

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μεταβολική Μηχανική – Καινοτόμος βιοτεχνολογία ετερόλογης σύνθεσης φυτικών βιοενεργών προϊόντων από μικροοργανισμούς



των Δρ. Εμμανουήλ Τραντά και Δρ. Φίλιππου Βερβερίδη

Τα φυτικά είδη που έχουν εξελικτικά αναπτυχθεί στα χερσαία οικοσυστήματα παράγουν ένα πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών, πολλοί από τους οποίους έχουν πολύ σημαντικές φαρμακολογικές και αξιοποιήσιμες βιοτεχνολογικά ιδιότητες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλούς τομείς της καθημερινότητας. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό το γεγονός ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό από τα περίπου 500 χιλιάδες φυτικά είδη που έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα έχει χαρακτηριστεί ως προς το χημικό περιεχόμενό τους. Το γεγονός αυτό φέρνει τα φυτά στο προσκήνιο στην προσπάθεια για αναζήτηση βιο-ενεργών ουσιών, δηλαδή ουσιών που μπορούν να επιφέρουν επωφελή βιολογική δράση όταν χρησιμοποιηθούν από τον άνθρωπο. Κατά συνέπεια, τα φυτά μπορούν να τροφοδοτήσουν την ανθρώπινη δραστηριότητα με νέες χημικές ουσίες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια μιας περισσότερο βιώσιμης ανάπτυξης με εκφάνσεις στην γεωργία, την υγεία, την διατροφή και άλλες πτυχές της καθημερινότητας.

Η σύνθεση με χημικά μέσα των δευτερογενών μεταβολιτών είναι ασύμφορη λόγω των εξαιρετικά πολύπλοκων δομών των ενώσεων. Επιπρόσθετα, οι κλασικές μεθοδολογίες εκχύλισης/καθαρισμού που χρησιμοποιούνται για την απομόνωσή τους δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτικές, κάνοντας επιβεβλημένη την εξεύρεση νέων μεθοδολογιών σύνθεσης τέτοιων βιο-ενεργών

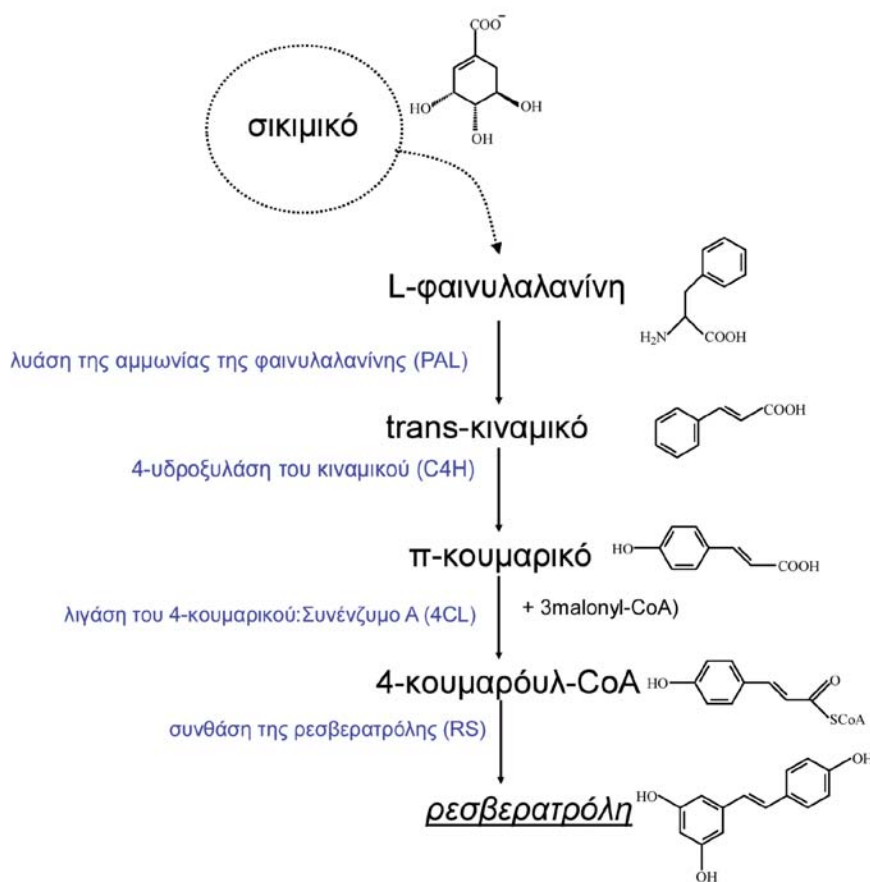
ενώσεων. Σήμερα, στα πλαίσια της αποδοτικότερης παραγωγής τέτοιων μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας, προωθείται η **ορθολογική** τροποποίηση των μεταβολικών οδών σύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών σε φυτά και σε μικρόβια.

