ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:
«Παραγωγή ανασυνδυασμένων ενζύμων στα τρόφιμα»

ΗΛΙΑΣ ΚΥΡΙΑΚΕΑΣ (71616050)

Επιβλέπουσα: ΑΝΘΙΜΙΑ ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2021

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF FOOD SCIENCES

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

Diploma Thesis:

“Production of recombinant enzymes in food industry”

ILIAS KYRIAKEAS (71616050)

Supervisor: ANTHIMIA BATRINOU

ATHENS 2021

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Anthimia Aikaterini Batrinou Digitally signed by Anthimia Aikaterini Batrinou Date: 2021.10.01 12:15:01 +03'00'

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ανθιμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Dimitra Houhoula Digitally signed by Dimitra Houhoula Date: 2021.10.03 16:26:23 +03'00'

2. Μέλος επιτροπής

Δήμητρα Χούχουλα

Χημικός, PhD, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

SPYRIDON KONTELES Digitally signed by SPYRIDON KONTELES Date: 2021.10.01 12:23:34 +03'00'

3. Μέλος επιτροπής

Σπυρίδων Κοντελές

Γεωπόνος, PhD, Ακαδημαϊκός Υπότροφος Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

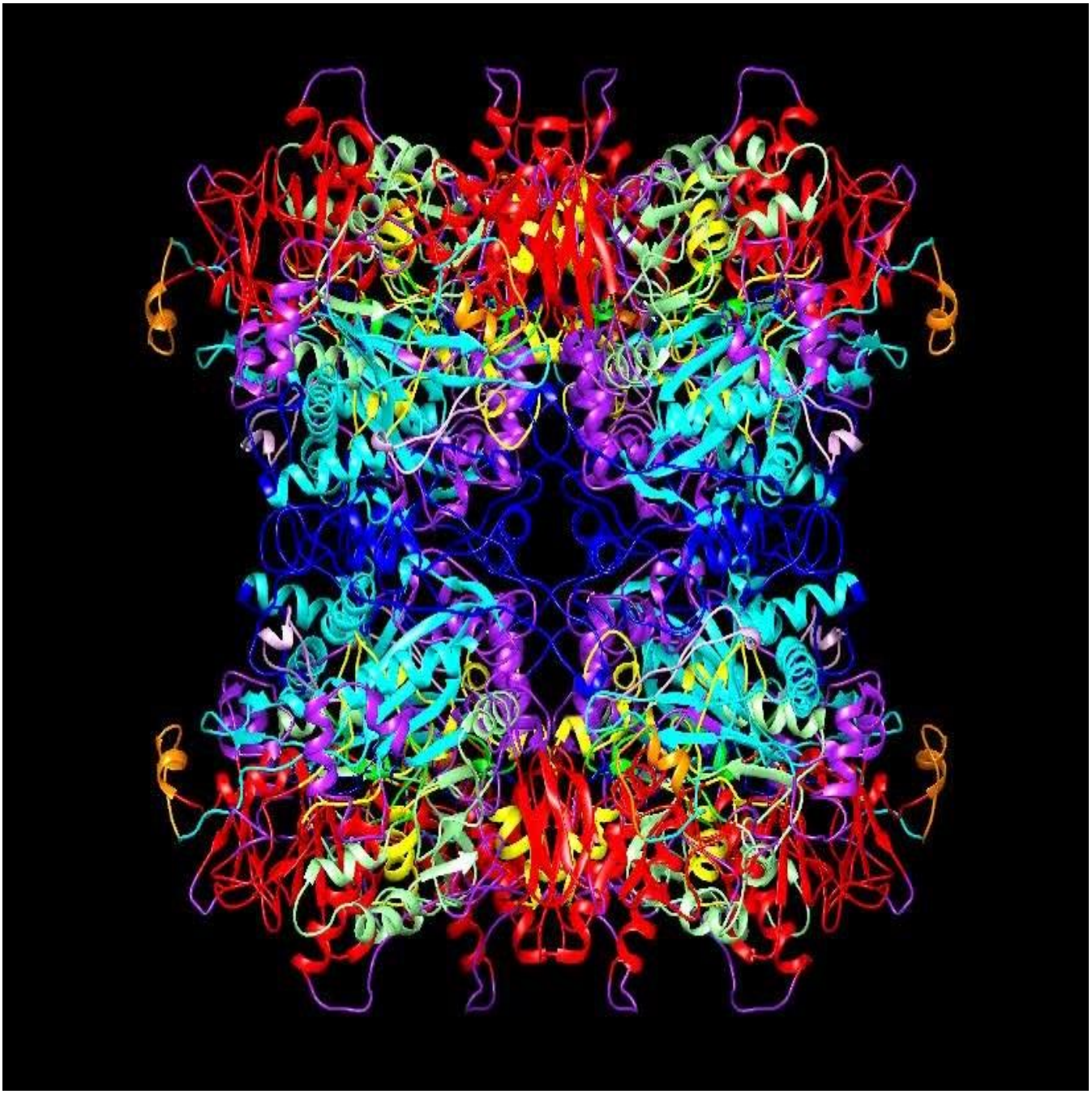
ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος ΗΛΙΑΣ ΚΥΡΙΑΚΕΑΣ του ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ, με αριθμό μητρώου 71616050 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα:



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ανασυνδυασμένα ένζυμα (recombinant enzymes) είναι ένζυμα που παράγονται και εκκρίνονται από γενετικά τροποποιημένα συστήματα ξενιστών. Οι ξενιστές μπορεί να είναι μικροοργανισμοί, φυτά ή ζωικά κύτταρα. Τα ανασυνδυασμένα ή γενετικά τροποποιημένα ένζυμα έχουν σχεδιαστεί για να βελτιώνουν ή να τροποποιούν τις ενζυμολογικές ιδιότητες ή/και να αυξάνουν την καθαρότητα και την απόδοση της έκφρασης, αλλαγές οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε τροποποιημένες αλληλουχίες αμινοξέων, που προκύπτουν από τη χειραγώγηση της γονιδιακής αλληλουχίας. Οι βασικές στρατηγικές ανασυνδυασμού των ενζύμων χωρίζονται σε 3 κατηγορίες: 1) κατευθυνόμενη εξέλιξη 2) ορθολογικός σχεδιασμός 3) ημι-ορθολογικός σχεδιασμός. Οι βασικότερες κατηγορίες ενζύμων που χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα στη βιομηχανία τροφίμων είναι οι αμυλάσες που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της αγοράς ενζύμων, οι πρωτεάσες, οι λιπάσες, οι πηκτινάσες και οι λακτάσες. Ωστόσο, αν και η τεχνολογία ανασυνδυαμένων ενζύμων βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, έχει ήδη κυριαρχήσει στην αγορά και εξελίσσεται ραγδαία.

Λέξεις κλειδιά: ανασυνδυασμένα ένζυμα, πρωτεινική μηχανική, συστήματα ξενιστών, κατευθυνόμενη εξέλιξη, ορθολογικός σχεδιασμός

ABSTRACT

Recombinant enzymes are enzymes produced and secreted by genetically engineered host systems. Hosts may be micro-organisms, plants or animal cells. Recombinant or genetically modified enzymes are designed to improve or modify enzymological properties and/or increase purity and efficiency of expression, changes which can be attributed to altered amino acid sequences resulting from manipulation of the gene sequence. The main enzyme rearrangement strategies are divided into 3 categories: 1) directed evolution 2) rational design 3) semi-rational design. The main classes of enzymes used in the food industry are amylases which constitute the largest part of the enzyme market proteases, lipases, pectinases and lactases. Although recombinant enzyme technology is at an early stage, it has already dominated the market and is developing rapidly.

Keywords: recombinant enzymes, protein engineering, hosts, directed evolution, rational design

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή 12
1.1 Ιστορικά Στοιχεία 13
1.2 Στατιστικά Στοιχεία 15
2. Διαδικασία παραγωγής ανασυνδυασμένων ενζύμων 16
2.1 Εργαλεία ανασυνδιασμού του DNA 16
2.2 Ξενιστές 19
2.2.1 Escherichia coli 22
2.2.2 Aspergillus niger 23
2.2.3 Aspergillus oryzae 24
2.2.4 Bacillus 26
2.2.5 Bacillus lichenformis 26
2.2.6 Bacillus subtilis 26
2.2.7 B. megaterium 27
2.2.8 B. brevis 28
2.2.9 Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος 28
2.2.10 Ζυμομύκητες 29
2.2.11 Pichia pastoris 29
2.2.12 Saccharomyces cerevisiae 30
2.2.13 Trichoderma 31
2.2.14 Φυτά 31
2.2.15 Ζωικά κύτταρα 33
2.3 Φορείς έκφρασης 33
2.3.1 Πλασμίδια 34
2.3.2 Βακτηριοφάγοι 36
2.3.3 Τεχνικά βακτηριακά χρωμοσώματα (BACs) 36
2.3.4 Τεχνητά χρωμοσώματα της ζύμης (YACs) 37
2.4 Κατευθυνόμενη Εξέλιξη (Directed Evolution) 38
2.4.1 Τυχαία Μεταλλαξιγένεση 39

2.4.2 Error Prone PCR 40
2.4.3 Χημική μεταλλαξιγένεση 41
2.4.4 DNA Shuffling 41
2.4.5 Εστιασμένη μεταλλαξιγένεση 42
2.4.6 Μεταλλαξιγένεση Κασσέτας 42
2.4.7 Αποκοπή (Truncation) 43
2.5 Στρατηγικές επιλογής και διαλογής (selection and screening) 44
2.5.1 Διαλογή 44
2.5.2 Διαλογή Χωρικά Διαχωρισμένων Παραλλαγών 45
2.5.3 Διαλογή Υψηλής Απόδοσης με Κυτταρομετρία Ροής 46
2.5.4 Διαλογή τεχνητών τμημάτων που μοιάζουν με κύτταρα 47
2.5.5 Επιλογή (Selection) Λειτουργικών Πρωτεϊνών 47
2.5.6 Επιλογή για Συγγένεια Δεσμού 48
2.5.7 Επιλογή με Βάση την Επιβίωση του Οργανισμού 49
2.5.8 Επιλογή εντός Τμημάτων In Vitro 49
2.6 Διαδικασία ζύμωσης 50
2.6.1 Συστήματα Ζυμωτήρων και Βιοαντιδραστήρων 51
2.7 Απομόνωση Ενζύμων 53
2.8 Λογικός ανασυνδιασμός ή Ορθολογικός σχεδιασμός (rational design) 56
2.8.1 Κατευθυνόμενη Τοποειδική Μεταλλαξιγένεση 57
2.8.2 De Novo Σχεδιασμός Πρωτεϊνών 59
2.9 Ημι-Ορθολογικός Σχεδιασμός (Semi-Rational Design) 61
2.9.1 Τοποειδική Μεταλλαξιγένεση Κορεσμού (Site Saturation Mutagenesis) 62
3. Αμυλάσες 64
3.1 Α-Αμυλάση 64
3.2 Β-Αμυλάση 67
3.3 Πουλουλανάση 69
3.4 Μαλτογενική Αμυλάση 69
4. Λιπάσες 70
4.1 Ρόλος λιπασών 71
4.2 Ευκαριωτικοί Φορείς Έκφρασης 72
4.2 Προκαρυωτικοί Φορείς Έκφρασης 73
4.3 Ανασυνδιασμένες Λιπάσες 73

5. Πρωτεάσες 75
5.1 Κατηγορίες πρωτεασών 76
5.2 Ρόλος πρωτεασών 79
5.3 Παπαΐνη 80
5.4 Χυμοσίνη (ρεννίνη) 82
6. Πηκτινάσες 84
6.1 Πεκτινλυάση 86
6.2 Πηκτινεστεράση 87
7. Λακτάσες 88
8. Άλλα ένζυμα 94
8.1 Τρανσγλουταμινάση 94
8.2 Τρανσγλουκοσιδάση 94
8.3 Ξυλανάση 95
8.3 Φυτάση 96
9. Νομοθεσία 99
9.1 Πρόσθετα τροφίμων ή βοηθήματα επεξεργασίας 99
9.2 Εξειδικευμένο τεκμήριο του καθεστώτος ασφάλειας (QPS) 100
9.3 Επισκόπηση διαφόρων ευρωπαϊκών κανονισμών 100
9.4 Επισήμανση 101
10. Μελλοντικές προοπτικές 103
11. Συμπεράσματα 105
Βιβλιογραφία 107

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Σύγκριση της μηχανικής ενζύμων με ορθολογικό σχεδιασμό και κατευθυνόμενη εξέλιξη. 60

Πίνακας 2: Παραδείγματα χρήσεων των ενζύμων στη βιομηχανία τροφίμων 91

Πίνακας 3: Ανασυνδυασμένα ένζυμα, η προέλευση τους, η βελτίωση σε σχέση με τα ένζυμα αγρίου τύπου και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την απόκτηση τους. 96

Πίνακας 4: Νομοθετικά συστήματα για τα ένζυμα τροφίμων στην Ευρωπαική Ένωση 102

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1 : Διεργασία κατευθυνόμενης εξέλιξης. Ο κύκλος διεργασίας επαναλαμβάνεται για πολλές γενεές μεταλλαξιγενέσεων έως ότου χαρακτηριστεί η πρωτείνη με τις επιθυμητές λειτουργίες. 39

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του βιοαντιδραστήρα συσκευασμένης κλίνης που χρησιμοποιείται στα γαλακτοκομικά, στην παραγωγή ποτών και άλλων βιομηχανιών (Lin, 2015). 51

Εικόνα 3: Βιομηχανικός Βιοαντιδραστήρας (Lin, 2015). 52

Εικόνα 4: Γενικό σχήμα για την παραγωγή ενζύμων και τη μεταγενέστερη επεξεργασία. 54

Εικόνα 5: Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης 55

Εικόνα 6: Διάγραμμα ροής ορθολογικού σχεδιασμού 56

Εικόνα 7: Διεργασία ημι-ορθολογικού σχεδιασμού 62

1. Εισαγωγή

Τα ένζυμα ως μακρομοριακοί βιοκαταλύτες επιταχύνουν χημικές αντιδράσεις, ακόμα και από πολλά εκατομμύρια χρόνια σε μερικά δευτερόλεπτα. Οι χημικές ουσίες πάνω στις οποίες δρούν τα ένζυμα, ονομάζονται αντιδρώντα, και οι ουσίες οι οποίες δημιουργούνται προιόντα. Όλα τα ένζυμα είναι πρωτεϊνες, συνήθως σφαιρικού σχήματος, οι οποίες δρούν είτε μόνες τους, είτε σε συμπλέγματα. Εξαιρείται, ωστόσο, ένας μικρός αριθμός ριβοενζύμων, τα οποία αποτελούνται από RNA, όπως τα γνωστά ριβοσώματα. Ο κύριος παράγοντας της καταλυτικής δράσης τους βασίζεται στην ακεραιότητα της φυσικής διαμόρφωσής τους. Μετουσιώνοντας ή διασπώντας ένα ένζυμο (όπως συμβαίνει με την θέρμαση και την αλλαγή του Ph), συνήθως χάνεται η καταλυτική ικανότητά του, και με την αποδόμηση του στα αμινοξέα του πάντοτε χάνεται. Το μοριακό βάρος των ενζύμων κυμαίνεται από 12.000 bp έως πάνω από ένα εκατομμύριο. Η καταλυτική λειτουργία πολλών ενζύμων απαιτεί την παρουσία πρωτεινικών συνενζύμων ή συμπαραγόντων (Cooper, 2000). Μία ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση λαμβάνει μέρος μέσα σε ένα θυλάκιο πάνω στο ένζυμο, το οποίο ονομάζεται ενεργό κέντρο. Το μόριο που αποτελεί στόχο για τη δράση του ενζύμου και «κολλάει» στο ενεργό κέντρο λέγεται υπόστρωμα. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος είναι η βάση της κινητικής συμπεριφοράς ενζυμικών αντιδράσεων και ενζυμικών μηχανισμών. Συνήθως, για την ονομασία ενός ενζύμου χρησιμοποιείται η κατάληξη «άση», είτε προσθέτοντας την στο όνομα του υποστρώματός τους, είτε σε σε μια λέξη η φράση που περιγράφει την αντίδραση που καταλύουν. Για παράδειγμα, η λιπάση καταλύει την υδρόλυση των λιπιδίων, διαλύοντας το μόριο με την βοήθεια του νερού.

Οι μικροοργανισμοί (ΜΟ) και τα ένζυμα χρησιμοποιούνται από τους ανθρώπους εν αγνοία τους εδώ και χιλιάδες χρόνια για την παραγωγή τροφίμων όπως η μπύρα, το ψωμί και το τυρί. Σήμερα, τα ένζυμα παράγονται βιομηχανικά από ζώα και φυτά με εκχύλιση ή από μικροβιακές πηγές και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων και την επεξεργασία τροφίμων. Τα δύο κυριότερα ένζυμα φυτικής προέλευσης που παράγονται εμπορικά είναι η παπαΐνη από την παπάγια και η βρωμελίνη από τον ανανά και τα δύο είναι πρωτεάσες (δηλαδή χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση πρωτεϊνών). Υπάρχουν, επίσης, ένζυμα όπως η πυτιά, τα οποία παράγονται παραδοσιακά από ζωικές πηγές. Ενώ πολυάριθμα άλλα ένζυμα θα μπορούσαν επίσης να

επιτελέσουν πολύτιμες λειτουργίες επεξεργασίας τροφίμων, μόνο λίγα ένζυμα φυτικής ή ζωϊκής προέλευσης κυκλοφορούν στην αγορά λόγω της ανεπάρκειας των πηγών και της έλλειψης συνοχής μεταξύ παρτίδων. Η δυσκολία και το κόστος των διαδικασιών καθαρισμού που εφαρμόζονται για τα ένζυμα φυτικής ή ζωικής προέλευσης είναι ένα άλλο εμπόδιο. Ως εκ τούτου, σήμερα περίπου το 85% των βιομηχανικών ενζύμων παράγεται από μικροοργανισμούς (50% μύκητες και ζύμες, 35% βακτήρια), ενώ το υπόλοιπο παράγεται από φυτά (Ray & Mishra, 2016).

Τα ένζυμα μπορούν να παραχθούν από κύτταρα άγριου τύπου (όπως υπάρχουν στη φύση) ή από γενετικά τροποποιημένους (μεταλλαγμένους) οργανισμούς. Επί του παρόντος, τα περισσότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων παράγονται από γενετικά τροποποιημένους (ΓΤ) μικροοργανισμούς (*Comprehensive Biotechnology*, 2019). Αυτό παρέχει δύο πλεονεκτήματα: πρώτον, είναι δυνατή η παραγωγή τροποποιημένων (γενετικά τροποποιημένων) ενζύμων με βελτιωμένες ιδιότητες για σκοπούς παρασκευής τροφίμων, και δεύτερον, είναι δυνατή η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο σε ένα μικροβιακό ξενιστή που προάγει υψηλότερη απόδοση, μικρότερο χρόνο και χαμηλότερο κόστος διεργασίας από την παραγωγή με βάση ένα στέλεχος άγριου τύπου.

1.1 Ιστορικά Στοιχεία

Υπολογίζεται ότι ο άνθρωπος, παρόλο που δε διέθετε τις γνώσεις της σημερινής εποχής, χρησιμοποιούσε ένζυμα για ζυμώσεις διαφόρων προϊόντων, όπως για παράδειγμα για την ζύμωση της ζάχαρης σε αλκοόλ, από το 7000 π.Χ.. Με το πέρασμα των χρόνων και την εξέλιξη της χημείας και της βιολογίας, έγινε γνωστή η φύση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια των ενζύμων στα τέλη του 19ου αιώνα, η οποία αργότερα οδήγησε στην ανάπτυξη του τομέα της βιοτεχνολογίας και της μοριακής βιολογίας. Το πρώτο ένζυμο που ανακαλύφθηκε ήταν η διάσταση (αμυλάση) από τους Payen και Persoz το 1833, οι οποίοι το αναγνώριζαν ως ένα ζυμωτικό παράγοντα (Armstrong, 1933). Η διεργασία της κατάλυσης, όταν δηλαδή χημικά διευκολύνουν μια αντίδραση χωρίς να υποβάλλονται τα ίδια σε αλλαγές, αναγνωρίστηκε από τον Berzelius το 1836 (Armor, 2011). Ο πρώτος που εισήγαγε τον όρο ένζυμο (από τις ελληνικές λέξεις εν + ζύμη) ήταν ο Wilhelm Kühne το 1877 (Heidelberg, 1859).

Όσο σπουδαία και αν είναι τα φυσικά ένζυμα στην εκτέλεση της λειτουργίας τους, συχνά παρουσιάζουν μειονεκτήματα που τα καθιστούν ακατάλληλα για βιομηχανικές εφαρμογές, όπως η έλλειψη σταθερότητας, η ανεκτικότητα σε (συν)διαλύτες ή το πολύ περιορισμένο εύρος υποστρώματος. Έτσι, γρήγορα έγινε επιθυμητή η δυνατότητα αλλαγής των ιδιοτήτων των ίδιων των ενζύμων. Ολόκληροι οργανισμοί υποβλήθηκαν σε συνθήκες, όπως ακτινοβολία ή χημικοί παράγοντες, που προκαλούν μεταλλάξεις, και τα στελέχη που προέκυψαν ελέγχθηκαν για ευνοϊκούς φαινότυπους. Μέσω αυτής της μεθόδου, μπορούσαν να προκύψουν στελέχη που παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες επιθυμητών προϊόντων, είτε συγκεκριμένα ένζυμα, είτε χημικές ουσίες, και να εισαχθούν εντελώς νέα μονοπάτια. Ωστόσο, οι προσεγγίσεις αυτές ήταν αργές, ήταν απίθανο να αλλάξουν άμεσα τις ιδιότητες οποιουδήποτε συγκεκριμένου ενζύμου και μπορούσαν να εφαρμοστούν πραγματικά μόνο σε οργανισμούς με αρκετά σύντομους κύκλους αντιγραφής. Έτσι, με τη διαθεσιμότητα του ανασυνδυασμένου DNA, καθώς και με την κατανόηση των ενζύμων και των μηχανισμών τους, η εισαγωγή συγκεκριμένων μεταλλάξεων σε ένα ένζυμο-στόχο ήταν πλέον εφικτή, ανεξάρτητα από τον οργανισμό από τον οποίο προερχόταν. Πράγματι, μια γενική μέθοδος για τη κατευθυνόμενη τοποειδική μεταλλαξιγένεση αναφέρθηκε από τον Michael Smith το 1978 (βραβείο Νόμπελ Χημείας 1993), την ίδια χρονιά που επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση της ινσουλίνης (Berg, 2008). Σχεδιάζοντας εκκινητές DNA που φιλοξενούσαν τις επιθυμητές μεταλλάξεις και που ήταν συμπληρωματικοί προς την αλληλουχία-στόχο που επρόκειτο να μεταλλαχθεί, και επεκτείνοντας με DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας την αλληλουχία-στόχο ως πρότυπο, μπορούσαν να παραχθούν αντίγραφα που περιείχαν τη μετάλλαξη. Με την ανάπτυξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τη δεκαετία του 1980 από τον Kary Mullis (Νόμπελ Χημείας 1993), κατέστη δυνατή η παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων αλληλουχιών DNA από ένα μόνο πρότυπο. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, η Frances Arnold χρησιμοποίησε αυτή την τεχνική για να δημιουργήσει μεγάλες βιβλιοθήκες μεταλλάξεων στις οποίες στη συνέχεια εφάρμοσε εξελικτική πίεση. Με τον τρόπο αυτό κατάφερε να παράγει μια παραλλαγή της υποτιλίνης Ε που μπορούσε να ανεχθεί υψηλές συγκεντρώσεις DMF, εισάγοντας συνολικά 10 μεταλλάξεις (Parker et al., 2011). Έτσι, γεννήθηκε ο τομέας της κατευθυνόμενης εξέλιξης. Το 1994, ο Pim Stemmer εισήγαγε την έννοια του ανακατέματος του DNA (DNA shuffling), μιμούμενος τον ανασυνδυασμό του DNA που

συμβαίνει στους οργανισμούς ως τρόπος αύξησης της γενετικής ποικιλότητας, και εφαρμόζοντάς την σε ανασυνδυασμένο DNA in vitro. Χωρίς να περιορίζονται σε γονίδια από ένα μόνο είδος, πολύ διαφορετικές πρωτεΐνες μπορούσαν να αναμιχθούν μεταξύ τους για να δημιουργήσουν νέες αλληλουχίες πολύ απομακρυσμένες από τις φυσικές. Η τεχνική αυτή αποδείχθηκε πολύ ισχυρή από μόνη της, αλλά ιδίως όταν συνδυάστηκε με την epPCR, επιτρέποντας τον συνδυασμό μεταλλάξεων από διάφορα μεταλλαγμένα χωρίς να απαιτείται κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι διάφορες μεταλλάξεις θα αλληλεπιδρούσαν μεταξύ τους (Stemmer, 1994). Η Frances Arnold έλαβε το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 2018 για την κατευθυνόμενη εξέλιξη των ενζύμων. Εκτός από την ανοχή σε συνδιαλύτες, η κατευθυνόμενη εξέλιξη χρησιμοποιήθηκε γρήγορα για τη δημιουργία ενζύμων με βελτιωμένη θερμοσταθερότητα, σταθερότητα του pH, καθώς και αυξημένη δραστικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες, δραστικότητα έναντι αφύσικων υποστρωμάτων, τροποποιημένη εναντιοεκλεκτικότητα, ή συνδυασμούς των παραπάνω. Έτσι, καθιερώθηκε γρήγορα ως ένα ισχυρό εργαλείο στην πρωτεϊνική μηχανική σε δομικά και λειτουργικά διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων (Wrublewski, 2019). Με τη χρήση μεθόδων τυχαίας μεταλλαξιγένεσης έγινε γρήγορα αντιληπτό ότι οι ευεργετικές μεταλλάξεις εντοπίζονταν συχνά σε απροσδόκητα μέρη των ενζύμων, εξηγώντας γιατί οι πρώτες ορθολογικές προσπάθειες δυσκολεύονταν να επιτύχουν αυτές τις τροποποιήσεις.

1.2 Στατιστικά Στοιχεία

Η παγκόσμια αγορά ενζύμων τροφίμων αποτιμήθηκε σε 2,75 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ το 2019 και αναμένεται να φτάσει τα 3,91 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ μέχρι το έτος 2027, με CAGR 6,8%. Το 40,2% της συνολικής αγοράς τροφίμων καταλαμβάνεται από μικροβιακά ένζυμα (Nunes & Kumar, 2018). Οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής είναι η χώρα με την μεγαλύτερη παραγωγή και κατανάλωση ενζύμων παγκοσμίως λόγω της αυξημένης κατανάλωσης επεξεργασμένων προϊόντων από τους πολίτες. Μελλοντικά, η ανατολική Ασία προβλέπεται να έχει την πιο άμεση ανάπτυξη στην αγορά ενζύμων. Σύμφωνα με την έκθεση που δημοσίευσε η Ένωση Κατασκευαστών και Διαμορφωτών Ενζυμικών Προϊόντων (AMFEP) το 2015, υπάρχουν περισσότεροι από 70 τύποι ενζύμων που είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο. Λαμβάνοντας υπόψη

ότι ένα συγκεκριμένο ένζυμο μπορεί να παραχθεί από πολλούς μικροοργανισμούς, περισσότερα από 200 εμπορικά ενζυμικά προϊόντα είναι σήμερα διαθέσιμα. Το μερίδιο των ενζύμων που παράγονται από ΓΤ μικροοργανισμούς στη συνολική αγορά βιομηχανικών ενζύμων είναι περίπου 50%.

Μεταξύ των κυριότερων εμπορικών ενζύμων, οι αμυλάσες ξεχωρίζουν στον βιομηχανικό τομέα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 25% της παγκόσμιας αγοράς ενζύμων, ακολουθούμενες από τις πρωτεάσες. Οι προβλέψεις που έγιναν για τον τομέα από τον όμιλο Freedonia (2016) υποδεικνύουν αύξηση της παγκόσμιας ζήτησης για ένζυμα κατά περίπου 4,6% έως το 2020. Τα δεδομένα αυτά αντιπροσωπεύουν συνολικά παγκόσμια έσοδα ύψους 7,2 δισεκατομμυρίων δολαρίων, μόνο για τον τομέα των τροφίμων και των ποτών. Η παγκόσμια αγορά ενζύμων κυριαρχείται από τις εφαρμογές τροφίμων και ζωοτροφών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 55% έως 60% της αγοράς(Opportunities et al., n.d.).

2. Διαδικασία παραγωγής ανασυνδυασμένων ενζύμων

2.1 Εργαλεία ανασυνδιασμού του DNA

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, νέες τεχνικές όπως το recombinant DNA(rDNA), η κυτταρική σύντηξη (μονοκλωνικό αντίσωμα), η πρωτεΐνη μηχανική, η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων και η μηχανική βιολογικών διεργασιών αναπτύχθηκαν (Sandhir et al., 1999). Ωστόσο, η ανακάλυψη της τεχνολογίας rDNA, ευρέως γνωστή ως γενετική μηχανική, οδήγησε στη σημερινή έκρηξη της βιοτεχνολογίας. Οι τεχνικές για την ανταλλαγή γενετικού υλικού μέσω της μετάλλαξης και του γενετικού ανασυνδυασμού που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα έχουν ορισμένους περιορισμούς. Οι συμβατικές τεχνικές δεν μπορούσαν να υπερβούν τα όρια ενός γένους ή ακόμη και, σε πολλές περιπτώσεις, αυτά ενός είδους. Η τεχνολογία rDNA δεν προσφέρει μόνο την προοπτική βελτίωσης των υφιστάμενων διαδικασιών και προϊόντων, αλλά μας δίνει επίσης τη δυνατότητα να αναπτύξουμε εντελώς νέα ετερόλογα προϊόντα, καθώς και με διαδικασίες που δεν ήταν δυνατές με τη χρήση της συνηθισμένης τεχνικής μεταλλαξιγένησης. Η τεχνολογία αυτή δημιουργεί μοναδικούς βιομηχανικούς μικροοργανισμούς που είναι σε θέση να συνθέτουν πολύτιμες πρωτεΐνες και βρίσκει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων. Έτσι αποτέλεσε

απόρροια της βασικής έρευνας σε τρεις σημαντικές επιστημονικές εξελίξεις που συνέβησαν περίπου την ίδια εποχή. Η πρώτη ήταν η ανακάλυψη και η επακόλουθη εμπορική προμήθεια των ενζύμων περιοριστικής ενδονουκλεάσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση και την αποκοπή συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών εντός του μορίου DNA. Η δεύτερη ήταν η δημιουργία και η διαλογή σε υψηλές αποδόσεις τεχνητών φορέων κλωνοποίησης (δηλ. πλασμιδιακό DNA στο οποίο εισάγονται επιλέξιμοι δείκτες και θέσεις περιορισμού τεχνητά), και η τρίτη ήταν η ικανότητα να επιτυγχάνεται ο μετασχηματισμός - η εισαγωγή DNA σε E. coli, και στη συνέχεια να ταυτοποιούνται οι μετασχηματιστές που περιέχουν τους ανασυνδυασμένους κλώνους (*Fundamentals of Food Biotechnology*, 2015).

Χρησιμοποιώντας αυτές τις τρεις απλές διαδικασίες, το ανασυνδυασμένο DNA μπορεί να επιτευχθεί in vitro. Κλωνοποίηση σημαίνει να λαμβάνουμε μεταξύ πολλών εκατομμυρίων διαφορετικών τμημάτων DNA μια αποικία γενετικά πανομοιότυπων κυττάρων που περιέχουν το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει. Η αρχή της τεχνικής κλωνοποίησης γονιδίων είναι ότι η γενετική πληροφορία που φέρει το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό-δότη και διασπάται από ένζυμα περιοριστικής ενδονουκλεάσης σε μεμονωμένα κομμάτια που δημιουργούν συνεκτικά ή κολλώδη άκρα. Στη συνέχεια, τα τμήματα του DNA ενώνονται με ένα κατάλληλο DNA-φορέα με τη χρήση ενός άλλου ενζύμου, την DNA λιγάση. Τα συνεκτικά άκρα έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες και μπορούν έτσι να σχηματίσουν ζεύγη βάσεων. Έτσι, προκύπτει ετερόλογος πληθυσμός μορίων, αλλά ορισμένα πλασμίδια θα περιέχουν ένα εισαγόμενο θραύσμα, παράγοντας έτσι ανασυνδυασμένα μόρια DNA (χίμαιρες). Το συνδεδεμένο πλασμίδιο στη συνέχεια μετασχηματίζεται σε κύτταρο ξενιστή. Από το αρχικό μείγμα των συνδεδεμένων πλασμιδίων και άλλου DNA έχει κλωνοποιηθεί ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA. Επειδή η κάθε βακτηριακή αποικία περιέχει ένα πλασμίδιο που περιλαμβάνει το ξένο ένθετο DNA, πρέπει να ταυτοποιηθεί με μία από τις μεθόδους που περιγράφονται αργότερα. Υπάρχουν τρεις πιθανές διαδρομές στην κλωνοποίηση ενός ξένου τμήματος DNA. Αυτές μπορούν να αναφέρονται ως η πρωτεϊνική οδός (κλωνοποίηση shotgun), η οδός του συμπληρωματικού DNA (cDNA) και η οδός του συνθετικού DNA (*Fundamentals of Food Biotechnology*, 2015).

Με τη γενετική μηχανική, οι επιστήμονες ξεκινούν επιλέγοντας ή αναπτύσσοντας έναν ισχυρό, παραγωγικό μικροοργανισμό ξενιστή που είναι γνωστό ότι είναι ασφαλής (δεν είναι παθογόνος και δεν παράγει τοξίνες). Αφού επιλεγεί/αναπτυχθεί ένας κατάλληλος ξενιστής έκφρασης, χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές για την εισαγωγή ή τη διαγραφή μιας ή περισσότερων αλληλουχιών DNA στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού που ενισχύουν την υπάρχουσα ή προσδίδουν νέα λειτουργικότητα στον οργανισμό. Παραδείγματα των ειδών νέας ή ενισχυμένης λειτουργικότητας περιλαμβάνουν: παραγωγή ενζύμου ή άλλης λειτουργικής πρωτεΐνης που προορίζεται να συλλεχθεί από τον μικροοργανισμό για χρήση στην παραγωγή τροφίμων (π.χ. α-αμυλάση, λιπάση, πρωτεάση, πρωτεΐνη δομής πάγου, λεγεμοσφαιρίνη), παραγωγή ενζύμων που βοηθούν τον ίδιο τον μικροοργανισμό να παράγει ένα άλλο συστατικό τροφίμων (π.χ. ριβοφλαβίνη, γλυκοζίτης στεβιόλης ή ολιγοσακχαρίτης), ή πρόσθετες τροποποιήσεις, όπως η διαγραφή ενδογενών γονιδίων ή η εισαγωγή μεταφορέων με στόχο να καταστεί ο μικροοργανισμός μια πιο αποτελεσματική πλατφόρμα παραγωγής. Στις αλληλουχίες DNA που επιτρέπουν την έκφραση νέας ή βελτιωμένης λειτουργικότητας περιλαμβάνονται αλληλουχίες που κωδικοποιούν στοιχεία (π.χ. αλληλουχίες υποκινητή και τερματιστή) που βοηθούν στον έλεγχο της έκφρασης των λειτουργικών γονιδίων στον μικροοργανισμό. Αν και οι αλληλουχίες DNA μπορεί να εισάγονται τυχαία στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού, συχνά οι αλληλουχίες αυτές εισάγονται σκόπιμα σε συγκεκριμένα σημεία (που ονομάζονται "τόποι") του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Ανεξάρτητα από αυτό, το σημείο εισαγωγής μπορεί αργότερα να επιβεβαιωθεί μέσω της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος(*Fundamentals of Food Biotechnology*, 2015).

Η πηγή του DNA που εκφράζεται από τον γενετικά τροποποιημένο μικροοργανισμό μπορεί να είναι ενδογενής, από τον ίδιο οργανισμό (π.χ. για την παραγωγή περισσότερων ενζύμων), ή εξωγενής, από διαφορετικό οργανισμό. Όταν το DNA προέρχεται εξωγενώς από έναν στενά συγγενή μικροοργανισμό ικανό για φυσική ανταλλαγή DNA (συχνά εντός του ίδιου γένους), η διαδικασία αυτή αναφέρεται επίσης ως "αυτοκλωνοποίηση" από ορισμένα ρυθμιστικά πλαίσια. Ωστόσο, η πηγή του εξωγενούς DNA είναι συχνά ένας άλλος, πιο απομακρυσμένος μικροοργανισμός που δεν μπορεί να καλλιεργηθεί αποτελεσματικά υπό βιομηχανικές συνθήκες. Μέσω της δημιουργίας του νέου, βιομηχανοποιημένου οργανισμού το άθροισμα των

εισαγόμενων αλληλουχιών φτάνει στο πλήρες δυναμικό του και γίνεται ένας μικροοργανισμός ικανός να παράγει τις επιθυμητές τροφικές ουσίες σε εμπορική κλίμακα. Ως εκ τούτου, ο όρος "βιομηχανική" είναι ένας πιο στενά καθορισμένος όρος που υποδηλώνει βήματα γενετικής μηχανικής ή επεξεργασίας γονιδιώματος που έχουν ως αποτέλεσμα έναν τροποποιημένο οργανισμό που δεν υπάρχει στη φύση ή δεν θα μπορούσε να παραχθεί με την παραδοσιακή αναπαραγωγή και επιλογή. Όταν εφαρμόζεται στα τρόφιμα, ο όρος "βιομηχανική" είναι ένας ρυθμιστικός όρος που καθορίζει τις απαιτήσεις επισήμανσης των καταναλωτών.

Ενώ αρχικά το DNA απομονωνόταν από έναν μικροοργανισμό, στη συνέχεια πολλαπλασιαζόταν και μεταφερόταν σε έναν άλλο μικροοργανισμό, σήμερα, συνθετικές αλληλουχίες DNA που δημιουργήθηκαν μέσω άλλων τεχνικών μοριακής βιολογίας μπορούν να εισαχθούν σε μικροοργανισμούς για να προσδώσουν λειτουργικότητα. Η χρήση συνθετικού DNA (αντί για DNA που απομονώθηκε φυσικά από άλλο μικροοργανισμό) επιτρέπει την πολύ γρήγορη ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων μικροβίων που παράγουν πολλές παραλλαγές ενζυμικών πρωτεϊνών που μπορούν να δοκιμαστούν στην εφαρμογή-στόχο. Επιπλέον, με τη χρήση συνθετικού DNA αποφεύγεται πλήρως η ακούσια εισαγωγή ανεπιθύμητων αλληλουχιών, όπως υπολείμματα κλωνοποίησης DNA, συμπεριλαμβανομένων ακόμη και παθογόνων μικροοργανισμών. Η χρήση συνθετικού DNA επιτρέπει στους μοριακούς βιολόγους να περιορίσουν τη μεταφορά μόνο στην ευεργετική αλληλουχία γονιδίων που τους ενδιαφέρει, χωρίς να έρθουν ποτέ σε επαφή με το παθογόνο και αποφεύγοντας τη μεταφορά αλληλουχιών που θα μπορούσαν να κωδικοποιήσουν παθογένεια. Οι εκτιμήσεις για την ασφάλεια ενός τέτοιου παραδείγματος αλληλουχίας που προέρχεται από πιθανό παθογόνο αναλύονται από τους Sewalt, Reyes και Bui (2018) για μια αλληλουχία α-αμυλάσης από το Cytophaga sp., που εκφράστηκε με ασφάλεια στο Bacillus licheniformis και κοινοποιήθηκε στον FDA για χρήση στην επεξεργασία υδατανθράκων (US FDA 2017) (Sewalt et al., 2018).

