metabolic Engineering: Present and Future.* **Woolston, B M, Edgar, S és Stephanopoulos, G.** 2013., Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng., 4. kötet, old.: 259–88.
11. *Genomics-driven discovery of PKS–NRPS hybrid metabolites from Aspergillus nidulans.* **Bergmann, S, és mtsai.** 2007., Nat Chem Biol, 3. kötet, old.: 213-217.
12. *Multivariate modular metabolic engineering of Escherichia coli to produce resveratrol from L-tyrosine.* **Wua, J, és mtsai.** 4, 2013., Journal of Biotechnology, 167. kötet, old.: 404–411.
13. *Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene coding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of Clostridium acetobutylicum ATCC 824.* **Fontaine, L., et. al.** 3, 2002., Journal of Bacteriology, 184. kötet, old.: 821-830.
14. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* **Sambrook, J F és Russell, D W (szerk).** 2001. Harmadik kiadás., Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY

