

Molekulární biotechnologie č.10 b.

Využití poznatků molekulární biotechnologie
Bioremediace a využití odpadní biomasy

Bioremediace a využití odpadní biomasy

- Bioremediace: Proces využívající biologických činitelů k odstranění toxických látek z vnějšího prostředí.
- Odpadní biomasa: Odpadní materiály produkované potravinářským průmyslem a zemědělstvím,
- je považována za významnou surovinu.

Bioremediace - 2 hlavní problémy

- Jak nakládat s velkým množstvím odpadů nově vznikajících
- Jak odstranit toxické komponenty naakumulované ve vodě, v půdě a na skládkách v minulých desetiletích
- Příp. jak snížit a opětně využít odpady s využitím biotechnologických postupů.
- Mnohé vlády vyhlásily program 3R – reduce, reuse, recycle (snížit, znovu využít, recyklovat)

Mikrobiální degradace xenobiotik

- Xenobiotika: nepřírodní, syntetické látky, cizí pro životní prostředí (herbicidy, pesticidy, rozpouštědla, chladičí média apod.)
- Jsou degradována půdními mikroorganismy rodu *Pseudomonas*.

Baktérie rodu *Pseudomonas*

- Využívají organické sloučeniny jako zdroje C
- Mohou degradovat více jak 100 různých organických sloučenin
- Biodegradace vyžaduje řadu různých enzymů
- Geny kódující tyto enzymy jsou lokalizovány na chromozomu i na plasmidech

Pseudomonádové plasmidy a jejich degradativní dráhy (Glick a spol. 2003)

Table 10.1 Typical *Pseudomonas* plasmids, their degradative pathways, and sizes.

Name of plasmid ^a	Compound degraded	Plasmid size (kb)
SAL	Salicylate	60
SAL	Salicylate	72
SAL	Salicylate	83
TOL	Xylene/toluene	113
pJP1	2,4-D	87
pJP2	2,4-D	54
pJP3	2,4-D	78
CAM	Camphor	225
XYL	Xylene	15
pAC31	3,5-Dichlorobenzoate	108
pAC25	3-Chlorobenzoate	102
pWWO	Xylene/toluene	176
NAH	Naphthalene	69
XYL-K	Xylene/toluene	135

^aPlasmids with the same name encode a similar degradative pathway despite the fact that they have different sizes and were described in different laboratories.

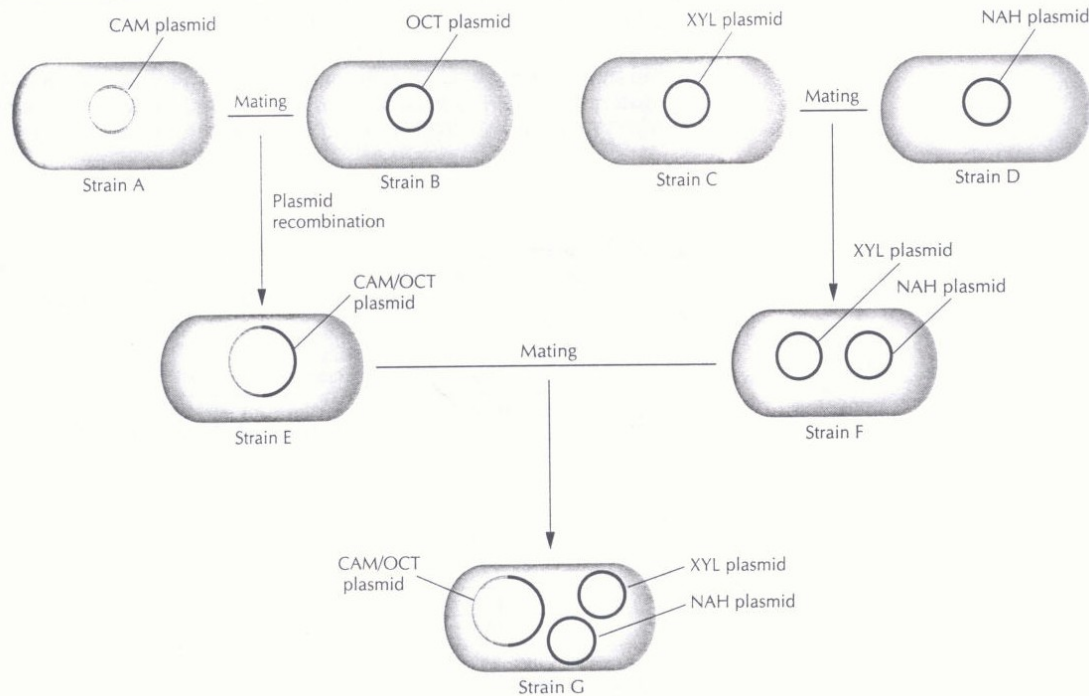
Adapted from Cork and Krueger. 1991. *Adv. Appl. Microbiol.* **36**:1–66.