Η παγκόσμια αγορά φαρμακευτικών προϊόντων υπολογίζεται ότι θα ανέλθει στα 1,3 τρισεκατομμύρια δολάρια το 2020 (Abdullah et al., 2008). Ενώ τα φάρμακα που προέρχονται από χημική σύνθεση συνεχίζουν να αποτελούν την πλειοψηφία, ο τζίρος που δημιουργήσαν σκευάσματα προερχόμενα από χρήση βιοτεχνολογίας το 2003 εκτιμήθηκε στα 30-35 δισεκατομμύρια δολάρια, 15% του συνολικού τζίρου των φαρμακευτικών προϊόντων (Walsh, 1999). Από αυτά, εκείνα που προήλθαν από φυτά είχαν τζίρο 9-11 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως (Abdullah et al., 2008). Συνεπώς, η συνεργεία ακαδημαϊκών και ερευνητικών ινστιτούτων με τη βιομηχανία, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και νέων μορίων/σκευασμάτων για την αντιμετώπιση των ασθενειών (Rodney and Gibaldi, 2003).

Η ρεσβερατρόλη, (trans - 3, 5, 4' - trihydroxystilbene, Εικ. 1) αποτελεί ένα μόριο που συγκεντρώνει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών μιας και εμφανίζει τόσο φαρμακευτικές όσο και φυτοπροστατευτικές ιδιότητες. Έχει βρεθεί ότι τροποποιεί το μεταβολισμό των λιπιδίων και

ότι αναστέλλει την οξείδωση χαμηλής-πυκνότητας (low-density) λιποπρωτεϊνών καθώς και τη θρόμβωση αιμοπεταλίων (Τραντάς, 2009).

έχει αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Τραντάς, 2009). Από πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα στο Εργαστήριο Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών (PBBL, Plant Biochemistry & Biotechnology Laboratory) του ΤΕΙ Κρήτης, βρέθηκε ότι η ρε-



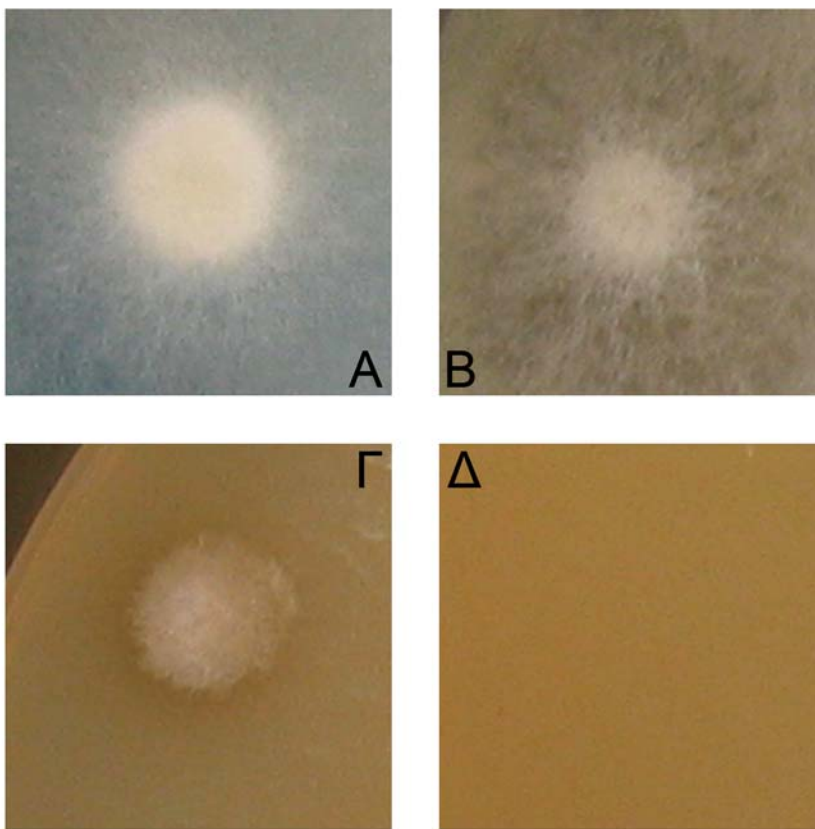
Εικόνα 1. Παρουσίαση βιοσυνθετικού μονοπατιού *trans*-ρεσβερατρόλης που μελετήθηκε στο PBBL (ΤΕΙ-Κρήτης). PAL: αμμωνιολυάση της φαινυλαλανίνης, C4H: 4-υδροξυλάση κινναμικού οξέος, 4CL: λιγάση του π-κουμαρικού οξέος:συνένζυμου A, RS: συνθάση της ρεσβερατρόλης (Τραντάς, 2009).