2.2 Ξενιστές

Τα ένζυμα τροφίμων μπορούν να ληφθούν είτε από μικροοργανισμούς, με ζύμωση, είτε από ζωικές και φυτικές πηγές με εκχύλιση. Παλαιότερα, η χρήση ενζύμων που προέρχονται από φυτικές και ζωικές πηγές προτιμούνταν επειδή τα ένζυμα αυτά θεωρούνταν ότι δεν περιέχουν

προσμίξεις που είναι συχνά συνδεόμενες με τις μικροβιακές ζυμώσεις. Ωστόσο, με την πάροδο των χρόνων, τα πλεονεκτήματα των μικροβιακών ζυμώσεων δεν μπορούσαν να παραμεληθούν, όπως η αποδοτικότητα κόστους και τα τεχνικά και ηθικά τους πλεονεκτήματα (όσον αφορά τις ζωικές πηγές).

Οι μικροβιακές πηγές προτιμώνται για την παραγωγή ενζύμων (κυρίως για οικονομικούς και τεχνικούς λόγους) σε σύγκριση με την εξαγωγή από φυτικές και ζωικές πηγές. Τα πλεονεκτήματα μπορούν να συνοψιστούν ως εξής: (I) Πολλοί ΜΟ παράγουν ένζυμα εξωκυτταρικά, γεγονός που απλοποιεί την μέθοδο εκχύλισης κατά τον καθαρισμό. Ακόμη και όταν η παραγωγή του ενζύμου είναι ενδοκυτταρική, η διάσπαση των κυττάρων των μικροβίων είναι ευκολότερη από την εκχύλιση από φυτά και ζώα. (II) Ιδιαίτερα μικροβιακά στελέχη μπορούν να επιλεγούν για να ληφθούν καλά χαρακτηρισμένα ένζυμα με συγκεκριμένες ιδιότητες. (III) Λόγω του συντομότερου χρόνου παραγωγής, απαιτούνται μικρότερες εγκαταστάσεις παραγωγής, με αποτέλεσμα το μειωμένο κόστος παραγωγής. Επιπλέον, τα ζώα και τα φυτά πρέπει να μεταφέρονται στις εγκαταστάσεις εξαγωγής, οι οποίες δεν απαιτούνται για τις μικροβιακές ζυμώσεις, όπου ολόκληρη η παραγωγή πραγματοποιείται σε μία μόνο τοποθεσία. Για τα μικροβιακά ένζυμα μπορούν να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα ενζύμων από ζωικές και φυτικές πηγές εξαρτάται επίσης από την εποχή του έτους, μειώνοντας έτσι τη συνολική απόδοση και περιορίζοντας την δυνατότητα συνεχούς παραγωγής. (V) Τα μικροβιακά ένζυμα έχουν συνήθως υψηλότερη δραστικότητα και σταθερότητα. Για παράδειγμα, τα ένζυμα που λαμβάνονται από θερμόφιλους ΜΟ θα έχουν μεγαλύτερη αντοχή στη θερμοκρασία. (VI) Οι ΜΟ μπορούν να μεταλλαχθούν σε γενετικά τροποποιημένους προκειμένου να ληφθούν βελτιστοποιημένα ενζυμικά προϊόντα, υψηλότερες αποδόσεις και καλύτερα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, οι τροποποιήσεις των ζώων και των φυτών είναι τεχνικά πιο δύσκολες και οι τροποποιήσεις των ζώων, ιδιαίτερα, είναι ηθικά πιο ευαίσθητες (Deckers et al., 2020).

Λαμβάνοντας υπόψη τα διάφορα πλεονεκτήματα της χρήσης ΜΟ, η ευκολία εισαγωγής γενετικών τροποποιήσεων στα στελέχη μικροβιακής παραγωγής για την περαιτέρω βελτίωση της παραγωγής ενζύμων είναι πιθανώς ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα. Οι

τροποποιήσεις αυτές μπορούν να επιτευχθούν με την χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA και της κλωνοποίησης. Η χρήση ΓΤΜ για την παραγωγή ενζύμων τροφίμων επιτρέπει την αύξηση της απόδοσης της παραγωγής, τη βελτίωση των χαρακτηριστικών του παραγόμενου ενζύμου, περιορίζοντας την παραγωγή ανεπιθύμητων μεταβολιτών (όπως οι μυκοτοξίνες), καθώς και την έκφραση ενζύμων σε οργανισμούς που κανονικά δεν θα παρήγαγαν το ένζυμο αυτό. Οι τροποποιήσεις αυτές σκοπεύουν στη βελτίωση των χαρακτηριστικών ενός ενζύμου, όπως η δραστικότητά του, η βέλτιστη θερμοκρασία του και η σταθερότητα του Ph.

Η επιλογή του κυττάρου ξενιστή του οποίου ο μηχανισμός πρωτεϊνοσύνθεσης θα παράγει την πολύτιμη πρωτεΐνη, θα ξεκινήσει το περίγραμμα της όλης διαδικασίας. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές για την παραγωγή ανασυνδυασμένων ενζύμων είναι μη παθογόνοι και αξιόπιστοι, καθώς έχουν μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης και έχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα για τη βιομηχανική παραγωγή. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν πολλοί ξενιστές οι οποίοι, παρόλο που δεν έχουν ιστορικά στοιχεία χρήσης για την επεξεργασία τροφίμων, χρησιμοποιούνται ως επιτυχημένοι ξενιστές για την έκφραση του ετερόλογου ενζύμου, όπως τα E.coli K-12, F. Venenatum και Pseudomonas fluorescence. Το σύστημα ετερόλογης έκφρασης μπορεί σε γενικές γραμμές να κατηγοριοποιηθεί σε προκαρυωτικό και ευκαρυωτικό ξενιστή. Τα προκαρυωτικά συστήματα περιλαμβάνουν τα βακτήρια και τα ευκαρυωτικά συστήματα περιλαμβάνουν ζύμες, νηματοειδείς μύκητες, έντομα και κύτταρα θηλαστικών. Εργασία με βακτήρια, ζύμες και νηματοειδείς μύκητες είναι γενικά ευκολότερη από ό,τι με έντομα και κύτταρα θηλαστικών, καθιστώντας τα ευνοϊκά για βιομηχανικούς σκοπούς (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Ο ρυθμός παραγωγής ενζύμων και η απόδοση είναι οι κύριοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή του κατάλληλου συστήματος έκφρασης για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ανασυνδυασμένα ένζυμα έχουν εκφραστεί σε βακτήρια (π.χ. Escherichia coli, Bacillus και βακτήρια γαλακτικού οξέος), νηματοειδείς μύκητες (π.χ. Aspergillus) και ζύμες (π.χ. Pichia pastoris). Τα ευνοϊκά και πολύ πλεονεκτικά χαρακτηριστικά αυτών των ειδών έχουν οδηγήσει σε αυξανόμενο αριθμό βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Οι βακτηριακοί ξενιστές (π.χ. E. coli) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη γρήγορη και εύκολη υπερέκφραση

ανασυνδυασμένων ενζύμων- ωστόσο, τα βακτηριακά συστήματα δεν μπορούν να εκφράσουν πολύ μεγάλες πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που απαιτούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι κύριοι βακτηριακοί ξενιστές έκφρασης, με εξαίρεση τα βακτήρια γαλακτικού οξέος και τους νηματοειδείς μύκητες, μπορούν να παράγουν αρκετές τοξίνες, οι οποίες δεν είναι συμβατές με την έκφραση ανασυνδυασμένων ενζύμων σε τρόφιμα και φάρμακα. Ωστόσο, λόγω της πολλαπλότητας των φυσιολογικών επιπτώσεων που προκύπτουν από την έκφραση υψηλού επιπέδου των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα και των ξενιστών έκφρασης, ο στόχος της υπερπαραγωγής δύσκολα μπορεί να επιτευχθεί και, ως εκ τούτου, η απόδοση των ανασυνδυασμένων ενζύμων είναι περιορισμένη (Dubey et al., 2019).

Για την επιλογή ενός μικροοργανισμού ως ξενιστής ενζύμου συστήνονται τα εξής: 1. Το στέλεχος πρέπει να είναι σε θέση να δώσει υψηλές αποδόσεις ενζύμου εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος. 2. Εάν είναι δυνατόν, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εξωκυτταρικά ένζυμα επειδή είναι ευκολότερο να παραχθούν και να απομονωθούν, ενώ τα ενδοκυτταρικά ένζυμα πρέπει να περάσουν από δαπανηρές διαδικασίες αποσύνθεσης. 3. Ένας μικροοργανισμός (GRAS, γενικά αναγνωρισμένος ως ασφαλής) που δεν παράγει τοξικές ουσίες προτιμάται, για να διευκολυνθεί η έγκριση από τις αρμόδιες αρχές. 4. Ένα στέλεχος παραγωγής θα πρέπει να αναπτύσσεται σε ένα φθηνό μέσο που περιέχει φθηνά υποστρώματα, δεδομένου ότι το κόστος των πρώτων υλών αποτελεί το σημαντικότερο κόστος στη ζύμωση (Dubey et al., 2019).

2.2.1 Escherichia coli

Ο Escherichia coli είναι ένας από τους πιο συμφέροντες και ευρέως χρησιμοποιούμενους ξενιστές για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών, κυρίως μη γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών. Η εύκολη καλλιέργεια και η ταχεία ανάπτυξη και έκφραση τον καθιστούν ευνοϊκό ξενιστή για την παραγωγή ενζύμων. Σε μέσο με γλυκόζη και άλατα και με τις βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες, ο χρόνος διπλασιασμού του είναι περίπου 20 λεπτά. Μια καλλιέργεια ενοφθαλμισμένη με αραίωση 1/100 μιας κορεσμένης καλλιέργειας εκκίνησης μπορεί να φτάσει σε στάσιμη φάση σε λίγες ώρες (Sezonov et al., 2007). Πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μπορεί να επιβαρύνει το μεταβολισμό του μικροοργανισμού,

προκαλώντας σημαντική μείωση του χρόνου παραγωγής. Επιπλέον, το μελετημένο γονιδίωμά του μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί, ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης σύντηξης (fusion) μπορεί να χειραγωγηθεί με ρύθμιση υποκινητή και την αλλαγή του αριθμού αντιγράφων του πλασμιδίου. Ορισμένοι περιορισμοί υπάρχουν, όπως η υψηλή κυτταρική πυκνότητα που οδηγεί σε τοξικότητα λόγω σχηματισμού οξικού οξέος, έλλειψη μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, αναδίπλωσης κ.λπ. Οι πρωτεΐνες που παράγονται με τη μορφή κυτταρικών εγκλείστων ή κοκκίων (inclusion bodies) είναι συχνά ανενεργές και αδιάλυτες. Ωστόσο, έχουν ληφθεί πολλά μέτρα για να καταστεί ο E. coli ένας αποτελεσματικός ξενιστής, όπως: (i) η χρήση αποτελεσματικών υποκινητών για την ρύθμιση της έκφρασης, (ii) η χρήση διαφορετικών στελεχών (πχ. για μια πρώτη διαλογή έκφρασης, μόνο ένα ζευγάρι στελέχους E. coli είναι απαραίτητο: BL21 [DE3] και ορισμένα παράγωγα γενεαλογίας του K-12), (iii) μείωση της θερμοκρασίας ανάπτυξης για την μεγιστοποίηση της σύνθεσης σωστά διπλωμένων ετερόλογων πρωτεϊνών καθώς και για τη μείωση του σχηματισμό ανεπιθύμητων μεταβολιτών, (iv) συν-έκφραση συνοδών (chaperones) για την αύξηση της απόδοση των σωστά διπλωμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, αν και έχουν παρατηρηθεί ορισμένες αρνητικές παρενέργειες, και (v) έκκριση πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο. Ορισμένες άλλες προσπάθειες, όπως η προσθήκη ενός εταίρου σύντηξης, η έκφραση ενός θραύσματος της πρωτεΐνης, η μετουσίωση in vitro, η αναδίπλωση της πρωτεΐνης, κ.λπ., έχουν επίσης τεκμηριωθεί, υποστηρίζοντας την E. coli για χρήση της έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών (Baeshen et al., 2015) (Rosano & Ceccarelli, 2014).

2.2.2 Aspergillus niger

Οι νηματοειδείς μύκητες θεωρούνται γενικά υποσχόμενοι ξενιστές για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, κυρίως λόγω της εκκριτικής τους ικανότητας και της μεταβολικής τους ευελιξίας. Ωστόσο, μόνο λίγα είδη φαίνεται να είναι σε θέση να παράγουν ανταγωνιστικά επίπεδα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και ακόμη λιγότερα έχουν εξελιχθεί σε πλατφόρμες βιομηχανικής παραγωγής. Αυτό μπορεί να αποδοθεί κυρίως στις ελλιπείς γνώσεις μας για τη φυσιολογία των μυκήτων. Για παράδειγμα, οι μηχανισμοί πίσω από την παραγωγή και την έκκριση πρωτεϊνών στα κύτταρα των μυκήτων δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί για

τα περισσότερα είδη. Επιπλέον, η παρουσία ανεπιθύμητων μεταβολιτών (π.χ. μυκοτοξίνες) έχει αποκλείσει αρκετούς μύκητες από τη βιομηχανική παραγωγή (C. Li et al., 2020).

Ο Aspergillus niger ανήκει στο γένος Aspergillus, το οποίο περιλαμβάνει ένα σύνολο μυκήτων που γενικώς συλλαμβάνονται αγενώς. Οι Aspergilla είναι πανταχού παρόντες στη φύση και γεωγραφικά διαδεδομένοι παγκοσμίως. Αυτός ο μύκητας είναι σε θέση να αναπτυχθεί σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών από 6 έως 47°C με 35-37°C βέλτιστη θερμοκρασία και εξαιρετικά ευρύ φάσμα pH, δηλαδή 1,4-9,8. Ο Aspergillus niger έχει γίνει ένας από τους σημαντικότερους ξενιστές για την παραγωγή ενζύμων στα τρόφιμα λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών του για την ασφάλεια των τροφίμων και των εξαιρετικών συστημάτων έκκρισης πρωτεϊνών. Μια σειρά ένζυμων, όπως η φυτάση, η χυμοσίνη και η λιπάση, έχουν παραχθεί εμπορικά από στελέχη του Aspergillus niger, καθιστώντας το είδος αυτό κατάλληλη πλατφόρμα για τη μηχανική ανάπτυξη στελεχών με βελτιωμένη παραγωγή ενζύμων.

Χρησιμοποιώντας γενετική μηχανική, οι ερευνητές αύξησαν την παραγωγική διαδικασία. Η ανάπτυξη του μετασχηματισμού με τη μεσολάβηση rDNA των Aspergilli, αρχικά στο A. nidulans και στη συνέχεια στο A. niger έχει γίνει με επιτυχία. Οι Kluyver και Perquin (1932) έδειξαν την καλλιέργεια υποβρύχιας καλλιέργειας των νηματοειδών μυκήτων όπως ο A. Niger (Nevalainen & Peterson, 2014). Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) έχει αποδεχθεί μια ποικιλία ενζύμων για την παρασκευή και την επεξεργασία τροφίμων (Kelly & Hynes, 1985) (Driouch et al., 2010). Στις αρχές της δεκαετίας του 1960, ο FDA ασχολήθηκε επίσης με τις δυνατότητες του A. niger στη παραγωγή τροφίμων, η οποία συμβάλλει στη βελτίωση της εκβιομηχάνισης στο πλαίσιο μη παθογόνων και μη τοξινογόνων συνθηκών (Notice [GRN] No. 703 FDA).

2.2.3 Aspergillus oryzae

Ο Aspergillus oryzae είναι ένας σημαντικός νηματοειδής μύκητας που εφαρμόζεται ευρέως στις παραδοσιακές βιομηχανίες ζύμωσης και επεξεργασίας τροφίμων, όπως η σάλτσα σόγιας, η πάστα σόγιας και η παρασκευή σάκε. Αυτή η μακρά ιστορία της ευρείας χρήσης του στη βιομηχανία τροφίμων έχει οδηγήσει στην αναγνώριση του A. oryzae από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Ηνωμένων Πολιτειών και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό

Υγείας (FAO/WHO) ως οργανισμού γενικά αναγνωρισμένου ως ασφαλούς (GRAS Notice [GRN] No. 829) (Chang et al., 2014).

Επιπλέον, ο A. oryzae έχει ισχυρή ικανότητα έκκρισης μεγάλων ποσοτήτων υδρολυτικών ενζύμων (όπως αμυλάσες και πρωτεάσες) και, ως εκ τούτου, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία ενζύμων ως κυτταρικό εργοστάσιο για την παραγωγή πολυάριθμων εγγενών και ετερόλογων ενζύμων. Εκτός από την ικανότητα έκκρισης πρωτεϊνών, ο A. oryzae έχει επίσης ισχυρή ικανότητα σύνθεσης, ταχεία ανάπτυξη και καλλιεργείται με ευκολία, μεταξύ των πλεονεκτημάτων του. Σε σύγκριση με τον Escherichia coli και τον ζυμομύκητα Saccharomyces cerevisiae, ο A. oryzae έχει ισχυρή λειτουργία μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, εξ' ου και χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή ποικίλων ενζυμικών παρασκευασμάτων. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται επίσης στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Ichikawa et al., 2020).

Τα εξωγενή γονίδια που εκφράζονται στο A. Oryzae, σε σύγκριση με το σύστημα παραγωγής και έκκρισης των προκαρυωτών όπως ο E. Coli, υφίστανται ευκαρυωτικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της γλυκοζυλίωσης και της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, ο A. oryzae θεωρείται ένας από τους πιο πλεονεκτικούς ξενιστές για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από ανώτερα ευκαρυωτικά. Ωστόσο, η παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών περιορίζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το μεταγραφικό επίπεδο, το επίπεδο μετάφρασης, η εκκριτική διαδικασία και η εξωκυτταρική αποικοδόμηση. Η ισχυρή δραστηριότητα πρωτεασών του A. oryzae είναι ο σημαντικότερος λόγος για την αναστολή της παραγωγής ετερόλογων πρωτεϊνών, επειδή οι ετερόλογες πρωτεΐνες διασπώνται ευκολότερα από τις πρωτεάσες από ό,τι οι πρωτεΐνες του ίδιου του οργανισμού. Για να βελτιώσουν την απόδοση των ετερόλογων πρωτεϊνών, οι ερευνητές έχουν δοκιμάσει διάφορες βιολογικές μεθόδους. Για παράδειγμα, η μεταγενέστερη επεξεργασία σε χαμηλή θερμοκρασία, ο πρώιμος διαχωρισμός των προϊόντων από τις πρωτεάσες, η εφαρμογή αναστολέων πρωτεασών κ.λπ. μπορούν να μειώσουν την υδρόλυση, ωστόσο, το αποτέλεσμα δεν είναι αισιόδοξο, διότι οι περισσότερες ετερόλογες πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποικοδομηθούν κατά τη διαδικασία παραγωγής πρωτεϊνών (Jin et al., 2021).

2.2.4 Bacillus

Τα είδη Bacillus είναι μια ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων που απαντώνται ευρέως στη φύση, τα οποία μπορούν να παράγουν σπόρια σε σκληρά περιβάλλοντα. Θεωρούνται GRAS από τον FDA και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή α-αμυλάσης, πουλλουλανάσης, αποκαρβοξυλάσης, μαλτογενικής αμυλάσης. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια φαίνεται να είναι υποσχόμενοι ξενιστές για την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα ετερόλογων πρωτεϊνών. Τα είδη Bacillus είναι ελκυστικοί ξενιστές επειδή διαθέτουν φυσικά υψηλή ικανότητα έκκρισης και εξάγουν πρωτεΐνες απευθείας στο εξωκυτταρικό μέσο, δεδομένου ότι το κυτταρόπλασμα ενός θετικού κατά Gram βακτηρίου περιβάλλεται από ένα ενιαίο σύστημα μεμβρανών.

2.2.5 Bacillus lichenformis

Στέλεχος ξενιστή B. licheniformis με ανεπάρκεια εξωπρωτεάσης έχει προσαρμοστεί ειδικά για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων. Είναι ασπορογενές και παρέχει υψηλά επίπεδα εξωκυτταρικής έκφρασης με ελάχιστη απώλεια προϊόντος λόγω πρωτεολυτικής διάσπασης μετά την έκκριση. Για να επιτευχθεί ένα πιο γενετικά σταθερό σύστημα μετά το μετασχηματισμό και για να αυξηθούν τα επίπεδα παραγωγής, έχει επίσης αφαιρεθεί το γονίδιο της α-αμυλάσης. Για την παραγωγή της ιντερλευκίνης-3 (van Leen et al., 1991) έγινε σύγκριση των οργανισμών ξενιστών μεταξύ E. coli, B. licheniformis, S. cerevisiae, K. lactis και κυττάρων θηλαστικών C127. Το πιο αποδοτικό σύστημα αναφέρθηκε ότι ήταν το B. Licheniformis (Demain & Vaishnav, 2009).

2.2.6 Bacillus subtilis

Το B. subtilis είναι ένα ενδιαφέρον εναλλακτικό σύστημα για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων. Η ικανότητα έκκρισης πρωτεϊνών απευθείας στο μέσο είναι ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματά του. Έχουν κατασκευαστεί διάφορα συστήματα έκφρασης για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Μετά από σύγκριση διαφόρων συστημάτων έκφρασης του B. subtilis, διαπιστώθηκε ότι το σύστημα έκφρασης γονιδίων ρυθμιζόμενων από υποτιλίνη (SURE) ήταν το πιο αποτελεσματικό σύστημα έκφρασης και ήταν κατάλληλο για την έκφραση πρωτεινικών μεμβρανικών συμπλόκων. Αρκετά ανασυνδυασμένα ένζυμα εκφράστηκαν στο σύστημα έκφρασης του B. subtilis. Τα επιμέρους συστατικά του μηχανισμού έκκρισης με τις ειδικές

λειτουργίες τους εμπλέκονται στη συνολική ροή των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στο μέσο. Ωστόσο, στον B. subtilis, πολλαπλοί ρυθμιστές μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των μηχανισμών έκκρισης καθώς και τις μετα-μεταγραφικές λειτουργίες τους για την έκκριση πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται περίπλοκα δίκτυα. Η έκκριση ετερόλογων πρωτεϊνών μπορεί να ενισχυθεί με τη μηχανική επεξεργασία συστατικών που εμπλέκονται στα όψιμα στάδια της έκκρισης. Η υπερπαραγωγή της λιποπρωτεΐνης PrsA του μοριακού συνοδού PrsA ενίσχυσε την έκκριση της α-αμυλάσης από τον B. stearothermophilus (4 φορές) στον B. subtilis. Το σύστημα υποκινητών είναι επίσης σημαντικός παράγοντας για τη δύναμη έκφρασης του B. subtilis. Προκειμένου να βελτιωθεί το σύστημα υποκινητή Pglv, υιοθετήθηκε κατευθυνόμενη τοποειδική μεταλλαξιγένεση πολλών νουκλεοτιδίων κάτω από τη θέση προέλευσης της μεταγραφής. Στη συνέχεια, προέκυψε ο μεταλλαγμένος υποκινητής Pglv-M1 και η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης έφθασε σε τιμές 1,8 φορές υψηλότερης από εκείνες του υποκινητή άγριου τύπου στο B. subtilis (Saengkerdsub, n.d.) (Vijayalakshmi et al., 2013).

2.2.7 B. megaterium

Το B. megaterium είναι ένα καλά μελετημένο προκαρυωτικό σύστημα, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Αυτός ο ξενιστής έκφρασης έχει διάφορα ευνοϊκά χαρακτηριστικά, όπως η χαμηλή δραστικότητα πρωτεασών, η δομική και διαχωριστική σταθερότητα των πλασμιδίων και η ικανότητα ανάπτυξης σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων. Διάφορες ετερόλογες πρωτεΐνες (π.χ. GFP, ένζυμα τροποποίησης σακχάρων και υδρολάσες) έχουν παραχθεί με επιτυχία στο B. megaterium. Για παράδειγμα, η κερατινάση έχει εκφραστεί από τους υποκινητές PxylA και PamyL σε ανασυνδυασμένο B. megaterium, ενώ το γονίδιο της ακυλάσης της πενικιλλίνης G (pac) εκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό στο μετάλλαγμα B. megaterium pac minus. Ωστόσο, οι διαδικασίες παραγωγής ενζύμων στο B. megaterium χρησιμοποιούν μηχανισμούς ρύθμισης-διαφοροποίησης για την αποικοδόμηση των ενζύμων και η παραγωγή γονιδίων εξωενζύμων καταστέλλεται κατά την εκθετική ανάπτυξη από ρυθμιστές μεταβατικής κατάστασης. Προκειμένου να εξουδετερωθεί η καταστολή, ο μεταγραφικός έλεγχος του ρυθμιστή DegSU προώθησε την υπερέκκριση μιας ετερόλογης αμυλάσης του B. amyloliquefaciens στο B. Megaterium (Vary et al., 2007).

2.2.8 B. brevis

Ο B. brevis είναι επίσης ένας ενδιαφέρων ξενιστής για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Τα ετερόλογα εκφραζόμενα ένζυμα εκκρίνονται απευθείας στο μέσο καλλιέργειας και συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα σε σχετικά καθαρή κατάσταση. Τα εκκρινόμενα ένζυμα είναι συνήθως σωστά διπλωμένα, διαλυτά και βιολογικά ενεργά. Δεδομένου ότι ο B. brevis έχει πολύ χαμηλό επίπεδο εξωκυτταρικής δραστικότητας πρωτεασών, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες είναι σταθερές και δεν αποικοδομούνται σημαντικά. Για παράδειγμα, μια υπερθερμόφιλη κυτταρινάση που προέρχεται από τον Pyrococcus horikoshii και η ανασυνδυασμένη ειδική φωσφατιδυλινοσιτόλη-φωσφολιπάση C από τον B. thuringiensis έχουν παραχθεί επιτυχώς με το σύστημα ξενιστή B. brevis. Επιπλέον, η έκκριση ετερόλογων πρωτεϊνών, η οποία είναι σημαντική για την παραγωγή υψηλού επιπέδου, μπορεί να βελτιωθεί με μεθόδους μηχανικής. Πράγματι, το σύστημα έκκρισης του B. brevis ενισχύθηκε με τη χρήση μυκητιακής πρωτεϊνικής δισουλφιδικής ισομεράσης (PDI). Η σύντηξη με την PDI αύξησε την εξωκυτταρική παραγωγή της συνθάσης της πυροφωσφορικής γερανυλογερανύλης στον B. Brevis (Kajino et al., 2000).

2.2.9 Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος

Για την ανάπτυξη βιοτεχνολογικών, γονιδιωματικών και πρωτεομικών εργαλείων, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος γίνονται υποσχόμενοι πιθανοί ξενιστές για την έκφραση ανασυνδυασμένων ενζύμων υψηλού επιπέδου. Εκτός από τη φθηνή και εύκολα κλιμακούμενη παραγωγή πρωτεϊνών που συνδέεται με τη μικροβιακή φύση των γαλακτικών βακτηρίων και δεδομένου ότι δεν έχουν ενδοτοξίνες στη μεμβράνη τους, τα είδη αυτά αποτελούν ασφαλείς ξενιστές έκφρασης για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών διατροφικού ενδιαφέροντος. Τα βασικά εργαλεία έχουν αναπτυχθεί (π.χ. τροποποιημένα στελέχη, βέλτιστοι φορείς έκφρασης, κατάλληλοι υποκινητές και ενισχυμένα συστήματα επαγωγής και έκκρισης) για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε αυτά τα στελέχη (García-Fruitós, 2012).

Το L. lactis είναι ένα υποσχόμενο βακτήριο γαλακτικού οξέος. Ορισμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έχουν εκφραστεί με επιτυχία στο L. lactis. Το στέλεχος L. lactis MG 1363 κατασκευάστηκε ως ανασυνδυασμένο ζωντανό σύστημα παροχής β-γαλακτοσιδάσης

χρησιμοποιώντας τεχνικές έκφρασης πρωτεϊνών τροφίμων και επιλεγμένα προβιοτικά ως φορείς. Η β-γαλακτοσιδάση τροφίμων εκφράστηκε επιτυχώς στο εν λόγω σύστημα. Επιπλέον, έχουν κατασκευαστεί διάφορα επαγώγιμα συστήματα έκφρασης για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο L. lactis. Η επαγώγιμη ελεγχόμενη έκφραση γονιδίων με νισίνη είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο επαγώγιμο σύστημα στο L. lactis. Αυτό το σύστημα παρέχει αυστηρά ελεγχόμενη έκφραση και σχετικά υψηλή απόδοση πρωτεϊνών. Το Bifidobacterium longum NRRL B-41409 l-arabinose isomerase (I-AI) κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε στο L. lactis με τη χρήση ενός επαγώγιμου συστήματος έκφρασης με εξάντληση φωσφορικών αλάτων (Jørgensen et al., 2014) (Song et al., 2017).

2.2.10 Ζυμομύκητες

Λόγω των πλεονεκτημάτων, όπως ο γενετικός χειρισμός, η ταχεία ανάπτυξη και η ικανότητα εκτέλεσης μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε ευκαρυωτικά συστήματα (π.χ. γλυκοζυλίωση), οι ζυμομύκητες είναι δημοφιλείς βιομηχανικοί ξενιστές για την έκφραση ανασυνδυασμένων ενζύμων. Οι ξενιστές έκφρασης ζύμης που χρησιμοποιούνται για την έκφραση ανασυνδυασμένων ενζύμων περιλαμβάνουν κυρίως τα P. pastoris, Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces lactis, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Arxula adeninivorans και Candida boidinii. Αυτοί οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούν πηγές άνθρακα, φθάνουν γρήγορα σε υψηλές πυκνότητες κυττάρων και είναι θερμοανθεκτικοί και ανθεκτικοί στην υψηλή αλατότητα. Προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγή ανασυνδυασμένων ενζύμων, διάφοροι ξενιστές ζυμομυκήτων τροποποιήθηκαν ώστε να περιλαμβάνουν περαιτέρω πλεονεκτήματα (π.χ. έλλειψη πρωτεασών, βελτιστοποιημένο σύστημα μετασχηματισμού και αποτελεσματική έκφραση) (Antošová & Sychrová, 2016; Vieira Gomes et al., 2018).

2.2.11 Pichia pastoris

Ο μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας P. pastoris θεωρείται εξαιρετικός ξενιστής για την παραγωγή ενζύμων από διάφορες πηγές. Όλα τα στελέχη έκφρασης του P. pastoris, συμπεριλαμβανομένων των ευρέως χρησιμοποιούμενων βοηθητικών μεταλλάξεων GS115 και των στελεχών με ανεπάρκεια πρωτεασών (π.χ. SMD 1163, SMD 1165), προέρχονται από το άγριο στέλεχος NRRL-

Y 11430. Το P. pastoris έχει τρεις φαινότυπους (δηλ. Mut+, Muts και Mut-) που σχετίζονται με τη χρησιμοποίηση της μεθανόλης. Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα αυτού του συστήματος έκφρασης και το σημαντικότερο είναι ο τέλειος μηχανισμός επεξεργασίας πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της διάσπασης πεπτιδίων σήματος, της αναδίπλωσης πρωτεϊνών, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων εντός του κυττάρου και της ικανότητας έκκρισης των προϊόντων του στο μέσο με φυσιολογική λειτουργία. Πολλά ανασυνδυασμένα ένζυμα έχουν εκφραστεί με επιτυχία στο P. pastoris. Για παράδειγμα, ένα γονίδιο αλκαλικής α-αμυλάσης από αλκαλιφιλικό Alkalimonas amylolytica εκφράστηκε επιτυχώς σε P. pastoris GS115 (Karbalaei et al., 2020).

2.2.12 Saccharomyces cerevisiae

Ο S. cerevisiae αναγνωρίζεται ως στέλεχος που θεωρείται γενικά ασφαλές (GRAS). Ως εκ τούτου, τα ανασυνδυασμένα ένζυμα που παράγονται σε αυτόν τον ξενιστή χρησιμοποιούνται κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Το σημαντικότερο ανασυνδυασμένο ενζυμικό προϊόν που κυκλοφορεί στην αγορά και παρασκευάζεται σε S. cerevisiae είναι η ουρική οξειδάση. Επίσης, υπάρχουν και άλλα ανασυνδυασμένα ένζυμα που έχουν εκφραστεί επιτυχώς σε S. cerevisiae (π.χ. μια εστεράση από Thermus thermophilus HB27). Ωστόσο, διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση έκφρασης ανασυνδυασμένων ενζύμων στο S. cerevisiae. Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχουν διάφορες στρατηγικές που αποσκοπούν στην ενίσχυση της απόδοσης έκφρασης των πρωτεϊνών. Μια ενδογλουκανάση από το Paenibacillus barcinonensis έχει εκφραστεί στο S. cerevisiae χρησιμοποιώντας διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης Pir4 του κυτταρικού τοιχώματος ως εταίρους μεταφραστικής σύντηξης. Ο χειρισμός του ρυθμιστή της οδού απόκρισης στις αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (UPR) Hac1p μπορεί να διεγείρει την εκκριτική οδό του S. cerevisiae για να βελτιώσει την έκκριση ανασυνδυασμένων ενζύμων. Η υπερέκφραση του S. cerevisiae HAC1 οδήγησε σε 2 φορές μεγαλύτερη έκκριση της ενδογενούς ιμβερτάσης. Μετά από έλεγχο μιας βιβλιοθήκης μεταλλάξεων του S. cerevisiae, η διαγραφή του γονιδίου MON2 ενίσχυσε την έκκριση της ανασυνδυασμένης λουσιφεράσης, η οποία κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ικριώματος για το σχηματισμό κυστιδίων που βρίσκεται στο

ύστερο Golgi. Η συμπλήρωση του μέσου ανάπτυξης με αμινοξέα βελτίωσε σημαντικά την ανάπτυξη της καλλιέργειας και την παραγωγή κυτταρίνης στο S. cerevisiae (Nevoigt, 2008).

2.2.13 Trichoderma

Το Trichoderma spp περιλαμβάνει τα T. reesei, T. atroviride και T. virus. Το T. reesei έχει εξαιρετική ικανότητα έκκρισης πρωτεϊνών και αποτελεί κύριο στόχο κυτταρίνης-ξενιστή στην προσπάθεια αντικατάστασης της βενζίνης με αιθανόλη που προέρχεται από κυτταρίνη. Ωστόσο, απαιτείται ένα πιο αποτελεσματικό σύστημα ετερόλογης έκφρασης ενζύμων από διαφορετικούς οργανισμούς για την περαιτέρω βελτίωση του μίγματος κυτταρίνης στο T. reesei. Για παράδειγμα, ο ισχυρός υποκινητής cbh1 (cellobiohydrolase I) του T. reesei χρησιμοποιήθηκε στην ετερόλογη έκφραση της κυτταρινάσης. Οι Lv et al. (2012) κατασκεύασαν δύο φορείς έκφρασης του T. reesei, pWEF31 και pWEF3, οι οποίοι είναι χρήσιμοι για την έκφραση μεγάλης κλίμακας του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο. Τρία γονίδια ενδοξυλανάσης (Ct xyn11A, Ct xyn11B και Ct xyn11C) από τον θερμόφιλο μύκητα Chaetomium thermophilum CBS 730.95 εκφράστηκαν σε T. reesei υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή T. reesei cel7A (chh1). Το γονίδιο της λιπάσης (Lip) του A. niger συντέθηκε de novo και εκφράστηκε στον T. reesei υπό τον υποκινητή του cbh1. Επιπλέον, η γονιδιακή αποσιώπηση με τη μεσολάβηση RNAi- θα μπορούσε να καταστείλει αποτελεσματικά την έκφραση του γονιδίου cbh1 και η μείωση του CBHI είχε ως αποτέλεσμα σαφή βελτίωση της παραγωγής ετερόλογων ενζύμων (L. Liu et al., 2013; Lv et al., 2012).

2.2.14 Φυτά

Η φωτοσύνθεση ή η χρήση απλών μέσων καλλιέργειας παρέχει σαφή πλεονεκτήματα για τη χρήση φυτών για την παραγωγή πρωτεϊνικών προϊόντων με χαμηλό κόστος. Η πλειονότητα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που είναι σημαντικές για πολλές πολύπλοκες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες μπορούν να πραγματοποιηθούν από τα φυτά, των οποίων η ποικιλομορφία ειδών προσφέρει ποικιλία σε πλατφόρμες παραγωγής από in vitro καλλιέργειες μέχρι καλλιέργειες αγρού, όλες εντός καθιερωμένων ρυθμιστικών κατευθυντήριων γραμμών. Ιδιαίτερο πλεονέκτημα είναι ότι τα φυτά δεν μπορούν να φιλοξενήσουν παθογόνους

μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο και τα ζώα που μπορούν να πλήξουν τα συστήματα παραγωγής in vitro από θηλαστικά κύτταρα, οπότε τα φυτά παρέχουν σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την ασφάλεια των προϊόντων.

Η ποικιλομορφία των πλατφορμών έκφρασης φυτών περιλαμβάνει: ολόκληρα φυτά, εναιωρήματα, ρίζες, βρύα, αροειδή και μικροφύκη. Κάθε πλατφόρμα έχει πλεονεκτήματα και αδυναμίες, ενώ η επιλογή της συχνά καθορίζεται από τον τύπο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, την αγορά, την κλίμακα, το κόστος και τους περιορισμούς της προγενέστερης και μεταγενέστερης επεξεργασίας του συγκεκριμένου πρωτεϊνικού προϊόντος. Σε κάθε πλατφόρμα υπάρχει επίσης μια ποικιλία φυτικών ειδών που μπορούν να φιλοξενήσουν το πρωτεϊνικό προϊόν. Η ποικιλομορφία των πλατφορμών παρέχει ευελιξία στην έκφραση νέων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και επιτρέπει την προσαρμογή και την κάλυψη των αναγκών κάθε περιστάσεως.

Τα διαγονιδιακά φυτά αγρού είναι ιδιαίτερα ελκυστικά για την παραγωγή βιομηχανικών πρωτεϊνών/ενζύμων επειδή η γεωργική παραγωγή είναι χαμηλού κόστους, τα πρωτεϊνικά προϊόντα που αποθηκεύονται σε συγκεκριμένα όργανα, όπως οι σπόροι, είναι σταθερά, η κλιμάκωση είναι εύκολη και σχετικά γρήγορη και τα ακατέργαστα φυτικά υλικά μπορούν συχνά να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε βιομηχανικές διεργασίες (Burnett & Burnett, 2020). Οι βιομηχανικές πρωτεΐνες που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι οι υδρολάσες, συμπεριλαμβανομένων των γλυκοσιδασών (π.χ. κυτταρινάση, α-αμυλάση και β-γλυκουρονιδάση (GUS)) και των πρωτεασών (π.χ. θρυψίνη). Οι σπόροι καλαμποκιού θεωρούνται ιδανική πλατφόρμα για τη βιομηχανική παραγωγή πρωτεϊνών/ενζύμων, επειδή το φυτό αυτό έχει τη μεγαλύτερη ετήσια απόδοση σε κόκκους και σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στους σπόρους (10%), προσφέροντας την υψηλότερη δυνητική απόδοση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ανά εκτάριο. Ωστόσο, η νομοθεσία αποτελεί σημαντικό εμπόδιο για τη χρήση φυτικών βιομηχανικών πρωτεϊνών/ενζύμων, επειδή απαιτείται μεγάλη έκταση διαγονιδιακών φυτών (Park & Wi, 2016; Schillberg et al., 2019).