Genetické inženýrství biodegradativních drah

- Se provádí s cílem zvýšit degradativní kapacitu kmenů
- Byl zkonstruován bakteriální kmen, který degraduje různé ropné produkty: kafr, oktan, xylen, naftalen
- Tzv. superzvíře (superbug)
- Konstrukce a využití tohoto plasmidu bylo patentováno (první patent týkající se rekombinantní DNA)

Superbug (Glick a spol. 2003)

Figure 10.5 Schematic representation of the development of a bacterial strain that can degrade camphor, octane, xylene, and naphthalene. Strain A, which contains a CAM (camphor-degrading) plasmid, is mated with strain B, which carries an OCT (octane-degrading) plasmid. Following plasmid transfer and homologous recombination between the two plasmids, strain E carries a CAM and OCT biodegradative fusion plasmid. Strain C, which contains a XYL (xylene-degrading) plasmid, is mated with strain D, which contains a NAH (naphthalene-degrading) plasmid, to form strain F, which carries both of these plasmids. Finally, strain E and strain F are mated to yield strain G, which carries the CAM/OCT fusion plasmid, the XYL plasmid, and the NAH plasmid.

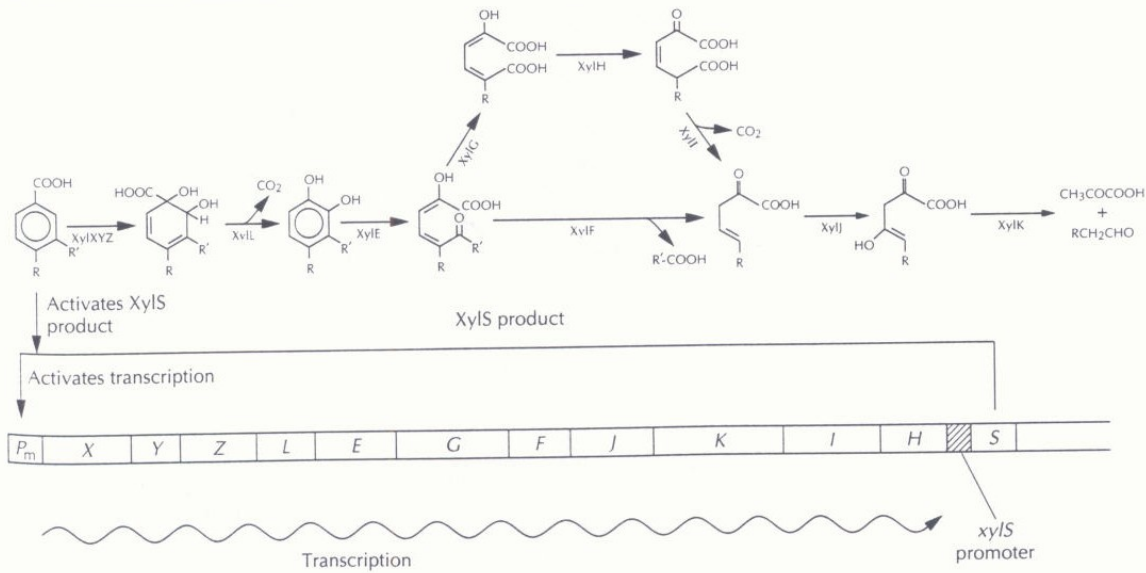


Genetické inženýrství biodegradativních drah se provádí s cílem

- Ovlivnit transkripci genů
- Změnit regulaci exprese genů biodegradativních drah
- U plasmidu pWWO

Plasmid pWWO (Glick a spol. 2003)