Ως φυτοοιστρογόνο (συμπληρώνει διαμέσου της διατροφής τα επίπεδα των οιστρογόνων στον ανθρώπινο οργανισμό), η ρεσβερατρόλη μπορεί να συμβάλει στην καρδιαγγειακή προστασία ενώ επιπλέον

σβερατρόλη (Εικ.1) που παράγεται από μερικά φυτά (όπως, αμπέλι, αραχίδα, κλη) με σκοπό την αυτοπροστασία τους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενάντια στον βοτρυτή, ένα σημαντικό φυτοπαθογόνο αίτιο που κα-

ταστρέφει σημαντικές εμπορεύσιμες ποσότητες σταφυλιών τόσο προσυληλεκτικά (πρωτης συγκομιδής) όσο και μετασυληλεκτικά (μετά τη συγκομιδή και κατά την εμπορική τους διακίνηση). Αρχικά πειράματα στο PBBL έδειξαν ότι η ουσία αυτή μπορεί να περιορίσει έως και να αναστείλει την ανά-

επίπονη, χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία. Η υψηλή βιολογική αλλά και οικονομική αξία του μορίου, το καθιστούν ιδανικό για την εφαρμογή βιοτεχνολογικών μεθόδων σύνθεσής του, με σκοπό την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υψηλής καθαρότητας με χαμηλό κόστος παραγωγής.



Εικόνα 2. Επίδραση ημικάθαρης μορφής ρεσβερατρόλης, απομονωμένης από σταφύλια, στην ανάπτυξη κονιδίων βοτρυτή. Α: 0mg/L, Β: 60μg/L ρεσβερατρόλης, Γ: 173μg/L ρεσβερατρόλης, Δ: 300μg/L ρεσβερατρόλης (Τραντάς, 2009).

πτυξη του βοτρυτή σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Εικ. 2, 200-300μg/L), γεγονός που αναδεικνύει τη σπουδαιότητα της ουσίας αυτής ως προς το φυτοπροστατευτικό της ρόλο (Τραντάς, 2009). Όμως, η απομόνωση της από φυτικές πηγές, αποτελεί

Οι (πολύ)φαινολικές ενώσεις στους καρπούς της ελιάς, όπου κυριαρχούν η ελλευρωπαΐνη (oleuropein, ομάδα σεκοϊριδοειδών) και τα παράγωγά της τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη (Hydroxytyrosol; HT), έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες όντας

φυσικά αντιοξειδωτικά (Chimi et al., 1991), ενώ αναστέλλουν τη δραστηριότητα των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση του ελαιοκάρπου (Brenes-Balbuena et al., 1992; Brenes et al., 1993). Προηγούμενες έρευνες στο Εργαστήριο Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών (PBBL, ΤΕΙ Κρήτης) έδειξαν ότι η ΗΤ έχει πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική και κυρίως αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Πρωταρχικά πειράματα μελών της ερευνητικής ομάδας δείχνουν ότι η ΗΤ ως προϊόν αποδόμησης της ελαιοκαΐνης, είναι ικανή να αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων οικονομικά σημαντικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων, μεταξύ των οποίων το *Clavibacter michiganensis* (θετικό κατά Gram) σε συγκέντρωση 0.5% w/v και το *Pseudomonas syringae* pv. tomato (αρνητικό κατά Gram) σε συγκέντρωση 0.1% w/v (Mavrakis et al., 2008a; Mavrakis et al., 2008b). Επιπρόσθετα, οι σημαντικότερες ιδιότητες που κάνουν την ΗΤ τόσο ελκυστικό μόριο είναι: **α)** η ικανότητά της να αποσβένει τις ελεύθερες ρίζες μέσα στα κύτταρα και άρα να λειτουργεί ως ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας (Visioli et al., 1998), **β)** η δυνατότητα που έχει στη μείωση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο και αθηροσκλήρωση (Yang et al., 2007) και **γ)** το γεγονός ότι παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνα του ανθρώπου και των φυτών (Tuck and Hayball, 2002).