2.2.15 Ζωικά κύτταρα

Για τη σύνθεση των επιθυμητών πρωτεϊνών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ζωικά κύτταρα, τα οποία μπορεί να είναι πιο κατάλληλα, επειδή πολλές πρωτεΐνες των θηλαστικών υφίστανται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση, κατά την οποία μια πρωτεΐνη υφίσταται επεξεργασία και εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας. Τα ζωικά συστήματα έκφρασης προσφέρουν, επίσης, σημαντικά πλεονεκτήματα για την έκφραση πρωτεϊνών σε σχέση με τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης - σωστή αναδίπλωση, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και σχετική ενζυμική δραστηριότητα. Μπορεί, επίσης, να είναι πιο επιθυμητά από άλλα ευκαρυωτικά συστήματα μη θηλαστικών όπου οι πρωτεΐνες που εκφράζονται μπορεί να μην περιέχουν τις σωστές γλυκοζυλίσεις. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την παραγωγή πρωτεϊνών που συνδέονται με μεμβράνες και απαιτούν συνοδούς για τη σωστή αναδίπλωση και σταθερότητα, καθώς και πολυάριθμες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Το μειονέκτημα, ωστόσο, είναι η χαμηλή απόδοση του προϊόντος σε σύγκριση με τους προκαρυωτικούς φορείς καθώς και η δαπανηρή φύση των σχετικών τεχνικών. Η περίπλοκη τεχνολογία τους και η πιθανή μόλυνση με ζωικούς ιούς έκφρασης από κύτταρα θηλαστικών έχουν επίσης θέσει περιορισμούς στη χρήση τους σε βιομηχανική παραγωγή μεγάλης κλίμακας.

Για την παραγωγή πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιεργημένες κυτταρικές αποικίες θηλαστικών, όπως η κινεζική ωοθήκη χάμστερ (CHO), η COS, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών, όπως η HEK και η HeLa. Οι φορείς ενσωματώνονται στα κύτταρα και το DNA μπορεί να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα με ομόλογο ανασυνδυασμό στην περίπτωση της σταθερής διαμόλυνσης ή τα κύτταρα μπορεί να διαμολυνθούν παροδικά (Hunter et al., 2019; Zboray et al., 2015).

2.3 Φορείς έκφρασης

Ο φορέας χρησιμοποιείται για την εισαγωγή ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα κύτταρο-στόχο και μπορεί να επιτάξει τον μηχανισμό πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου για την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο. Ένας φορέας έκφρασης είναι συνήθως ένα πλασμίδιο ή ένας ιός σχεδιασμένος για γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα. Οι φορείς έκφρασης

μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες εφαρμογών: παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εξάγονται από τους ξενιστές έκφρασης, και γενετική μηχανική των ξενιστών έκφρασης.

Επίσης, ένας φορέας έκφρασης πρέπει να διαθέτει στοιχεία απαραίτητα για τη γονιδιακή έκφραση. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν έναν υποκινητή, τη σωστή αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης, όπως μια ριβοσωμική θέση πρόσδεσης και ένα κωδικόνιο έναρξης, ένα κωδικόνιο λήξης και μια αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής. Υπάρχουν διαφορές στον μηχανισμό σύνθεσης πρωτεϊνών μεταξύ προκαρυωτών και ευκαρυωτών, επομένως οι φορείς έκφρασης πρέπει να διαθέτουν τα στοιχεία έκφρασης που είναι κατάλληλα για τον επιλεγμένο ξενιστή. Για παράδειγμα, οι φορείς έκφρασης των προκαρυωτών θα έχουν μια αλληλουχία Shine-Dalgarno στη θέση έναρξης της μετάφρασης για τη σύνδεση των ριβοσωμάτων, ενώ οι φορείς έκφρασης των ευκαρυωτών θα περιέχουν την αλληλουχία συναίνεσης Kozak (Scharff et al., 2017).

Ο υποκινητής εκκινεί τη μεταγραφή και επομένως είναι το σημείο ελέγχου για την έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου. Οι υποκινητές που χρησιμοποιούνται σε φορείς έκφρασης είναι συνήθως επαγώγιμοι, πράγμα που σημαίνει ότι η πρωτεϊνοσύνθεση ξεκινά μόνο όταν απαιτείται από την εισαγωγή ενός επαγωγέα όπως η IPTG. Ωστόσο, η έκφραση του γονιδίου μπορεί να είναι και καταστατική (δηλαδή η πρωτεΐνη εκφράζεται συνεχώς) σε ορισμένους φορείς έκφρασης. Χαμηλό επίπεδο συνισταμένης πρωτεϊνοσύνθεσης μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και σε φορείς έκφρασης με αυστηρά ελεγχόμενους υποκινητές.

2.3.1 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά, αυτοαναπαραγόμενα, δίκλωνα μόρια DNA που βρίσκονται συχνά στα βακτήρια και σε ορισμένους κατώτερους ευκαρυώτες. Τα περισσότερα είναι κυκλικά, αλλά υπάρχουν και μερικά γραμμικά. Το μέγεθός τους ποικίλλει από 5,000 έως 400,000 bp. Εισάγονται στα βακτηριακά κύτταρα με την διεργασία του μετασχηματισμού όπου με μεθόδους θερμικού σοκ ή ηλεκτροδιήθησης τα κύτταρα ξενιστές προσλαμβάνουν πλασμιδικό DNA. Επειδή, όμως, λίγα κύτταρα στη πραγματικότητα αφομοιώνουν πλασμιδικό DNA, είναι αναγκαία μια μέθοδος διαχωρισμού των εν λόγω κύτταρων από τα φυσιολογικά κύτταρα. Η λύση είναι η εισαγωγή ενός γονιδίου δείκτη επιλογής σε ένα πλασμίδιο. Το πιο

σύνηθες είναι η χρησιμοποίηση πλασμιδίου που φέρει γονίδιο με αντοχή στα αντιβιοτικά. Έτσι, θα αναπτυχθούν μόνο τα τροποποιημένα, από το πλασμίδιο, κύτταρα καθιστώντας τα εύκολα επιλέξιμα (Lodish et al., 2000).

Οι πλασμιδιακοί φορείς χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση και την έκφραση ξένου γονιδίου σε προκαρυωτικό σύστημα. Το ξένο DNA εισάγεται σε ένα πλασμίδιο (ή σε οποιονδήποτε φορέα κλωνοποίησης) με τη σύνδεση του DNA σε μια συμπληρωματική θέση στο πλασμίδιο. Οι θέσεις αυτές δημιουργούνται με πέψη του DNA και του φορέα με το ίδιο ένζυμο περιορισμού. Η θέση για το ένζυμο περιορισμού που επιλέγεται πρέπει να αντιπροσωπεύεται μόνο μία φορά στο πλασμίδιο. Έτσι, κατά την πέψη του πλασμιδίου θα δημιουργηθεί ένα μόνο, γραμμικό μόριο). Το ξένο DNA εισάγεται στη συνέχεια στο πλασμίδιο με τη δράση του ενζύμου DNA λιγάση. Το επόμενο βήμα είναι η εισαγωγή του συνδεδεμένου DNA σε ένα βακτηριακό κύτταρο για πολλαπλασιασμό. Αυτό γίνεται με μια τεχνική που ονομάζεται μετασχηματισμός. Τα βακτηριακά κύτταρα (ξενιστές) υποβάλλονται σε επεξεργασία είτε με Ca2Cl είτε με Rb2Cl. Η επεξεργασία αυτή δημιουργεί πόρους στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και τη μεμβράνη μέσω των οποίων εισέρχεται το πλασμίδιο. Αν και δεν υπάρχει περιορισμός μεγέθους στην αντίδραση σύνδεσης, η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού υπαγορεύεται από το μέγεθος του πλασμιδίου.

Ο περιορισμός αυτού του φορέα είναι το μέγεθος του DNA που μπορεί να εισαχθεί στο κύτταρο με μετασχηματισμό. Αυτό δημιουργεί προβλήματα στη προσπάθεια δημιουργίας μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ενός μεγάλου γονιδιώματος, όπως συμβαίνει με τα φυτά. Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει όλο το DNA που βρίσκεται στο κύτταρο του φυτού (ή οποιουδήποτε οργανισμού). Εάν χωνευτεί το φυτικό DNA μέχρι την ολοκλήρωσή του με ένα ένζυμο περιορισμού, συνδεθούν αυτά τα θραύσματα σε έναν πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματιστούν βακτηριακά κύτταρα, μόνο ένα μέρος αυτών των θραυσμάτων θα αντιπροσωπεύεται στα τελικά προϊόντα μετασχηματισμού. Εάν ένα γονίδιο ενδιαφέρωντος βρίσκεται σε ένα μεγάλο θραύσμα, τότε δεν θα μπορέσει να απομονωθεί το γονίδιο αυτό από μια πλασμιδιακή βιβλιοθήκη (Clark et al., 2019).

2.3.2 Βακτηριοφάγοι

Ο εντεροβακτηριακός φάγος λ (φάγος λάμδα, κολιφάγος λ, επίσημα Escherichia virus Lambda) είναι ένας βακτηριακός ιός ή βακτηριοφάγος που μολύνει το βακτηριακό είδος Escherichia coli (E. coli). Ανακαλύφθηκε από την Esther Lederberg το 1950. Οι βακτηριοφάγοι φορείς lambda αναπτύχθηκαν επειδή έγιναν διάφορες παρατηρήσεις που έδειχναν ότι μπορούσαν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους ακόμη και αν σε ένα τμήμα του γονιδιώματός τους είχε εισαχθεί ξένο DNA. Αυτό υποδήλωνε ότι ορισμένες περιοχές του ιού δεν ήταν απαραίτητες. Επομένως βασική ιδιότητα του βακτηριοφάγου είναι ότι το μισό γονιδίωμα του δε χρησιμοποιείται και μπορεί να αντικατασταθεί με ξένο DNA. Επίσης το DNA συσκευάζεται σε λοιμογόνα σωματίδια μόνο εάν το μεγεθός του βρίσκεται στα όρια 40,000 ως 53,000 bp, οπότε εξασφαλίζεται η συσκευασία μόνο του ανασυνδιασμένου DNA. Ο βακτηριοφάγος λάμδα είναι ίσως ο πιο μελετημένος και ο πιο γνωστός από όλα τα βακτηριακά εξωχρωμοσωμικά είδη. Όταν ο βακτηριοφάγος συνδεθεί με κλάσμα ξένου DNA κατάλληλου μεγέθους (μέχρι 23,000bp) τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA που προκύπτουν συσκευάζονται σε ιικά μόρια. Η μεταφορά του ανασυνδιασμένου DNA στα κύτταρα του ξενιστή θα έχει μεγάλη απόδοση γιατί όλα τα λοιμογόνα σωματίδια του φάγου θα περιέχουν ένα ξένο κλάσμα DNA (Kasman & Porter, 2021).

2.3.3 Τεχνικά βακτηριακά χρωμοσώματα (BACs)

Τα BACs είναι απλά πλασμίδια τα οποία είναι τροποποιημένα μόρια DNA που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA σε βακτηριακά κύτταρα (π.χ. E. coli). Είναι ικανά για κλωνοποίηση μεγάλων κλασμάτων DNA (100,000-300,000 bp). Τα BACs, με το DNA που έχουν εισαχθεί, προσλαμβάνονται με ηλεκτροδιήθηση στη συνέχεια από βακτηριακά κύτταρα. Καθώς τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται, ενισχύουν το DNA BAC, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να απομονωθεί και να χρησιμοποιηθεί στην αλληλούχιση DNA. Επειδή το BAC είναι πολύ μικρότερο από το ενδογενές βακτηριακό χρωμόσωμα, είναι εύκολο να εξαγνιστεί το DNA BAC μακριά από το υπόλοιπο DNA του βακτηριακού κυττάρου και έτσι να έχουμε το κλωνοποιημένο DNA σε καθαρισμένη μορφή. Αυτό και άλλα ισχυρά χαρακτηριστικά των BACs τα έχουν καταστήσει εξαιρετικά χρήσιμα για τη χαρτογράφηση και την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων των θηλαστικών (Godiska et al., 2013).

2.3.4 Τεχνητά χρωμοσώματα της ζύμης (YACs)

Τα τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης (YACs) είναι φορείς που βασίζονται σε πλασμίδια του Saccharomyces cerevisiae (ζύμη του αρτοποιού) που αναπαράγονται αυτόνομα. Στους ζυμομύκητες (ευκαρυωτικός οργανισμός) ένα YAC συμπεριφέρεται όπως ένα χρωμόσωμα ζύμης και διαχωρίζεται σε θυγατρικά κύτταρα. Αυτοί οι φορείς μπορούν να μεταφέρουν τα μεγαλύτερα ένθετα από όλους και χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλωνοποίηση μεγάλων γονιδιωμάτων, όπως το ανθρώπινο γονιδίωμα. Ένας YAC αποτελείται από δύο αντίγραφα μιας τελομερικής αλληλουχίας ζύμης (τα τελομερίδια είναι οι αλληλουχίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων), ένα κεντρομερές ζύμης, ένα ARS ζύμης (μια αλληλουχία αυτόνομης αντιγραφής όπου αρχίζει η αντιγραφή του DNA) και κατάλληλους επιλέξιμους δείκτες (Anand, 1992).

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των YACs υπερβαίνουν τη δυνατότητα κλωνοποίησης μεγάλων τμημάτων DNA. Τα υψηλά επίπεδα ομόλογου ανασυνδυασμού στη ζύμη και οι εξελίξεις στη δυνατότητα αλλαγής οποιουδήποτε αλληλουχία με οποιονδήποτε τρόπο, επιτρέπει την πραγματοποίηση συγκεκριμένων μεταλλάξεων στις αλληλουχίες των YAC χωρίς να χρειάζεται να καταφύγουμε σε υποκλωνοποίηση. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτές οι τροποποιημένες YAC μπορούν άμεσα να μεταφερθούν πίσω στον οργανισμό ή στο κύτταρο προέλευσης για την εξέταση φαινοτύπων. Ο ανασυνδυασμός μεταξύ YACs που επικαλύπτονται εν μέρει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία νέων YACs μεγαλύτερου μεγέθους, επιτρέποντας τη δημιουργία συνεχόμενων τμημάτων μεγαλύτερων από το αρχική βιβλιοθήκη. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο όταν η γονιδιωματική οργάνωση ενός γονιδίου ή μιας περιοχής ενδιαφέροντος καλύπτει ένα μεγαλύτερο από το μέγεθος του ένθετου. Με αυτόν τον τρόπο έχουν κατασκευαστεί YACs που υπερβαίνουν τα 2 Mb.

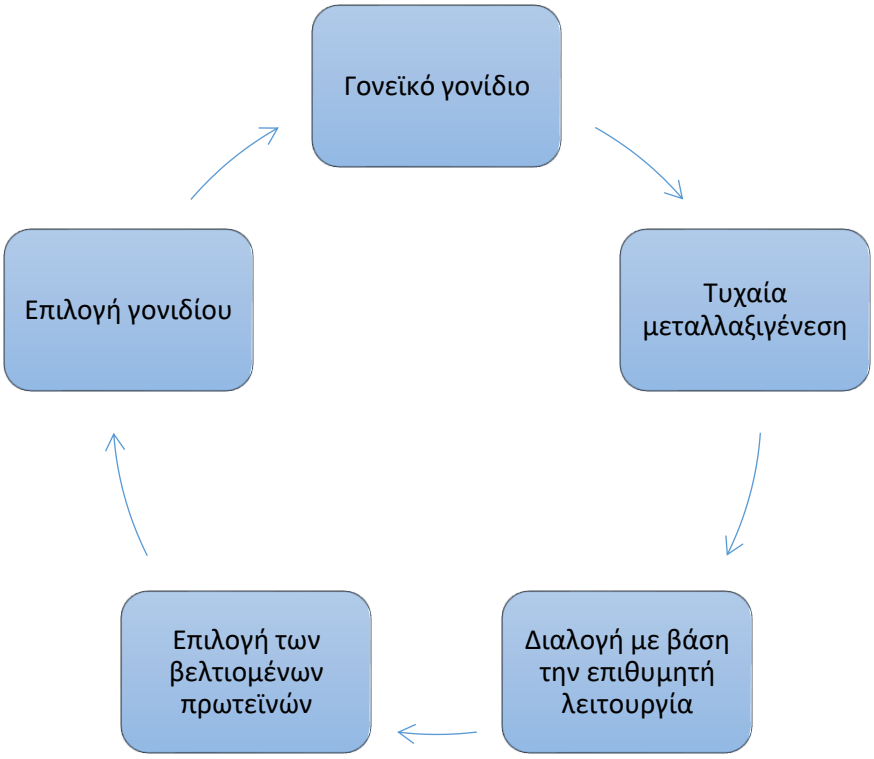
Ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζεται κατά την κατασκευή και τη χρήση των βιβλιοθηκών YAC είναι ότι συνήθως περιέχουν κλώνους που είναι χιμαιρικοί, δηλαδή περιέχουν DNA σε έναν μόνο κλώνο από διαφορετικές θέσεις του γονιδιώματος.Επίσης οι κλώνοι YAC περιέχουν συχνά διαγραφές, αναδιατάξεις ή μη συνεχόμενα κομμάτια του κλωνοποιημένου DNA. Ως αποτέλεσμα, κάθε κλώνος YAC πρέπει να αναλύεται προσεκτικά για να μην συμβούν

αναδιατάξεις του DNA. Η αποτελεσματικότητα της κλωνοποίησης είναι χαμηλή (λαμβάνονται περίπου 1000 κλώνοι ανά μικρογραμμάριο φορέα και ένθετου DNA, και τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι οι YAC είναι λιγότερο σταθεροί από τους BAC (Louis, 2013).

2.4 Κατευθυνόμενη Εξέλιξη (Directed Evolution)

Η κατευθυνόμενη εξέλιξη (DE) μιμείται το σύστημα εξέλιξης της φύσης για τη δημιουργία νέων πρωτεϊνών. Υπάρχουν όμως αρκετές διαφορές μεταξύ της φυσικής εξέλιξης και της εργαστηριακής εξέλιξης. Η μητέρα φύση χρειάζεται εκατομμύρια χρόνια για να εξελιχθεί σε αντίθεση με την κατευθυνόμενη εξέλιξη η οποία χρειάζεται μόνο μήνες ή ημέρες για την ανάπτυξη πρωτεϊνών με νέα χαρακτηριστικά. Τα διακριτικά χαρακτηριστικά των μεθόδων κατευθυνόμενης εξέλιξης είναι ότι δεν απαιτούν προηγούμενη γνώση για τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, γεγονός που δίνει το προβάδισμα σε αυτή τη στρατηγική σχεδιασμού πρωτεϊνών έναντι της προσέγγισης του ορθολογικού σχεδιασμού. Στηρίζεται σε δύο απαιτήσεις από τις πρωτεΐνες, η μία είναι η δύναμη ανοχής των πρωτεϊνών σε περιορισμένο βαθμό υποκατάστασης καταλοίπων αμινοξέων χωρίς να διακυβεύεται η αναδίπλωση ή η σταθερότητά τους και η άλλη είναι, ότι η μητέρα φύση έχει εξερευνήσει μόνο ένα μικρό κομμάτι ευεργετικών αλληλουχιών αλλά ένα μεγάλο ανεξερεύνητο τμήμα της αλληλουχίας μπορεί να αποκαλύψει τις αξιοθαύμαστες απαντήσεις σε ιδιόμορφες βιολογικές διαμάχες. Η στρατηγική κατευθυνόμενης εξέλιξης κατασκευάζει πρωτεΐνες με την επιθυμητή δραστικότητα, σταθερότητα, εκλεκτικότητα, εξειδίκευση και συγγένεια (Cobb et al., 2013).

Εικόνα 1 : *Διεργασία κατευθυνόμενης εξέλιξης. Ο κύκλος διεργασίας επαναλαμβάνεται για πολλές γενεές μεταλλαξιγενέσεων έως ότου χαρακτηριστεί η πρωτείνη με τις επιθυμητές λειτουργίες.*



2.4.1 Τυχαία Μεταλλαξιγένεση

Είναι μία από τις πιο ισχυρές μεθόδους για τη δημιουργία μεταλλαγμένων βιβλιοθηκών. Το σύστημα εισάγει διάφορους τύπους μεταλλάξεων, όπως μεταφορές, μεταγραφές, εισαγωγές, διαγραφές κ.λ.π. στο απαιτούμενο γονίδιο για τη δημιουργία της μεταλλαγμένης βιβλιοθήκης του. Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για τη δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων που περιλαμβάνει, χημική μεταλλαξιγένεση, μεταλλακτικά στελέχη, error prone PCR. κ.λπ. Μεταξύ αυτών, η πιο διαδεδομένη μέθοδος είναι η error prone PCR, καθώς είναι γρήγορη, απλή και ευπροσάρμοστη και επιτρέπει την απλή ρύθμιση των ποσοστών σφάλματος (Labrou, 2010).

2.4.2 Error Prone PCR

Είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εισαγωγή μεταλλάξεων στα γονίδια. Βασίζεται στη χαμηλή πιστότητα της Taq DNA πολυμεράσης, η οποία στερείται την δραστηριότητα της 3'-5'εξωνουκλεάσης. Γενικά, το ποσοστό σφάλματος της Taq DNA πολυμεράσης είναι 0,001-0,002% ανά νουκλεοτίδιο ανά κύκλο αντιγραφής υπό κανονικές συνθήκες, το οποίο είναι επαρκές για τη δημιουργία μεταλλαγμένων βιβλιοθηκών για μεγάλα γονίδια αλλά όχι για μικρά γονίδια. Βασικά βήματα στη μέθοδο περιλαμβάνουν: (1) την επιλογή τμήματος ενός γονιδίου προς μετάλλαξη ή ολόκληρου γονιδίου, (2) την επιλογή της έκτασης του απαιτούμενου σφάλματος που εξαρτάται από τον τύπο και την έκταση της δραστηριότητας που θέλει κανείς να δημιουργήσει, (3) την επιλογή της στρατηγικής για την εκτέλεση error prone PCR που εξαρτάται από το απαιτούμενο ποσοστό σφάλματος, (4) μετά την PCR, την κλωνοποίηση των γονιδίων σε κατάλληλα πλασμίδια και στη συνέχεια το μετασχηματισμό σε κατάλληλο κυτταρικό σύστημα ξενιστή, (5) τη διαλογή των αποικιών για τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, (6) την απομόνωση των πλασμιδίων από τις επιλεγμένες αποικίες, οι οποίες χρησιμεύουν ως πρότυπο για τον επόμενο κύκλο μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση error prone PCR. Η διαδικασία θα συνεχιστεί μέχρι να έχουμε όλες τις επιθυμητές μεταλλάξεις στο πλασμίδιο. Τελικά, οι πρωτεΐνες εκφράζονται και καθαρίζονται από τα πλασμίδια, και ακολουθεί ο χαρακτηρισμός των καθαρών πρωτεϊνών (Acevedo et al., 2017).

Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου περιλαμβάνουν: (α) περιορισμένο αριθμό κλώνων που λαμβάνονται λόγω του σταδίου της λιγάσης β) μεροληψίες (biases) για τις μεταλλάξεις, όπως ισχυρή μερόληψη για τις μεταβάσεις που περιορίζουν τις προσβάσιμες αντικαταστάσεις αμινοξέων. Απλοποιημένες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένων της MegAnneal και της παραγωγής κυκλικών πλασμιδίων με PCR (PPCP) που βασίζονται στο συνδυασμό της epPCR και της κλωνοποίησης μέσω της στρατηγικής των μεγαπριμερών, έχουν αναπτυχθεί για την in situ δημιουργία βιβλιοθηκών τυχαίας μεταλλαξιγένεσης (Wilson & Keefe, 2001).

2.4.3 Χημική μεταλλαξιγένεση

Υπάρχει ποικιλία χημικών ουσιών που μπορούν να τροποποιήσουν το DNA με διάφορους τρόπους. Έχει αναφερθεί ότι το δισουλφιτικό νάτριο μεταλλάσσει τα πλούσια σε GC γονίδια λόγω της καταλυτικής δράση της από-αμινοποίησης της μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης σε ουρακίλη. Με την ικανότητα του σουλφονικού αιθυλομεθανίου (EMS) να αλκυλιώνει τη γουανιδίνη, προκαλεί τα γουανιδινικά υπολείμματα να αντιγράφονται εσφαλμένα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA. Το νιτρώδες οξύ προκαλεί σημειακές μεταλλάξεις μεταστροφής (A/T σε G/C) με απο-αμίνωση της αδενίνης και τα κατάλοιπα της κυτοσίνης. Έχουν αναφερθεί πολλά άλλα τέτοια χημικά μεταλλαξιογόνα τα οποία περιλαμβάνουν το νιτρώδες οξύ, την υδροξυλαμίνη (HA), τη μιτομυκίνη C (MMC), το μεθυλομεθανιοσουλφονικό οξύ (MMS), N-μεθυλ-N'-νιτρο-N-νιτροζογουανιδίνη (MNNG), 2-αμινοπουρίνη(2AP), διθειικό άλας (BS), 2-αμινοπουρίνη (2AP), μεθυλαμίνη (MA) κ.λπ. Η απλότητα και το χαμηλό κόστος προσδίδουν αξία σε αυτή την προσέγγιση μεταλλαξιγένεσης, αλλά ο περιορισμός του ελέγχου του ρυθμού μετάλλαξης και των περιορισμένων αντικαταστατών αμινοξέων υποβαθμίζει την αξία αυτής της προσέγγισης (Bose, 2016).

2.4.4 DNA Shuffling

Το DNA Shuffling είναι ένα από τα πρώτα πρωτοποριακά έργα στην εποχή του ανασυνδυασμού, το οποίο πραγματοποίησε ο Stemmer και οι συνεργάτες του για το σχεδιασμό νέων πρωτεϊνών. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την πέψη ομόλογων γονιδίων σε μικρά τμήματα με την DNase I και στη συνέχεια τον καθαρισμό των τμημάτων αυτών από τα μη πεψημένα γονικά γονιδία. Τα καθαρισμένα θραύσματα επανασυναρμολογούνται στη συνέχεια σε γονίδιο πλήρους μήκους με τη χρήση PCR χωρίς εκκινητές, στην οποία τα ομόλογα θραύσματα από διαφορετικούς γονείς θα «εκκινήσουν» το ένα το άλλο, το οποίο είναι το βασικό βήμα του ανασυνδυασμού και οδηγεί σε χιμαιρικό DNA. Το χιμαιρικό DNA γονικού μεγέθους στη συνέχεια, ενισχύεται με τη χρήση τερματικών εκκινητών σε κανονική αντίδραση PCR. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον ανασυνδυασμό σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια που παράγονται με μεθόδους τυχαίας μεταλλαξιγένεσης και επίσης για τον ανασυνδυασμό των συγγενικών γονιδίων. Ο Stemmer το 1994 χρησιμοποίησε για πρώτη φορά αυτή τη μέθοδο για να αυξήσει την ανθεκτικότητα της

TEM-I-β-λακταμάσης στο αντιβιοτικό κεφοταξίμη. Χρησιμοποίησε τρεις γύρους ανακάτεματος και δύο γύρους επαναδιασταύρωσης με το γονικό DNA, για να αφαιρέσει τις μη ουσιώδεις μεταλλάξεις. Κάθε γύρος ακολουθήθηκε από επιλογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού κεφοταξίμη. Η μετάλλαξη είχε με μόνο 6 σημειακές μεταλλάξεις, 32.000 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα σε σύγκριση με την πρωτεΐνη άγριου τύπου (Stemmer, 1994).

2.4.5 Εστιασμένη μεταλλαξιγένεση

Οι στρατηγικές τυχαίας μεταλλαξιγένεσης έχουν πολλά επιτυχημένα αποτελέσματα, αλλά ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι οι μεγάλες βιβλιοθήκες που πρέπει να ελεγχθούν. Αυτή η αδυναμία έχει ξεπεραστεί με τις μεθόδους εστιασμένης μεταλλαξιγένεσης (focused mutagenesis) οι οποίες οδηγούν σε μειωμένο μέγεθος βιβλιοθήκης, καθώς εστιάζουν σε μία μόνο θέση για μεταλλάξεις, μειώνοντας έτσι τις χρονοβόρες εργασίες διαλογής. Άλλα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων περιλαμβάνουν την εξάλειψη της μεροληψίας(biases) των κωδικωνίων της PCR και τα επίπονα βήματα υποκλωνοποίησης (Acevedo et al., 2017).

2.4.6 Μεταλλαξιγένεση Κασσέτας

Οι μέθοδοι μεταλλαξιγένεσης κασέτας περιλαμβάνουν αρχικά τη σύνθεση μιας κασέτας DNAπου περιέχει το θραύσμα του γονιδίου ενδιαφέροντος πλαισιωμένο από περιοχή περιορισμού ενδονουκλεάσης για την οποία υπάρχει επίσης μια μοναδική θέση στο πλασμίδιο-στόχο. Στη συνέχεια και τα δύο πλασμίδια-στόχοι και το DNA κασέτας υποβάλλονται σε επεξεργασία με περιοριστική ενδονουκλεάση για τη δημιουργία κολλώδη άκρων, τα οποία τελικά συνδέονται μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την εισαγωγή του θραύσματος ενός γονιδίου στο πλασμίδιο-στόχο.

Η μεταλλαξιγένεση κασέτας κωδικονίου είναι μια απλή μέθοδος για την εισαγωγή/αντικατάσταση ενός μόνο κωδικονίου σε συγκεκριμένη θέση σε δίκλωνο DNA, η οποία απαιτεί ένα μεταλλαξιγόνο κωδικόνιο κασέτα το οποίο περιέχει τρία ζεύγη βάσεων άμεσης τερματικής επανάληψης και δύο ενωμένες θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης SapI, και ένα μόριο-στόχο με αμβλύ, σπασίματα διπλής αλυσίδας στο σημείο που στοχεύει η μεταλλαξιγένεση. Η μεταλλαξιογόνος κασέτα εισάγεται στο μόριο-στόχο, το

οποίο στη συνέχεια υποβάλλεται σε πέψη περιορισμού με τη SapI, η οποία κόβει εκτός της αλληλουχίας αναγνώρισης, επομένως το βήμα αυτό θα αφαιρέσει το μεγαλύτερο μέρος της κασέτας αφήνοντας μια προεξοχή 3 βάσεων, και τα προϊόντα συνδέονται με λιγάση για να δημιουργηθεί η ένθεση. Μια σειρά από έντεκα καθολικές μεταλλαξιγόνες κασέτες που είναι ικανές να εισάγουν όλα τα πιθανά αμινοξέα στη θέση-στόχο, δημιουργήθηκαν για το σκοπό αυτό (Ferreira Amaral et al., 2017).

2.4.7 Αποκοπή (Truncation)

Τυχαίες ή κατευθυνόμενες στρατηγικές αποκοπής έχουν χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση των ανεπιθύμητων περιοχών των πρωτεϊνών που εμποδίζουν τη δραστικότητα του ενζύμου. Έτσι κατασκευάζονται αποκομένες βιβλιοθήκες ή ένζυμα με τροποποιημένες ενζυμικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, μια μεταλλαγμένη ενδο-δεξτρανάση TM-NCGΔ από Streptococcus mutant παρουσίασε 1,4-2 φορές ενισχυμένη υδρολυτική δραστικότητα σε 0,05% δεξτράνη μετά την αποκοπή (Chen et al., 2012). Με τη χρήση ενός συνδυασμού αποκοπής και κατευθυνόμενης τοποειδικής μεταλλαξιγένεσης, κατασκευάστηκε ένα μετάλλαγμα τρανσγλουταμινάσης E5D με βελτιωμένη δραστικότητα και θερμοσταθερότητα. Επτά N-τελικά κατάλοιπα της τρανσγλουταμινάσης Streptomyces hygroscopicus διαγράφηκαν ένα προς ένα για να μελετηθεί η επίδρασή τους στη δραστικότητα του ενζύμου. Παρατηρήθηκε ότι η ειδική δραστικότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου (με 4 κατάλοιπα μήκους αποκομμένου N-τελικού άκρου) αυξήθηκε κατά 32,92%. Το πέμπτο κατάλοιπο στην περιοχή του N-τελικού άκρου (E5 ή κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος) του ενζύμου άγριου τύπου αντικαταστάθηκε περαιτέρω από 19 άλλα αμινοξέα. Η μεταλλαγμένη τρανσγλουταμινάση με τμήμα ασπαρτικού οξέος στην πέμπτη θέση παρουσίασε 1,85 φορές υψηλότερη ειδική δραστικότητα και 2,7 φορές μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής στους 50°C σε σύγκριση με το ένζυμο άγριου τύπου. Παράλληλα, η θερμοκρασία τήξης του μεταλλαγμένου ενζύμου τρανσγλουταμινάσης αυξήθηκε από 68,9ºC σε 79,1ºC (Kim et al., 2011).

2.5 Στρατηγικές επιλογής και διαλογής (selection and screening)

Μετά τη δημιουργία γενετικής διαφοροποίησης, τα μεταλλάγματα συχνά μετασχηματίζονται σε βακτηριακούς ξενιστές ή ζύμες για την έκφραση πρωτεϊνών και ελέγχονται για τη λειτουργικότητά τους. Η επιλογή εξαλείφει τις μη λειτουργικές παραλλαγές και βασίζεται κυρίως σε πλασμίδια, φάγους ή ριβοσώματα επίδειξης, σε συμπληρωματικές στρατηγικές ανάπτυξης και σε στρατηγικές που βασίζονται σε αναμεταδότες. Κατά τη διάρκεια της διαλογής, οι μεμονωμένες παραλλαγές πρωτεϊνών αξιολογούνται ως προς την επιθυμητή δραστικότητα. Οι μεθοδολογίες υψηλής απόδοσης επιτρέπουν την αποτελεσματική διαλογή για την επιθυμητή λειτουργικότητα και περιλαμβάνουν τα ακόλουθα εργαλεία και μεθόδους: άμεσες πλάκες μικροτιτλοδότησης, ψηφιακή απεικόνιση σε συνδυασμό με φασματοσκοπία, διαμερισματοποίηση, FACS (διαλογή κυττάρων με ενεργοποίηση φθορισμού), απεικόνιση κυτταρικής επιφάνειας, μεταφορά ενέργειας συντονισμού, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), αέρια χρωματογραφία και φασματοσκοπία μάζας. Οι επιθυμητοί κλώνοι με την καλύτερη λειτουργικότητα προσδιορίζονται μετά τη διαλογή και χρησιμεύουν ως πρότυπα για τον επόμενο γύρο γονιδιακής χειραγώγησης. Η συστηματική αλληλεπίδραση με το συνδυασμό των μεθόδων διαλογής και επιλογής θα οδηγήσει συχνά στην καλύτερη παραλλαγή με την επιθυμητή δραστικότητα (Wingfield, 2015).

2.5.1 Διαλογή

Οι γενετικές διαλογές αναπτύχθηκαν αρχικά για την ανακάλυψη γονιδίων που σχετίζονται με συγκεκριμένους φαινότυπους. Οι γενετιστές μεταλλάσσουν τυχαία το γονιδίωμα ενός πρότυπου οργανισμού και στη συνέχεια εξετάζουν μεμονωμένους οργανισμούς για έναν τύπο φαινομένου που τους ενδιαφέρει. Οι οργανισμοί με αλλοιωμένους φαινότυπους χαρακτηρίζονται με αναλύσεις διασταύρωσης και διασύνδεσης, ή πιο πρόσφατα με αλληλουχία DNA υψηλής απόδοσης, για να προσδιοριστούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις που διέπουν τις φαινοτυπικές αλλαγές. Η κατευθυνόμενη εξέλιξη εφαρμόζει παρόμοιες στρατηγικές διαλογής

σε βιβλιοθήκες ενός γονιδίου που παρασκευάζονται με τις προαναφερθείσες μεθόδους διαφοροποίησης (Martínez & Schwaneberg, 2013).

2.5.2 Διαλογή Χωρικά Διαχωρισμένων Παραλλαγών

Ο χωρικός διαχωρισμός (δηλαδή η κωδικοποίηση ανά θέση) των μεμονωμένων μεταλλάξεων διατηρεί τη σύνδεση μεταξύ φαινοτύπου και γονότυπου. Για αυτές τις διαλογές, οι γονιδιακές παραλλαγές εκφράζονται σε μονοκύτταρο οργανισμό, όπως το E. coli, που μπορεί να καλλιεργηθεί σε στερεά μέσα ή να μεταφερθεί σε πλάκες υγρής καλλιέργειας πολλαπλών κοιλοτήτων. Αν και ο χωρικός διαχωρισμός των κλώνων επιβάλλει ένα πρακτικό όριο απόδοσης λιγότερων από ~104 μέλη βιβλιοθήκης ανά γύρο διαλογής, ένα βασικό πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι η ευρεία συμβατότητά της με πολλές διαφορετικές τεχνικές δοκιμών. Όταν δεν είναι διαθέσιμη μια φθορίζουσα ένδειξη, τεχνικές όπως ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η αέρια χρωματογραφία ή η φασματοσκοπία μάζας μπορούν να παρακολουθούν άμεσα την κατανάλωση υποστρώματος ή τον σχηματισμό προϊόντος. Θεωρητικά, σχεδόν οποιαδήποτε ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να διαλεχθεί σε μορφή χωρικά διαχωρισμένης βιβλιοθήκης, αν και η χρονοβόρα και απαιτητική σε υποδομές φύση ορισμένων τεχνικών περιορίζει την απόδοση (Longwell et al., 2017).

Κατά την εκτέλεση διαλογής χαμηλής απόδοσης, η κατανόηση των σχέσεων δομής-δραστικότητας εντός της πρωτεΐνης-στόχου είναι απαραίτητη για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας πρόσβασης σε μια επιθυμητή παραλλαγή. Αυτές οι εκτιμήσεις παραδειγματίζονται καλύτερα από την εξέλιξη των κυτοχρωμάτων P450, μιας κατηγορίας ενζύμων με υψηλό εξελικτικό δυναμικό που αποδεικνύεται από τις ποικίλες οξειδωτικές αντιδράσεις που καταλύουν στη φύση. Ο Arnold και οι συνεργάτες του εξέτασαν μια ομάδα ~100 προηγουμένως σχεδιασμένων παραλλαγών P450 σε λυτικά E. coli για τη μεταφορά καρβενίων προς σχηματισμό κυκλοπροπανίων- ο σχηματισμός προδρόμων παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία. Τα προκύπτοντα ένζυμα παρουσίασαν υψηλή δραστικότητα κυκλοπροπανοποίησης με εναντιοεκλεκτικότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα, ικανότητες που δεν υπάρχουν σε φυσικούς βιοκαταλύτες (Schenone et al., 2013).