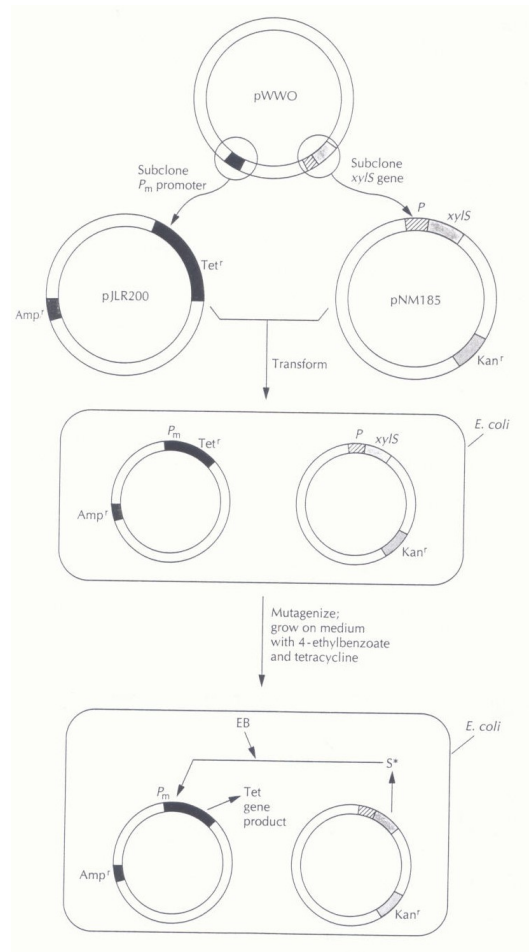
Figure 10.6 The meta-cleavage pathway and the *xyl* operon of the toluene/xylene-degrading plasmid pWWO. Transcription of the *xyl* operon is controlled by the P_m promoter, which is regulated by the XylS gene product that must be activated by one of the initial pathway substrates. The genes from *xylX* to *xylH* are under the control of the P_m promoter. The *xylS* gene, which is not part of this operon, is constitutively expressed. Some of the primary substrates are benzoate where R and R' = H; 3-methylbenzoate where R = H and R' = CH₃; 3-ethylbenzoate where R = H and R' = CH₂CH₃; and 4-methylbenzoate where R = CH₃ and R' = H. The genes *xylXYZ* encode toluene dioxygenase; *xylL* encodes dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase; *xylE* encodes catechol 2,3-dioxygenase; *xylF* encodes hydroxymuconic semialdehyde hydrolase; *xylG* encodes hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase; *xylH* encodes 4-oxalocrotonate tautomerase; *xylI* encodes 4-oxalocrotonate decarboxylase; *xylJ* encodes 2-oxopent-4-enoate hydratase; and *xylK* encodes 2-oxo-4-hydroxypentonate aldolase.



Konstrukce buněk

- S xylS proteinem aktivovaným 4-ethylbenzoátem

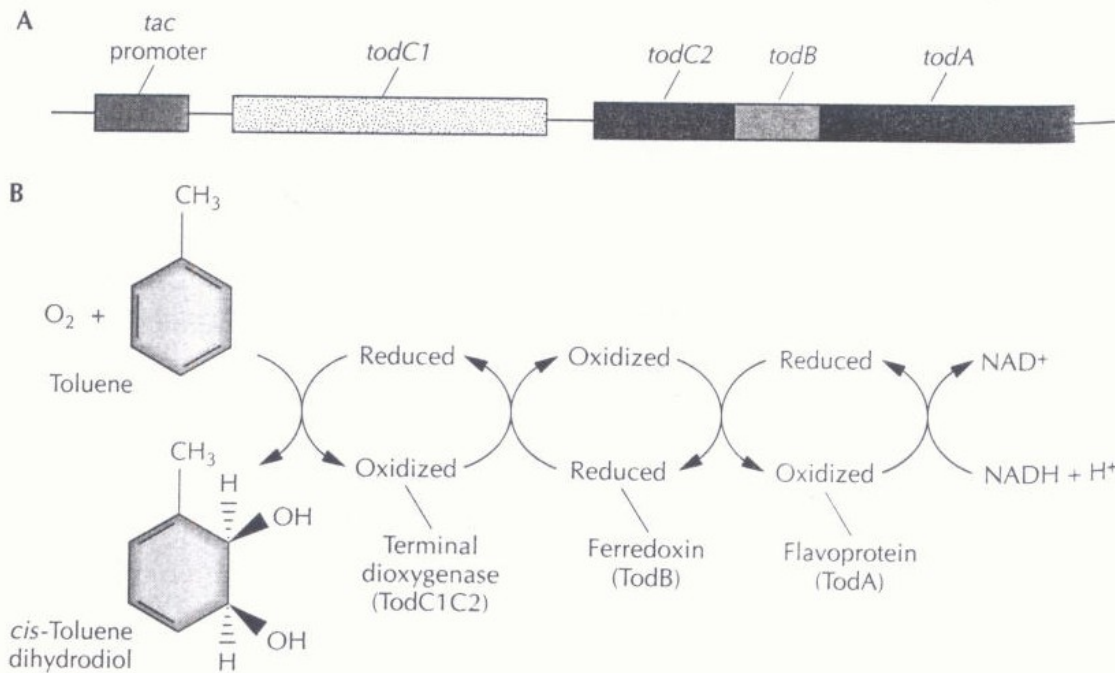
Figure 10.7 Protocol used to create a XylS protein that can be activated by 4-ethylbenzoate. The P_m promoter is cloned onto plasmid pBR322 and replaces the tetracycline-resistance gene promoter to form plasmid pJLR200; the *xyIS* gene and its promoter are spliced onto a broad-host-range plasmid containing a kanamycin-resistance gene. *E. coli* is transformed with both of these plasmids. Transformants are selected by their resistance to both ampicillin and kanamycin and then chemically mutagenized with ethylmethane sulfonate. The cells with a mutation (S^*) in the *xyIS* gene that allows the XylS protein to be activated by 4-ethylbenzoate (EB) are the only ones that can grow on medium that contains both 4-ethylbenzoate and tetracycline, because only these cells are resistant to tetracycline.