Από όσα γνωρίζουμε έως τώρα, η ΗΤ παράγεται στη φύση για τη δημιουργία της ελαιοκαΐνης και εντοπίζεται κυρίως κατά την ωρίμανση του ελαιοκάρπου ως προϊόν καταβολισμού της (Soler-Rivas et al., 2001). Παρόλα αυτά, μόνο το 2% περιέχεται στο ελαιόλαδο, ενώ το υπόλοιπο 98% των σημαντικών αντιοξειδωτικών της ελιάς καταλήγει στα απόβλητα των ελαιολιτριβείων (Agalias, et al., 1997). Το γεγονός αυτό της κατάληξης ενός τόσο ισχυρού

αντιοξειδωτικού στα απόβλητα με αποτέλεσμα την πιθανή μόλυνση του περιβάλλοντος, έχει απασχολήσει τα τελευταία χρόνια την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου PBBL, που οδήγησε και στη συνεργασία με το Εργαστήριο Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Εθν. Καποδ. Παν/μίου Αθηνών. Εφαρμόστηκαν στρατηγικές αφαίρεσης των αντιοξειδωτικών από τα λιμνάζοντα φυτικά απόβλητα τα οποία και απομονώθηκαν για την περαιτέρω εφαρμογής τους. Το PBBL προσπαθεί να αξιοποιήσει τα αποτελέσματα της μικροβιοκτόνου δράσης της ΗΤ και της ρεσβερατρόλης στη γεωργία, ώστε να μπορέσουν να αξιοποιηθούν σε πρωτόκολλα φυτοπροστασίας. Για να μπορέσει να συμβεί αυτό, πρώτο μέλημα της ερευνητικής ομάδας είναι οι προσπάθειες για αυξημένη παραγωγή υδροξυτυροσόλης και ρεσβερατρόλης. Μετά την επίτευξη αυτού του στόχου, οι παραγόμενες ποσότητες των βιοενεργών αυτών ενώσεων θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε in vitro πειράματα ελέγχου της ανάπτυξης σημαντικών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.

ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ PBBL ΤΟΥ ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ

Από το 1999, η ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών (PBBL, Plant Biochemistry & Biotechnology Laboratory) του ΤΕΙ Κρήτης, μέσα από πτυχιακές και μεταπτυχιακές διατριβές και με την αξιοποίηση τεχνολογιών αιχμής της επιστήμης, επιχειρεί να συμβάλει με λύσεις στα προβλήματα που αντιμετωπίζει ο Πρωτογενής Τομέας της Κρήτης και της χώρας γενικότερα. Τρέχοντα ερευνητικά ενδιαφέροντα της ομάδας αφορούν τη διερεύνηση αξιοποίησης καινοτόμων τεχνολογιών για την ανακάλυψη και χρήση γνωστών ή νέων φυσικών προϊόντων, που μπορούν να συμβάλουν μεταξύ των άλλων (Τεχνολογία Τροφίμων) και στην επίλυση παραδοσιακών προβλημάτων φυτοπρο-