Όταν η μοριακή εικόνα είναι ελλιπής, είναι απαραίτητο να ελεγχθούν περισσότερες παραλλαγές για να επιτευχθεί ο επιθυμητός φαινότυπος. Οι διαλογές υψηλής απόδοσης βασίζονται στην ταχεία αξιολόγηση των οπτικών χαρακτηριστικών, όπως το χρώμα, ο φθορισμός, η φωταύγεια ή η θολερότητα (Thorn, 2017).

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες παρέχουν έναν εύκολα ανιχνεύσιμο φαινότυπο και, ως εκ τούτου, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει τον κυτταρικό φθορισμό ως ανιχνευτή για τον εντοπισμό παραλλαγών της GFP με φωτεινότερο φθορισμό και τροποποιημένο φάσμα απορρόφησης ή εκπομπής. Πιο πρόσφατα, αυτή η προσέγγιση εφαρμόστηκε στη ροδοψίνη Arch, που κατασκευάστηκε από τον Cohen και τους συνεργάτες του ώστε να εμφανίζει φθορισμό εξαρτώμενο από την τάση και χρησιμοποιήθηκε για την άμεση απεικόνιση της νευρωνικής δραστηριότητας. Ο Arnold και οι συνεργάτες εξέφρασαν μια βιβλιοθήκη παραλλαγών Arch σε E. coli χρησιμοποιώντας πλάκες καλλιέργειας υγρού πολλαπλών κοιλοτήτων και ξέπλυναν τα κύτταρα με ιοντικό ρυθμιστικό διάλυμα για να δημιουργήσουν το διαμεμβρανικό δυναμικό που απαιτείται για μετρήσεις φθορισμού. Μετά από πολλαπλούς γύρους διαλογής τυχαίων και κατευθυνόμενων προς τη θέση βιβλιοθηκών, η πιο δραστική παραλλαγή εμφάνισε εκπομπή με μετατόπιση προς το ερυθρό και αυξημένη φωτεινότητα. Οι δυνατότητες του εξελιγμένου Arch θα πρέπει να επιτρέπουν την παράλληλη παρακολούθηση πολλαπλών νευρώνων με τη χρήση μικροσκοπίας ευρέος πεδίου (Thorn, 2017).

2.5.3 Διαλογή Υψηλής Απόδοσης με Κυτταρομετρία Ροής

Αντί για χωρικό διαχωρισμό κλώνων, ένας μαζικός πληθυσμός μπορεί να εξεταστεί σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων χρησιμοποιώντας το κυτταρικό τοίχωμα ή τη μεμβράνη για να διατηρηθεί η συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου. Η διαλογή κυττάρων με φθορισμό (FACS)69 βασίζεται σε έναν μη διαχέοντα φθορίζοντα ρεπόρτερ για την αυτόματη ταυτοποίηση και απομόνωση κυττάρων που περιέχουν τις επιθυμητές γονιδιακές παραλλαγές. Η σύγχρονη κυτταρομετρία ροής, ενσωματώνοντας σημαντικές προόδους στη μικρορευστομηχανική, την οπτική και το χειρισμό των κυττάρων, προσφέρει μία από τις υψηλότερες δυνατότητες οποιασδήποτε μεθόδου διαλογής, επιτυγχάνοντας έως και 108 διαλεγμένα μέλη βιβλιοθήκης σε <24 ώρες (Longwell et al., 2017).

2.5.4 Διαλογή τεχνητών τμημάτων που μοιάζουν με κύτταρα

Όταν οι περιορισμένοι σε κύτταρα αναμεταδότες φθορισμού είναι δύσκολο ή αδύνατο να εφαρμοστούν για ένα δεδομένο γονίδιο και τύπο φαινοτύπου, η in vitro τμηματοποίηση (IVC) παρέχει μια εναλλακτική μορφή για να καταστεί δυνατή η διαλογή υψηλής απόδοσης. Η IVC, πρωτοπόρος των Tawfik και Griffiths, χρησιμοποιεί τα υδατοειδή σταγονίδια σε γαλακτώματα νερού-λαδιού για τη διαμερισματοποίηση μεμονωμένων γονιδίων και γονιδιακών προϊόντων μαζί με ένα υποκατάστατο φθοριογόνο υπόστρωμα. Η IVC μπορεί να επιτρέψει την εξέλιξη των πρωτεϊνών σε δύο μορφές: είτε σε γαλάκτωμα μεμονωμένων κυττάρων που εκφράζουν το μέλος της βιβλιοθήκης είτε σε γαλάκτωμα μεμονωμένων μορίων DNA μαζί με μηχανήματα μεταγραφής-μετάφρασης in vitro. Επειδή τα κυτταρόμετρα ροής μπορούν να ταξινομήσουν τα σωματίδια μόνο σε υδατικό μείγμα, είναι απαραίτητο ένα δευτερεύον γαλάκτωμα για τη δημιουργία σταγονιδίων νερού-έλαιου-νερού για διαλογή με βάση τη FACS. Η ευελιξία χρήσης φθοριογόνων υποστρωμάτων διευρύνει τους φαινότυπους και τα ένζυμα που μπορούν να ελεγχθούν με κυτταρομετρία ροής (Bernath et al., 2004).

2.5.5 Επιλογή (Selection) Λειτουργικών Πρωτεϊνών

Η διαλογή, εξ ορισμού, απαιτεί την επιθεώρηση μεμονωμένων φαινοτύπων. Τα δεδομένα που προκύπτουν, τα οποία μπορεί να είναι πολύ πλούσια ανάλογα με την επιλογή των παρατηρήσιμων στοιχείων, όχι μόνο εντοπίζουν τους επιθυμητούς υποπληθυσμούς, αλλά και ενημερώνουν για την επιλογή της κατάλληλης ακρίβειας της διαλογής στους επόμενους γύρους εξέλιξης. Αντίθετα, η επιλογή παρακάμπτει την ανάγκη ατομικής επιθεώρησης κάθε μέλους της βιβλιοθήκης και, αντιθέτως, συνδέει μια δραστηριότητα ενδιαφέροντος με τον φυσιολογικό διαχωρισμό του κωδικοποιητικού DNA ή με την επιβίωση του οργανισμού που παράγει τα ενεργά μέλη της βιβλιοθήκης. Η ανάπτυξη αποτελεσματικών συστημάτων με τα οποία οι μοριακές δραστηριότητες ενδιαφέροντος οδηγούν στο διαχωρισμό ή την αναπαραγωγή των επιθυμητών παραλλαγών μπορεί να είναι ένα σημαντικό εγχείρημα που απαιτεί δημιουργικότητα και ισχυρή μοριακή αντίληψη. Η καλά σχεδιασμένη επιλογή προσφέρει μοναδική απόδοση, αν και εις βάρος δυνητικά πλούσιων δεδομένων διαλογής. Αυτό το

μειονέκτημα καθιστά συχνά αναγκαία μια δευτερεύουσα φαινοτυπική δοκιμή των επιτυχιών επιλογής προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης και επιλογής για τον επόμενο κύκλο εξέλιξης (Phong et al., 2018).

2.5.6 Επιλογή για Συγγένεια Δεσμού

Επειδή όλα τα μέλη της βιβλιοθήκης στο ίδιο μείγμα υποβάλλονται σε επιλογή ταυτόχρονα, πρέπει να διατηρείται μια μοριακή σύνδεση μεταξύ των γονιδίων και των αντίστοιχων γονιδιακών προϊόντων και όχι μια χωρική κωδικοποίηση. Σε μια τυπική επιλογή δέσμευσης στόχου, τα πρωτεϊνικά μέλη της βιβλιοθήκης με την επιθυμητή δεσμευτική δραστηριότητα και οι αλληλουχίες DNA που τα κωδικοποιούν συλλαμβάνονται με τη χρήση ενός ακινητοποιημένου στόχου, ενώ τα μη δεσμευτικά μέλη της βιβλιοθήκης ξεπλένονται. Στις μεθόδους απεικόνισης κυτταρικής επιφάνειας ή απεικόνισης φάγων, ένα κύτταρο ή ένας βακτηριοφάγος χρησιμεύει ως «θάλαμος» για τη σύνδεση γονιδίων και γονιδιακών προϊόντων. Τα πρωτεϊνικά μέλη της βιβλιοθήκης εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου ή στο περίβλημα του βακτηριοφάγου μέσω σύντηξης με ενδογενείς πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας ή πρωτεΐνες του περιβλήματος του φάγου. Η απεικόνιση φάγου έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανάπτυξη θεραπευτικών αντισωμάτων και στην αποκάλυψη μοτίβων πρόσδεσης πεπτιδίων (Longwell et al., 2017).

Σε αντίθεση με τις μεθόδους διαλογής που συνήθως περιορίζονται από την απόδοση της μέτρησης, η αποτελεσματικότητα με την οποία τα μέλη της βιβλιοθήκης DNA μεταφέρονται στον οργανισμό-ξενιστή, περιορίζοντας έτσι τον αριθμό των παραλλαγών που μπορούν να αξιολογηθούν με επιλογή και διαλογή in vivo, περιορίζει τα μεγέθη των βιβλιοθηκών που μπορούν να επεξεργαστούν με μεθόδους επιλογής, όπως η απεικόνιση στην κυτταρική επιφάνεια ή η απεικόνιση φάγων, οι οποίες απαιτούν ενδοκυτταρική μετάφραση. Καθώς ο βακτηριακός μετασχηματισμός παρέχει, στην καλύτερη περίπτωση, ~10^9-10^10 μετασχηματιστές ανά πείραμα, οι μέθοδοι επιλογής με βάση το κύτταρο ή τον φάγο περιορίζονται γενικά σε μεγέθη βιβλιοθήκης σε αυτό το εύρος (Xiao et al., 2015).

2.5.7 Επιλογή με Βάση την Επιβίωση του Οργανισμού

Σε μια δεύτερη σημαντική κατηγορία επιλογών, τα ενεργά μέλη της βιβλιοθήκης επιτρέπουν στους οργανισμούς που περιέχουν τα αντίστοιχα γονίδια να επιβιώνουν και να αναπαράγονται. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι ίσως η πιο απλή δραστηριότητα που μπορεί να εξελιχθεί χρησιμοποιώντας την επιλεκτική αντιγραφή του E. coli. Πολυάριθμες μελέτες έχουν εξελίξει ένζυμα που εξουδετερώνουν ή εξάγουν αντιβιοτικά, δίνοντας παραλλαγές ενζύμων που προβλέπουν φυσικές εξελικτικές τροχιές σε μικροοργανισμούς με ανοχή σε υψηλότερες δόσεις αντιβιοτικών ή αντοχή σε ευρύτερο φάσμα αντιβιοτικών υποστρωμάτων. Εκτός από την εξέλιξη των γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, είναι επίσης δυνατό να χρησιμοποιηθούν οι επιλογές αντιβιοτικών για την εξέλιξη άλλων πρωτεϊνών συνδέοντας την επιθυμητή δραστηριότητα με την έκφραση ενός γονιδίου ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Για παράδειγμα, ο Schultz και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν αμινοακυλικές tRNA συνθετάσες που αμινοακυλιώνουν κατασταλτικά tRNA με μη κανονικά αμινοξέα, με αποτέλεσμα την καταστολή ενός κωδικονίου στάσης σε ένα γονίδιο αντλίας εκροής χλωραμφενικόλης (Jørgensen et al., 2014). Σε μια παρόμοια στρατηγική που συνδέει την ενζυμική δραστηριότητα με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, ο Barbas και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ρεκομπινάσες με τροποποιημένη εξειδίκευση της αλληλουχίας του DNA, χρησιμοποιώντας τη δραστηριότητά τους για την ανασύνθεση ενός γονιδίου β-λακταμάσης (Gersbach et al., 2010).

2.5.8 Επιλογή εντός Τμημάτων In Vitro

Οι in vitro επιλογές μπορούν να παρακάμψουν τους περιορισμούς των in vivo επιλογών, όπως τα σημεία συμφόρησης της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού και οι μεταλλάξεις του γονιδιώματος του ξενιστή που επηρεάζουν απροσδόκητα την επιβίωση των επιλογών. Μια δημοφιλής προσέγγιση για τη σύζευξη γονιδίων και γονιδιακών προϊόντων χωρίς τη χρήση κυττάρων είναι ο μετασχηματισμός των μελών της βιβλιοθήκης σε τεχνητά διαμερίσματα, όπως τα υδατικά σταγονίδια γαλακτωμάτων νερού-λαδιού. Η επιλογή εντός in vitro τμημάτων είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για ένζυμα που δρουν άμεσα σε υποστρώματα DNA (Frei & Lai, 2016). Για παράδειγμα, σε μια επιλογή για μεγανουκλεάσες με τροποποιημένη εξειδίκευση αλληλουχίας, ο Stoddard και οι συνεργάτες του τοποθέτησαν μια μεταλλαγμένη αλληλουχία υποστρώματος

ακριβώς πάνω από το γονίδιο της μεγανοκλεάσης- η διάσπαση του DNA παρήγαγε κολλώδη άκρα που ήταν ικανά για τη σύνδεση με λιγάση ενός προσαρμογέα PCR. Ως αποτέλεσμα, η PCR εντός των σταγονιδίων γαλακτώματος ενίσχυσε επιλεκτικά γονίδια που κωδικοποιούν νουκλεάσες που ήταν ενεργές στις νέες αλληλουχίες υποστρώματος (Takeuchi et al., 2015).

2.6 Διαδικασία ζύμωσης

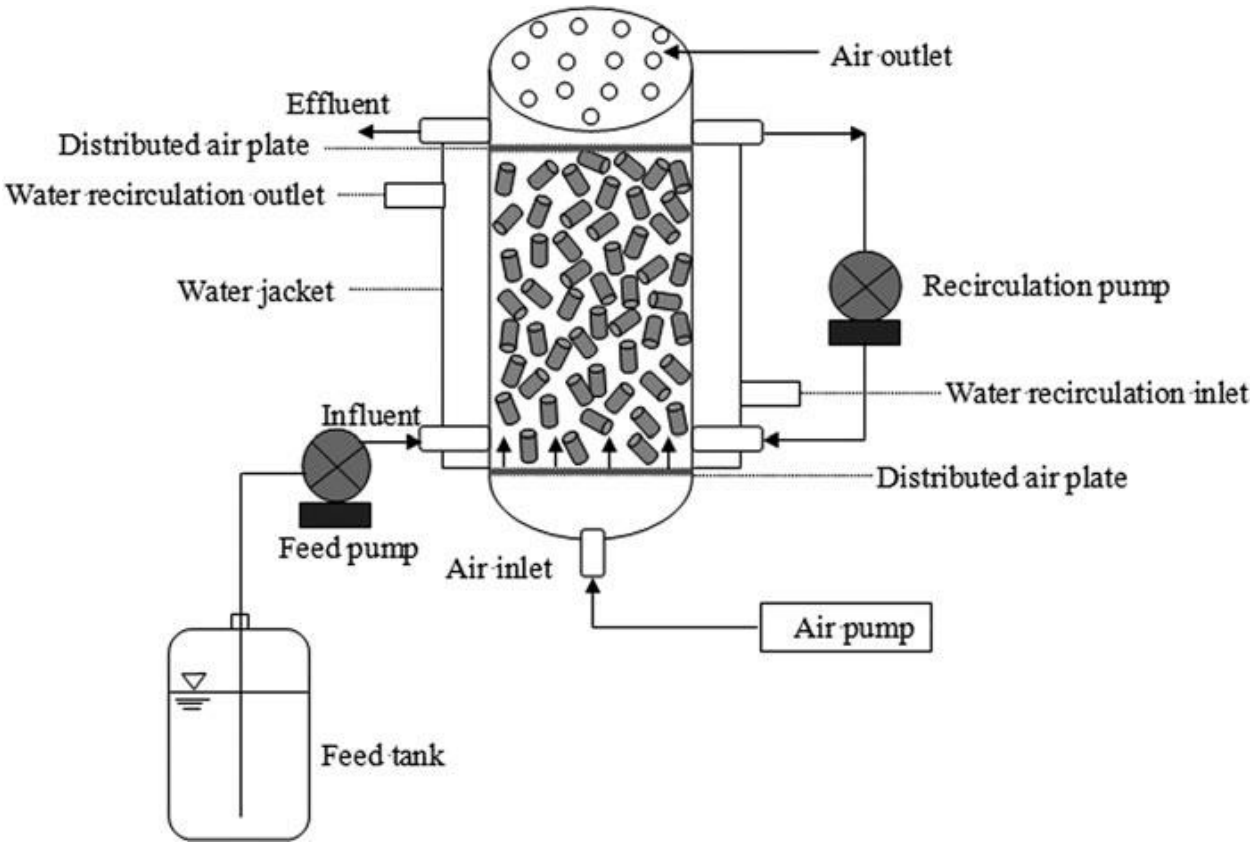
Τόσο οι επιφανειακές (στερεές) καλλιέργειες όσο και οι βυθισμένες (υγρές) καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μικροβιακών ενζύμων. Οι καλλιέργειες μικροοργανισμών μεταφέρονται στην επιφάνεια στερεών μέσων, όπως το πίτουρο σιταριού, του οποίου η υψηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά περιλαμβάνει μέταλλα και άλατα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ακόμη για την παραγωγή αμυλάσης, πρωτεάσης και λιπάσης από τα είδη Aspergillus και Mucor, καθώς και για την παραγωγή πηκτινάσης και κυτταρινάσης από είδη Aspergillus και Penicillium. Η καλλιέργεια των μυκήτων πραγματοποιείται είτε με τη διαδικασία του δίσκου, κατά την οποία το υπόστρωμα απλώνεται σε λεπτό στρώμα σε χώρους επώασης, είτε με τη διαδικασία των τυμπάνων, σε οριζόντια περιστρεφόμενα τύμπανα. Μετά την καλλιέργεια των μυκήτων με σπόρια, τα μυκήλια εκχυλίζονται με νερό ή αλατούχο διάλυμα σε αντίθετη ροή, και το συμπυκνωμένο ενζυμικό διάλυμα κατακρημνίζεται. Το κόστος χειρισμού και ο έλεγχος της μόλυνσης, θερμοκρασίας, υγρασίας και του αερισμού είναι οι κύριες δυσκολίες αυτής της διαδικασίας. Οι μέθοδοι υποβρύχιας καλλιέργειας με τη χρήση ζυμωτήρων κυριαρχούν σήμερα στην παραγωγή ενζύμων, δεδομένου ότι παρουσιάζουν μικρότερο κίνδυνο μόλυνσης και προσφέρουν μειωμένο κόστος χειρισμού με υψηλότερες αποδόσεις. Η υποβρύχια καλλιέργεια πραγματοποιείται συνήθως σε δεξαμενές με μηχανική ανάδευση με χωρητικότητα 10.000-100.000L σε λειτουργία παρτίδας. Ο εξοπλισμός και οι τεχνικές, προσαρμόζονται τις περισσότερες φορές από τις ζυμώσεις αντιβιοτικών (Wang & Yang, 2007). Ανάλογα με το ένζυμο και το μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται, η κύρια ζύμωση, ιδίως για τα εξωκυτταρικά ένζυμα, διαρκεί περίπου 30-150 ώρες. Η συνεχής ζύμωση σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιείται μόνο για την παραγωγή ισομεράσης της γλυκόζης. Οι συνεχείς ζυμώσεις έχουν περιορισμένη εφαρμογή για την παραγωγή βιομηχανικών ενζύμων, κυρίως εξαιτίας της αστάθειας των στελεχών παραγωγής και της δυσκολίας αποστείρωσης των μέσων. Αν και οι

συνεχείς μέθοδοι εφαρμόζονται σπάνια, η διεργασία παρτίδας επεκτείνεται με την τροφοδοτούμενη παρτίδα ζύμωση (δηλ. το υπόστρωμα τροφοδοτείται σταδιακά, όπως στις διεργασίες ζύμωσης). Ο σχηματισμός ενζύμων και πολλών δευτερογενών μεταβολιτών υπόκειται συχνά σε καταβολίτες καταστολή από υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Εκτός από τις επιδράσεις των θρεπτικών συστατικών μέσου και του μεγέθους και του χρόνου του ενοφθαλμισμού, οι λειτουργικές παράμετροι, όπως το pH, ο αερισμός και οι ανάδευση πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής ενζύμων. Προσθήκη επιφανειοδραστικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη απέκκριση εξωκυτταρικών ενζύμων (Rodríguez-León et al., 2018).

2.6.1 Συστήματα Ζυμωτήρων και Βιοαντιδραστήρων

Δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ ζυμωτήρων και βιοαντιδραστήρων. Ανεξάρτητα από τύπο και το μέγεθος της συσκευής, ο βασικός ζυμωτήρας αποτελείται από ένα κλειστό δοχείο, εφοδιασμένο με είσοδο αέρα και έναν αναδευτήρα, στο οποίο πραγματοποιούνται μικροβιακές ή βιοχημικές αντιδράσεις για εμπορικούς σκοπούς υπό ελεγχόμενο περιβάλλον. Τα δοχεία που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη μικροβιακών κυττάρων συχνά αναφέρονται ως ζυμωτήρες, ενώ εκείνα στα οποία καλλιεργούνται φυτικά κύτταρα και κύτταρα θηλαστικών ονομάζονται βιοαντιδραστήρες. Ουσιαστικά, ωστόσο, ο εξοπλισμός αυτός διαθέτει ετερογενή συστήματα που αποτελούνται από δύο φάσεις, συνήθως αέρια και υγρή (Krishania et al., 2018).

Εικόνα 2: *Σχηματική απεικόνιση του βιοαντιδραστήρα συσκευασμένης κλίνης που χρησιμοποιείται στα γαλακτοκομικά, στην παραγωγή ποτών και άλλων βιομηχανιών (Lin, 2015).*



Εικόνα 3: *Βιομηχανικός Βιοαντιδραστήρας (Lin, 2015).*

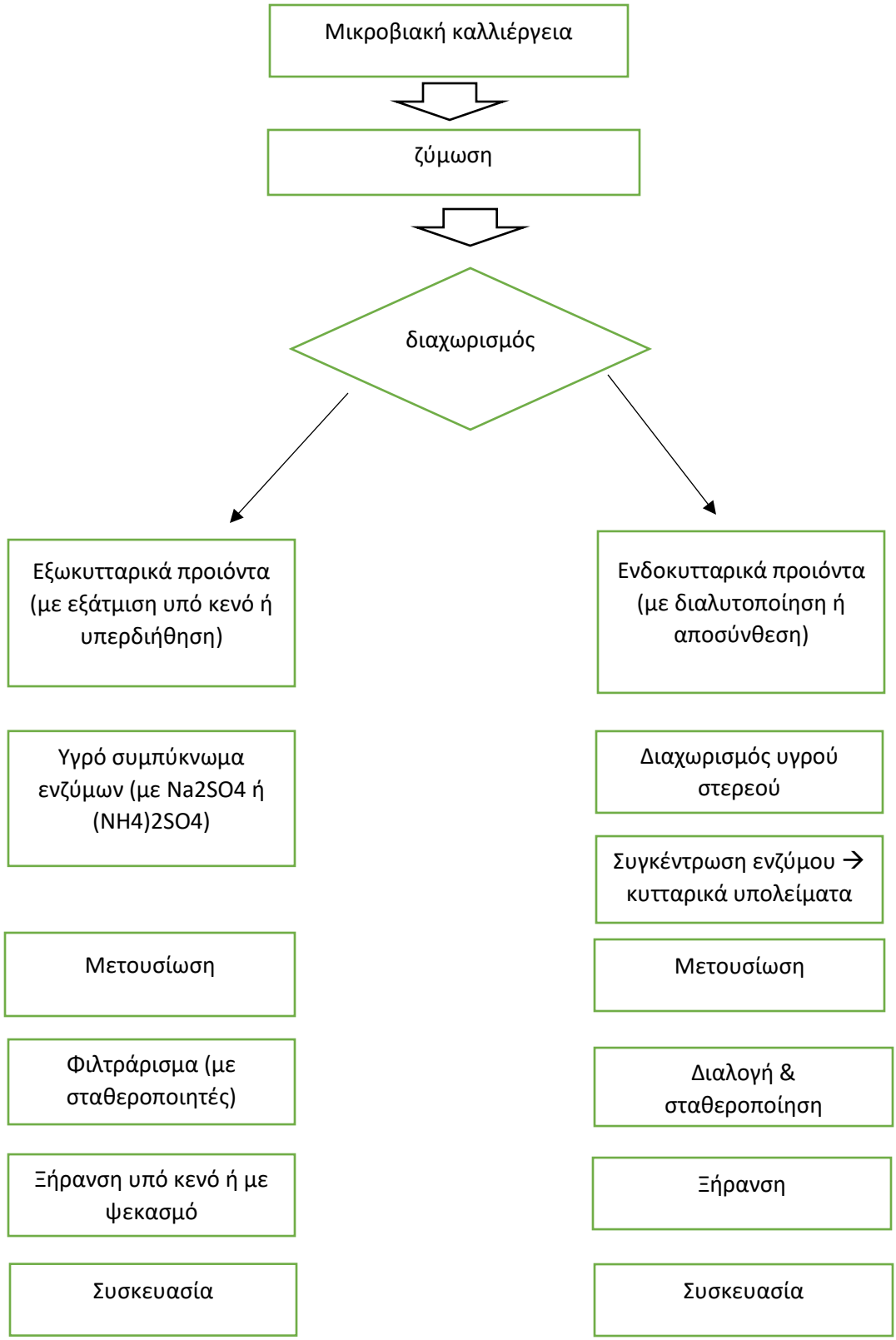
2.7 Απομόνωση Ενζύμων

Στην περίπτωση των εξωκυτταρικών ενζύμων, η πλειονότητα των ενζύμου βρίσκεται στο υπόστρωμα της καλλιέργειας και, επομένως, οι μέθοδοι ανάκτησης είναι απλές όπως η φυγοκέντρηση ή η διήθηση, η εξάτμιση υπό κενό και η καταβύθιση των πρωτεϊνών. Για την ανάκτηση ενδοκυτταρικών ενζύμων, τα οποία είναι συγκεντρωμένα στο εσωτερικό της βιομάζας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν μηχανικές και φυσικές μέθοδοι για την αποσύνθεση των άθικτων κυτταρικών τοιχωμάτων. Αυτόλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί, αλλά σε βιομηχανική κλίμακα προτιμώνται φυσικές μέθοδοι όπως ο ομογενοποιητής υψηλής πίεσης ή ο μύλος σφαιριδίων με αναδευτήρα. Το κόστος της απομόνωσης και του καθαρισμού των ενδοκυτταρικών ενζύμων για εμπορικές διεργασίες μπορεί να μειώσει την κερδοφορία της χρήσης τους σε σημείο μη ελκυστικό. Ωστόσο, τα πλεονεκτήματα των απομονωμένων ενζύμων πρέπει να εξισορροπούνται έναντι το κόστος, ανάλογα με τη φύση της διαδικασίας μετατροπής. Κατά τη διάσπαση των κυττάρων, τα το ένζυμο μπορεί να καθαριστεί όπως στην περίπτωση των εξωκυτταρικών ενζύμων αλλά η διαδικασία είναι συνήθως πιο δύσκολη λόγω της παρουσίας κυτταρικών υπολειμμάτων και νουκλεϊκών οξέων από τα σπασμένα κύτταρα. Η καταβύθιση των

πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με θειικό αμμώνιο ή νάτριο θειικό νάτριο. Με τα θερμοσταθερά ένζυμα, οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται σε υψηλές θερμοκρασίες και το υπόστρωμα μπορεί να μετουσιωθεί αφού απορριφθούν τα συσσωματώματα (C.-H. Lee, 2017). Οργανικοί διαλύτες όπως οι αλκοόλες (αιθανόλη, μεθανόλη, ισοπροπανόλη) είναι τα κύρια μέσα μετουσίωσης που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα. Διάφορα πολυμερή (π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη, πολυαιθυλενοϊμίνη) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία.

Τα νουκλεϊκά οξέα προσδίδουν υψηλό ιξώδες σε ένα ενζυμικό διάλυμα και παρεμποδίζουν την πρωτεινική κλασματοποίηση και τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, συνεπώς, είναι επιθυμητή η απομάκρυνση αυτών πριν από την προσπάθεια καθαρισμού ενδοκυτταρικών ενζύμων. Άλατα μαγνησίου, θειική στρεπτομυκίνη, θειική πρωταμίνη και ιμίνη πολυαιθυλενίου είναι μεταξύ των συστατικών που χρησιμοποιούνται ως μέσα μετουσίωσης. Η υπερδιήθηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί επωφελώς για τη συμπύκνωση του ενζυμικού διαλύματος αντί της εξάτμισης υπό κενό, αλλά οι μεμβράνες φράσσονται εύκολα από ιζήματα. Χρειάζονται πολλές χρωματογραφικές διαδικασίες και διαδικασίες κατανομής για περαιτέρω καθαρισμό, αλλά λίγα ένζυμα, εκτός από τα ιατρικά και τα γενετικά τροποποιημένα υποβάλλονται σε χρωματογραφικούς καθαρισμούς. Το ίζημα μπορεί να ξηρανθεί με ξήρανση υπό ψύξη, ξήρανση υπό κενό ή ξήρανση με ψεκασμό, ανάλογα με τη θερμοσταθερότητα του ενζύμου. Κατά την ξήρανση, σταθεροποιητές όπως σάκχαρα, ενζυμικά υποστρώματα ενζύμων, συμπαράγοντες και αναγωγικοί παράγοντες προστίθενται για τη σταθεροποίηση των ενζύμων. Στο παρελθόν, όλα τα ένζυμα πωλούνταν ως σκόνες πολύ μικρού μεγέθους σωματιδίων, αλλά σήμερα τα περισσότερα ένζυμα παρασκευάζονται ως κόκκοι, ώστε να αποφεύγεται η έκθεση των ανθρώπων στη σκόνη των ενζύμων και να βελτιώνεται η σταθερότητα αποθήκευσης (Wingfield, 2015).

Εικόνα 4: *Γενικό σχήμα για την παραγωγή ενζύμων και τη μεταγενέστερη επεξεργασία.*



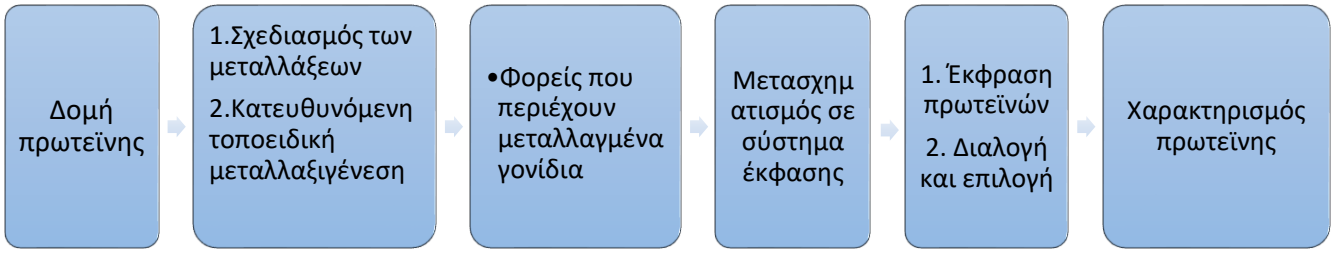
Εικόνα 5: *Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης (Patrignani & Lanciotti, 2016)*

2.8 Λογικός ανασυνδιασμός ή Ορθολογικός σχεδιασμός (rational design)

Ο ορθολογικός σχεδιασμός είναι μια στρατηγική στην πρωτεϊνική μηχανική, η οποία προσπαθεί να δημιουργήσει βελτιωμένα πρωτεϊνικά μόρια με βάση την τρισδιάστατη δομή τους και την σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας, η οποία έχει αναπτυχθεί με την πάροδο των ετών ως μέρος της της επιστήμης των πρωτεϊνών. Λόγω των ριζών του στην πρωτεϊνική χημεία, ο ορθολογικός σχεδιασμός ήταν η πρώτη προσέγγιση στην πρωτεϊνική μηχανική και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως, είτε ως αυτόνομη προσέγγιση είτε σε συνδυασμό με τυχαία μεταλλαξιγένεση ή κατευθυνόμενη εξέλιξη (Marshall et al., 2003).

Οι πρώιμες συζητήσεις για τον ορθολογικό σχεδιασμό περιγράφουν μια επαναληπτική διαδικασία κατά την οποία οι ακτίνες Χ κρυσταλλογραφίας παρέχουν μια τρισδιάστατη δομή, η οποία μπορεί να αναπαρασταθεί γραφικά και μαθηματικά σε έναν υπολογιστή. Το υπολογιστικό μοντέλο επιτρέπει να γίνουν προβλέψεις, ιδιαίτερα στο πεδίο της επίδρασης των μεταλλάξεων των ιδιοτήτων της δομής.

Εικόνα 6: *Διάγραμμα ροής ορθολογικού σχεδιασμού*



2.8.1 Κατευθυνόμενη Τοποειδική Μεταλλαξιγένεση

Η πρωταρχική απαίτηση της κατευθυνόμενης τοποειδικής μεταλλαξιγένεσης είναι η πλήρης κατανόηση της δομής και της λειτουργίας του ενζύμου, ιδίως του τρόπου με τον οποίο τα κατάλοιπα συμβάλλουν σε συγκεκριμένους καταλυτικούς μηχανισμούς. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του ενζύμου, μπορούν να επιλεγούν διαφορετικές θέσεις-στόχοι για τροποποίηση. Για παράδειγμα, οι αλλαγές κοντά ή στις ενεργές περιοχές, τις περιοχές πρόσδεσης και τις περιοχές κατάλυσης μπορούν να επηρεάσουν την ειδικότητα υποστρώματος και την εναντιοεκλεκτικότητα, ενώ οι μεταλλάξεις κάπου αλλού είναι πιθανότερο να συνδέονται με τη σταθερότητα και άλλες δραστηριότητες.

Πριν από την έναρξη της μεταλλαξιγένεσης, απαιτούνται συνήθως δομικές πληροφορίες σχετικά με το αρχικό ένζυμο άγριου τύπου με βάση κρυσταλλική δομή υψηλής ανάλυσης. Τα γενικά βήματα που χρησιμοποιούνται για την απόκτηση της κρυσταλλικής δομής ενός ενζύμου περιλαμβάνουν:

- την απομόνωση της πρωτεΐνης του ενζύμου-στόχου με κατάλληλες μεθόδους
- τον καθαρισμό για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ιόντων μετάλλων και μακρομορίων
- την ανάπτυξη κρυστάλλων για μελέτες περίθλασης ακτίνων Χ
- λήψη και ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου.

Στη συνέχεια, μπορούν να γίνουν και να εφαρμοστούν συγκεκριμένα σχέδια για την εύρεση ενζύμων με τις επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες.

Προγενέστερα, χρησιμοποιήθηκε ευρέως μια μέθοδος που πρωτοστάτησε ο Kunkel, η οποία εκμεταλλεύεται ένα στέλεχος με ανεπάρκεια σε dUTPάση και απογλυκοζυλάση της ουρακίλης, έτσι ώστε η E. coli του αποδέκτη να αποικοδομεί το DNA άγριου τύπου που περιέχει ουρακίλη (Duncan, 1985). Επί του παρόντος, υπάρχει ένας αριθμός εμπορικά διαθέσιμων κιτ που απαιτούν επίσης ειδική τροποποίηση ή/και μοναδικά στελέχη E. Coli. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι δεν απαιτούν τροποποιήσεις ή μοναδικά στελέχη και ενσωματώνουν μεταλλάξεις στο πλασμίδιο με αντίστροφη PCR με τυποποιημένους εκκινητές. Για τις μεθόδους αυτές, οι εκκινητές μπορούν να σχεδιαστούν είτε με επικαλυπτόμενο (QuikChange®, Agilent) είτε με προσανατολισμό back-to-back (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit). Ο σχεδιασμός επικαλυπτόμενων εκκινητών έχει ως αποτέλεσμα ένα προϊόν που θα επανακυκλωθεί για να σχηματίσει ένα πλασμίδιο με διπλά εγκοπτόμενη έλικα. Παρά την παρουσία αυτών των εγκοπών, αυτό το κυκλικό προϊόν μπορεί να μετασχηματιστεί απευθείας σε E. coli, αν και με χαμηλότερη απόδοση από τα μη εγκοπτόμενα πλασμίδια. Οι μέθοδοι σχεδιασμού με εκκινητές back-to-back όχι μόνο έχουν το πλεονέκτημα του μετασχηματισμού μη εγκοπτόμενων πλασμιδίων, αλλά επιτρέπουν επίσης την εκθετική ενίσχυση για την παραγωγή σημαντικά περισσότερου από το επιθυμητό προϊόν. Επιπλέον, επειδή οι εκκινητές δεν επικαλύπτουν ο ένας τον άλλον, τα μεγέθη των διαγραφών περιορίζονται μόνο από το πλασμίδιο και οι εισαγωγές περιορίζονται μόνο από τους περιορισμούς της σύγχρονης σύνθεσης εκκινητών. Επί του παρόντος, με τη διαίρεση της ένθεσης (insertion) μεταξύ των δύο εκκινητών, μπορούν να δημιουργηθούν συστηματικά ένθεσης έως και 100 bp σε ένα βήμα με τη χρήση αυτής της μεθόδου (*Fundamentals of Food Biotechnology*, 2015).

Στην πράξη, ένα παράδειγμα είναι της βελτίωση της σταθερότητας του οξέος της α-αμυλάσης του Bacillus licheniformis με κατευθυνόμενη τοποειδική μεταλλαξιγένεση. Τα μεταλλαγμένα γονίδια BLA, His281Arg/Asp, His289Arg/Asp, His293Arg/Asp, His316Arg/Asp και His327Arg/Asp, δημιουργήθηκαν με το πλασμίδιο pET-amy ως πρότυπο με την τεχνική overlap extension PCR. Χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για τη μεταλλαξιγένεση. Ο εμπρόσθιος

εκκινητής AMY-F και ο αντίστροφος εκκινητής AMY-R χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των μεταλλαγμένων γονιδίων BLA πλήρους μήκους. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη His281Arg δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας τον εμπρόσθιο εκκινητή H281R-F και τον αντίστροφο εκκινητή H281R-R. Υπογραμμίστηκαν οι περιοχές με αναντιστοιχία για την κατευθυνόμενη από το σημείο μεταλλαξιγένεση. Το μεταλλαγμένο γονίδιο H281R καθαρίστηκε και χωνεύτηκε με BamHI και HindIII και στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI-HindIII του pET-22b(+) με την ετικέτα 6-His στο άκρο C για καθαρισμό, ώστε να δημιουργηθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-H281R. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pET-H281D, pET-H289R, pET-H289D, pET-H293R, pET-H293D, pET-H316R, pET-H316D, pET-H327R και pET-H327D ελήφθησαν με τη μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως και στη συνέχεια μετασχηματίστηκαν σε E. coli DH5α. Αφού επιβεβαιώθηκαν με αλληλουχία DNA (DNA sequencing), τα πλασμίδια που προέκυψαν μετασχηματίστηκαν σε E. coli BL21 (DE3) για την έκφραση πρωτεϊνών (Ho et al., 1989).