Genové manipulace

- S toluen dioxigenázovým operonem

Figure 10.8 A cloned toluene dioxygenase operon under the control of the *tac* promoter in *E. coli*. **A.** Toluene dioxygenase activity is due to the products of four genes (*todA*, *todB*, *todC1*, and *todC2*). *todA* encodes a flavoprotein that accepts electrons from NADH and transfers them to a ferredoxin encoded by *todB*, which reduces the terminal dioxygenase that is encoded by *todC1* and *todC2*. These genes are equivalent to the genes *xylXYZ* shown in Fig. 10.7. **B.** Toluene is converted to *cis*-toluene dihydrodiol by the concerted enzymatic activities of the Tod proteins.



Psychrotrofní bakterie

- Mohou nalézt uplatnění při degradaci škodlivin ve vodách (ne mesofilní)
- Do nich se přenášejí vhodné geny

Psychrotrofní degradující kmeny *P. putida*

Table 10.2 Generation time of wild-type (nontransformed) and transformed psychrotrophic strains of *Pseudomonas putida* on salicylate or toluate as the sole carbon source at various temperatures.

Temp (°C)	Generation time (hours)		
	Wild-type + salicylate	Transformant + salicylate	Transformant + toluate ^a
37	No growth	No growth	No growth
30	2.2	2.5	2.0
25	2.1	3.2	1.3
20	2.6	3.8	1.9
15	3.2	4.2	2.9
10	6.3	5.6	3.3
5	13.9	12.9	12.2
0	18.6	18.1	24.4

^aNote that the wild-type strain is unable to use toluate for growth at any temperature because it lacks the enzymes to metabolize this compound.

Adapted from Kolenc et al. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:638–641.

Biosenzory

- Se konstrují s cílem detekovat přítomnost nežádoucích látek v prostředí
- Např. biosensor s využitím genově modifikované bakterie *P. fluorescens*

Biosensor

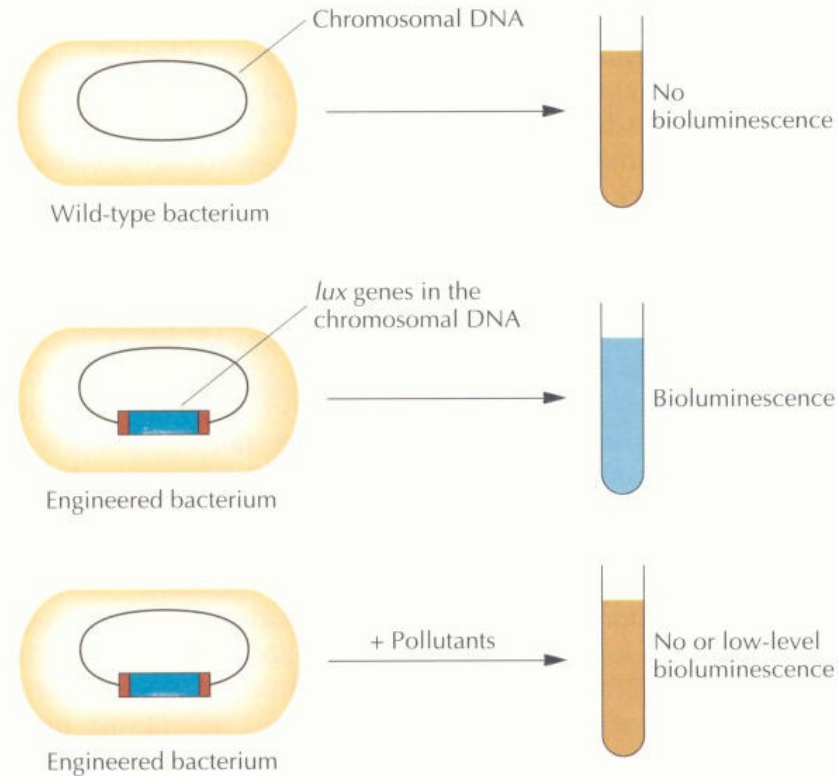


Figure 9.16 Assaying for the presence of pollutants with genetically engineered bioluminescent *P. fluorescens*.