στασίας στη Γεωργία.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού αξιοποιείται πρωταρχικά η γνώση, σύμφωνα με την οποία ορισμένα φυτά μπορούν να επιβιώνουν με την εκμετάλλευση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που έχουν αναπτύξει. Αφετέρου, με τη βοήθεια της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής, αναπτύσσονται και/ή βελτιώνονται μεθοδολογίες που δύνανται να μας επιτρέψουν να απομονώσουμε τους φυσικούς αυτούς μηχανισμούς φυτοπροστασίας και μεταφέροντάς τους σε φιλικούς μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, να τους μετατρέψουμε σε βιοεργαστάσια ικανά να βιοσυνθέτουν τις φυτικές αυτές ουσίες μέσω της τροποποίησης του γενετικού τους υλικού (ετερόλογη λειτουργία). Οι ουσίες αυτές μπορούν τελικά να αποτελέσουν νέα καινοτόμα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα, δηλαδή προϊόντα με εμπορική προσέλευση, όχι μόνο για την Αγροβιομηχανία αλλά και για τη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά συντηρητικά, ασφαλή για τον καταναλωτή, αφού είναι φυτικής προέλευσης και μπορούν να προστατεύσουν σημαντικά την ανθρώπινη υγεία (βιοενεργές ουσίες). Ιδιαίτερα δίνεται έμφαση σε οξειδωτικούς μηχανισμούς της φύσης, όπως της ωρίμανσης και γήρανσης των οπωροκηπευτικών, καθώς και ορισμένων φυσιολογικών διεργασιών του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών.

Μία από τις πλέον πρόσφατες δραστηριότητες της ερευνητικής ομάδας του PBBL είναι η αξιοποίηση μεθοδολογιών μεταβολικής και γενετικής μηχανικής για την παραγωγή των φυτικών ουσιών που προαναφέρθηκαν (π.χ. Ρεσβερατρόλη, ΗΤ, κλπ) από φιλικούς για το περιβάλλον οργανισμούς, όπως ο σακχαρομύκητας (*Saccharomyces cerevisiae*), με γενετικά και περιβαλλοντικά ελεγχόμενο τρόπο. Τα μέλη του PBBL διαθέτουν μακρόχρονη

εμπειρία σε τομείς που σχετίζονται με την ανίχνευση, τη χημική και βιοτεχνολογική σύνθεση ουσιών φυτικής ή μικροβιακής προέλευσης, ενώ είναι σε θέση να προσφέρουν στην ανάπτυξη της έρευνας και της τοπικής οικονομίας με σαφείς βιομηχανικές προεκτάσεις (Mavrakis et al., 2006; Milios et al., 2006; Trantas et al., 2008, 2009a; Trantas et al., 2009b; Ververidis et al., 2007a, b).

Εν κατακλείδει, απώτερος σκοπός των παραπάνω δράσεων του εργαστηρίου PBBL είναι η παραγωγή βιοενεργών ουσιών με καινοτόμο τεχνολογικά, αποδοτικό και οικονομικό τρόπο ώστε να μπορέσει να συμβάλει στην κάλυψη τόσο αναγκών της Αγροτικής και Φαρμακευτικής Βιομηχανίας όσο και της Βιομηχανίας Τροφίμων.

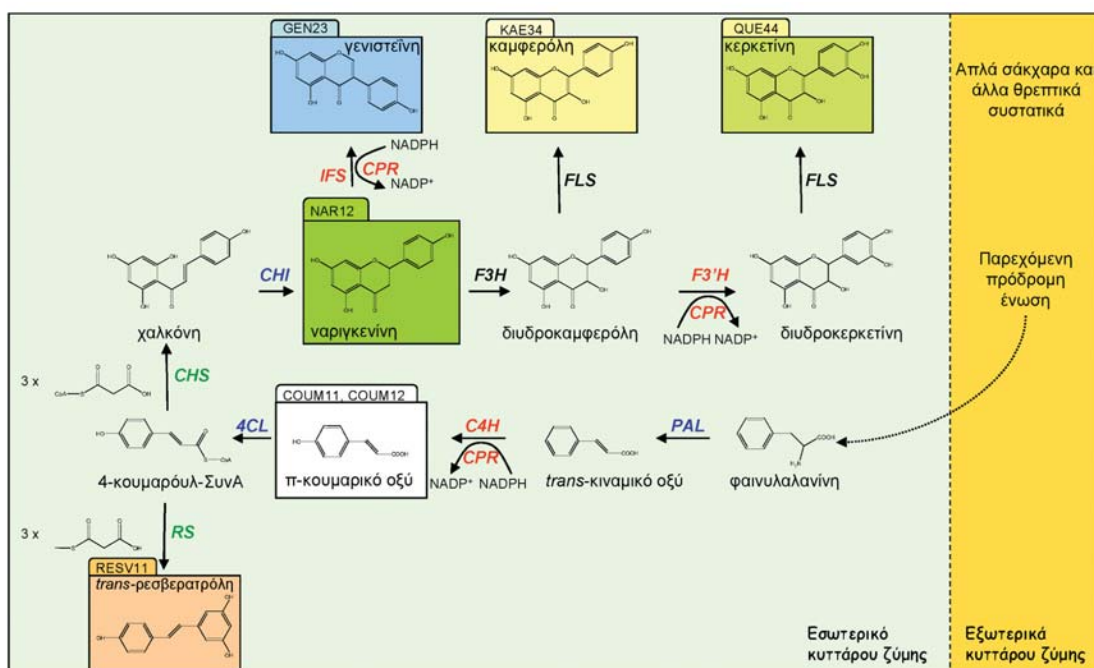
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΤΥΧΙΕΣ ΑΠΟ ΑΡΧΙΜΗΔΗ Ι ΚΑΙ ΠΕΝΕΔ 2003