2.8.2 De Novo Σχεδιασμός Πρωτεϊνών

Το απόλυτο όνειρο στην πρωτεϊνική μηχανική είναι να μπορεί να δημιουργηθεί οποιαδήποτε λειτουργική πρωτεΐνη απλά καθορίζοντας την αλληλουχία των αμινοξέων που την αποτελούν. Αυτό δεν είναι αδύνατο, αφού η πρωταρχική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης καθορίζει την τελική δομή της. Το πρόβλημα (γνωστό ως πρόβλημα αναδίπλωσης) είναι ότι μια εντελώς προγνωστική σχέση του τρόπου με τον οποίο οι αλληλουχίες των αμινοξέων αναδιπλώνονται στις τρισδιάστατες δομές τους δεν έχει βρεθεί, αν και ορισμένα στοιχεία του προβλήματος της αναδίπλωσης έχουν περιγραφεί. Οι τύποι (και οι αλληλουχίες) των αμινοξέων που οδηγούν σε γνωστά δευτερογενή δομικά στοιχεία, όπως η α-έλικα ή το β-φύλλο, είναι αρκετά καλά κατανοητά. Οι τρόποι συσχέτισης αυτών των στοιχείων, μέσω της χρήσης υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, δισουλφιδικών δεσμών και συντονισμού μεταλλικών ιόντων είναι επίσης σαφείς. Κατά συνέπεια, μεγάλο μέρος της τρέχουσας προσπάθειας επιχειρεί να συνδυάσει γνωστά δευτερογενή δομικά στοιχεία με τη χρήση υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, δισουλφιδικών δεσμών ή μεταλλικών ιόντων για να να προκύψουν λειτουργικές πρωτεΐνες (Woolfson, 2021).

Κατά το σχεδιασμό πρωτεϊνών "από το μηδέν", μια στρατηγική είναι η χρήση ενός μοτίβου "δέσμης τεσσάρων α-ελίκων". Η στρατηγική αυτή προτιμάται λόγω της απλότητάς της και της λειτουργικής της ποικιλομορφίας. Τα υδρόφοβα αμινο οξέα, όπως η λευκίνη, εισάγονται στη μία πλευρά μιας α-έλικας για να οδηγήσουν τη σύζευξη. Με την ενσωμάτωση ορισμένων λειτουργικών ομάδων, όπως μια ομάδα αίμης (heme), είναι δυνατόν να επιτευχθούν φασματοσκοπικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες που μοιάζουν πολύ με εκείνες της εγγενούς αίμης πρωτεΐνης.

Μια δεύτερη σημαντική στρατηγική στον de novo σχεδιασμό χρησιμοποιεί γνωστές πρωτεϊνικές δομές ως φυσικές σκαλωσιές για να παρουσιάσουν μια νέα ιδιότητα, όπως η κατάλυση, η αναστολή ή οι θέσεις πρόσδεσης μετάλλων. Παραδείγματα αυτής της προσέγγισης περιλαμβάνουν την εισαγωγή ενός βρόχου δέσμευσης ελαστάσης στην δομή της ιντερλευκίνης-1β. Η τροποποιημένη πρωτεΐνη δρα ως αναστολέας της ελαστάσης υποδηλώνοντας ότι οι βρόχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή νέας λειτουργικότητας. Πρωτεΐνες δέσμευσης μεταλλικών ιόντων έχουν κατασκευαστεί σχεδιασμένες με βάση το α/β σκελετό της χαριδοτοξίνης, στις οποίες εισήχθησαν οι θέσεις δέσμευσης μετάλλων της καρβονικής ανυδράσης Β, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια τροποποιημένη πρωτεΐνη στην οποία τα ιόντα μετάλλων χαλκού και ψευδαργύρου συνδέονται με υψηλή συγγένεια. Ομοίως, η δραστικότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (μετατροπή του μεταβολικά παραγόμενου υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου) σχεδιάστηκε στη θειορεδοξίνη με την εισαγωγή ενός ατόμου σιδήρου στο υδρόφοβο πυρήνα μέσω της προσθήκης μιας θέσης (His)3Asp (Steiner & Schwab, 2012).

Πίνακας 1: *Σύγκριση της μηχανικής ενζύμων με ορθολογικό σχεδιασμό και κατευθυνόμενη εξέλιξη.*

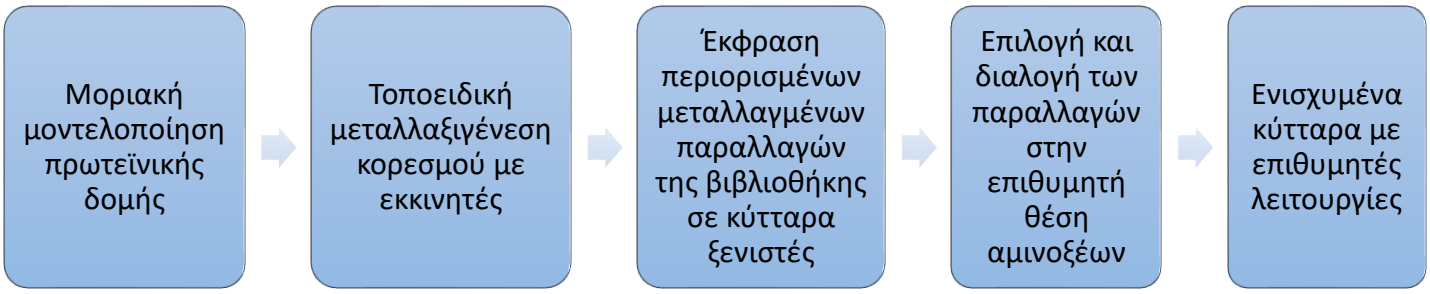
	Ορθολογικός σχεδιασμός	Κατευθυνόμενη εξέλιξη
Γνώση της πρωτεινικής δομής	Απαιτούμενο	Μη απαιτούμενο
Γνώση του μηχανισμού	Απαιτούμενο	Μη απαιτούμενο
Μεροληψίες(bias) σημειακής μετάλλαξης	Κανένα	Η μετάβαση ευνοείται
Μηχανική δευτεροταγούς δομής	Εφικτό	Μη εφικτό
Σχεδιασμός τομέων	Εφικτό	Μη εφικτό
Ευαίσθητη ενζυμική ανάλυση	Απαιτούμενο	Μη απαιτούμενο
Σύστημα επιλογής	Μη απαιτούμενο	Απαιτούμενο

2.9 Ημι-Ορθολογικός Σχεδιασμός (Semi-Rational Design)

Όπως αναφέρθηκε εν συντομία προηγουμένως, ο ορθολογικός σχεδιασμός και η κατευθυνόμενη εξέλιξη δεν αποκλείουν η μία την άλλη. Η μέθοδος που τις συνδυάζει και τις δύο, η οποία ονομάζεται ημι-ορθολογικός σχεδιασμός, μπορεί να ενισχύσει την επιτυχία της παραγωγής των επιθυμητών βιβλιοθηκών, μειώνοντας παράλληλα με βέλτιστο τρόπο τον φόρτο εργασίας στην διαλογή υψηλής απόδοσης. Ο ημι-ορθολογικός σχεδιασμός μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις βασικούς τύπους: βασισμένος στην αλληλουχία, βασισμένος στη δομή και βασισμένος στο υπολογιστικό μοντέλο. Ο ημι-ορθολογικός σχεδιασμός με βάση την αλληλουχία χρησιμοποιεί πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία αμινοξέων και τη λειτουργική βάση δεδομένων για την εύρεση συγκεκριμένων θέσεων νουκλεοτιδίων προς μετάλλαξη, ακολουθούμενη από στοχευμένη τυχαία μεταλλαξιγένεση μικρής κλίμακας. Ο βασισμένος στη δομή σχεδιασμός σχεδιάζει ένζυμα με τη βοήθεια μιας βάσης δεδομένων δομικής τοπολογίας, όπως η PDB, και λογισμικού μοντελοποίησης ομολογίας. Η προσέγγιση με βάση το υπολογιστικό μοντέλο εξαρτάται κυρίως από αλγορίθμους για το σχεδιασμό πρωτεϊνών και συγκεκριμένα για τη διερεύνηση των λειτουργικών βελτιώσεων των ενζυμικών δραστηριοτήτων. Για παράδειγμα,

ένας αλγόριθμος που ονομάζεται SCHEMA έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της διαταραχής από ανασυνδυασμό χρησιμοποιώντας μια δεξαμενή γονικών αλληλουχιών. Μπορεί να δημιουργήσει μια βιβλιοθήκη λειτουργικών πληροφοριών με βάση εκείνη των γονικών αλληλουχιών. Μια άλλη μέθοδος στατιστικής ανάλυσης για τις σχέσεις δραστικότητας πρωτεϊνικών αλληλουχιών, που ονομάζεται ProSARs, αναπτύχθηκε για την πρόβλεψη της λειτουργικής επίδρασης από διαφορετικές θέσεις μετάλλαξης (Korendovych, 2018).

Εικόνα 7: *Διεργασία ημι-ορθολογικού σχεδιασμού*



2.9.1 Τοποειδική Μεταλλαξιγένεση Κορεσμού (Site Saturation Mutagenesis)

Πρόκειται για μια μέθοδο που βασίζεται στην PCR για τη δημιουργία μεταλλάξεων στο γονίδιο-στόχο. Ωστόσο η προσέγγιση επικεντρώνεται σε μια συγκεκριμένη θέση για μετάλλαξη σε αντίθεση με την epPCR. Η SSM κατευθύνεται στη μετάλλαξη των hotspot στις πρωτεΐνες. Τα "hotspot" είναι τα αμινοξέα που έχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Η SSM μας επιτρέπει να δοκιμάσουμε και τα 20 αμινοξέα έναντι του συγκεκριμένου hotspot σε ένα μόνο πλάνο. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την SSM, μεταξύ των οποίων δύο είναι οι πιο συνηθισμένες. (A) PCR ενός γύρου ολόκληρου πλασμιδίου, γνωστή και ως site directed μεταλλαξιγένεση (SDM), (B) overlap extension PCR, που περιλαμβάνει δύο γύρους PCR. Η SDM περιλαμβάνει ένα ζεύγος συμπληρωματικών εκκινητών με ένα μεταλλαγμένο κωδικόνιο για την επέκταση της αλληλουχία του προτύπου με την DNA πολυμεράση. Το προϊόν PCR περιέχει ένα μείγμα πλασμιδίων, ένα πλασμίδιο τύπου που περιέχει ένα γονικό σκέλος και μια νέα συντιθέμενη αλυσίδα που περιλαμβάνει τη μετάλλαξη. Άλλα πλασμίδια που περιέχουν και τις δύο νεοσυντιθέμενες αλυσίδες που περιλαμβάνουν τη μετάλλαξη. Το προϊόν PCR υποβάλλεται στη συνέχεια σε Dpn ενδονουκλεάση που αποικοδομεί μόνο το γονικό σκέλος, δεδομένου ότι περιέχει μια αλληλουχία GmATC η οποία είναι μεθυλιωμένη στη θέση N6 της αδενίνης. Το προϊόν πέψης χρησιμοποιείται στη συνέχεια απευθείας για τον μετασχηματισμό κυττάρων E. coli που επιδιορθώνουν τα nicks στο νέο συντιθέμενο προϊόν με το δικό τους φυσικό μηχανισμό (Siloto & Weselake, 2012).

Στην overlap extension PCR, χρησιμοποιούνται 2 ζεύγη εκκινητών 1/3 και 2/4 με μεταλλάξεις σε 1ο και 2ο εκκινητή. Ο 1ος γύρος της PCR έχει ως αποτέλεσμα δύο δίκλωνες αλυσίδες DNA. Στον δεύτερο γύρο της PCR θα μετουσιωθούν και θα συνδεθούν για να σχηματίσουν ετεροδιπλέγματα στα οποία κάθε αλυσίδα θα περιέχει μετάλλαξη. Τα τμήματα που λείπουν στο ετεροδιπλέγματα θα συμπληρωθούν από την DNA πολυμεράση και θα χρησιμοποιηθούν οι εκκινητές 1 και 4. για περαιτέρω ενίσχυση. Πλεονεκτήματα της SDM έναντι της PCR επέκτασης επικάλυψης περιλαμβάνουν: (α) απαιτείται μόνο ένας γύρος PCR, β) η ανάγκη 2 αντί 4 εκκινητών. Τα μειονεκτήματα της SDM περιλαμβάνουν: α) δεν λειτουργεί με μεγάλα πλασμίδια (>10 kB), β) χρειάζεται ταυτόχρονη αντικατάσταση μόνο δύο νουκλεοτιδίων (Özgün et al., 2016).

3. Αμυλάσες

Οι αμυλάσες, είναι μια ομάδα ενζύμων που υδρολύουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς που υπάρχουν στο άμυλο. Χρησιμοποιούνται ευραίως στην αρτοποιία, καθώς αναμιγνύονται με το αλεύρι για να διασπάσουν το άμυλο σε διαθέσιμα προς ζύμωση σάκχαρα (γλυκόζη και μαλτόζη) τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε διοξείδιο του άνθρακα από τους ζυμομύκητες. Επίσης, χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία και στη οινοποιία για να διασπάσουν το άμυλο σε σάκχαρα, τα οποία μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα από τους ζυμομύκητες.

Η ιστορία των αμυλασών ξεκίνησε το 1811, όταν ανακαλύφθηκε από τον Kirchhoff το πρώτο ένζυμο που αποικοδομεί το άμυλο του σιταριού το οποίο έθεσε τα θεμέλια για την ανακάλυψη και την έρευνα της αμυλάση. Οι α-αμυλάσες ονομάστηκαν από τον Kuhn το 1925, επειδή τα προϊόντα υδρόλυσης βρίσκονται στην α-διαμόρφωση. Το 1930, ο Ohlsson ανακάλυψε μια άλλη αμυλάση, η οποία παρήγαγε β-μαννόζη. Ο ίδιος την ονόμασε β-αμυλάση. Η κρυσταλλική δομή καθορίστηκε με τη χρήση δομής ανάλυσης 3Å, η οποία βελτιώθηκε περαιτέρω σε ανάλυση 1,5 Å της α-αμυλάσης (Kumari et al., 2012). Οι τρισδιάστατες κρυσταλλικές δομές κάθε μορφής προσδιορίστηκαν τη δεκαετία του 1990 και διαπιστώθηκε ότι είναι ουσιαστικά πανομοιότυπες. Πρώτα ως διαστάση, η αμυλάση ήταν το πρώτο ένζυμο που ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε από τον Anselme Payen (1833) (Hill [SC.D.], 1970). Είναι ενδιαφέρον ότι το πρώτο ένζυμο που παρήχθη βιομηχανικά ήταν μια αμυλάση από ένα μύκητα το 1894, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως φαρμακευτικό βοήθημα για τη θεραπεία διαταραχών του πεπτικού συστήματος (Soetaert & Vandamme, 2010). Οι Boidin & Effront (1917) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν Bacillus. subtilis και Bacillus mesentericus για την παραγωγή α-αμυλασών σε εμπορική κλίμακα χρησιμοποιώντας μεγάλους ζυμωτήρες με βυθισμένη ζύμωση. Η χρησιμοποίηση βακτηριακών καλλιεργειών για την παραγωγή εμπορικών ενζύμων την οποία ανακάλυψαν αυτοί, καθιερώθηκε ως βιομηχανική πρακτική για την παραγωγή α-αμυλάσης (Tiwari et al., 2015).

3.1 Α-Αμυλάση

Οι α-αμυλάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των εσωτερικών α-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών του αμύλου σε προϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους, όπως μονάδες γλυκόζης, μαλτόζης

και μαλτοτριόζης. Οι αμυλάσες συγκαταλέγονται μεταξύ των σημαντικότερων ενζύμων και έχουν μεγάλη σημασία για τη βιοτεχνολογία, αποτελώντας μια κατηγορία βιομηχανικών ενζύμων που κατέχουν περίπου το 25% της παγκόσμιας αγοράς ενζύμων. Μπορούν να ληφθούν από διάφορες πηγές, όπως φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς. Σήμερα διατίθεται στο εμπόριο μεγάλος αριθμός μικροβιακών αμυλασών, οι οποίες έχουν αντικαταστήσει σχεδόν πλήρως τη χημική υδρόλυση του αμύλου στη βιομηχανία επεξεργασίας αμύλου. Η α-αμυλάση έχει παραχθεί από διάφορους μύκητες, ζύμες και βακτήρια. Ωστόσο, τα ένζυμα από μυκητιακές και βακτηριακές πηγές κυριαρχούν στις εφαρμογές στους βιομηχανικούς τομείς (Kumari et al., 2012).

Οι α-αμυλάσες χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία αρτοποιίας. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να προστεθούν στη ζύμη του ψωμιού για να αποδομήσουν το άμυλο στο αλεύρι σε μικρότερες δεξτρίνες, οι οποίες στη συνέχεια ζυμώνονται από τη μαγιά. Η προσθήκη α-αμυλάσης στη ζύμη έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του ρυθμού ζύμωσης και τη μείωση του ιξώδους της ζύμης, με αποτέλεσμα τη βελτίωση του όγκου και της υφής του προϊόντος. Επιπλέον, δημιουργεί πρόσθετη ζάχαρη στη ζύμη, η οποία βελτιώνει τη γεύση, το χρώμα της κρούστας και τις ιδιότητες φρυγανίσματος του ψωμιού. Εκτός από τη δημιουργία ζυμώσιμων ενώσεων, οι α-αμυλάσες έχουν επίσης αντικολλητική δράση στην αρτοποιία και βελτιώνουν τη διατήρηση της μαλακότητας των αρτοσκευασμάτων, αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής των προϊόντων αυτών. Επί του παρόντος, μια θερμοσταθερή μαλτογενετική αμυλάση του Bacillus stearothermophilus χρησιμοποιείται εμπορικά στη βιομηχανία αρτοποιίας (Jones et al., 2008). Η εμπορικά διαθέσιμη α-αμυλάση από Bacillus licheniformis είναι σταθερή σε υψηλές θεσμοκρασίες αλλά ευαίσθητη στα οξέα. Οι αμυλάσες χρησιμοποιούνται επίσης για τη διαύγαση της μπύρας ή των χυμών φρούτων ή για την προεπεξεργασία των ζωοτροφών για τη βελτίωση της πεπτικότητας των φυτικών ινών.

Η α-αμυλάση υδρολύει τους δεσμούς -1,4 της γλυκάνης αλλά δεν μπορεί να υδρολύσει τους δεσμούς -1,6. Στο πρώιμο στάδιο της υδρόλυσης, παράγονται δεξτρίνες με σχετικά υψηλότερο μοριακό βάρος και ακολουθεί ταχεία μείωση του ιξώδους του διαλύματος αμύλου. Καθώς η υδρόλυση προχωρεί, το μέσο DP των δεξτρινών μειώνεται σταδιακά, και στο τελικό στάδιο της

υδρόλυσης, μεγάλες ποσότητες μαλτόζης, μαλτοτριόζης, γλυκόζης και ολιγοσακχαριτών (α-λιγοδεξτρίνες) με τον δεσμό -1,6 αποτελούν τα προϊόντα της υδρόλυσης. Όλα τα προϊόντα υδρόλυσης έχουν α-διαμόρφωση . Τα προφίλ της σύνθεσης των προϊόντων κατά την υδρόλυση διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με την προέλευση του ενζύμου. Ορισμένα παρουσιάζουν απότομη μείωση του ιξώδους στο πρώιμο στάδιο της υδρόλυσης, ενώ άλλα παρουσιάζουν μια σχετικά αργή μείωση στο στο ίδιο στάδιο. Τα ένζυμα αυτής της ομάδας έχουν καθαριστεί και έχουν χαρακτηριστεί από ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων αρχαίων όπως ο Sulfolobus, προκαρυωτικών όπως ο Bacillus, και ευκαρυώτες όπως ο Aspergillus. Τα περισσότερα από αυτά έχουν μέγιστη δραστηριότητα στους 30°-37° C σε ουδέτερο pH, ωστόσο, ορισμένοι παρουσιάζουν μέγιστη δραστηριότητα σε pH 3 ή 10 και σε θερμοκρασίες άνω των 100° C. Τα ένζυμα από Aspergillus niger, A. oryzae, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus circulans, Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus, και Bacillus subtilis είναι ιδιαίτερης σημασίας από τη σκοπιά τόσο της βασικής έρευνας όσο και της βιομηχανικής εφαρμογής. Όλα τα ένζυμα αυτής της ομάδας κατατάσσονται στην οικογένεια GH 13 και η δομή τους περιέχει $(\beta/\alpha)_8$ με τη Glu ως δότη πρωτονίων και την Asp ως νουκλεόφιλο στις καταλυτικές θέσεις τους (Deckers et al., 2020).

Λόγω του πιο αποδεκτού καθεστώτος GRAS, οι μυκητιακές α-αμυλάσες, κυρίως από A. oryzae, είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες στο εμπόριο. Έχουν επίσης καταβληθεί προσπάθειες για την παραγωγή ανασυνδυασμένων α-αμυλασών κατάλληλες για χρήση στην αρτοποιία. Ειδικότερα, πολύ πρόσφατα μια α-αμυλάση από έναν ψυχοανεκτικό μύκητα της Ανταρκτικής κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε ετερόλογα σε A. oryzae (He et al., 2017), και μια α-αμυλάση από Thermomyces lanuginosus εκφράστηκε σε S. cerevisiae. Και στις δύο περιπτώσεις, η προσθήκη του ανασυνδυασμένου ενζύμου στον ζυμομύκητα είχε ως αποτέλεσμα ευεργετικές επιδράσεις στον όγκο του ψωμιού, στην ψίχα και στη συνεκτικότητα. Ανασυνδυασμένο στέλεχος ζυμομύκητα αρτοποιίας έχει επίσης τροποποιηθεί ώστε να εκφράζουν α-αμυλάσες από A. Oryzae και Schwanniomyces occidentalis (Marín et al., 2001). Όταν χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία, έδειξαν ζυμωτική ικανότητα και προσδιόρισαν τη βελτίωση της ποιότητας του ψωμιού σε σύγκριση με τα στελέχη «ελέγχου». Βακτηριακές μαλτογόνες α-αμυλάσες από Bacillus, Geobacillus, και Thermus spp. χρησιμοποιούνται, αντιθέτως, ως αντισταφυλοποιητικοί

παράγοντες. Χάρη στη θερμική τους σταθερότητα, αυτά τα ένζυμα μπορούν να τροποποιήσουν το άμυλο, όχι μόνο κατά τη διάρκεια του ψησίματος, αλλά και κατά τη φάση της ψύξης, επιβραδύνοντας έτσι την οπισθοδρόμηση του αμύλου και το σβήσιμο του ψωμιού. Επί του παρόντος, μια ανασυνδυασμένη μαλτογόνα α-αμυλάση κυκλοφορεί στην αγορά με την εμπορική ονομασία Novamyl (Novozymes) παράγεται με υπερέκφραση στο B. subtilis του γονιδίου που κωδικοποιεί την α-αμυλάση από τον Bacillus thermoalkalophilus. Μια μηχανική προσέγγιση που αποτελείται από epPCR ακολουθούμενη από DNA shuffling έχει επίσης εφαρμοστεί για τη βελτίωση της απόδοσης του Novamyl για ψωμί χαμηλού pH με εφαρμογές στο προζύμι και τη σίκαλη (Jones et al., 2008). Το τροποποιημένο NM477, το οποίο έφερε αντικαταστάσεις Phe188Leu, Asp261Gly και Thr288Pro, παρουσίασε καλύτερες επιδόσεις κατά της στυψοποίησης σε ψωμιά με χαμηλότερο pH σε σύγκριση με το εμπορικό ένζυμο. Αυτό οφειλόταν όχι μόνο στην υψηλότερη σταθερότητα σε χαμηλά pH, αλλά και στην υψηλότερη θερμική σταθερότητά του, η οποία θα επέτρεπε το ένζυμο να είναι ενεργό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (σε υψηλότερη θερμοκρασία) κατά τη διάρκεια του ψησίματος. Η όξινη σταθεροποίηση της α-αμυλάσης του B. licheniformis έχει επίσης επιτευχθεί με τη δημιουργία του Leu134Arg/Ser320Ala μέσω μιας προσέγγισης epPCR.

3.2 Β-Αμυλάση

Η β-αμυλάση είναι αναμφισβήτητα ένα σημαντικό ένζυμο, καθώς διασπά δύο δεσμευμένα μόρια γλυκόζης (μαλτόζη) από το αναγωγικό άκρο της αλυσίδας. Η δραστηριότητατης β-αμυλάσης είναι πιο σημαντική κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ζυθοποίησης (πολτοποίηση) για την παραγωγή επαρκούς ποσότητας μαλτόζης, του σημαντικότερου ζυμώσιμου σακχάρου. Η πλειοψηφία της μαλτόζης προέρχεται όχι μόνο από τη βύνη αλλά και από τα πρόσθετα δημητριακά που χρησιμοποιούνται. Όμως η β-αμυλάση είναι επίσης ευαίσθητη στη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ζυθοποίησης και η ταχεία αδρανοποίηση της β-αμυλάσης έχει ως αποτέλεσμα λιγότερη μαλτόζη σε σύγκριση με τα άλλα σάκχαρα και περισσότερους ολιγοσακχαρίτες ανώτερης τάξης, ευθείας αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει ειδικά στην περίπτωση των στερεών πρόσθετων υλών που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία .

Οι β-αμυλάσες ή μαλτογενετικές αμυλάσες δρουν στο μη αναγωγικό άκρο του αμύλου, του γλυκογόνου και των άλλων πολυσακχαριτων και ολιγοσακχαριτών, για τη διάσπαση της β-μαλτόζης (δύο μόρια γλυκόζης) με αναστροφή. Η β-αμυλάση υπάρχει στα βακτήρια και τα φυτά, όπου κατά την ωρίμανση των φρούτων, διασπά το άμυλο σε μαλτόζη, με αποτέλεσμα να δίνει τη γλυκιά γεύση στα ώριμα φρούτα. Ο όρος "βήτα" αναφέρεται στην αρχική ανομερή διαμόρφωση της ελεύθερης ομάδας σακχάρου που απελευθερώνεται και όχι στη διαμόρφωση του δεσμού που υδρολύεται (Raveendran et al., 2018).

Έχει βρεθεί ότι η μηχανική της β-αμυλάσης έχει οδηγήσει σε περίπου 2,2 φορές αύξηση της απόδοσης του ενζύμου στο B. circufans, 5,5 φορές στο B. Cereus και δύο φορές στο Saccharomycopsis fibuligera και στο E. nidulans. Αποδοτική παραγωγή BMY επιτεύχθηκε επίσης στον B. brevis με τη χρήση του θερμοσταθερού γονιδίου που κωδικοποιεί την BMY και το οποίο ελήφθη από τον C. thermosulfuregenes με γενετική μηχανική. Το γονίδιο BMY του B. cereus BQ10-S1 (οικογένεια γονιδίων SpoII) και του B. polymyxa 72 κλωνοποιήθηκε σε E.coli JM109 και E. coli HBlOl αντίστοιχα για την παραγωγή του ενζύμου σε βιομηχανική κλίμακα. Η μηχανική της αμυλάσης B. polymyxa 72 σε E. coli HBlOl επιτεύχθηκε με την εισαγωγή τμημάτων DNA που δημιουργήθηκαν από Hind HI στην περιοχή Hind 111 του PBR 322 και το ένθεμα των 4,8 kb έδειξε τη σύνθεση του BMY. Η γενετική έκφραση των ανθεκτικών ομάδων βακτηριακών κυττάρων κατέστησε το ένζυμο θερμοσταθερό. Ως εκ τούτου, τα γονίδια αυτά μπορούν να εισαχθούν σε κατάλληλους ξενιστές για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένης BMY που απαιτείται για την εμπορική παραγωγή της (Nag et al., 2021).

Επιπλέον, η ικανότητα συγκράτησης υγρασίας της μαλτόζης που παράγεται με τη δράση του ενζύμου, συμβάλλει στην απαλότητα των τροφίμων που περιέχουν άμυλο. Έτσι, η β-αμυλάση χρησιμοποιείται για την αποτροπή της υποβάθμισης του κέικ ρυζιού. Η β-αμυλάση που περιέχεται στο σιτάρι θεωρείται αποτελεσματική στην αναστολή της υποβάθμισης κατά τη διαδικασία του ψησίματος, αν και το ένζυμο που προέρχεται από το κριθάρι χρησιμοποιείται σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω του προβλήματος της θερμοσταθερότητας (Das & Kayastha, 2019).

3.3 Πουλουλανάση

Οι πουλουλανάσες είναι ειδικά είδη γλυκανασών, αμυλολυτικά εξο-ένζυμα, που αποικοδομούν την πουλουλάνη,την αμυλοπηκτίνη, το γλυκογόνο και τις α- και β- δεξτρίνες της αμυλοπηκτίνης και του γλυκογόνου. Παράγονται εξωκυτταρικά, προσδεδεμένες στην κυτταρική επιφάνεια λιποπρωτεινών από αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Οι πουλουλανάσες τύπου Ι προσβάλλουν τους δεσμούς α-1,6, ενώ οι πουλουλανάσες τύπου ΙΙ υδρολύουν τους δεσμούς α-1,4. Η ονομασία τους προκύπτει, επειδή διασπούν τις διακλαδώσεις των μορίων αμυλοπηκτίνης στο άμυλο για την παραγωγή αλυσίδων αμυλάσης. Χρησιμοποιούνται κυρίως σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα για την ενίσχυση της σακχαροποίησης του αμύλου σε γλυκόζη και σιρόπι γλυκόζης. Εφαρμόζονται περιστασιακά ως ένζυμο αρτοποιίας ή στην ποτόβιομηχανία, όπου αυξάνουν την ποσότητα των ζυμώσιμων σακχάρων που είναι διαθέσιμα για μετατροπή σε αλκοόλη. Οι πουλουλανάσες παράγονται μέσω ζύμωσης, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες βακτηρίων (Bacillus και Klebsiella) ή μυκήτων (Trichoderma).Μια συγκεκριμένη ανασυνδυασμένη πουλουλανάση του Bacillus naganoensis εκφράζεται σε Bacillus subtilis. Ο Bacillus subtilis χρησιμοποιείται επίσης για την έκφραση της πουλουλανάσης Bacillus acidopullulylyticus. Μια τρίτη πουλουλανάση που προέρχεται από το Bacillus deramificans εκφράζεται στο B. Licheniformis (Y. Zhang et al., 2020).

3.4 Μαλτογενική Αμυλάση

Η μαλτογενετική αμυλάση είναι ένα εξω-ενεργό ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση των α-1,4-γλυκοζιτικώντων δεσμών της αμυλόζης, της αμυλοπηκτίνης και των άλλων πολυμερών γλυκόζης. Εμπορικά ένζυμα και πρωτεΐνες στη βιομηχανία τροφίμων που προέρχονται από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς απομακρύνονται από το μη αναγωγικό άκρο του αμύλου ή των σχετικών πολυσακχαριτών και ολιγοσακχαριτικών πολυμερών έως ότου αποικοδομηθεί το μόριο ή, στην περίπτωση της αμυλοπηκτίνης, επιτευχθεί ένα σημείο διακλάδωσης. Η μαλτογενής αμυλάση μπορεί να παραχθεί με υποβρύχια ζύμωση ενός μη παθογόνου και μη τοξικογόνου στελέχους του Bacillus subtilis, το οποίο περιέχει το γονίδιο amyM από τον Bacillus stearothermophilus που κωδικοποιείται για τη μαλτογόνο αμυλάση (Sulong et al., 2017).

4. Λιπάσες

Οι λιπάσες είναι πολύ ευπροσάρμοστα ένζυμα και έχουν προκαλέσει την προσοχή πολλών βιομηχανικών διεργασιών. Οι λιπάσες μπορούν να προέλθουν από διάφορες πηγές, ζωικές, φυτικές και μικροβιολογικές. Η αγορά μικροβιακής λιπάσης εκτιμάται στα 425,0 εκατομμύρια δολάρια το 2018 και προβλέπεται να φτάσει τα 590,2 εκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2023, με αύξηση με CAGR 6,8% από το 2018 (Opportunities et al., n.d.). Οι μικροβιακές λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων μακράς αλυσίδας. Στον άνθρωπο και στα μονογαστρικά ζωικά είδη, το ένζυμο λιπάση απαντάται φυσιολογικά στο στομάχι και στο πάγκρεας, όπου λειτουργεί στην πέψη των λιπών και των λιπιδίων. Για βιομηχανικές εφαρμογές, οι ζωικής προέλευσης λιπάσες εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σε ορισμένους συγκεκριμένους ιατρικούς τομείς (π.χ. χορήγηση λιπάση παγκρέατος χοίρου στους ασθενείς με έλλειψη λιπάσης).

Εκτός από τη βιολογική τους σημασία, οι λιπάσες διαθέτουν τεράστιες δυνατότητες στη βιοτεχνολογία. Διαθέτουν ένα μοναδικό χαρακτηριστικό ότι δρουν στη διεπιφάνεια υδατικών και μη υδατικών ουσιών, το οποίο τις διακρίνει από τις εστεράσες. Η λιπόλυση καθορίζεται κυρίως από τις λιπάσες, οι οποίες δρουν κυρίως σε ακυλογλυκερόλες μακράς αλυσίδας, ενώ οι εστεράσες καταλύουν την υδρόλυση και το σχηματισμό εστέρων λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας.

Οι λιπάσες καταλύουν ευρύ φάσμα αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της υδρόλυσης, της διατεροποίησης, της αλχολύσης, της οξεόλυσης, της εστεροποίησης και της αμινόλυσης. Καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού λιπαρών οξέων στην τριακυλογλυκερόλη και απελευθερώνουν FFA. Η αντίδραση είναι αντιστρεπτή και η κατεύθυνση της αντίδρασης εξαρτάται από το νερό που είναι διαθέσιμο στην αντίδραση. Σε μέσα με χαμηλό νερό, οι λιπάσες καταλύουν την εστεροποίηση, τη δια-εστεροποίηση και τη διαεστεροποίηση. Οι λιπάσες που προέρχονται από διάφορες πηγές παρουσιάζουν μεγάλη ανομοιογένεια όσον αφορά την ειδικότητα, την αλληλουχία αμινοξέων και τις καταλυτικές ιδιότητες. Η σερίνη που υπάρχει στο ενεργό μέρος της λιπάσης περικλείεται στην εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή και αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό που μοιράζονται όλες οι λιπάσες.

Τα λιπίδια είναι αδιάλυτα στο νερό και πρέπει να διασπαστούν εξωκυτταρικά στα πιο πολικά συστατικά τους για να διευκολυνθεί η απορρόφησή τους, εάν πρόκειται να λειτουργήσουν ως θρεπτικά συστατικά για το κύτταρο. Επομένως, η πλειονότητα των λιπασών εκκρίνεται εξωκυτταρικά (Saxena et al., 2003). Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, οι πηγές αζώτου, άνθρακα και λιπιδίων, η ανάδευση και το διαλυμένο οξυγόνο, επηρεάζουν την παραγωγή λιπασών.

4.1 Ρόλος λιπασών

Στη βιομηχανία τροφίμων, οι λιπάσες χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, ψημένων τροφίμων και χυμών φρούτων, καθώς και για την εστεροποίηση λιπών και ελαίων για την παραγωγή τροποποιημένων ακυλογλυκερολών. Ο τομέας αυτός αποτελεί σημαντικό καταναλωτή λιπασών και βιοκαταλυτών γενικότερα στην παγκόσμια αγορά ενζύμων. Το μεγαλύτερο μέρος της συνθετικής δραστηριότητας της λιπάσης στοχεύει στην παραγωγή αρωματικών υλών που μιμούνται με επιτυχία τα πιο σύνθετα φυσικά αρώματα. Οι λιπάσες από το Penicillium roquefortii βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη βελτίωση των μπλε τυριών, καθώς μπορούν να συνθέσουν μεθυλοκετόνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη χαρακτηριστική γεύση αυτών των τυριών. Ο οξικός φουρφουρυλικός εστέρας χρησιμοποιείται ευρέως ως αρωματικός παράγοντας στα τρόφιμα και τα αρτοσκευάσματα, ο οποίος έχει συντεθεί με τη χρήση λιπάσης Burkholderia cepacia. Μια άλλη σημαντική εφαρμογή λιπασών στη βιομηχανία τροφίμων σχετίζεται με την παραγωγή μαργαρίνης χωρίς trans-FA από τριακυλογυκερίδιο. Η υδρόλυση αποβλήτων τροφίμων για την παραγωγή βιομεθανίου μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση λιπάσης Aspergillus niger (Deckers et al., 2020).

Οι λιπάσες μπορούν να συνθέσουν προϊόντα με δομή TAG παρόμοια με το λίπος του ανθρώπινου γάλακτος (HMF). Το Betapol, ένα υποκατάστατο του λίπους του ανθρώπινου γάλακτος, ήταν το πρώτο εμπορικό προϊόν που παρασκευάστηκε με την επεξεργασία με 1,3-ειδικές λιπάσες της τριπαλμιτίνης με ακόρεστα FAs. Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση σε ανάλογο HMF που περιέχει ωμέγα-3 FAs για πιθανή χρήση σε βρεφικά παρασκευάσματα έγινε με τη χρήση Lipozyme® TL IM, ακινητοποιημένης sn-1,3 ειδικής λιπάσης ως βιοκαταλύτη για την

ενδιαμέριση της τριπαλμιτίνης με έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και λιναρόσπορο (T. Yang et al., 2003).

Το βούτυρο κακάο (CB) χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες ζαχαροπλαστικής, ιδίως για την παραγωγή σοκολάτας, ωστόσο είναι ένα ακριβό προϊόν. Σε αυτό το πλαίσιο, ισοδύναμα βουτύρου κακάο (CBE) μπορούν να παραχθούν με τη χρήση παλμιτικού και στεατικού οξέος με τη χρήση sn-1,3 ρεγιοεκλεκτικής λιπάσης. Από την άλλη πλευρά, έχουν δοκιμαστεί άλλες ενώσεις, όπως μείγμα βουτύρου illipe και ελαιολάδου, για την παραγωγή CBE (Akanda et al., 2014). Επιπλέον, οι Shekarchizadeh και Kadivar σχετίζονται με μια νέα παραγωγή CBE από λίπος καμήλας και τριστεαρίνη με ενζυματική ενδιαστροφή σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη λιπάση Thermomyces lanuginosus (Lipozyme TL IM) ως βιοκαταλύτη.

4.2 Ευκαριωτικοί Φορείς Έκφρασης

Τα κυριότερα μελετημένα και χρησιμοποιούμενα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης είναι οι ζυμομύκητες K. phaffii, S. cerevisiae, Y. lipolytica, και τα είδη του νηματοειδούς μύκητα Aspergillus που αντιπροσωπεύουν σχεδόν 35, 8, 1 και 3% των όλων των ετερόλογα παραγόμενων λιπασών, αντίστοιχα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί δεν είναι μόνο αποτελεσματικοί παραγωγοί, αλλά ορισμένοι έχουν το καθεστώς του γενικά αναγνωρισμένου ως ασφαλούς (GRAS) (S. cerevisiae, Y. lipolytica, A. niger και A. oryzae). Οι πρωτεΐνες που παράγονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα μπορούν να υποστούν μια σειρά από PTMs που μπορούν να επηρεάσουν τις χημικές και φυσικές ιδιότητές τους. Οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν να αυξήσουν τις πρωτεϊνικές διαλυτότητα, τη σταθερότητα και τον ρυθμό έκκρισης. Στη βιομηχανία, οι μυκητιακές λιπάσες έχουν κερδίσει την προσοχή λόγω των σταθερότητά τους υπό διαφορετικές συνθήκες και την εξειδίκευση υποστρώματος. Επιπλέον, οι διαδικασίες εκχύλισης είναι απλούστερες σε σύγκριση με τις βακτηριακές λιπάσες λόγω του εξωκυτταρικού τους χαρακτήρα (Saxena et al., 2003).

