

## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ ΑΠΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΕΡΓΟΣΤΑΣΙΑ

**A.I. Βαβουράκη<sup>1</sup>, Ε. Τραντάς<sup>1,2</sup>, Φ. Βερβερίδης<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο (ΕΛΜΕΠΑ), Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Βιολογικών & Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών (ΕΒΒΕ), Εσταυρωμένος, 71410 Ηράκλειο, Κρήτη

<sup>2</sup> Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο (ΕΛΜΕΠΑ), Πανεπιστημιακό Ερευνητικό Κέντρο (ΠΕΚ), Ινστιτούτο Αγροδιατροφής και Επιστημών Ζωής (ΙΝΑΖΩ), Εσταυρωμένος, 71410 Ηράκλειο, Κρήτη  
[\\*ververidis@hmu.gr](mailto:ververidis@hmu.gr)

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υδροξυτυροσόλη (ΥΤ) είναι μια αμφιπαθής λειτουργική φαινολική ένωση, που βρίσκεται στα φύλλα και τους καρπούς της ελιάς, σε ελεύθερη ή δεσμευμένη μορφή, καθώς και στο ελαιόλαδο, αλλά και στα υποπροϊόντα της παραγωγής του. Λόγω της ευεργετικής, αντιοξειδωτικής επίδρασης της ΥΤ στην ανθρώπινη υγεία και στη γεωργία, την καθιστούν εξαιρετική υποψήφια για εφαρμογή ως λειτουργικό συστατικό σε προϊόντα διατροφής, προστασίας της ανθρώπινης υγείας, καλλυντικά, καθώς και σε φυτοπροστατευτικά σκευάσματα. Επί του παρόντος, η εμπορική ΥΤ λαμβάνεται κυρίως μέσω της εκχύλισης φυσικών υλικών που την περιέχουν, ή με χημική σύνθεση. Παρόλη την αφθονία των φυσικών πρώτων υλών, μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών περιλαμβάνουν τη χαμηλή απόδοση και χρονοβόρα διαδικασία καθαρισμού, καταλήγοντας σε υπερβολικά υψηλές τιμές του τελικού καθαρού προϊόντος. Εντούτοις, μέσω της συνθετικής βιολογίας και της τεχνολογίας της μεταβολικής μηχανικής, επιτυγχάνεται η βιοσύνθεση της ΥΤ από φθηνά υλικά με την ανασύσταση φυσικών ή τεχνητών βιοσυνθετικών μονοπατιών με χρήση μεταβολικά τροποποιημένων βακτηρίων *Escherichia coli*. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κλιμάκωση (scale-up) της παραγωγής ΥΤ από L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (DOPA) από πειράματα μικρής κλίμακας (σε κωνική φιάλη 250mL), σε βιοαντιδραστήρα 1L και ημιβιομηχανικού τύπου, 50L. Χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα βακτηριακά στελέχη *E. coli*, BL21-pACYC-PcAAS που υπερεκφράζουν το γονίδιο της συνθάσης αρωματικών ακεταλδεϋδών (Aromatic Acetaldehyde Synthase, AAS), το οποίο είχε προηγουμένως κλωνοποιηθεί από τον μαιντανό (*Petroselinum crispum*). Η παραγωγή ΥΤ πραγματοποιήθηκε με καλλιέργεια των κατάλληλων βακτηριακών στελεχών σε υγρό θρεπτικό μέσο ελάχιστης σύστασης θρεπτικών υλικών (Minimal Medium M9) παρουσία του παράγοντα επαγωγής, IPTG και της πρόδρομης ένωσης, DOPA. Κατά την πειραματική διαδικασία και ανάλογα με την μέθοδο παραγωγής (κωνική φιάλη, βιοαντιδραστήρας 1L ή 50L), γίνονταν η διαρκής καταγραφή των παραγόντων ανάπτυξης, όπως του pH, της κατανάλωσης / παροχής O<sub>2</sub>, της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας, του αριθμού των ζωντανών κυττάρων και της κατανάλωσης της γλυκόζης. Ιδιαίτερα για τον βιοαντιδραστήρα 1L (Erpendorf, BioFlo 120) γίνονταν επιπλέον η διαρκής καταγραφή και ρύθμιση του διαλυτού οξυγόνου και του ρυθμού ανάδευσης. Σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνονταν δείγματα για την εκτίμηση της παραγωγής ΥΤ σε σχέση με την κατανάλωση DOPA και της γλυκόζης, οι οποίες μετρήθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας με φασματογράφο μάζας τριπλού τετράπολου (SCIEX 4500, UHPLC-MS-MS). Η βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων έδειξε την αποτελεσματική σύνθεση ΥΤ με απόδοση αντίδρασης άνω του 60%, φτάνοντας μια συγκέντρωση της τάξης των 460mg/L.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (DOPA), Υδροξυτυροσόλη, *Escherichia coli*, Μεταβολική Μηχανική

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ, συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ε.Ε. και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (ΑΝΤΙΟΧ-PLUS, κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-04267).