Την τελευταία πενταετία ολοκληρώθηκαν μεταξύ άλλων και δύο πολύ παραγωγικά και σημαντικά ερευνητικά προγράμματα, τα ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ Ι (υποέργο 18) ΚΑΙ ΠΕΝΕΔ 2003 (776ΕΔ03), που συντόνισε και διαχειρίστηκε το Εργαστήριο PBBL και τα οποία οδήγησαν μεταξύ των άλλων σε ολοκλήρωση μιας διατριβής επιπέδου Μάστερ (κ. Δημητρίου Μήλιου, 2008) και μιας Διδακτορικής διατριβής (Δρ. Εμμανουήλ Τραντά, 2009). Οι μεταπτυχιακές αυτές εργασίες εκτελέστηκαν εξ ολοκλήρου στο εργαστήριο Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Κρήτης με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας φυτών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης (Συνεργαζόμενος καθηγητής Π.Κ. Νίκος Πανόπουλος) από όπου και απονεμήθηκαν οι τίτλοι.

Ο επιτευχθείς στόχος των ερευνητικών αυτών έργων ήταν η ανάπτυξη καινοτόμων

προϊόντων τεχνολογίας, όπως μεταβολικά τροποποιημένα στελέχη ζύμης (*S. cerevisiae*) ικανά να βιομετατρέπουν φθηνές πρόδρομες ενώσεις όπως το αμινοξύ φαινυλαλανίνη και το κουμαρικό οξύ, προς ρεσβερατρόλη, ναρινγκενίνη, καμφερόλη κερκετίνη, και γενιστεΐνη, ενώσεις με ιδιαί-

γανισμού αυτού για τη βιοσύνθεσή τους, που θεωρείται ασφαλής ακόμα και από την βιομηχανία τροφίμων (GRAS οργανισμός, Generally Regarded as Safe). Ουσιαστικά, οι κύριες τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν, είχαν σαν κίνητρο την παραγωγή των ουσιών αυτών π.χ. ρεσβερα-



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση μονοπατιών βιοσύνθεσης των ενώσεων ρεσβερατρόλη, ναρινγκενίνη, γενιστεΐνη, καμφερόλη και κερκετίνη, όπως αυτά μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά μεταβολικά τροποποιημένα στελέχη σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) και έχουν οδηγήσει σε στην ετερόλογη βιοσύνθεση των τελικών προϊόντων π-κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid στελέχος COUM11 και COUM12), ρεσβερατρόλη (trans-resveratrol στέλεχος RESV11), ναρινγκενίνη (naringenin στέλεχος NAR12), γενιστεΐνη (genistein, στέλεχος GEN23), καμφερόλη (kaempferol, στέλεχος KAE34) και κερκετίνη (quercetin, στέλεχος QUE44) (Trantas et al., 2009b).

τερα υψηλή προστιθέμενη αξία. Η καινοτομία των αποτελεσμάτων των διατριβών αυτών στηρίζεται στο γεγονός ότι αφενός είναι η πρώτη φορά που γίνεται αναφορά στην Ελλάδα για τη βιοσύνθεση των συγκεκριμένων ενώσεων στο σακχαρομύκητα και αφετέρου, στη χρησιμοποίηση του ορ-

τρόλης και γενιστεΐνης από ένα σύστημα που απαιτεί ελάχιστες εισροές (το αμινοξύ φαινυλαλανίνη ως πρόδρομη ένωση δε θεωρείται ιδιαίτερα ακριβό, <10€/gr) ώστε η παραγωγή τους να είναι οικονομικά συμφέρουσα (εμπορική τιμή της HT είναι >100€/g). Επιπρόσθετα, οι πολυφαινολικές

αυτές ενώσεις παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον τόσο για το ισχυρό αντιοξειδωτικό δυναμικό τους, όσο και επειδή είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένα βιο-ενεργά "φαρμακευτικά" μόρια με αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε ασθένειες των φυτών αλλήλα και ενάντια σε ασθένειες του ανθρώπου.