4.2 Προκαρυωτικοί Φορείς Έκφρασης

Ο E. coli είναι μακράν ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος προκαρυωτικός μικροοργανισμός για την ανασυνδυασμένη παραγωγή λιπασών,ακολουθούμενο από το θετικό κατά Gram βακτήριο B. subtilis. Ως εκ τούτου, σύμφωνα με τους Borrelli και Trono,το E. coli αντιπροσωπεύει το 50% της συνολικής ετερόλογης παραγωγής λιπασών από ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς ξενιστές. Αυτή η κυρίαρχη θέση στην ιεραρχία της παραγωγής έχει κερδηθεί από περισσότερο από 40 χρόνια εντατικής χρήσης ως ξενιστή παραγωγής και το ακόμη μεγαλύτερο ιστορικό της ως ένας από τους σημαντικότερους βιολογικούς οργανισμούς-μοντέλο. Ως αποτέλεσμα, το E. coli είναι πιθανότατα ο πιο κατανοητός οργανισμός στον πλανήτη. Μαζί,αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή εξαιρετικά αποτελεσματικών κυτταρικών εργοστασίων με βάση την E. coli για ετερόλογες παραγωγές πρωτεϊνών. Υπάρχουν παραδείγματα όπου η νέα πρωτεΐνη αποτελεί το 30% του συνολικού ενδοκυτταρικού περιεχομένου των πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι διεργασίες με βάση το E. coli είναι συνήθως εύκολες στο χειρισμό και στη κλιμάκωση λόγω ενοποιημένων μεθοδολογιών ζύμωσης, κλωνοποίησης και έκφρασης με διαφορετικά στελέχη, πρωτόκολλα και μελέτες. Πολλές στρατηγικές είναι διαθέσιμες για τη βελτιστοποίηση μιας διαδικασίας παραγωγής (Deckers et al., 2020). Για παράδειγμα, στο πλαίσιο των ανασυνδυασμένων λιπασών, ο καθαρισμός μπορεί να απλοποιηθεί με τη συνένωση της λιπάσης γονιδίου με αλληλουχίες που κωδικοποιούν πεπτίδια σήματος (PelB και OmpA), καθώς αυτά θα κατευθύνουν τις πρωτεΐνες στον περιπλασματικό χώρο. Επιπλέον, οι αποδόσεις της διαλυτής πρωτεΐνης μπορούν να αυξηθούν με συνεκφράσεις με συνοδούς (GroES, GroEL και ClpB). Στην πρώτη περίπτωση, το ένζυμο θα μπορούσε να ανακτηθεί με υπερήχους ή άλλες διαδικασίες λύσης των κυττάρων (W. Liu et al., 2017). Η συν-έκφραση με συνοδούς επιτρέπει τη σωστή αναδίπλωση της λιπάσης, αυξάνει τη διαλυτότητά της και μειώνει τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών.

4.3 Ανασυνδιασμένες Λιπάσες

Η πρόσφατη βιβλιογραφία καλύπτει διάφορες προσεγγίσεις που βασίζονται στην ανασυνδυασμένη τεχνολογία για τη βελτίωση της απόδοσης των λιπασών. Οι βελτιωμένες λιπάσες μπορούν να παρασκευαστούν με τη χρήση ορθολογικού σχεδιασμού πρωτεϊνικής

μηχανικής μέσω προεπιλεγμένων παραλλαγών, μεταλλαξιγένεσης κορεσμού, συστημάτων διαλογής υψηλής απόδοσης ή επιλογής, με error prone PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), της θερμικά σταθερής λιπάσης που παρασκευάζεται από C. antarctica, B. pumilus, T. lanuginosus μέσω κατευθυνόμενης τοποειδικής μεταλλαξιγένεσης και μέσω μοριακή δυναμική προσομοίωσης. Επίσης, η λιπάση από το Geobacillus sp βρέθηκε ότι λειτουργεί σε ακραίες θερμοκρασίες και έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την ανάλυση και την αποσυμμετρικοποίηση ενώσεων που σχετίζονται με την βιομηχανία τροφίμων (Sarmah et al., 2018).

Μια παραλλαγή λιπάσης που περιλαμβάνει τρεις αντικαταστάσεις αμινοξέων (στη θέση 9, 190 και 225) κατέδειξε αύξηση της βέλτιστης θερμοκρασίας της κατά 10°C και αύξηση της θερμοσταθερότητάς της κατά 12 φορές στους 50°C. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν τρία ανασυνδυασμένα ένζυμα λιπάσης που περιλάμβαναν μεμονωμένες παραλλαγές για ανάλυση. Εντοπίστηκε ότι τα αμινοξέα στη θέση 190 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας έχουν βασικό ρόλο στην ενίσχυση της θερμοσταθερότητας της λιπάσης, ενώ τα αμινοξέα στη θέση 9 και 225 είχαν μόνο μικρή επίδραση (W.-N. Niu et al., 2006). Επί του παρόντος, η τροποποίηση πρωτεϊνών για τη θερμοσταθερότητα των ενζύμων και για λιπάσες ανθεκτικές σε διαλύτες αποτελεί το κύριο αντικείμενο της έρευνας στις μέρες μας.

Σε μια άλλη μελέτη, ένας βελτιωμένος βιοκαταλύτης T. lanuginosus DSM 10635 lipase κατασκευάστηκε για να βελτιώσει τη δραστικότητά του με τη χρήση τοποειδική μεταλλαξιγένεσης κορεσμού και τεχνικών διαλογής υψηλής απόδοσης και χρησιμοποιήθηκε αποτελεσματικά στη βιοσύνθεση του χειρικού ενδιάμεσου προϊόντος της πρεγκαμπαλίνης (X.-J. Li et al., 2014). Η μελέτη που αναφέρθηκε από τους Clementz κ.ά., περιλαμβάνει την ακινητοποίηση της ανασυνδυασμένης λιπάσης R. oryzae σε φορέα από οστό βοοειδών, ο οποίος παρουσίασε υψηλό πορώδες, μεγάλη επιφάνεια και κατάλληλη πορώδη δομή, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της βιοκαταλυτικής δραστικότητας της λιπάσης. Περαιτέρω, δύο νέα μεταλλάγματα μιας ψυχρόφιλης λιπάσης που απομονώθηκε από ένα αρκτικό βακτήριο, το B. pumilus, σχεδιάστηκαν ορθολογικά με βάση το μοντέλο τρισδιάστατης δομής και οδήγησαν σε σημαντική βελτίωση των δραστηριοτήτων τους σε σύγκριση με εκείνη του άγριου τύπου. Από τη μελέτη

των Raftari et al., διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή αυξήθηκε σε 34 φορές υψηλότερη από το εγγενές ένζυμο μέσω της μεταβολικής μηχανικής της λιπάσης από Burkholderia cepacia η οποία κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε σε υψηλό βαθμό σε Lactococcus lactis (Raftari et al., 2012).

5. Πρωτεάσες

Η πρωτεάση είναι ένας τύπος ενζύμου που εκτελεί κυρίως πρωτεόλυση. Πρωτεολυτικά ένζυμα είναι εκείνα που διασπούν τους πεπτιδικούς δεσμούς στις πρωτεϊνικές τροφές και απελευθερώνουν τα αμινοξέα που χρειάζεται ο οργανισμός, συνεπώς, είναι πολύ σημαντικά στη διαδικασία της πέψης. Αυτά τα ένζυμα οδηγούν επίσης στην έναρξη του πρωτεϊνικού καταβολισμού κατά τον οποίο οι μεγάλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες διασπώνται από υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι μικροβιακές πρωτεάσες είχαν ζωτικής σημασίας ρόλους στην παραγωγή παραδοσιακών ζυμωμένων τροφίμων. Σήμερα, μια μεγάλη και ζωντανή βιομηχανία ενζύμων, στην οποία κυριαρχούν τα προϊόντα μικροβιακών πρωτεασών, προμηθεύει τον κόσμο με μεγάλους βιοκαταλύτες για την χρήση τους στην επεξεργασία τροφίμων (Ward et al., 2009). Οι πρωτεάσες έχουν εξελιχθεί με πολλαπλούς τρόπους. Διαφορετικές κατηγορίες πρωτεασών πραγματοποιούν την ίδια αντίδραση με εντελώς διαφορετικούς καταλυτικούς μηχανισμούς. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πρωτεολυτικών ενζύμων των οποίων η ταξινόμηση βασίζεται στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο σημείο, που καταλύεται από τα ένζυμα αυτά. Δύο μεγάλες ομάδες είναι οι εξωπεπτιδάσες, οι οποίες συνήθως στοχεύουν τα τελικά άκρα των πρωτεϊνών, ενώ η άλλη είναι οι ενδοπεπτιδάσες των οποίων οι θέσεις-στόχοι βρίσκονται στο εσωτερικό των πρωτεϊνών. Οι ενδοπεπτιδάσες εκτελούν διάφορες καταλυτικούς μηχανισμούς. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τις ασπαρτικές ενδοπεπτιδάσες, τις κυστεϊνικές ενδοπεπτιδάσες, γλουταμινικές ενδοπεπτιδάσες, μεταλλοενδοπεπτιδάσες, σερίνη ενδοπεπτιδάσες και ενδοπεπτιδάσες θρεονίνης. Ο όρος ολιγοπεπτιδάση προορίζεται κυρίως για τα ένζυμα που δρουν ειδικά σε πεπτίδια. Οι πρωτεάσες είναι πανταχού παρούσες, απαντώνται σε ζώα, φυτά, βακτήρια, αρχαία, μύκητες, και στους ιούς (Rodarte et al., 2011).

Οι πρωτεάσες και οι πεπτιδάσες παίζουν επίσης ρόλο στην επιτάχυνση της ωρίμανσης του τυριού και στην ανάπτυξη πτητικών ουσιών. Η πρωτεόλυση καταλύεται, ουσιαστικά, από τα υπολειπόμενα πηκτικά ένζυμα που παραμένουν στο τυρόπηγμα, τις πρωτεάσες που υπάρχουν στο γάλα, στα γαλακτικά βακτήρια και άλλους εκκινητές που προστίθενται κατά την παρασκευή του τυριού. Επιπλέον, καθώς η ωρίμανση του τυριού διαρκεί πολύ χρονικό διάστημα, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν εξωτερικά προστιθέμενες μη πηκτικές πρωτεάσες. Αυτά τα εμπορικές ένζυμα είναι γενικά εγγενή ένζυμα που προέρχονται από γαλακτικά βακτήρια, Bacillus spp. και Aspergillus spp. Ωστόσο, έχουν επίσης καταβληθεί προσπάθειες για την παραγωγή ανασυνδυασμένων στελέχων γαλακτικών βακτηρίων που υπερεκφράζουν ένα ή περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα. Ειδικότερα, το Lactococcus lactis χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής για την ανασυνδυασμένη έκφραση μιας ουδέτερης πρωτεάσης από το B. subtilis, του πρωτεολυτικού ενζύμου από το Lactobacillus helveticus και της υποτιλίνης από το B. Licheniformis. Αυτά τα ανασυνδυασμένα στελέχη βρέθηκαν να παράγουν και να εκκρίνουν σωστά την ώριμη και ενεργό μορφή των ενζύμων και, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα άγριου τύπου στελέχη, παρουσίασαν αυξημένη πρωτεολυτική δραστικότητα, υποδηλώνοντας έτσι τον πιθανό ρόλο τους στο τυρί ωρίμανση του τυριού (van de Guchte et al., 1990). Επίσης, ο Hickey και οι συνεργάτες του δημιούργησαν ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος L. lactis που, μέσω της επαγώγιμης έκφρασης του ενζύμου εντερολυσίνη A από Enterococcus που αποδομεί το κυτταρικό τοίχωμα faecalis, προκάλεσε την αυτόλυση και επέτρεψε την παράδοση της ενδοκυτταρικής πρωτεολυτικής του ενζύμων στο τυρί, ευνοώντας έτσι την ωρίμανση και την απελευθέρωση αρωμάτων.

5.1 Κατηγορίες πρωτεασών

Οι πρωτεάσες κατηγοριοποιούνται γενικά σε δύο μεγάλες ομάδες με βάση τον τόπο δράσης τους, τις εξωπεπτιδάσες και τις ενδοπεπτιδάσες. Οι εξωπεπτιδάσες διασπούν τον πεπτιδικό δεσμό πλησίον των αμινο- ή καρβοξυτελών άκρων του υποστρώματος (διασπούν τους N- ή C-τελικούς πεπτιδικούς δεσμούς μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας), ενώ οι ενδοπεπτιδάσες διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς που απέχουν από τους άκρους του υποστρώματος (διασπούν

εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς). Οι πρωτεάσες ταξινομούνται επίσης σε όξινες, αλκαλικές και ουδέτερες πρωτεάσες με βάση το pH στο οποίο είναι ενεργές.

Με βάση την καταλυτική τους δράση, οι πρωτεάσες έχουν επίσης ομαδοποιηθεί σε τέσσερις κατηγορίες ως ασπαρτικές, κυστεϊνικές, μεταλλικές και σερινικές πρωτεάσες. Ωστόσο, πρόσφατα έχουν οριστεί τρία νέα συστήματα: το σύστημα πρωτεασώματος με βάση τη θρεονίνη, το σύστημα γλουταμινικού-γλουταμίνης της eqolisin και το σύστημα σερίνης-γλουταμινικού-ασπαρτικού της sedolisin (Ward, 2011).

- Οι πρωτεάσες σερίνης χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας ομάδας σερίνης στο ενεργό τους κέντρο. Είναι άφθονες μεταξύ ιών, βακτηρίων και ευκαρυωτών, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι χρήσιμες για τους οργανισμούς. Οι πρωτεάσες σερίνης ανήκουν στις ομάδες των εξωπεπτιδασών, των ενδοπεπτιδασών, των ολιγοπεπτιδασών και των ομεγαπεπτιδασών. Οι περισσότερες από τις ουδέτερες και αλκαλικές πρωτεάσες που είναι εμπορικές πρωτεάσες σερίνης παράγονται από βακτήρια του γένους Bacillus. Παρόμοια ένζυμα σερίνης μπορούν επίσης να παραχθούν από άλλα βακτήρια, όπως Thermus caldophilus και Desulfurococcus mucosus, Streptomyces, Aeromonas και Escherichia. Τα είδη μυκήτων όπως ο Aspergillus oryzae παράγουν ομοίως αρκετές πρωτεάσες σερίνης (Owen, 2006).

- Οι πρωτεάσες κυστεΐνης απαντώνται τόσο σε προκαρυώτες όσο και σε ευκαρυώτες. Υπάρχουν περίπου 20 οικογένειες πρωτεασών κυστεΐνης. Η δραστικότητα όλων των πρωτεασών κυστεΐνης προσδιορίστηκε σε μια καταλυτική δυάδα που αποτελείται από κυστεΐνη και ιστιδίνη. Η σειρά των καταλοίπων Cys και His (Cys-His ή His-Cys) ποικίλλει μεταξύ των οικογενειών. Γενικά, οι πρωτεάσες κυστεΐνης είναι ενεργές μόνο παρουσία αναγωγικών παραγόντων, όπως HCN ή κυστεΐνη. Οι πρωτεάσες κυστεΐνης κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες με βάση την ειδικότητα της πλευρικής τους αλυσίδας: (i) παρόμοιες με την παπαΐνη, (ii) παρόμοιες με τη θρυψίνη κατά προτίμηση με διάσπαση στο κατάλοιπο αργινίνης, (iii) εξιδεικευμένες στο γλουταμινικό οξύ και (iv) άλλες. Οι κυστεϊνικές πρωτεάσες της παπαΐνης έχουν βέλτιστη δραστικότητα σε

ουδέτερο pH, ενώ μερικές από αυτές, όπως οι λυσοσωμικές πρωτεάσες, έχουν μέγιστη δραστικότητα σε όξινο pH. Είναι ευαίσθητες σε σουλφυδρυλικούς παράγοντες, όπως η PCMB, αλλά δεν επηρεάζονται από την DFP και τους παράγοντες χηλικοποίησης μετάλλων. Οι πρωτεάσες της κυστεΐνης δεν είναι τόσο ευρέως κατανεμημένες όπως παρατηρήθηκε με τις πρωτεϊνάσες της σερίνης και της ασπαρτίνης (S. Verma et al., 2016).

- Οι ασπαρτικές πρωτεϊνάσες ή ασπαρτυλοπρωτεϊνάσες είναι ενδοπεπτιδάσες που έχουν δύο κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (Asp32 και Asp215, αρίθμηση πεψίνης) στο ενεργό τους κέντρο, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την καταλυτική τους δραστηριότητα. Είναι κοινώς γνωστές ως όξινες πρωτεάσες. Οι όξινες πρωτεάσες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τρεις οικογένειες, την πεψίνη, την ρετροπεψίνη και τα ένζυμα από παραρετροϊούς. Οι περισσότερες ασπαρτικές πρωτεάσες (Aps) παρουσιάζουν την καλύτερη δραστικότητα σε χαμηλό pH (pH 3 έως 4) και έχουν ισοηλεκτρικά σημεία στην περιοχή pH 3 έως 4,5. Αναστέλλονται από ένα εξαπεπτίδιο από Streptomyces που περιέχει δύο κατάλοιπα στατίνης και ονομάζεται πεπστατίνη. Οι ασπαρτικές πρωτεάσες είναι επίσης ευαίσθητες στον διαζοακετυλο-DL-νορλευκίνης μεθυλεστέρα (DAN) και στο 1, 2-εποξυ-3-(p-νιτροφαινοξυ) προπάνιο (EPNP) παρουσία ιόντων χαλκού. Οι μικροβιακές όξινες πρωτεάσες παρουσιάζουν εξειδίκευση έναντι αρωματικών ή ογκωδών αμινοξικών καταλοίπων και στις δύο πλευρές του πεπτιδικού δεσμού, η οποία είναι παρόμοια με την πεψίνη, αλλά η δράση τους είναι λιγότερο αυστηρή από εκείνη της πεψίνης. Οι όξινες πρωτεάσες αντιπροσωπεύουν μια βασική ομάδα ενζύμων, που χρησιμοποιούνται εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων. Για τις περισσότερες από αυτές τις εφαρμογές, τα ακατέργαστα ένζυμα πρέπει να είναι τουλάχιστον μερικώς καθαρισμένα και απαλλαγμένα από ουσίες που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τα χαρακτηριστικά του προϊόντος. Τα ένζυμα ασπαρτικής πρωτεάσης από μικροβιακές πηγές κατηγοριοποιούνται κυρίως σε δύο ομάδες: (i) τα ένζυμα που μοιάζουν με πεψίνη και παράγονται από Aspergillus, Penicillium, Rhizopus και Neurospora και (ii) τα ένζυμα που μοιάζουν με ρενίνη και παράγονται από Endothia και Mucor spp. όπως Mucor miehei, M. pusillus και Endothia parasitica. Η χυμοσίνη, κοινώς γνωστή ως ρενίνη, είναι

μια ασπαρτική πρωτεάση που παράγεται από τα μηρυκαστικά που διασπά επιλεκτικά την πρωτεΐνη k-καζεΐνη του γάλακτος, προάγοντας έτσι την πήξη του (Dunn, 2013).

- Οι μεταλλοπρωτεάσες είναι εξαιρετικά διαφοροποιημένοι τύποι πρωτεασών. Περιέχουν ένζυμα διαφορετικής προέλευσης, όπως κολλαγενάσες από ανώτερους οργανισμούς, αιμορραγικές τοξίνες από δηλητήρια φιδιών και θερμολυσίνη από βακτήρια. Για τη δράση τους, απαιτούν ιόν δισθενούς μετάλλου. Έχουν καταγραφεί συνολικά περίπου 30 οικογένειες μεταλλοπρωτεασών, από τις οποίες οι 17 περιέχουν μόνο ενδοπεπτιδάσες, οι 12 περιέχουν μόνο εξωπεπτιδάσες και 1 (M3) περιέχει τόσο ενδο- όσο και εξωπεπτιδάσες (Auld, 2013).

5.2 Ρόλος πρωτεασών

Η κύρια εφαρμογή των όξινων πρωτεασών είναι η παραγωγή τυριού στη γαλακτοβιομηχανία. Οι μικροβιακές πρωτεάσες πήξης του γάλακτος ανήκουν σε μια κατηγορία όξινων ασπαρτικών πρωτεασών και έχουν μοριακό βάρος μεταξύ 30.000 και 40.000. Ο κύριος ρόλος των όξινων πρωτεασών στην παραγωγή τυριού είναι η υδρόλυση του συγκεκριμένου πεπτιδικού δεσμού (του δεσμού Phe105-Met106) για τη δημιουργία της παρα-Κ-καζεΐνης και των μακροπεπτιδίων. Η χυμοσίνη προτιμάται λόγω της υψηλής ειδικότητάς της για την καζεΐνη, η οποία εξηγεί την εξαιρετική της απόδοση στην παραγωγή τυριού. Οι ασπαρτικές πρωτεάσες που παράγονται από μικρόβια όπως το Mucor miehei, το B. subtilis και το Endothia parasitica, οι οποίες είναι GRAS (γενετικά θεωρούνται ασφαλείς), αντικαθιστούν σταδιακά τη χυμοσίνη στην τυροκομία.

Ενδο- και εξωπρωτεϊνάσες από τον Aspergillus oryzae έχουν εφαρμοστεί για τη βελτίωση της γλουτένης σιταριού μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης. Επιπλέον, οι ασπαρτικές πρωτεάσες από μύκητες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ευρέως στην παραγωγή καρυκευμάτων τροφίμων και στη βελτίωση τροφίμων πλούσιων σε πρωτεΐνες, όπως το ψωμί και άλλα ζυμαρικά.

Οι πρωτεάσες βρίσκουν, επίσης, εφαρμογές στην βιομηχανία μπίρας. Η προσθήκη μιας ζύμης ζυθοποιίας που εκκρίνει ένα ένζυμο πρωτεϊνάσης (συνήθως παπαΐνη) που μπορεί να αποικοδομήσει τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν θόλωμα κατά τη ζύμωση του ζύθου είναι επίσης

μια λύση για την προστασία της μπίρας από την θολούρα κατά την ψύξη. Παρομοίως και στη βιομηχανία κρασιού, οι όξινες πρωτεάσες είναι κατάλληλες για την αποικοδόμηση του συμπλόκου θολότητας που παράγεται από πρωτεΐνες σε χυμούς φρούτων και αλκοολούχα ποτά. Έχουν χρησιμοποιηθεί ορισμένες ασπαρτικές πρωτεάσες μυκήτων για την υδρόλυση πρωτεϊνών που προκαλούν θολότητα σε χυμούς και κρασί. Πρόκειται για την πρωτεάση BcAP8 από τον Botrytis cinerea και την ασπεργιλλοπεψίνη I από τον Aspergillus saitoi (εμπορικά διατίθεται ως Molsin F από την Kikkoman Corp., Ιαπωνία), οι οποίες χρησιμοποιούνται και οι δύο στο οινοποιείο, καθώς απομακρύνουν με επιτυχία τις πρωτεΐνες που προκαλούν θολότητα και συνεπώς μειώνουν τις απαιτήσεις σε μπεντονίτη (Deckers et al., 2020).

5.3 Παπαΐνη

Η παπαΐνη, που ονομάζεται επίσης παπαϊνική πρωτεϊνάση I (PPI), είναι μια ενδοπεπτιδάση κυστεΐνης 23,4 kDa, 212 καταλοίπων, που ανήκει στην υποοικογένεια C1A των πρωτεασών που μοιάζουν με την παπαΐνη (Rawlings et al., 2016). Η εμπορική σημασία της παπαΐνης οφείλεται κυρίως στην ισχυρή πρωτεολυτική της δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος πρωτεϊνικών υποστρωμάτων και επίσης, επειδή είναι δραστική σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών συνθηκών. Αυτά τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά επέτρεψαν στην παπαΐνη να ηγηθεί της αγοράς πρωτεασών, ξεπερνώντας άλλες πρωτεάσες φυτικής προέλευσης, όπως η βρωμελίνη (Ananas comosus) και η φικίνη (Ficus carica), καθώς και πρωτεάσες μυκητιακής προέλευσης. Οι κυριότεροι παραγωγοί παπαΐνης περιλαμβάνουν την Ινδία, τη Σρι Λάνκα, τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό, το Ζαΐρ, την Τανζανία, την Ουγκάντα, το Μεξικό, τη Βραζιλία και την Αργεντινή. Όσον αφορά την παγκόσμια αγορά παπαΐνης, οι κύριοι εισαγωγείς συγκεντρώνονται στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ, με μέγεθος αγοράς περίπου 150-200 και 300-400 τόνους ετησίως, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ιαπωνική αγορά είναι σχετικά μικρή (λιγότεροι από 50 τόνοι ετησίως). Ορισμένοι από τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες της παγκόσμιας και βιώσιμης προσφοράς παπαΐνης είναι η υψηλή κλιματική εξάρτηση των καλλιεργειών παπάγιας, καθώς και τα οικονομικά και πολιτικά ζητήματα ορισμένων χωρών παραγωγής (*Papain Production*, n.d.). Το γεγονός αυτό καθιστά την αναζήτηση εναλλακτικών πηγών παπαΐνης προτεραιότητα για τις

εταιρείες παραγωγής. Ευτυχώς, οι τελευταίες εξελίξεις στην έκφραση ανασυνδυασμένης παπαΐνης μπορούν να δώσουν λύση στο πρόβλημα αυτό.

Η υψηλή παγκόσμια ζήτηση παπαΐνης για βιομηχανικές χρήσεις καθιστά αναγκαία την αναζήτηση εναλλακτικών πηγών από την παραδοσιακή εξαγωγή από το λατέξ της C. papaya. Παρά την υψηλή ανάκτηση της παπαΐνης από το φυτικό υλικό της Carica papaya (έως και 53 g ακατέργαστου ενζύμου ανά kg υγρού λατέξ), αυτή η φυσική πηγή παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Πρώτον, η παπαΐνη αντιπροσωπεύει μόνο περίπου το 5-8% των συνολικών πρωτεασών κυστεΐνης στο λατέξ, γεγονός που συνεπάγεται μια δαπανηρή και βαριά στρατηγική απομόνωσης (Nitsawang et al., 2006). Επιπλέον, η απομονωμένη παπαΐνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην οξείδωση, οπότε πρέπει να διατηρείται αμέσως σε χαμηλές θερμοκρασίες και να αποφεύγεται η άμεση επαφή με τον αέρα. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα είναι η εξάρτηση των καλλιεργειών παπάγιας από εξωτερικούς παράγοντες, όπως το κλίμα, το έδαφος, τα παράσιτα κ.λπ., γεγονός που εμποδίζει τη συνεχή παροχή παπαΐνης.

Η έκφραση της ανασυνδυασμένης παπαΐνης σε διάφορα συστήματα με βάση μικροοργανισμούς καθιστά δυνατή την αντιμετώπιση αυτών των μειονεκτημάτων, αυξάνοντας παράλληλα σημαντικά την παραγωγική ικανότητα της παπαΐνης. Η πρόδρομη πρωτεΐνη παπαΐνης μπορεί να κλωνοποιηθεί και να εκφραστεί σε Escherichia coli, αλλά το ανασυνδυασμένο ένζυμο σχηματίζει ανενεργά σωμάτια εγκλεισμού (inclusion bodies). Ωστόσο, μπορούν να επαναρυθμιστούν και να αποδώσουν περίπου 3 mg ενεργής παπαΐνης/L (Reveil et al., 1993). Από αυτή την άποψη, οι Choudhury, Roy, Chakrabarti, Biswas και Dattagupta (2009) περιέγραψαν ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο καθαρισμού και αναδίπλωσης, φτάνοντας σε 400 mg/L μιας προ-παπαΐνης σύντηξης με His-tagged από E. coli. Ωστόσο, διάφορα προβλήματα μπορεί να προκύψουν κατά τη διαδικασία αναδίπλωσης, όπως η αυτοπρωτεόλυση, η οξείδωση του ενεργού κέντρου και ο σχηματισμός λανθασμένων δισουλφιδικών δεσμών.

Τα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης έχουν επίσης μελετηθεί για την παραγωγή ανασυνδυασμένης παπαΐνης. Οι Vernet et al. (1990) έλαβαν 0,3 mg/L διαλυτής παπαΐνης χρησιμοποιώντας ένα σύστημα έκφρασης βακουλόβιου/εντόμων. Υψηλότερες συγκεντρώσεις 1,7 mg/L αναφέρθηκαν από τους Ramjee, Petithory, McElver, Weber και Kirsch (1996)

χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκφρασης τον ζυμομύκητα Saccharomyces cerevisiae. Πιο πρόσφατα, οι Werner, Hirth, Rupp και Zibek (2015) περιέγραψαν την έκφραση μιας βελτιστοποιημένης ως προς το κωδικόνιο παπαΐνης με ετικέτα His σε Pichia pastoris. Μετά τον καθαρισμό μπορούν να ληφθούν 463 mg/L ενζύμου, που ταιριάζει με την υψηλότερη παραγωγή που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα με τη χρήση E. coli ως ξενιστή (400 mg/L) (Vernet et al., 1991). Επιπλέον, αυτή η βελτιστοποιημένη ως προς το κωδικόνιο παπαΐνη μπορεί να καθαριστεί σε ένα μόνο βήμα από το μέσο καλλιέργειας και παρουσίασε 1,4 φορές υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα έναντι του χρωμογόνου πεπτιδίου Z-φαινυλαλανίνη-αργινίνη-παρανιτροανιλίδιο σε σύγκριση με μια εμπορική παπαΐνη. Στη μελέτη αυτή, οι συγγραφείς αποδεικνύουν ότι η έκφραση της παπαΐνης είναι καλύτερη στο σύστημα P. pastoris από ό,τι στο σύστημα E. coli (Werner & Zibek, 2015).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραδοσιακή διαδικασία παραγωγής παπαΐνης από καλλιέργειες παπάγιας (έως και 53 g ακατέργαστου ενζύμου ανά kg υγρού λατέξ) διαρκεί περίπου 11-13 μήνες από τη μεταφύτευση της Carica papaya έως ότου ο καρπός είναι έτοιμος να παράγει το λατέξ (Kamphuis et al., 1984). Συγκρίνοντας αυτά τα δεδομένα με εκείνα που ελήφθησαν από τους Werner κ.ά. (2015) στην Pichia pastoris, μπορεί να εκτιμηθεί ότι μια μικρή καλλιέργεια σε ζυμωτήρα παρτίδας 1000-L θα μπορούσε να αποδώσει 463 g παπαΐνης σε μόλις 2-3 ημέρες. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την τεράστια διαφορά στις αποδόσεις καθώς και τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η ανασυνδυασμένη παραγωγή όσον αφορά τις διαδικασίες καθαρισμού, ανεξάρτητα από πολιτικούς, οικονομικούς και κλιματικούς παράγοντες, η παραγωγή ανασυνδυασμένης παπαΐνης αναμένεται να εκτοπίσει πλήρως την παραδοσιακή παραγωγή μεσοπρόθεσμα.

5.4 Χυμοσίνη (ρεννίνη)

Η παραγωγή τυριού απαιτεί τη χρήση μιας πρωτεΐνης 323 αμινοξέων που ονομάζεται χυμοσίνη (επίσης γνωστή ως ρενίνη). Η χυμοσίνη (36 kDA) είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που λαμβάνεται συνήθως από το στομάχι μοσχαριού. Ο ρόλος αυτού του ενζύμου είναι η πήξη του γάλακτος, η οποία είναι πολύ σημαντική για την πέψη του γάλακτος στα νεαρά ζώα. Αρχικά, η χυμοσίνη εκκρίνεται ως ανενεργή προχυμοσίνη και στη συνέχεια ενεργοποιείται σε χαμηλό pH. Μόλις

ενεργοποιηθεί, διασπά την πρωτεΐνη του γάλακτος κ-καζεΐνη σε ένα συγκεκριμένο σημείο και επιφέρει πήξη, η οποία είναι το πρώτο βήμα στην παραγωγή τυριού. Με την πήξη του γάλακτος λαμβάνεται ένα στερεό προϊόν που ονομάζεται τυρόπηγμα. Το τυρόπηγμα επεξεργάζεται στη συνέχεια για την παρασκευή τυριού (Persson, 2003). Η αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής τυριού, σε συνδυασμό με τη μείωση του αριθμού των σφαγμένων μοσχαριών, ώθησε στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών χυμοσίνης.

Η καθαρή, διαλυτή και ενεργή χυμοσίνη έχει συνεχή ζήτηση για τη γαλακτοβιομηχανία. Ωστόσο, οι φυσικές πηγές δεν είναι συχνά πληρούν τις επιθυμητές απαιτήσεις ποιότητας και ποσότητας. Επομένως, για να καλυφθεί η βιομηχανική ζήτηση της χυμοσίνης, η γενετική η γενετική μηχανική επέτρεψε την παραγωγή χυμοσίνης σε υψηλότερο επίπεδο από βακτήρια (E. coli), ζύμες (Kluveryomyces lactis) και μύκητες (Aspergillus niger var. awamori) ως διαφορετικούς μικροβιακούς ξενιστές. Η Επιτροπή Τροφίμων και Drug Administration (FDA) έχει καθορίσει την ανασυνδυασμένη χυμοσίνη ως GRAS για χρήση στη βιομηχανία τυριού. Μετά την ολοκληρωμένη ανασκοπήση της δημοσιευμένης βιβλιογραφίας, ο FDA κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο της χυμοσίνης μοσχαριού που έχει κλωνοποιηθεί και εκφραστεί σε E. coli k-12, ήταν δυσδιάκριτη από το τις αντίστοιχες φυσικές μορφές της και οι προσμίξεις στο παρασκεύασμα μικροβιακής χυμοσίνης δεν το καθιστούσαν μη ασφαλές. Αρκετές εμπορικοί οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των Pfizer, Chr. Hansen, Milwaukee (Chy-max), DSM Food Specialties (Maxiren) και Genencor International Inc. (Chymostar) έχουν επίσης ξεκινήσει προσπάθειες για την παραγωγή ανασυνδυασμένης χυμοσίνης που παράγεται από ζύμωση με την έκφραση γονιδίου προχυμοσίνης σε διάφορους μικροβιακούς ξενιστές (Wong, 2016). Η ανασυνδυασμένη χυμοσίνη έχει πολυάριθμα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες αντίστοιχες, όπως χαμηλή πρωτεολυτική δραστικότητα, προβλέψιμη συμπεριφορά πήξης, kosher πιστοποίηση, έγκριση για χορτοφάγους και προστασία των θρησκευτικών πεποιθήσεων και των δικαιωμάτων των ζώων. Ο κύριος λόγος για τη δημοτικότητά της είναι η υψηλότερη απόδοση λόγω της μικρότερης ποσότητας πρωτεόλυσης (100% χυμοσίνη), ενώ η πυτιά του μοσχαριού έχει 10-20% πεψίνη η οποία είναι περισσότερο πρωτεολυτική λόγω κάποιων απωλειών πεπτιδίων σε στο ρεύμα ορού γάλακτος. Η συνήθης στρατηγική που χρησιμοποιείται για την έκφραση ενός ευκαρυωτικού γονιδίου σε έναν προκαρυώτη περιλαμβάνει την απομόνωση του

ολικού RNA και του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, όπου το mRNA μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA από από το οποίο αποκόπτονται ιντρόνια και στη συνέχεια κλωνοποιούνται και εκφράζονται σε κατάλληλο ξενιστή. Η επιλογή ενός εκφραστή συστήματος για την υπερπαραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής ανάπτυξης, το επίπεδο έκφρασης, την ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική έκφραση, μετα-μεταφραστική τροποποίηση, και τη βιολογική δραστηριότητα της πρωτεΐνης (Demain & Vaishnav, 2009). Το τυρί που παρασκευάζεται με χυμοσίνη είναι υψηλότερης ποιότητας σε σύγκριση με τις άλλες πηγές.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τελευταία γίνονται προσπάθειες για παραγωγή βιοδραστικής ανασυνδυασμένης χυμοσίνης βοοειδών από φυτά. Η έκφραση της χυμοσίνης σε φυτά θα μπορούσε να συμβάλει στην αντιμετώπιση της μη επαρκής παραγωγής χυμοσίνης, δεδομένου ότι το ΓΤ φυτό προσφέρει μια πρόσθετη πηγή εφοδιασμού και η παραγωγή του μπορεί δυνητικά σε χαμηλό κόστος. Τα πιο διαδεδομένα φυτά είναι ο καπνός, ο λιναρόσπορος και η ελαιοκράμβη, με τα δυο τελευταία να δίνουν την μεγαλύτερη απόδοση (Wei et al., 2016)

6. Πηκτινάσες

Η πηκτίνη, ένας ετεροπολυσακχαρίτης, είναι ένα από τα κύρια συστατικά των φρούτων και λαχανικών. Με βάση τα ενεργά τους κέντρα, οι πηκτινάσες ταξινομούνται σε υδρολάσες, εστεράσες και λυάσες. Διάφορα ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων των πηκτινεστεράσων, ενδο- και εξω-πολυγαλακτουρονιδάσες και λυάσες της πηκτίνης, παράγονται συνήθως από τον A. niger. Τα ένζυμα αυτά αποικοδομούν την πηκτίνη. Έτσι, χρησιμοποιούνται στην παραγωγή οίνου και χυμών φρούτων, χρησιμοποιούνται για τη μείωση ιξώδους του χυμού πριν από την έκθλιψη και βελτιώνουν επίσης τη διαύγαση (D. K. Verma et al., 2018). Η παραγωγή πηκτινάσης καταλαμβάνει περίπου το 10% του συνολικής παραγωγής ενζύμων. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων κυρίως για την παραγωγή χυμών και κρασιού (Semenova et al., 2006).

Η πιο κοινή πηγή ανασυνδυασμένης πηκτινάσης που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων περιλαμβάνει κυρίως πηκτινάσες που προέρχονται από μύκητες, όπως οι ποικιλίες Aspergillus,

Penicillium και Trichoderma. Οι ανασυνδυασμένες πηκτινάσες που προέρχονται από Bacillus χρησιμοποιούνται κυρίως για βιομηχανικούς σκοπούς. Η χρήση ιδιαίτερα αποτελεσματικών πηκτινάσων με ιδιαίτερες ιδιότητες υπό τον έλεγχο του υποκινητή σε διάφορους ξενιστές έκφρασης έχει γίνει σε Escherichia coli, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae, P. Griseoroseum. Η συγκριτική ανάλυση της απόδοσης, της θερμοσταθερότητας και της ανοχής στο pH αυτών των ενζύμων βοηθά σημαντικά στην επικύρωση της χρήσης τους σε διάφορους τομείς. Η ανασυνδυασμένη έκφραση του γονιδίου του θερμοαλκαλικού Pel (BacPelA) από το Bacillus clausii σε E. coli οδήγησε σε ανασυνδυασμένο ώριμο BacPelA με ενζυμική δραστικότητα 8378,2 U ml-1 (A235) με καλλιέργεια υψηλής πυκνότητας κυττάρων σε ζύμωση τροφοδοτούμενης παρτίδας με παραγωγικότητα 239,4 U ml-1 h-1 και αυτό αποτελεί την υψηλότερη απόδοση Pel που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα (L. Li et al., 2021). Σε μια άλλη μελέτη, ο ανασυνδυασμένος Aspergillus που εκφράζεται στο P. pastoris πέτυχε μέγιστη δραστικότητα 2408,70 U ml-1 στο υπερκείμενο της καλλιέργειας με ζύμωση παρτίδας υψηλής πυκνότητας κυττάρων, που ισοδυναμεί με 4,8 φορές μεγαλύτερη απόδοση από εκείνη της καλλιέργειας σε φιάλη ανακίνησης (Abdulrachman et al., 2017). Η έκφραση με βάση το P. pastoris στα οξέα γονιδίου ενδο-πολυγαλακτουρονάσης από το Penicillium oxalicum παρήγαγε απόδοση 1828,7 U ml-1 (Shan Qin et al., 2017). Ο μεγάλος χρόνος υστέρησης σε μέσο βασικών αλάτων (BSM) και μια εμφάνιση πρωτεόλυσης που σχετίζεται με την παραγωγή ανασυνδυασμένης πηκτινάσης στο P. pastoris KM71 έχει βρεθεί ότι μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση συνθετικού μέσου FM22 για εμβόλιο και τον έλεγχο της πρωτεόλυσης με ανάπτυξη σε χαμηλότερο pH (Rebello et al., 2017).