Επιτεύχθηκε η ανασύσταση, η μεταφορά δηλαδή με μεθόδους μεταβολικής μηχανικής των βιοσυνθετικών μονοπατιών που οδηγούν στην ετερόλογη βιοσύνθεση των ενώσεων κουμαρικού οξέος, ρεσβερατρόλης, ναριγκενίνης, γενισειΐνης, καμπερόλης και κερκετίνης, από κατάλληλα γενετικά τροποποιημένα στελέχη σακχαρομύκητα (Εικ. 3). Η πολύτιμη τεχνογνωσία και εμπειρία που αποκτήθηκε κατά την υλοποίηση των προαναφερθέντων έργων θα χρησιμοποιηθεί για την παραπέρα ανάπτυξη της τεχνολογίας ετερόλογης βιοσύνθεσης βιοενεργών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας με τη χρήση μικροοργανισμών.

Για την υλοποίηση των έργων αυτών συνεργάστηκαν φορείς πέραν του ΤΕΙ Κρήτης (ΤΕΙ-Κ.), όπως το Πανεπιστήμιο Κρήτης (Π.Κ.), το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας (IMBB, Ηράκλειο, Κρήτη), το Εθνικό Καποδιστριακό Παν/μιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), το Παν/μιο British Columbia (UBC, Καναδάς) καθώς και το Πολιτειακό Παν/μιο της Ν. Υόρκης (SUNY, State University of New York, ΗΠΑ) με μακρόχρονη εμπειρία στο χώρο της παραγωγής και διάθεσης βιοενεργών ουσιών. Συνεργάστηκαν ερευνητικές ομάδες υπό την επιστημονική καθοδήγηση των υπευθύνων καθηγητών/ερευνητών, Βερβερίδη Φ.(ΤΕΙ-Κ), Πανόπουλου Ν. (Π.Κ.), Τζαμαρία Δ. (IMBB), Σκαήτσουνη Λ. (ΕΚΠΑ), Douglas C. (UBC), και Koffa M. (SUNY). Η διεπιστημονικότητα των συνεργασθέντων ομάδων δηλαδή η συμμετοχή συνεργατών διαφόρων επιστη-

μονικών ειδικοτήτων, όπως Χημικών, Βιοχημικών, Φαρμακοποιών και Μοριακών Βιολόγων, εξασφάλισε την επιτυχή έκβαση των έργων αυτών, εκπλήρωση των στόχων τους και προδιαθέτει για μια επιτυχή συνεργασία στο μέλλον.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΒΗΜΑΤΑ

Στο PBBL έχει ήδη ξεκινήσει η προσπάθεια για την ετερόλογη βιοσύνθεση της υδροξυτυροσόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις μέσω τριών παράλληλων προσεγγίσεων και αναμένεται να ενισχυθεί με νέα ερευνητικά προγράμματα (ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ III, ΘΑΛΗΣ, κλπ). Οι προσεγγίσεις αυτές θα αφορούν τη χρήση πειραματικών και υπολογιστικών εργαλείων της επιστήμης της μεταβολικής μηχανικής για την ετερόλογη βιοσύνθεση της ένωσης

- 1) στο πράσινο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii*,
- 2) στον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, και
- 3) στο σταυρανθές *Arabidopsis thaliana*.