Το ανασυνδυασμένο P. griseoroseum T20 που παρήχθη με μετασχηματισμό του P. griseoroseum με το πλασμίδιο pAN52pgg2, το οποίο περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την PG του P. griseoroseum, υπό τον έλεγχο του γονιδίου υποκινητή gpd από τον Aspergillus nidulans, έδωσε 266 και 27 φορές μεγαλύτερα επίπεδα πηκτινικής λυάσης (PL) και πολυγαλακτουρονάσης (PG) αντίστοιχα από το στέλεχος άγριου τύπου (Teixeira et al., 2000). Η χρήση του υποκινητή του γονιδίου gpd αντί του υποκινητή του Penicillium, ενίσχυσε σημαντικά την παραγωγή πηκτινάσης. Οι προσπάθειες για τη δημιουργία ανθεκτικών μεταλλαγμένων στελεχών στην καταστολή καταβολισμού του Penicillium griseoroseum με αυθόρμητες μεταλλάξεις με χρήση

υπεριώδης ακτινοβολίας είχαν ως αποτέλεσμα την 7,8-πλάσια αύξηση της παραγωγής πηκτινάσης σε σχέση με το άγριο στέλεχος (Wu et al., 2018).

6.1 Πεκτινλυάση

Οι πηκτινάσες είναι μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν πηκτινικές ουσίες αποικοδόμησης μέσω της διαδικασίας του αποπολυμερισμού (υδρολάσες και λυάσες) και αντιδράσεων αποεστεροποίησης (εστεράσες). Η πεκτινλυάση καθορίζεται ότι περιέχει δύο τύπους πηκτινάσης, την ενδο-PG και την ενδο-πεκτίνη λυάση μαζί με τον παράγοντα διέγερσης της εκχύλισης. Στην ενζυμολογία, η πηκτινική λυάση, γνωστή και ως πηκτολιάση, είναι μια φυσική πηκτινάση που αποικοδομεί την πηκτίνη. Το ένζυμο αυτό ανήκει στην οικογένεια των λυασών, συγκεκριμένα στις λυάσες άνθρακα-οξυγόνου που δρουν σε πολυσακχαρίτες. Παράγεται εμπορικά για τη βιομηχανία τροφίμων κυρίως από μύκητες όπου χρησιμοποιείται για την καταστροφή του υπολειμματικού αμύλου φρούτων (πηκτίνη), στο κρασί και μηλίτη (Dekker, 1994). Στην καλλιέργεια φυτικών κυττάρων, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το ένζυμο κυτταρινάση για τη δημιουργία πρωτοπλαστών με την αποικοδόμηση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Συνεπώς, έχει μεγάλη σημασία στη βιοτεχνολογία των φυτών (Yadav et al., 2009). Η πηκτινική λυάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει επίσης την χημική αντίδραση: εξαλειπτική διάσπαση του μεθυλίου της 1-4-α-D-γαλακτουρονάνης εστέρα για την παραγωγή ολιγοσακχαριτών με 4-δεοξυ-6-O-μεθυλο-α-D-γαλακτουρονόνη με 4 ενουρονοσυλομάδες στα μη αναγωγικά τους άκρα. Η πηκτινυλάση είναι ένα πολύτιμο ένζυμο που αποσκοπεί στην αύξηση της παραγωγικότητας των τροφίμων.

Η κυρίαρχη μικροβιακή πηγή της πηκτινικής λυάσης που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα είναι οι μύκητες, αν και έχουν αναφερθεί επίσης λίγα βακτήρια και ζύμες (*Fundamentals of Food Biotechnology*, 2015). Υπάρχουν λίγες αναφορές κλωνοποίησης γονιδίων λυασών πηκτίνης, κυρίως από είδη Aspergillus. Έχουν γίνει προσπάθειες κατανόησης των παραγόντων που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων της πηκτινάσης και οι αναφορές αποκαλύπτουν ότι αυτή ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο και επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το pH του μέσου, η πηγή άνθρακα, την πηκτίνη και τα πηκτινικά συστατικά (Cao, 2012). Έχουν γίνει προσπάθειες ανάλυσης της έκφρασης διαφόρων ανασυνδυασμένων γονιδίων πηκτινικής

λυάσης από ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του Penicillium citrinum που υποβλήθηκε σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Το ανασυνδυασμένο γονίδιο της πηκτινικής λυάσης αποκάλυψε την υψηλότερη δραστικότητα σε απόκριση στο χυμό ζαχαροκάλαμου (Teixeira et al. 2011). Μια μεθυλεστεράση Α της πηκτίνης από την Erwinia chrysanthemi υποβλήθηκε σε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση για ενισχυμένη θερμική σταθεροποίηση, καθιστώντας την πιο κατάλληλη για εφαρμογές σε βιοδιυλιστήριο πολτού ζαχαρότευτλων (Chakiath et al., 2009).

6.2 Πηκτινεστεράση

Οι πηκτινεστεράσες καταλύουν την αποεστεροποίηση της πηκτίνης σε πηκτάτη και μεθανόλη. Υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ μεθανόλης και γαλακτουρονικού οξέος στην εστεροποιημένη πηκτίνη. Η πηκτίνη είναι ένα από τα κύρια συστατικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Στα φυτά, οι πηκτινεστεράσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο κυτταρικό τοίχωμα κατά την ωρίμανση των καρπών. Η ενζυματική αποεστεροποίηση των πηκτινών έχει ως αποτέλεσμα μια χαμηλή μεθοξυλιωμένη πηκτίνη, η οποία παρουσία ιόντων ασβεστίου σχηματίζει ένα ισχυρό πήκτωμα. Η ενζυματική μετατροπή της υψηλής μεθοξυλιωμένης σε χαμηλή μεθοξυλιωμένη πηκτίνη καθιστά δυνατό το σχηματισμό πηκτής και μπορεί, σε προϊόντα όπως η μαρμελάδα και η κέτσαπ, να καταστήσει δυνατή την περαιτέρω προσθήκη πηκτής. Η εστεράση της πηκτίνης συσφίγγει επίσης τα φρούτα και τα λαχανικά μετά την έγχυσή της στον ιστό τους (Deckers et al., 2020). Η ετερόλογη πηκτινική εστεράση παράγεται από το στέλεχος IF0 4177 του Aspergillus oryzae που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την εστεράση πηκτίνης από τον Aspergillus aculeatus. Η κασέτα έκφρασης αποτελείται από το γονιδιο προωθητή της αμυλάσης TAKA του A. oryzae, ακολουθούμενη από το γονίδιο της πηκτινικής εστεράσης του A. aculeatus και την αλληλουχία τερματισμού του γονιδίου της γλυκοαμυλάσης του A. niger. Το προκύπτον ενζυμικό παρασκεύασμα κυκλοφορεί στην αγορά με την εμπορική ονομασία Rheozyme, που χρησιμοποιείται για τη ζελατινοποίηση φυτικών υλικών, την πύκνωση φυτικών παρασκευασμάτων, τη σκλήρυνση φρούτων και λαχανικών και την ελεγχόμενη απομεθυλίωση υψηλής περιεκτικότητας μεθοξυλιωμένων πηκτινών. Μπορεί να βρεθεί σε παρασκευάσματα φρούτων, κομπόστα, μηλίτη, μαρμελάδα και ντομάτες (Sajjaanantakul & Pitifer, 1991).

7. Λακτάσες

Η β-γαλακτοσιδάση, κοινώς γνωστή ως λακτάση, είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για την υδρόλυση της λακτόζης. Το ένζυμο αυτό έχει ευρείες εφαρμογές στις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων. Η παρουσία υπερβολικής λακτόζης στο έντερο οδηγεί συνήθως σε αφυδάτωση των ιστών και μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου λόγω της χαμηλής οξύτητας που προκαλεί διάρροια, μετεωρισμό και κράμπες (Carrara & Rubiolo, 1994). Η απορρόφηση της λακτόζης απαιτεί τη δραστηριότητα του ενζύμου λακτάση, που βρίσκεται στο λεπτό έντερο και λειτουργεί διασπώντας τον δεσμό που συνδέει τα δύο σάκχαρα (μονοσακχαρίτες). Η ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου στο έντερο οδηγεί σε δυσανεξία στη λακτόζη και τα άτομα που πάσχουν από αυτήν αδυνατούν να καταναλώσουν γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιπλέον, η ικανότητα αυτού του ενζύμου να παράγει ένα έγχρωμο προϊόν κατά τη διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης έχει αποκτήσει τη σημασία του στη μοριακή βιολογία.

Η κεντρική περιοχή είναι καταλυτικά ενεργή και αποτελείται από τις υπομονάδες του τετραμερούς. Η διάσπαση του τετραμερούς σε διμερή αδρανοποιεί το ενεργό κέντρο. Η αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο αυτού του ενζύμου αποτελείται από α-πεπτίδιο το οποίο εμπλέκεται στην α-συμπληρωματικότητα και παίζει ρόλο στη διεπαφή των υπομονάδων. Ως ένζυμο, η β-γαλακτοσιδάση διασπά τον δισακχαρίτη λακτόζη για την παραγωγή γαλακτόζης και γλυκόζης, οι οποίες στη συνέχεια εισέρχονται τελικά στη γλυκόλυση. Το ένζυμο αυτό προκαλεί επίσης αντίδραση διαγαλακτοζυλίωσης της λακτόζης προς αλλολακτόζη η οποία στη συνέχεια διασπάται τελικά σε μονοσακχαρίτες. Κατά τη σύνδεση με τον καταστολέα lacZ, αυτή η αλλολακτόζη ρυθμίζει την ποσότητα της β-γαλακτοσιδάσης στο κύτταρο δημιουργώντας θετική ανατροφοδότηση.

Βιομηχανικά, η β-γαλακτοσιδάση έχει διάφορες εφαρμογές. Εκτός από την παραγωγή προϊόντων χωρίς λακτόζη για άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, οι β-γαλακτοσιδάσες χρησιμοποιούνται επίσης για την επίλυση προβλημάτων διάθεσης ορού γάλακτος σε εμπορική κλίμακα (Lipovová et al., 2021). Η λακτόζη είναι υγροσκοπική και προκαλεί κρυστάλλωση στα τρόφιμα- ως εκ τούτου, οι β-γαλακτοσιδάσες χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση της λακτόζης ώστε να επιλύεται η κρυστάλλωση που σχετίζεται με τη λακτόζη σε κατεψυγμένα,

συμπυκνωμένα επιδόρπια. Αυτή η επεξεργασία συνήθως μειώνει την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη για να χρησιμοποιηθεί από άτομα με δυσανεξία.

Επιπλέον, ο γαλακτοκομικός ορός γάλακτος, υποπροϊόν της τυροκομίας, συνήθως επεξεργάζεται με αυτό το ένζυμο. Η απόρριψη του ορού γάλακτος έχει γίνει ένα σοβαρό περιβαλλοντικό ζήτημα, δεδομένου ότι απορρίπτεται σε υδάτινα ρεύματα, προκαλώντας έτσι σοβαρή ρύπανση των υδάτων (Brandão et al., 1987). Η β-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιείται για την επεξεργασία του ορού γάλακτος για τη μετατροπή του σε χρήσιμα προϊόντα όπως αιθανόλη και σιρόπι που έχει περαιτέρω ευρύ φάσμα εφαρμογών στη ζαχαροπλαστική, την αρτοποιία και άλλες βιομηχανίες. Οι πηγές των β-γαλακτοσιδασών είναι μικροβιακής, φυτικής και ζωικής προέλευσης. Ωστόσο, συνήθως οι μικροβιακές πηγές παρουσιάζουν υψηλότερη παραγωγικότητα και, κατά συνέπεια, η χρήση τους οδηγεί σε μείωση του κόστους. Η επιλογή των πηγών εξαρτάται από τις απαιτούμενες συνθήκες αντίδρασης- για παράδειγμα, οι βακτηριακές β-γαλακτοσιδάσες λειτουργούν με βέλτιστο pH μεταξύ 2,5 και 5,4 και χρησιμοποιούνται κυρίως για την όξινη υδρόλυση ορού γάλακτος. Αντίθετα, η β-γαλακτοσιδάση ζύμης παρουσιάζει μέγιστη δραστικότητα σε pH 6,0-7,0, το οποίο είναι πιο κατάλληλο για την υδρόλυση του γάλακτος και του γλυκού ορού γάλακτος (Ramos & Malcata, 2011).

Πολλαπλές ορθολογικές και μη ορθολογικές στρατηγικές έχουν εφαρμοστεί για τη μηχανική των β-γαλακτοσιδασών. Τα οφέλη των αλλαγών είναι η υψηλή απόδοση τρανς-γλυκοζυλίωσης, η διευρυμένη εξειδίκευση υποστρώματος, οι προσαρμοσμένες δομές προϊόντων, η αυξημένη θερμική σταθερότητα και η μειωμένη αναστολή του προϊόντος.

Η κατευθυνόμενη τοποειδική μεταλλαξιγένεση εκτός του καταλυτικού υπολείμματος μπορεί επίσης να βελτιώσει τις ιδιότητες της διαγαλακτοζυλίωσης. Οι μεταλλάξεις Y296F, F417S και F417Y προέκυψαν μέσω ορθολογικής σχεδιαστικής μηχανικής της β-γλυκοσιδάσης GH1 από το Halothermothrix orenii, οι οποίες αύξησαν την παραγωγή GOS από 39,3% σε περισσότερο από 50%. Επιπλέον, δύο μεταλλάξεις F359Q και F441Y οι οποίες προέκυψαν από μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης της β-γαλακτοσιδάσης από το S. solfataricus P2 αποδείχθηκε ότι παράγουν 58,3% και 61,7% GOS, ενώ το εγγενές ένζυμο έκανε 50,9% (Movahedpour et al., n.d.).

Γενικά, οι β-γαλακτοσιδάσες έχουν αυστηρή εξειδίκευση στο τμήμα γαλακτόζης του γλυκοζυλικού δότη, εκτός από τα ένζυμα της οικογένειας GH1. Ωστόσο, η ειδικότητα αυτή μπορεί να τροποποιηθεί με τη μηχανική των ενζύμων. Οι προκύπτουσες τροποποιημένες β-γαλακτοσιδάσες μπορούν να μετατραπούν σε άλλες γλυκοσιδάσες, όπως η β-φουκοσιδάση και η β-γλυκουρονιδάση, οι οποίες δρουν σε υποστρώματα που περιέχουν φουκόζη και γλυκουρονικό οξύ, αντίστοιχα (Mangiagalli & Lotti, 2021).

Το γονίδιο lacZ (γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση) από την E. coli μετατράπηκε σε αποτελεσματική β-φουκοσιδάση με ανακάτεμα του DNA και διαλογή μέσω χρωμογόνων υποστρωμάτων φουκόζης. Σε κάθε γύρο ανακατέματος, μόνο οι αποικίες που παρουσίαζαν ενισχυμένη δραστικότητα φουκοσιδάσης επιλέγονταν ως πρότυπα για τον επόμενο γύρο ανακατέματος για τη συσσώρευση ευεργετικών μεταλλάξεων. Η καθαρισμένη φουκοσιδάση εμφάνισε 1000 φορές αυξημένη ειδικότητα για το ορθονιτροφαινυλο-β-d-φουκοπυρανοσίδιο (oNP-fuc) και 300 φορές αυξημένη ειδικότητα για το 4-νιτροφαινυλο-α-l-φουκοπυρανοσίδιο (pNP-fuc) σε σύγκριση με το ορθονιτροφαινυλο-β-γαλακτοσίδιο (oNP-Gal) και το p-νιτροφαινυλο-β-d-γαλακτοσίδιο (pNP-Gal), αντίστοιχα. Αργότερα, ο ημιεπαγωγικός σχεδιασμός της lacZ παρήγαγε πιο αποτελεσματικές β-φουκοσιδάσες μέσω της ανάλυσης των κρυσταλλικών δομών του συμπλόκου ενζύμου-γαλακτόζης (J.-H. Zhang et al., 1997).

Οι β-γαλακτοσιδάσες έχουν διαφορετικές προτιμήσεις για διάφορους αποδέκτες παρά την ευελιξία προς τις δομές των αποδεκτών. Γενικά καταλύουν το σχηματισμό O-γλυκοσιδικών δεσμών μεταξύ γαλακτόζης και αλκοολικών υδροξυλικών ομάδων των αποδεκτών, ενώ σπάνια αναφέρθηκε η γλυκοζυλίωση φαινολικών υδροξυλικών ομάδων ή η σύνθεση γλυκοζιτών εκτός του δεσμού O. Η ενζυματική γλυκοζυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου φαίνεται να είναι πιο δύσκολη από εκείνη του αλκοολικού υδροξυλίου λόγω της χαμηλής πυρηνόφιλίας του. Πρόσφατα, ο ορθολογικός σχεδιασμός της β-γαλακτοσιδάσης L3 του L. bulgaricus L3 ενίσχυσε την προτίμησή της για φαινολικές υδροξυλικές ομάδες.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις απαιτούν επίσης μεγαλύτερη λειτουργική σταθερότητα, ιδίως οι βιομηχανικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η

μεταλλαξιγένεση του BgaD-D είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας τριπλής μετάλλαξης (K166P, G307P, A833P) με καλύτερη θερμική σταθερότητα στους 60°C.

Οι περισσότερες β-γαλακτοσιδάσες αναστέλλονται από τη γαλακτόζη που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση της λακτόζης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η σύνδεση της γαλακτόζης με το ένζυμο μπορεί να εμποδίσει τη λακτόζη να φθάσει στο ενεργό κέντρο. Ο ορθολογικός σχεδιασμός των β-γαλακτοσιδασών μπορεί να μειώσει την ανταγωνιστική αναστολή της γαλακτόζης. Το μοτίβο Asp258-Ser-Tyr-Pro-Leu-Gly-Phe264 της β-γαλακτοσιδάσης του Aspergillus niger, το οποίο μπορεί να εμπλέκεται στη δέσμευση της γαλακτόζης, μεταλλάχθηκε τυχαία για να παραχθεί μια μετάλλαξη αναίσθητη στη γαλακτόζη που περιέχει το τροποποιημένο μοτίβο Asp258-Phe-Tyr-Thr-Ser-Ser-Phe264 (Huber, 2001).

Πίνακας 2: *Παραδείγματα χρήσεων των ενζύμων στη βιομηχανία τροφίμων*

Εφαρμογή	Ένζυμο	Καταλυτική δράση	Αποτέλεσμα	Βιβλιογραφία
Προϊόντα αρτοποιίας	Λιπάσες	Υδρόλυση λιπιδίων	Βελτίωση του χειρισμού της ζύμης, ενίσχυση της αντοχής και της σταθερότητας της ζύμης, αύξηση της ελαστικότητας του ψωμιού και του ειδικού όγκου	(Sarmah et al., 2018)
	Ημικυτταρινάσες	Υδρόλυση των ημικυτταρινών	Βελτιωμένη κατανομή του αλεύρου και του νερού, πιο μαλακή, εύκαμπτη και σταθερή ζύμη που χειρίζεται ευκολότερα, βελτιωμένες οργανοληπτικές ιδιότητες και μεγαλύτερος όγκος ψωμιού.	(Yi, 2021)
Γαλακτοκομικά	Πρωτεάσες	Υδρόλυση πρωτεϊνων	Διαχωρισμός του γάλακτος σε στερεή (τυρόπηγμα) και υγρή (ορός γάλακτος) φάση στην τυροκόμηση	(Ward et al., 2009)
	Λυσοζύμες	Υδρόλυση των πεπτιδογλυκανών στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram+ βακτηρίων	Αδρανοποίηση των βακτηρίων που προκαλούν αλλοίωση στα τυροκομικά προϊόντα, προκαλώντας "καθυστερημένο φούσκωμα"	(H. Zhao et al., 2014)

Χυμοί φρούτων και λαχανικών	Πηκτινάσες	Υδρόλυση των πηκτινών (πολυσακχαρίτης στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών)	Μειωμένο ιξώδες του χυμού φρούτων, υψηλότερες αποδόσεις ανάκτησης και διαυγασμού του χυμού	(Rebello et al., 2017)
Κρεατικά και ιχθυρά	Τρανσγλουταμινάσες	Διασύνδεση πρωτεϊνών	Βελτίωση της υφής, της συνεκτικότητας και της διάρκειας ζωής των προϊόντων κρέατος, σκληρότερη πάστα πρωτεΐνης ψαριού	(Kuraishi et al., 2001)
Γλυκαντικές ύλες	Αμυλάσες	Υδρόλυση αμύλου	Παραγωγή μεγάλης ποικιλίας σακχάρων και σιροπιών ζάχαρης από άμυλο	(Tiwari et al., 2015)
Κρασί	Πηκτινάσες και ημικυτταρινάσες	Υδρόλυση πηκτίνης και ημικυτταρινών (συστατικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος)	Βελτιωμένη εκχύλιση και διαυγασμός χυμού σταφυλιών για την οινοποίηση	(Deckers et al., 2020)
Μπίρα	Αμυλάσες	Υδρόλυση αμύλου	Αυξημένη συγκέντρωση ζυμώσιμων σακχάρων και ως εκ τούτου, υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης στις μπύρες	(Tiwari et al., 2015)

8. Άλλα ένζυμα

8.1 Τρανσγλουταμινάση

Η τρανσγλουταμινάση είναι ένα ένζυμο διασταύρωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία κρέατος για τη βελτίωση της την υφή, τη γεύση και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων κρέατος. Αυτό το ένζυμο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε κακής ποιότητας μυς, όπως τα τεμάχια, για να τα συνδυάσει και να σχηματίσει ολόκληρα κρέατα. Η παραγωγή του τρανσγλουταμινάσης από Streptomyces spp. έχει σημαντικά υψηλή απόδοση και, ως εκ τούτου, τα στελέχη που ανήκουν στα είδη αυτά, ιδίως στο Streptomyces mobaraensis, χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την βιομηχανική παραγωγή τρανσγλουταμινάσης (D. Zhu et al., 2019). Για τον ίδιο λόγο, διάφορες μελέτες έχουν για την ανάπτυξη αποτελεσματικών ετερόλογων συστημάτων για την παραγωγή υψηλής απόδοσης της τρανσγλουταμινασών από Streptomyces spp. και οι μηχανικές προσεγγίσεις έχουν έχουν εφαρμοστεί για τη δημιουργία νέων, βελτιωμένων παραλλαγών. Για παράδειγμα, η διαγραφή των τεσσάρων πρώτων αμινοξέων στο N-τελικό άκρο σε συνδυασμό με την υποκατάσταση Glu5Asp στην πρωτεΐνη Streptomyces hygroscopicus transglutaminase δημιούργησε μια παραλλαγή του ενζύμου με ειδική δραστικότητα που ήταν 1,85 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με το ένζυμο άγριου τύπου. Η προσθήκη, στο ίδιο ένζυμο, πεπτιδίων συνδέσμων στο C-τελικό άκρο παρήγαγε παραλλαγές με ειδική δραστικότητα έως και 1,5 φορές υψηλότερη. Επιπλέον, η αντικατάσταση Ser199Ala σε συνδυασμό με προσθήκη τετραπεπτιδίου στο N-τελικό άκρο της τρανσγλουταμινάσης του S. mobaraensis δημιούργησε μια παραλλαγή με ειδική δραστικότητα 1,7 φορές υψηλότερη από το ένζυμο άγριου τύπου (*Fundamentals of Food Biotechnology*, 2015). Επίσης, η τυχαία μεταλλαξιγένεση που εφαρμόστηκε στο ίδιο ένζυμο επέτρεψε την ταυτοποίηση τόσο θερμοσταθερών όσο και θερμοευαίσθητων παραλλαγών, οι οποίες θα μπορούσαν να είναι χρήσιμες για διάφορες εφαρμογές στη βιομηχανία κρέατος.

8.2 Τρανσγλουκοσιδάση

Οι τρανσγλουκοσιδάσες μεταφέρουν ένα κατάλοιπο α-D-γλυκοσυλίου σε μια 1,4-α-D-γλυκάνη στην πρωτογενή υδροξυομάδα της γλυκόζης, ελεύθερης ή συνδυασμένης σε 1,4-α-D-γλυκάνη. Το γονίδιο της τρανσγλουκοσιδάσης από τον Aspergillus niger εκφράζεται ετερόλογα στο

στέλεχος RLP37 του Trichoderma reesei, το οποίο έχει τροποποιηθεί γενετικά με τη διαγραφή πολλών γονιδίων κυτταρινάσης. Η κασέτα έκφρασης περιέχει το DNA που κωδικοποιεί την ώριμη εκκρινόμενη πρωτεΐνη τρανσγλουκοσιδάση του A. niger, συγχωνευμένη με το πεπτίδιο σήματος CBHI του T. reesei, για ενισχυμένη έκκριση. Αυτό το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης πλαισιώνεται από τις αλληλουχίες υποκινητή και τερματιστή του T. Reesei cellobiohydrolase 1 (cbhl) .Η τρανσγλουκοσιδάση από το A. niger δρα μόνο σε ολιγοσακχαρίτες με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού. Αυτή η τρανσγλουκοσιδάση καταλύει τόσο την υδρόλυση όσο και τη μεταφορά των α-D-γλυκοολιγοσακχαριτών, με αποτέλεσμα μια ποικιλία προϊόντων (Goffin et al., 2010). Η μεταφορά συμβαίνει συχνότερα στην HO-6, παράγοντας ισομαλτόζη από D-γλυκόζη και πανόζη από μαλτόζη. Η τρανσγλουκοσιδάση μπορεί επίσης να μεταφερθεί στην HO-2 ή HO-3 της D-γλυκόζης για να σχηματίσει kojibiose ή nigerose, ή πίσω στην HO-4 για τον σχηματισμό μαλτόζης. Η δράση στη μαλτόζη παράγει ισομοριακή συγκέντρωση της πανόζης και της γλυκόζης. Ως αποτέλεσμα της κατάλυσης της τρανσγλυκοσιδάσης, οι μαλτο-ολιγοσακχαρίτες μετατρέπονται σε ισομαλτο-ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν υψηλά ποσοστά καταλοίπων γλυκοζυλίου συνδεδεμένων με δεσμό α-D-1,6 από το μη αναγωγικό άκρο. Ως εκ τούτου, τα μη ζυμώσιμα σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένης της ραφινόζης και της σταχυόζης, μετατρέπονται σε σακχαρόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να υποστούν ζύμωση και να μετατραπούν σε αλκοόλη. Ως εκ τούτου, το παρασκεύασμα χρησιμοποιείται ως βοήθημα επεξεργασίας στην παραγωγή σιροπιού ισομαλτο-ολιγοσακχαριτών από άμυλο και αλκοόλης από μελάσα.

8.3 Ξυλανάση

Οι ξυλανάσες υδρολύουν τους 1,4-b-D-ξυλοσιδικούς δεσμούς στον κορμό της αραβινοξυλάνης. Ο γραμμικός πολυσακχαρίτης 1,4-b-D-ξυλάνη είναι συστατικό των ημικυτταρινών, των κύριων συστατικών των φυτικών κυττάρων. Οι αραβινοξυλάνες είναι εξαιρετικά διακλαδισμένες ξυλάνες που απαντώνται σε διάφορα δημητριακά και υπάρχουν τόσο σε διαλυτή όσο και σε αδιάλυτη μορφή. Το γονίδιο της ενδο-1,4-β-ξυλανάσης από τον Thermomyces lanuginosus έχει μεταφερθεί σε ένα επιλεγμένο στέλεχος του Fusarium venenafum (εμπορική ονομασία NOVOZYM 899) καθώς και στο Aspergillus oryzae (Rosales et al., 2018). Η ξυλανάση από το T.

lanuginosus βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή και του τερματιστή του γονιδίου της τρυψίνης του F. Oxysporum (Shrivastava et al., 2011). Το παραγόμενα ετερόλογα παρασκευάσματα ενζύμων ξυλανάσης χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως βοηθητικό μέσο επεξεργασίας στην αρτοποιία. Η υδρόλυση των ξυλοσιδικών δεσμών σε μια ραχοκοκαλιά αραβινοξυλάνης έχει ως αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό της αραβινοξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες. Αυτό αυξάνει την ελαστικότητα του δικτύου γλουτένης, βελτιώνοντας το χειρισμό των της ζύμης.

8.3 Φυτάση

Φυτάση (φωσφοϋδρολάση της εξακρινοφωσφορικής μυοϊνοσιτόλης) είναι κάθε είδος ενζύμου φωσφατάσης που καταλύει την την υδρόλυση του φυτικού οξέος (εξακρινοφωσφορική μυο-ινοσιτόλη), μιας άπεπτης οργανικής μορφής φωσφόρου που βρίσκεται στα δημητριακά και στους ελαιούχους σπόρους, και απελευθερώνει μια χρήσιμη μορφή ανόργανου φωσφόρου (Mullaney et al., 2000). Η 4-φυτάση, επίσης ονομάζεται 6-φυτάση, μεσολαβεί στην ακόλουθη αντίδραση: Μια ετερόλογη 6-φυτάση από το Peniophora lycii παράγεται ετερόλογα στο στέλεχος Pz-3 του Aspergillus oryza (FSANZ A371). Η έκφραση τελεί υπό τη ρύθμιση του υποκινητή Pna2/TPI, που κατασκευάζεται από τον υποκινητή της ουδέτερης αμυλάσης ΙΙ από τον A. niger, όπου το μη μεταφρασμένο τμήμα έχει αντικατασταθεί με το μη μεταφρασμένο τμήμα του υποκινητή της ισομεράσης της φωσφορικής τριόζης (TPI) του Aspergillus nidulans (Guerrand, 2018, p. 26). Στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία το ενζυμικό αυτό παρασκεύασμα εφαρμόζεται ως βοήθημα επεξεργασίας αμύλου. Διαφορετικά, είναι γνωστό ως πρόσθετο ζωοτροφών για την πάχυνση μονογαστρικών ζώων, βελτιώνοντας τη χρήση του φωσφόρου σε ζώα που τρέφονται με δίαιτες βασισμένες σε δημητριακά (εμπορική ονομασία Bio-Feed).

Πίνακας 3: *Ανασυνδυασμένα ένζυμα, η προέλευση τους, η βελτίωση σε σχέση με τα ένζυμα αγρίου τύπου και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την απόκτηση τους.*

Ένζυμο	Προέλευση	Ξενιστής	Φορέας	Βελτίωση	Μέθοδος	Χρήση	Βιβλιογραφία
α-αμυλάση	B. Licheniformis	B. Licheniformis	pET-amy	Σταθερότητα σε χαμηλό ph	Ep-PCR	ρευστοποίηση του αμύλου, σακχαροποίηση και ζύμωση	(Y. Liu, Huang, et al., 2017)
α-αμυλάση	Rizopus Oryzae	K. lactis	plasmid pKLAC1	Βέλτιστο ph, θερμοκρασία	S.S.M.	Παραγωγή σιροπιού μαλτόζης	(S. Li et al., 2018)
Β-γλυκοσιδάση	Asp. Aculeatus	Aspergillus oryzae niaD300	pNAN8142	Υδρολιτική απόδοση	S.S.M.	σακχαροποίηση βαγάσσας	(Baba et al., 2016)
Ενδο-β-1,4-ξυλανάση	Άχυρα σιταριού	L. brevis DSM 1269	pET21b	Ειδική δραστικότητα	S.D.M.	Παραγωγή ξυλο-ολιγοσακχαριτών, αρτοποιία	(Faryar et al., 2015)
β-1,3-1,4-γλυκανάση	Bacillus sp. SJ-10	E. coli BL21	pETbg1314	Θερμοσταθερότητα, καταλυτική απόδοση	S.D.M.	Ζύμωση μπίρας, Παρασκευή κριθαριού	(J. M. Lee et al., 2017)
Ινβερτάση	Saccharomyces cerevisiae	Pichia pastoris	pUC 57	Θερμοσταθερότητα, καταλυτική απόδοση	S.D.M.	Υδρόλυση σακχαρόζης	(Mohandesi et al., 2017)
Μεταλλοπρωτεάση PT121	Pseudomonas aeruginosa	Escherichia coli BL21	pET22b-Y114S	απόδοση	S.D.M.	Καταλύτης για τη σύνθεση Z-ασπαρτάμης	(F. Zhu et al., 2018)
Όξινη πρωτεάση	A. oryzae (από πολτό πατάτας)	A. oryzae RIB40	-	απόδοση	UV μεταλλαξιγένεση	Καρυκεύματα, ζύμωση της σάλτσας σόγιας και ως πεπτικό βοηθήμα	(Murthy & Kusumoto, 2015)
ουδέτερη πρωτεάση I (NpI)	A. oryzae	Pichia pastoris	pPIC9K/Np I	Βέλτιστη θερμοκρασία και pH	Αποκοπή (truncation)	Παραγωγή αντιυπερτασικών πεπτιδίων, αποβουτυροποίηση, και επεξεργασία ελαιολάδου	(Ke et al., 2012)
αλκαλική πρωτεάση σερίνης	Bacillus pumilus	Bacillus subtilis WB600	-	πρωτεολυτική δραστικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες	S.D.M. + error PCR	Καρυκεύματα, γαλακτοβιομηχανία, προσθήκη πρωτείνης σε ζυμαρικά	(H.-Y. Zhao & Feng, 2018)
λιπάση A	Bacillus subtilis	Saccharomyces cerevisiae	pBR322lipA	Ικανότητα ζύμωσης, ρεολογικές ιδιότητες	Σύντηξη (fussion)	διογκωτικός παράγοντας και ενίσχυση αρώματος στην αρτοποιία	(Paciello et al., 2015)

		CEN.PK113-5D					
λιπάση	Rhizopus oryzae	K. phaffii,	pGAPZα	απόδοση	N-γλυκοζυλίωση	Παραγωγή λίπων και ελαίων	(X.-W. Yu et al., 2017)
λιπάση	Malassezia globosa	Pichia pastoris X33	pGAPZaA	θερμοσταθερότητα και ειδικότητα υποστρώματος	S.D.M.	σύνθεση διακυλογλυκερολών	(Gao et al., 2014, p.)
T1 λιπάση	Geobacillus zalihae	E. coli Bl21	pET23a	θερμοσταθερότητα	S.D.M.	σύνθεση ακυλογλυκερολών και διαρθρωμένων λιπιδίων	(Tang et al., 2017)
D-αλλουλόζη 3-επιμεράση	Clostridium bolteae	E. coli BL21	pET-22b(+)	Θερμοσταθερότητα και απόδοση	S.D.M.	ισομερισμός της D-φρουκτόζης σε D-αλλουλόζη	(W. Zhang et al., 2016)
2-επιμεράση της κελλοβιοζης	Caldicellulosiruptor saccharolyticus	E. coli BL21	pET28a(+)	δραστικότητα ισομερισμού	ep-PCR	σύνθεση λακτουλόζης	(Shen et al., 2016)
φυτάση	Y. enterocolitica/ Y. kristensenii	Pichia pastoris GS115	pPIC9γ	Αντίσταση σε πεψίνη και θρυψίνη και θερμοσταθερότητα	S.D.M.	Επεξεργασία αμύλου	(C. Niu et al., 2017)
DFA I-Φρουκτοτρανσφεράση της ινουλίνης (SdIFTase)	Streptomyces davawensis	E. coli BL21	pET23a	Δραστικότητα και θερμοσταθερότητα	S.D.M.	Γλυκαντικές ουσίες	(S. Yu et al., 2017)
α-l-ραμνοσιδάση	Aspergillus niger	E. coli DH5α	pPIC9k	Θερμοσταθερότητα, απόδοση	S.D.M.	Χυμοί πορτοκαλιού	(L. J. Li et al., 2018)
ισομεράση της αμυλόζης	Geobacillus thermoglucosidans STB02	E. coli BL21	pET-20b(+)	Καταλυτική δραστικότητα	S.D.M.	Παραγωγή δεξτρίνης, αλεύρι καλαμποκιού	(Y. Liu, Ban, et al., 2017, p. 3)
Γλυκοσυλτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης	Bacillus stearothermophilus	E. coli BL21	cgt/pET-20b (+)	Καταλυτική δραστικότητα	S.S.M.	Σύνθεση 2- O-α-d-γλυκοπυρανοσυλ-l-ασκορβικού οξέος	(Tao et al., 2018)

9. Νομοθεσία

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), πολλαπλοί κανονισμοί ((ΕΚ) αριθ. 1331/2008, (ΕΚ) αριθ. 1332/2008, (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 και (ΕΚ) αριθ. 1334/2008) έχουν δημοσιευθεί για την εναρμόνιση της αξιολόγησης των ενζύμων, πρόσθετων υλών και αρωματικών υλών στα τρόφιμα. Αυτοί οι κανονισμοί απαιτούν αξιολόγηση της ασφάλειας όλων των ενζύμων, πρόσθετων και αρωματικών υλών πριν επιτραπεί η πώλησή τους στην αγορά της ΕΕ. Ως εκ τούτου, οι αιτούντες καλούνται να υποβάλουν φακέλους για όλα τα ένζυμα που πωλούνται και θα πωληθούν στην αγορά της ΕΕ. Ένα από τα βασικά κριτήρια των αξιολογήσεων ασφάλειας είναι η απουσία του στελέχους παραγωγής (είτε πρόκειται για γενετικά τροποποιημένο ή μη) στα τελικά παρασκευάσματα. Ως αποτέλεσμα αυτών των κανονισμών, η ανάγκη για κατάλληλο έλεγχο από τα εργαστήρια επιβολής της νομοθεσίας για τα παρασκευάσματα ενζύμων που κυκλοφορούν στο εμπόριο αυξάνεται (*Food Enzymes | EFSA*, n.d.).