Επιπρόσθετα, θα διερευνηθεί α) το μονοπάτι βιοσύνθεσης της ΗΤ στην ελιά μιας και αυτό δεν είναι γνωστό και β) το κατά πόσο τα γενετικά τροποποιημένα φυτά (*Arabidopsis*) που θα παραχθούν και θα έχουν τη δυνατότητα αυξημένης ή de novo ετερόλογης βιοσύνθεσης ΗΤ, θα είναι ανθεκτικά σε διάφορα φυτοπαθογόνα. Τέλος, γ) θα καταβληθεί προσπάθεια βελτιστοποίησης των παραμέτρων που εμπλέκονται στα μονοπάτια της ετερόλογης βιοσύνθεσης για τη μέγιστη παραγωγή τελικού προϊόντος (ΗΤ), ώστε να απομονώνονται από καλλιέργειες σακχαρομύκητα ή χλαμυδομονάδας και να χρησιμοποιούνται απευθείας για τη φυτοπροστασία ενάντια σε σημαντικά παθογόνα των φυτών.

Ευχαριστίες

Στην εργασία αυτή συνέβαλε δημιουργικά στην επιμέλεια του κειμένου η κ. Παυλίδου Σοφία, συνεργάτης του ΡΒΒΛ (Μεταπτυχιακή Υπότροφος του Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Abdullah M.A., Rahmah A., Sinskey A.J., Rha C.K., 2008.** Cell engineering and molecular pharming for Biopharmaceuticals. *The Open Medic. Chem. J.* 2, 49-61.
- **Brenes-Balbuena M., Garcia-Garcia P., Garrido-Fernandez A., 1992.** Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1192-1196.
- **Brenes M., Garcia P., Duran M., Garrido A., 1993.** Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. *Journal of Food Science* 58, 347-350.
- **Chimi H., Cillard J., Cillard P., Rahmani M., 1991.** Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68, 307-312.
- **Mavrakis T., Agalias A., Skaltsounis A.L., Ververidis F., 2008a.** Application of bioactive plant substances from olive tissues and grapes pomace in non-chemical disease control. *Planta Med.* 74.
- **Mavrakis T., Agalias A., Skandalis N., Skaltsounis A.L., Panopoulos N., Goumas D., Ververidis F., 2008b.** Exploring potential of natural substances from olive and grape pomace in phytoprotection. *Planta Med.* 74.
- **Mavrakis, T., Trantas, E., Agalias, A., Skaltsounis L., Ververidis F., 2006.** Isolation of natural plant antioxidant substances from olive and katsigaros and their exploitation in plant protection. *Phytopathol. Mediterr.* 47, 167.
- **Milios M., Trantas E., Tampakaki E., Panopoulos N., Ververidis F., 2006.** Heterologous biosynthesis of resveratrol from *Saccharomyces cerevisiae* and its application against Botrytis. *Phytopathol. Mediterr.* 47, 167.
- **Rodney J.Y.H., Gibaldi M., 2003.** Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming proteins and genes into drugs. Wiley-Liss:Hoboken, New Jersey.
- **Soler-Rivas C., Moller A.C., Arpin N., Olivier J.M., Wichers H.J., 2001.** Induction of a tyrosinase mRNA in *Agaricus bisporus* upon treatment with a tolaasin preparation from *Pseudomonas tolaasii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58, 95-99.
- **Τραντάς Ε., 2009.** Ετερόλογη βιοσύνθεση

φυτικών φλαβονοειδών από το *Saccharomyces cerevisiae* για την αξιοποίησή τους στην φυτοπροστασία της αμπέλου και στην οινοποίηση (Διδακτορική διατριβή), Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.

- **Trantas E., Panopoulos N., Ververidis F., 2008.** Heterologous biosynthesis of resveratrol, genistein and kaempferol from *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta Med.* 74, 1163-1163.
- **Trantas E., Panopoulos N., Ververidis F., 2009a.** Biosynthesis of plant bioactive substances from yeast through metabolic engineering to control plant pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 350.
- **Trantas E., Panopoulos N., Ververidis F., 2009b.** Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 11, 355-366.
- **Tuck K.L., Hayball P.J., 2002.** Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 636-644.
- **Ververidis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretzschmar G., Panopoulos N., 2007a.** Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol. J.* 2, 1214-1234.
- **Ververidis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretzschmar G., Panopoulos N., 2007b.** Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of

multienzyme pathways in plants and microbes. *Biotechnol. J.* 2, 1235-1249.

- **Visioli F., Bellomo G., Galli C., 1998.** Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 60-64.
- **Walsh G., 1999.** Biopharmaceuticals, an overview, In: Walsh G., Murphy B. (Eds.), *Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective*. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, pp. 1-34.
- **Yang D.-P., Kong D.-X., Zhang H.-Y., 2007.** Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry* 104, 1269-1271.