9.1 Πρόσθετα τροφίμων ή βοηθήματα επεξεργασίας

Τα ένζυμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων ή ως βοηθήματα επεξεργασίας, ανάλογα με το αποτέλεσμα που έχουν στο τρόφιμο. Αυτές οι δύο διαφορετικές κατηγορίες οδηγούν σε διαφορετικούς κανονισμούς όσον αφορά την απαιτήσεις επισήμανσης. Ένα πρόσθετο τροφίμων προστίθεται σκόπιμα στο τρόφιμο για να ασκήσει μια τεχνολογική λειτουργία εντός του τροφίμου. Αυτό μπορεί να γίνει κατά την παρασκευή, την επεξεργασία, την προετοιμασία, τη συσκευασία, τη μεταφορά, ή την αποθήκευση του τροφίμου. Τα πρόσθετα τροφίμων απαιτούν ευρωπαϊκή έγκριση και υπόκεινται σε επισήμανση (σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1129/2011). Αυτή περιλαμβάνει αξιολόγηση κινδύνου που διενεργείται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για την Ασφάλεια των Τροφίμων Οργανισμό Τροφίμων (EFSA). Βοηθήματα επεξεργασίας είναι οι ουσίες που προστίθεται στα τρόφιμα για να ασκήσουν μια τεχνολογική λειτουργία κατά τη διάρκεια του τροφίμου αλλά όχι στο ίδιο το τελικό τρόφιμο. Τα βοηθήματα επεξεργασίας εξακολουθούν να ρυθμίζονται επί του παρόντος σε εθνικό επίπεδο στα κράτη μέλη της ΕΕ και δεν υπόκεινται σε επισήμανση (*Food Enzymes | EFSA*, n.d.).

9.2 Εξειδικευμένο τεκμήριο του καθεστώτος ασφαλείας (QPS)

Προκειμένου να υπάρξει εναρμονισμένη αξιολόγηση της ασφάλειας των ΜΟ, το τεκμήριο ασφαλείας (QPS) εισήχθη το 2003. Αυτή η προαξιολόγηση χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια των αξιολογήσεων κινδύνου που διενεργούνται από την EFSA. Το καθεστώς QPS χορηγείται μετά από εντατική βιβλιογραφική έρευνα, με βάση την ταξινομική ταυτοποίηση, το ιστορικό χρήσης, την παθογένεια και την τελική χρήση του είδους. Το καθεστώς QPS μπορεί επίσης να χορηγηθεί σε στελέχη ΓΤΜ, εάν το στέλεχος-δέκτης πληρεί τις προϋποθέσεις για το καθεστώς QPS και οι γενετικές τροποποιήσεις δεν προκαλούν ανησυχίες για την ασφάλεια. Το 2016 δημοσιεύθηκε από την EFSA ένας πρώτος κατάλογος QPS. Έκτοτε, μια νέα δήλωση της QPS έχει δημοσιεύεται κάθε 6 μήνες, η οποία περιέχει αξιολογήσεις νέων κοινοποιήσεων ΜΟ για πιθανή QPS κατάσταση, καθώς και βιβλιογραφικό έλεγχο όλων των αναφερόμενων ΜΟ σχετικά με πιθανές νέες ανησυχίες για την ασφάλεια. Επιπλέον, κάθε 3 χρόνια δημοσιεύεται ένας νέος κατάλογος QPS στη γνωμοδότηση QPS (Hazards (BIOHAZ) et al., 2021). Το QPS μπορεί να συγκριθεί με το καθεστώς GRAS (Generally Recognized as Safe) που χορηγείται σε ασφαλείς ΜΟ από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA).

9.3 Επισκόπηση διαφόρων ευρωπαϊκών κανονισμών

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) και πριν από το 2008, η χρήση των ενζύμων στη βιομηχανία τροφίμων ρυθμιζόταν μόνο σε εθνικό επίπεδο στη Γαλλία και τη Δανία. Η ίδια η βιομηχανία ήταν, και εξακολουθεί να είναι, υπεύθυνη για την ποιότητα του προϊόντος όλων των ενζύμων που πωλούνται στην αγορά της ΕΕ. Προκειμένου να εναρμονιστούν οι κανονισμοί και οι επακόλουθες αξιολογήσεις της ασφάλειας των πρόσθετων τροφίμων, των αρωματικών υλών και των ενζύμων, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο δημοσίευσε τέσσερις κανονισμούς το 2008: (i) (ΕΚ) αριθ. 1331/2008: (ii) (ΕΚ) αριθ. 1332/2008: (iii), (ΕΚ) αριθ. 1333/2008: (ΕΚ) αριθ. 1334/2008. Στόχος αυτών των τεσσάρων κανονισμών είναι η εναρμονισμένη αξιολόγηση της ασφάλειας των προσθέτων τροφίμων, των ενζύμων και των αρωματικών υλών, με αποτέλεσμα τρεις διαφορετικούς κοινοτικούς καταλόγους, αντίστοιχα που περιέχουν όλα τα πρόσθετα τροφίμων, τα ένζυμα ή τις αρωματικές ύλες που επιτρέπονται στην ευρωπαϊκή αγορά. Σε αντίθεση με τα πρόσθετα τροφίμων και τις αρωματικές ύλες, για τα ένζυμα τροφίμων δεν πραγματοποιήθηκαν

προηγούμενες αξιολογήσεις ασφάλειας και δεν υπήρξε κοινοτικός κατάλογος εγκεκριμένων ενζύμων. Ως εκ τούτου, σύμφωνα με τον (ΕΚ) αριθ. 1332/2008, οι παραγωγοί και οι αιτούντες κλήθηκαν να υποβάλουν φακέλους ενζύμων στην EFSA (μεταξύ 2011 και 2015) για αξιολόγηση πριν προστεθούν σε κοινοτικό κατάλογο, ο οποίος απαριθμούσε όλα τα εγκεκριμένα ένζυμα που πωλούνταν στην ευρωπαϊκή αγορά. Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 231/2012 της Επιτροπής, για τη θέσπιση προδιαγραφών για (ΕΚ) αριθ. 1333/2008, τόσο η ιμβερτάση (Ε 1103) όσο και η λυσοζύμη (Ε 1105) έχουν εγκριθεί για χρήση ως τρόφιμα πρόσθετα τροφίμων. Η ουρεάση, η -γλυκανάση και η λυσοζύμη έχουν επίσης εγκριθεί για χρήση στην παραγωγή οίνου, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1493/1999. Όλες αυτές οι εφαρμογές ενζύμων θα συμπεριληφθούν στο κοινοτικό κατάλογο, ο οποίος θα συγκεντρώνει όλα τα εγκεκριμένα ένζυμα σε ένα έγγραφο, υπερισχύοντας των προηγούμενων εγκρίσεων, όπως αναφέρεται στην αιτιολογική σκέψη 16 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1332/2008 (Sutay Kocabaş & Grumet, 2019).

9.4 Επισήμανση

Στην ΕΕ, σύμφωνα με τους κανονισμούς (ΕΚ) αριθ. 1829/2003 και 1830/2003 τα τρόφιμα πρέπει να αναγράφουν στην ετικέτα τους αν:

- Περιέχουν ή αποτελούνται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (ΓΤΟ) ή περιέχουν συστατικά που παράγονται από ΓΤΟ.

Αυτό σημαίνει ότι όλα τα ΓΤ τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του αλεύρου, των μαγειρικών ελαίων και των σιροπιών γλυκόζης από ΓΤ πηγή, πρέπει να επισημαίνονται ως ΓΤ. Για τα ΓΤ τρόφιμα που πωλούνται "χύμα", πρέπει να αναγράφονται πληροφορίες αμέσως δίπλα στο τρόφιμο που να υποδεικνύουν ότι είναι ΓΤ. Τα τρόφιμα που παράγονται με τη βοήθεια της ΓΤ τεχνολογίας δεν χρειάζεται να επισημαίνονται. Ένα παράδειγμα είναι το τυρί που παράγεται με τη βοήθεια ΓΤ ενζύμων τα οποία χρησιμοποιούνται για τη πήξη του γάλακτος κατά τη διαδικασία παραγωγής. Αυτά δεν αποτελούν συστατικά του τυριού. Προϊόντα όπως το κρέας, το γάλα και τα αυγά από ζώα που τρέφονται με ΓΤ ζωοτροφές επίσης δεν χρειάζεται να επισημαίνονται (*Food Enzymes | EFSA*, n.d.).

Πίνακας 4: *Νομοθετικά συστήματα για τα ένζυμα τροφίμων στην Ευρωπαική Ένωση*

Νομοθετικός οργανισμός	**EFSA**
Κανονισμός	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1332/2008
Ημερομηνία του κανονισμού	16 Δεκεμβρίου 2008
Ορισμός του ενζύμου τροφίμων	Προϊόν που λαμβάνεται από φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς ή προϊόντα αυτών, συμπεριλαμβανομένου προϊόντος που λαμβάνεται με διεργασία ζύμωσης με χρήση μικροοργανισμών: (i) που περιέχει ένα ή περισσότερα ένζυμα ικανά να καταλύουν μια συγκεκριμένη βιοχημική αντίδραση- και ii) που προστίθεται στα τρόφιμα για τεχνολογικό σκοπό σε οποιοδήποτε στάδιο της παρασκευής, της μεταποίησης, της προετοιμασίας, της επεξεργασίας, της συσκευασίας, της μεταφοράς ή της αποθήκευσης των τροφίμων.
Συνθήκη ασφάλειας με βάση τη γενική χρήση/αποδεικτικά στοιχεία	QPS

10. Μελλοντικές προοπτικές

Η ενζυμική μηχανική έχει μεγάλη επιρροή στην καθιέρωση επιτυχημένων στρατηγικών για την ανάπτυξη τροποποιημένων ενζύμων. Έχει βοηθήσει στον εντοπισμό νέων και αποτελεσματικών μεταβολικών μονοπατιών, γεγονός που άνοιξε νέες προοπτικές για την παραγωγή ποικίλων προϊόντων. Στο μέλλον, η μηχανική των ενζύμων θα οδηγήσει στην κατάλυση νέων μη φυσιολογικών αντιδράσεων, στο σχεδιασμό καινοτόμων και αποτελεσματικών μονοπατιών, στη βελτιστοποίηση των επιθυμητών διεργασιών και στην παραγωγή νέων μεταβολιτών.

Τα ένζυμα είναι βιοδιασπώμενα στη φύση και είναι γνωστά για την ικανότητά τους να αντέχουν σε σκληρές συνθήκες. Η ενζυμική μηχανική ή ενζυμική τεχνολογία είναι μια φιλική προς το περιβάλλον, καθαρή και πράσινη τεχνολογία. Για το λόγο αυτό, στο μέλλον είναι δυνατή η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών και αποδοτικών ενζυμικών συστημάτων. Τα συστήματα αυτά θα επικεντρώνονται στη χρήση λιγότερων πόρων και λιγότερης ενέργειας για την επίτευξη μέγιστης απόδοσης και απόδοσης του προϊόντος. Με τη χρήση προηγμένων τεχνικών μοριακής βιοτεχνολογίας και τη χειραγώγηση των υφιστάμενων ενζύμων, η ανάπτυξη νέων ενζυμικών συστημάτων έχει γίνει πιο εφικτή. Εκτός από τις υπάρχουσες τεχνικές για τη μηχανική των ενζύμων, στα μελλοντικά in vitro μεταφραστικά συστήματα, ο επαναπροσδιορισμός των κωδικονίων μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως πιθανός τομέας έρευνας για την de novo μηχανική των ενζύμων. Τα καταλυτικά αντισώματα, η υπολογιστική αναδιαμόρφωση των ενζύμων και οι μέθοδοι οπτικοποίησης της δευτερογενούς δομής του mRNA θα ήταν χρήσιμες για την εφαρμογή προηγμένων και νέων προσεγγίσεων πρωτεϊνικής μηχανικής (Cobb et al., 2013).

Στο μέλλον, με την πρόοδο των μεθόδων διαλογής υψηλής απόδοσης, των εργαλείων γενετικής μηχανικής και των τεχνολογιών "omics", θα καθιερωθούν αποτελεσματικότερες μέθοδοι πρωτεϊνικής μηχανικής που θα βοηθήσουν τελικά στη δημιουργία βελτιωμένων ενζύμων για περαιτέρω ειδικές εφαρμογές. Απαιτούνται περισσότερες εξελίξεις και έρευνα στους σημαντικούς τομείς της πρωτεϊνικής μηχανικής, όπως η πεπτιδομιμητική, η κυτταρομετρία ροής και η σχεδιασμένη αποκλίνουσα εξέλιξη, για την αποτελεσματική αναδιαμόρφωση των ενζύμων

για την ανάπτυξη μεταβολικά σταθερών ενζύμων. Τα τελευταία χρόνια, η μεταβολική μηχανική έχει συμβάλει σημαντικά στη βελτίωση των χαρακτηριστικών των ενζύμων με ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές. Στο μέλλον, πιο προηγμένες τεχνικές και εργαλεία θα βοηθήσουν στην εξερεύνηση και το σχεδιασμό νέων ενζύμων με πολύτιμα χαρακτηριστικά από φυσικούς πόρους και στην αναδιαμόρφωση του υπάρχοντος ρεπερτορίου των ενζύμων για τις επιθυμητές εφαρμογές. Η μεταγονιδιωματική με την ολοκληρωμένη τεχνολογία αλληλούχισης DNA επόμενης γενιάς (NGS) και τα συστήματα διαλογής υψηλής απόδοσης θα βοηθήσουν στην ταυτοποίηση των νέων γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα σε τεράστια κλίμακα για σκοπούς ενζυμικής μηχανικής. Τα προηγμένα εργαλεία βιοπληροφορικής και μεταβολικής μηχανικής μπορούν να αντικαταστήσουν την κατασκευή συνθετικών γονιδίων με επιθυμητά χαρακτηριστικά και την περαιτέρω κλωνοποίηση συνθετικών ή ετερόλογων γονιδιακών κατασκευών σε βιομηχανικά σχετικό στέλεχος για την ενισχυμένη και οικονομικά αποδοτική παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Ο σχεδιασμός συνθετικών γονιδίων γενικά ξεπερνά τα εμπόδια της γονιδιακής έκφρασης, όπως η μεροληψία κωδικών (codon bias) για την παραγωγή βέλτιστων ποσοτήτων του επιθυμητού ενζύμου σε μη φυσικούς ξενιστές. Περαιτέρω, επιτρέπει επίσης, την ειδική εισαγωγή επιθυμητών μεταλλαγμένων τόπων και οι τροποποιημένες γονιδιακές κασέτες μπορούν να εκφραστούν με τη χρήση επιλεγμένων υποκινητών, ενισχυτών και τερματιστών για την υψηλού επιπέδου παραγωγή εγγενών ή σχεδιασμένων ενζύμων. Οι τεχνικές κινητικής των ενζύμων και αποτελεσματικότητας του μεταβολικού μετασχηματισμού της μεταβολωμικής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της επίδρασης της ενζυμικής μηχανικής σε ένζυμα που σχετίζονται με τον μεταβολισμό για τη σύνθεση προϊόντων βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Τα εργαλεία πρόβλεψης, ρύθμισης και κατασκευής μη φυσικών μονοπατιών μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη μεγιστοποίηση του σχηματισμού του επιθυμητού προϊόντος και την εξάλειψη του σχηματισμού παρεπόμενων προϊόντων. Περαιτέρω, οι γονιδιακές τροποποιήσεις με βάση το CRISPR και η παρεμβολή RNA θα είναι χρήσιμες για την απενεργοποίηση του σχηματισμού ανεπιθύμητων προϊόντων μέσω εναλλακτικών μονοπατιών και επίσης για τη βελτίωση της καταλυτικής απόδοσης των ενζύμων (*Fundamentals of Food Biotechnology*, 2015). Απαιτούνται πιο αξιόπιστα υπολογιστικά εργαλεία αναδιαμόρφωσης των ενζύμων και οπτικοποίησης της δευτερογενούς δομής του mRNA, έτσι

ώστε να αποφεύγεται οποιαδήποτε αστάθεια στη δευτερογενή δομή, όπως ο σχηματισμός βρόχου φουρκέτας (hairpin loop), για ενισχυμένη γονιδιακή έκφραση. Περαιτέρω, πρέπει να διερευνηθούν νέες πηγές και τεχνικές για την παραγωγή ενζύμων ώστε να ικανοποιηθεί η αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών σε εμπορικό και βιομηχανικό επίπεδο μεγάλης κλίμακας. Παρά τις πολλές προόδους στην τεχνολογία της ενζυμικής μηχανικής, εξακολουθεί να υπάρχει μια πρόκληση για την πλήρη μεγιστοποίηση των πλεονεκτημάτων των ενζύμων ως βιοκαταλυτών. Ανεξάρτητα από τις πρόσφατες προόδους και τις αποτελεσματικές τεχνικές της μηχανικής των ενζύμων, η μετάλλαξη των πρωτεϊνικών αλληλουχιών εξακολουθεί να είναι ένα περίπλοκο έργο, καθώς απαιτεί τεράστια έρευνα για την αναδιαμόρφωση της δομής και την ανάπτυξη ταχύτερων και ικανών διαδικασιών επιλογής. Έχει προταθεί ότι στο μέλλον η κριτική ανάλυση και αξιολόγηση διαφορετικών στρατηγικών μηχανικής ενζύμων για παρόμοια προβλήματα θα βοηθήσει στον προσδιορισμό ισχυρών προσεγγίσεων. Η καλύτερη κατανόηση της φύσης και της σημασίας των ενζύμων θα ανοίξει νέους δρόμους για την ανακάλυψη νέων εφαρμογών των ενζύμων με τη βοήθεια της ενζυμικής μηχανικής. Έτσι, στο μέλλον, με τον έξυπνο συνδυασμό προηγμένων πειραματικών και υπολογιστικών εργαλείων της ενζυμικής μηχανικής και των συναφών πεδίων, θα βοηθηθεί τελικά η ανάπτυξη μηχανικών ή σχεδιασμένων ενζύμων με σταθερές δομές, ευρεία εξειδίκευση σε υποστρώματα, νέες και πολυλειτουργικές δραστηριότητες για τις επιθυμητές βιομηχανικές εφαρμογές (D. Zhu et al., 2019).

11. Συμπεράσματα

Λόγω της όλοενα αυξανόμενης ανάγκης επεξεργασμένων τροφίμων και ποτών, κρίνεται ύψιστης σημασίας η βελτιστοποίηση των προσθέτων και των βοηθητικών επεξεργασίας στα τρόφιμα. Τα γενετικά τροποποιημένα ένζυμα τροφίμων είναι συνήθως καλύτερα για συγκεκριμένες βιομηχανικές εφαρμογές από τα αντίστοιχα εγγενή και η έρευνα σχετικά με τις ενζυμολογικές τους ιδιότητες σε σύγκριση με τα ένζυμα άγριου τύπου μας επιτρέπουν να να κατανοήσουμε καλύτερα πώς να βελτιστοποιήσουμε την σχέση δομής και λειτουργίας τους. Επί του παρόντος, τα νέα ανασυνδυασμένα ένζυμα χρησιμοποιούνται κυρίως για εφαρμογές στην αρτοποιία, στην γαλακτοβιομηχανία, στη βιομηχανία ποτών, φρούτων και λαχανικών, κρέατος

και ιχθυρών κ.α.. Οι ανησυχίες για την ασφάλεια και τις επιπτώσεις στην υγεία των ενζύμων τροφίμων μικροβιακής προέλευσης αποτελούν πρωταρχικό μέλημα στην Ευρώπη. Η εφαρμογή των ενζύμων στην επεξεργασία τροφίμων παρακολουθείται και ρυθμίζεται από τη νομοθεσία περί τροφίμων και έτσι οι κίνδυνοι ελαχιστοποιούνται. Αν και υπάρχουν προκλήσεις για την ασφαλή χρήση, οι στρατηγικές γενετικής τροποποίησης για την ανάπτυξη νέων ενζύμων είναι πολλά υποσχόμενες για το μέλλον και αναμένεται να αυξηθεί η χρήση των ανασυνδυασμένων ενζύμων, όχι μόνο στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και στη βιομηχανία φαρμάκων, κλωστουφαντουργίας, βιοκαυσίμων και απορρυπαντικών.

Βιβλιογραφία

Abdulrachman, D., Thongkred, P., Kocharin, K., Nakpathom, M., Somboon, B., Narumol, N., Champreda, V., Eurwilaichitr, L., Suwanto, A., Nimchua, T., & Chantasingh, D. (2017). Heterologous expression of Aspergillus aculeatus endo-polygalacturonase in Pichia pastoris by high cell density fermentation and its application in textile scouring. *BMC Biotechnology*, *17*(1), 15. https://doi.org/10.1186/s12896-017-0334-9

Acevedo, J. P., Reetz, M. T., Asenjo, J. A., & Parra, L. P. (2017). One-step combined focused epPCR and saturation mutagenesis for thermostability evolution of a new cold-active xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*, *100*, 60–70. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.02.005

Akanda, Md. J., Sarker, M. Z., Norulaini, N., Ferdosh, S., Yunus, K., Ghafoor, K., & Kadir, M. (2014). Cocoa butter replacers from blends of mango seed fat extracted by supercritical carbon dioxide and palm stearin. *Food Research International*, *65*, 401–406. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.039

Anand, R. (1992). Yeast artificial chromosomes (YACs) and the analysis of complex genomes. *Trends in Biotechnology*, *10*(1–2), 35–40. https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90165-r

Antošová, Z., & Sychrová, H. (2016). Yeast Hosts for the Production of Recombinant Laccases: A Review. *Molecular Biotechnology*, *58*(2), 93–116. https://doi.org/10.1007/s12033-015-9910-1

Armor, J. N. (2011). A history of industrial catalysis. *Catalysis Today*, *163*(1), 3–9. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.11.019

Armstrong, E. F. (1933). Enzymes: A Discovery and its Consequences. *Nature*, *131*(3311), 535–537. https://doi.org/10.1038/131535a0

Auld, D. S. (2013). Metalloproteases. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 86–89). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00018-9

Baba, Y., Sumitani, J., Tanaka, K., Tani, S., & Kawaguchi, T. (2016). Site-saturation mutagenesis for β-glucosidase 1 from Aspergillus aculeatus to accelerate the saccharification of alkaline-pretreated bagasse. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(24), 10495–10507. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7726-y

Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Production of Biopharmaceuticals in E. coli: Current Scenario and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(7), 953–962. https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079

Berg, P. (2008). Moments of Discovery. *Annual Review of Biochemistry*, *77*(1), 15–44. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.051605.153715

Bernath, K., Magdassi, S., & Tawfik, D. S. (2004). In vitro compartmentalization (IVC): A high-throughput screening technology using emulsions and FACS. *Discovery Medicine*, *4*(20), 49–53.

Bose, J. L. (2016). Chemical and UV Mutagenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1373*, 111–115. https://doi.org/10.1007/7651_2014_190

Brandão, R. L., Nicoli, J. R., & de Souza Figueiredo, A. F. (1987). Purification and Characterization of a β-Galactosidase from Fusarium oxysporum var. Lini. *Journal of Dairy Science*, *70*(7), 1331–1337. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80152-2

Burnett, M. J. B., & Burnett, A. C. (2020). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, *2*(2), 121–132. https://doi.org/10.1002/ppp3.10073

Cao, J. (2012). The Pectin Lyases in Arabidopsis thaliana: Evolution, Selection and Expression Profiles. *PLoS ONE*, *7*(10), e46944. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046944

Carrara, C. R., & Rubiolo, A. C. (1994). Immobilization of .beta.-galactosidase on chitosan. *Biotechnology Progress*, *10*(2), 220–224. https://doi.org/10.1021/bp00026a012

Chakiath, C., Lyons, M. J., Kozak, R. E., & Laufer, C. S. (2009). Thermal Stabilization of Erwinia chrysanthemi pectin methylesterase a for application in a sugar beet pulp biorefinery. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7343–7349. https://doi.org/10.1128/AEM.01010-09

Chang, P.-K., Horn, B. W., Abe, K., & Gomi, K. (2014). ASPERGILLUS | Introduction. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 77–82). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00010-0

Chen, K., Liu, S., Ma, J., Zhang, D., Shi, Z., Du, G., & Chen, J. (2012). Deletion combined with saturation mutagenesis of N-terminal residues in transglutaminase from Streptomyces hygroscopicus results in enhanced activity and thermostability. *Process Biochemistry*, *47*(12), 2329–2334. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.013

Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Chapter 23—Plasmids. In D. P. Clark, N. J. Pazdernik, & M. R. McGehee (Eds.), *Molecular Biology (Third Edition)* (pp. 712–748). Academic Cell. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9

Cobb, R. E., Chao, R., & Zhao, H. (2013). Directed Evolution: Past, Present and Future. *AIChE Journal. American Institute of Chemical Engineers*, *59*(5), 1432–1440. https://doi.org/10.1002/aic.13995

Comprehensive Biotechnology. (2019). Elsevier.

Cooper, G. M. (2000). The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/

Das, R., & Kayastha, A. (2019). *β-Amylase: General Properties, Mechanism and Panorama of Applications by Immobilization on Nano-Structures* (pp. 17–38). https://doi.org/10.1007/978-3-030-25023-2_2

Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M.-A., & Roosens, N. H. C. (2020). Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods*, *9*(3), 326. https://doi.org/10.3390/foods9030326

Dekker, R. (1994). Enzymes in food and beverage processing (Part 2). *Food Australia*, *46*, 179. https://doi.org/10.13140/2.1.2499.6809

Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, *27*(3), 297–306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

Driouch, H., Sommer, B., & Wittmann, C. (2010). Morphology engineering of Aspergillus niger for improved enzyme production. *Biotechnology and Bioengineering*, *105*(6), 1058–1068. https://doi.org/10.1002/bit.22614

Dubey, K. K., Pramanik, A., Ankush, Khushboo, & Yadav, J. (2019). Enzyme Engineering. In *Advances in Enzyme Technology* (pp. 325–347). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00012-1

Duncan, B. K. (1985). Isolation of insertion, deletion, and nonsense mutations of the uracil-DNA glycosylase (ung) gene of Escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, *164*(2), 689–695.

Dunn, B. M. (2013). Aspartic Proteases. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 137–140). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00003-7

Faryar, R., Linares-Pastén, J. A., Immerzeel, P., Mamo, G., Andersson, M., Stålbrand, H., Mattiasson, B., & Karlsson, E. N. (2015). Production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. *Food and Bioproducts Processing*, *93*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.11.004

Ferreira Amaral, M. M., Frigotto, L., & Hine, A. V. (2017). Chapter Eight - Beyond the Natural Proteome: Nondegenerate Saturation Mutagenesis—Methodologies and Advantages. In A. K. Shukla (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 585, pp. 111–133). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.10.005

Food enzymes | EFSA. (n.d.). Retrieved September 25, 2021, from https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-enzymes

Fundamentals of Food Biotechnology (1st ed.). (2015). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781118384947

Gao, C., Lan, D., Liu, L., Zhang, H., Yang, B., & Wang, Y. (2014). Site-directed mutagenesis studies of the aromatic residues at the active site of a lipase from Malassezia globosa. *Biochimie*, *102*, 29–36. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.02.004

García-Fruitós, E. (2012). Lactic acid bacteria: A promising alternative for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, *11*, 157. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-157

Gersbach, C. A., Gaj, T., Gordley, R. M., & Barbas, C. F. (2010). Directed evolution of recombinase specificity by split gene reassembly. *Nucleic Acids Research*, *38*(12), 4198–4206. https://doi.org/10.1093/nar/gkq125

Godiska, R., Wu, C.-C., & Mead, D. A. (2013). Genomic Libraries. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 306–309). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00641-0

Goffin, D., Wathelet, B., Blecker, C., Deroanne, C., Malmendier, Y., & Paquot, M. (2010). Comparison of the glucooligosaccharide profiles produced from maltose by two different transglucosidases from Aspergillus niger. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *14*.

Guerrand, D. (2018). Chapter 26 - Economics of food and feed enzymes: Status and prospectives. In C. S. Nunes & V. Kumar (Eds.), *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (pp. 487–514). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00026-5

Hazards (BIOHAZ), E. P. on B., Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., … Herman, L. (2021). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 14: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2021. *EFSA Journal*, *19*(7), e06689. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6689

He, L., Mao, Y., Zhang, L., Wang, H., Alias, S. A., Gao, B., & Wei, D. (2017). Functional expression of a novel α-amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. *BMC Biotechnology*, *17*, 22. https://doi.org/10.1186/s12896-017-0343-8

Heidelberg, N.-M. V. zu. (1859, 1965). *Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg*. Winter.

Hill (SC.D.), R. (1970). *The Chemistry of Life: Eight Lectures on the History of Biochemistry*. CUP Archive.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, *77*(1), 51–59. https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2

Huber, R. E. (2001). Beta (β)-Galactosidase. In S. Brenner & J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (pp. 212–214). Academic Press. https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0489

Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D., & Fox, M. (2019). Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Current Protocols in Protein Science*, *95*(1), e77. https://doi.org/10.1002/cpps.77

Ichikawa, K., Shiono, Y., Shintani, T., Watanabe, A., Kanzaki, H., Gomi, K., & Koseki, T. (2020). Efficient production of recombinant tannase in Aspergillus oryzae using an improved glucoamylase gene promoter. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *129*(2), 150–154. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.08.002

Jin, F.-J., Hu, S., Wang, B.-T., & Jin, L. (2021). Advances in Genetic Engineering Technology and Its Application in the Industrial Fungus Aspergillus oryzae. *Frontiers in Microbiology*, *0*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644404

Jones, A., Lamsa, M., Frandsen, T. P., Spendler, T., Harris, P., Sloma, A., Xu, F., Nielsen, J. B., & Cherry, J. R. (2008). Directed evolution of a maltogenic alpha-amylase from Bacillus sp. TS-25. *Journal of Biotechnology*, *134*(3–4), 325–333. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.01.016

Jørgensen, C. M., Vrang, A., & Madsen, S. M. (2014). Recombinant protein expression in Lactococcus lactis using the P170 expression system. *FEMS Microbiology Letters*, *351*(2), 170–178. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12351

Kajino, T., Ohto, C., Muramatsu, M., Obata, S., Udaka, S., Yamada, Y., & Takahashi, H. (2000). A protein disulfide isomerase gene fusion expression system that increases the extracellular productivity of

Bacillus brevis. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(2), 638–642. https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.638-642.2000

Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B., & Drenth, J. (1984). Structure of papain refined at 1.65 A resolution. *Journal of Molecular Biology*, *179*(2), 233–256. https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90467-4

Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 10.1002/jcp.29583. https://doi.org/10.1002/jcp.29583

Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2021). Bacteriophages. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/

Ke, Y., Huang, W.-Q., Li, J., Xie, M., & Luo, X. (2012). Enzymatic Characteristics of a Recombinant Neutral Protease I (rNpI) from Aspergillus oryzae Expressed in Pichia pastoris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(49), 12164–12169. https://doi.org/10.1021/jf303167r

Kelly, J. M., & Hynes, M. J. (1985). Transformation of Aspergillus niger by the amdS gene of Aspergillus nidulans. *The EMBO Journal*, *4*(2), 475–479.

Kim, Y.-M., Shimizu, R., Nakai, H., Mori, H., Okuyama, M., Kang, M.-S., Fujimoto, Z., Funane, K., Kim, D., & Kimura, A. (2011). Truncation of N- and C-terminal regions of Streptococcus mutans dextranase enhances catalytic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(2), 329–339. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3201-y

Korendovych, I. V. (2018). Rational and Semirational Protein Design. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1685*, 15–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8_2

Krishania, M., Sindhu, R., Binod, P., Ahluwalia, V., Kumar, V., Sangwan, R. S., & Pandey, A. (2018). Chapter 5—Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 83–96). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00005-0

Kumari, A., Singh, K., & M. Kayastha, A. (2012). α-Amylase: General Properties, Mechanism and Biotechnological Applications - A Review. *Current Biotechnology*, *1*(1), 98–107.

Kuraishi, C., Yamazaki, K., & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: Its Utilization in the Food Industry. *Food Reviews International*, *17*(2), 221–246. https://doi.org/10.1081/FRI-100001258

Labrou, N. E. (2010). Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Current Protein & Peptide Science*, *11*(1), 91–100. https://doi.org/10.2174/138920310790274617

Lee, C.-H. (2017). A Simple Outline of Methods for Protein Isolation and Purification. *Endocrinology and Metabolism*, *32*(1), 18–22. https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.1.18

Lee, J. M., Moon, S. Y., Kim, Y.-R., Kim, K. W., Lee, B.-J., & Kong, I.-S. (2017). Improvement of thermostability and halostability of β-1,3-1,4-glucanase by substituting hydrophobic residue for Lys 48. *International Journal of Biological Macromolecules*, *94*, 594–602. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.043

Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020). Developing Aspergillus niger as a cell factory for food enzyme production. *Biotechnology Advances*, *44*, 107630. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630

Li, L., Gao, X., Liu, J., Chitrakar, B., Wang, B., & Wang, Y. (2021). Hawthorn pectin: Extraction, function and utilization. *Current Research in Food Science*, *4*, 429–435. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.06.002

Li, L. J., Wu, Z. Y., Yu, Y., Zhang, L. J., Zhu, Y. B., Ni, H., & Chen, F. (2018). Development and characterization of an α-l-rhamnosidase mutant with improved thermostability and a higher efficiency for debittering orange juice. *Food Chemistry*, *245*, 1070–1078. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.064

Li, S., Yang, Q., Tang, B., & Chen, A. (2018). Improvement of enzymatic properties of Rhizopus oryzae α-amylase by site-saturation mutagenesis of histidine 286. *Enzyme and Microbial Technology*, *117*, 96–102. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.012

Li, X.-J., Zheng, R.-C., Ma, H.-Y., & Zheng, Y.-G. (2014). Engineering of Thermomyces lanuginosus lipase Lip: Creation of novel biocatalyst for efficient biosynthesis of chiral intermediate of Pregabalin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(6), 2473–2483. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5136-y

Lipovová, P., Králová, B., & RUSSELL, N. (2021). *Beta-Galactosidase Activity in Psychrotrophic Microorganisms and their Potential Use in Food Industry*.

Liu, L., Yang, H., Shin, H., Chen, R. R., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes. *Bioengineered*, *4*(4), 212–223. https://doi.org/10.4161/bioe.24761

Liu, W., Li, M., & Yan, Y. (2017). Heterologous expression and characterization of a new lipase from Pseudomonas fluorescens Pf0–1 and used for biodiesel production. *Scientific Reports*, *7*(1), 15711. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16036-7

Liu, Y., Ban, X., Li, C., Gu, Z., Cheng, L., Hong, Y., & Li, Z. (2017). Met349 Mutations Enhance the Activity of 1,4-α-Glucan Branching Enzyme from Geobacillus thermoglucosidans STB02. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(28), 5674–5680. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01227

Liu, Y., Huang, L., Jia, L., Gui, S., Fu, Y., Zheng, D., Guo, W., & Lu, F. (2017). Improvement of the acid stability of Bacillus licheniformis alpha amylase by site-directed mutagenesis. *Process Biochemistry*, *58*, 174–180. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.040

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). DNA Cloning with Plasmid Vectors. *Molecular Cell Biology. 4th Edition*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/

Longwell, C. K., Labanieh, L., & Cochran, J. R. (2017). High-throughput screening technologies for enzyme engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, *48*, 196–202. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.05.012

Louis, E. J. (2013). Artificial Chromosomes, Yeast. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 198–199). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00095-4

Lv, D., Wang, W., & Wei, D. (2012). Construction of two vectors for gene expression in Trichoderma reesei. *Plasmid*, *67*(1), 67–71. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.10.002

Mangiagalli, M., & Lotti, M. (2021). Cold-Active β-Galactosidases: Insight into Cold Adaption Mechanisms and Biotechnological Exploitation. *Marine Drugs*, *19*(1), 43. https://doi.org/10.3390/md19010043

Marín, D., Jiménez, A., & Fernández Lobato, M. (2001). Construction of an efficient amylolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively derived from yeast. *FEMS Microbiology Letters*, *201*(2), 249–253. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10764.x

Marshall, S. A., Lazar, G. A., Chirino, A. J., & Desjarlais, J. R. (2003). Rational design and engineering of therapeutic proteins. *Drug Discovery Today*, *8*(5), 212–221. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02610-2

Martínez, R., & Schwaneberg, U. (2013). A roadmap to directed enzyme evolution and screening systems for biotechnological applications. *Biological Research*, *46*(4), 395–405. https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400011

Mohandesi, N., Haghbeen, K., Ranaei, O., Arab, S. S., & Hassani, S. (2017). Catalytic efficiency and thermostability improvement of Suc2 invertase through rational site-directed mutagenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, *96*, 14–22. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.004

Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., & Savardashtaki, A. (n.d.). β-Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *n/a*(n/a). https://doi.org/10.1002/bab.2137

Mullaney, E., Daly, C., Sethumadhavan, K., Rodriquez, E., Lei, X., & Ullah, A. (2000). Phytase Activity in Aspergillus fumigatus Isolates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *275*, 759–763. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3234

Murthy, P. S., & Kusumoto, K.-I. (2015). Acid protease production by Aspergillus oryzae on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. *Food and Bioproducts Processing*, *96*, 180–188. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.013

Nag, M., Lahiri, D., Garai, S., Mukherjee, D., & Ray, R. R. (2021). Regulation of β-amylase synthesis: A brief overview. *Molecular Biology Reports*. https://doi.org/10.1007/s11033-021-06613-5

Nevalainen, H., & Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology*, *5*, 75. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00075

Nevoigt, E. (2008). Progress in Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *72*(3), 379–412. https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-07

Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R., & Kanasawud, P. (2006). Purification of papain from Carica papaya latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*, 1103–1107. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.013

Niu, C., Yang, P., Luo, H., Huang, H., Wang, Y., & Yao, B. (2017). Engineering of *Yersinia* Phytases to Improve Pepsin and Trypsin Resistance and Thermostability and Application Potential in the Food and Feed Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(34), 7337–7344. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02116

Niu, W.-N., Li, Z., Zhang, D., Yu, M.-R., & Tan, T. W. (2006). Improved thermostability and the optimum temperature of Rhizopus arrhizus lipase by directed evolution. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *43*, 33–39. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.013

Nunes, C. S., & Kumar, V. (2018). *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*. Academic Press.

Opportunities, C., Contact, P., Agreement, U., Policy, P., FAQs/Help, Map, S., Index, S., Facebook, Twitter, & LinkedIn. (n.d.). *Global Industrial Enzymes by Product, Market and Region, 7th Edition*. The Freedonia Group. Retrieved September 22, 2021, from https://www.freedoniagroup.com/industry-study/global-industrial-enzymes-by-product-market-and-region-7th-edition-3593.htm

Owen, C. A. (2006). SERINE PROTEINASES. In G. J. Laurent & S. D. Shapiro (Eds.), *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 1–10). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00264-7

Paciello, L., Landi, C., Orilio, P., Di Matteo, M., Zueco, J., & Parascandola, P. (2015). Bread making with *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-5D expressing lipase A from *Bacillus subtilis:* leavening characterisation and aroma enhancement. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(9), 2120–2128. https://doi.org/10.1111/ijfs.12876

Papain production. (n.d.). 5.

Park, K. Y., & Wi, S. J. (2016). Potential of plants to produce recombinant protein products. *Journal of Plant Biology*, *59*(6), 559–568. https://doi.org/10.1007/s12374-016-0482-9

Parker, A. S., Griswold, K. E., & Bailey-Kellogg, C. (2011). Optimization of Combinatorial Mutagenesis. *Journal of Computational Biology*, *18*(11), 1743–1756. https://doi.org/10.1089/cmb.2011.0152

Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2016). Applications of High and Ultra High Pressure Homogenization for Food Safety. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1132. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01132

Persson, P. B. (2003). Renin: Origin, secretion and synthesis. *The Journal of Physiology*, *552*(Pt 3), 667–671. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049890

Phong, W. N., Show, P. L., Ling, T. C., Juan, J. C., Ng, E.-P., & Chang, J.-S. (2018). Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae—Recent developments and future perspectives. *Algal Research*, *31*, 506–516. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.005

Raftari, M., Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Bakar, F. A., Saari, N., & Sekawi, Z. (2012). Overexpression of Recombinant Lipase from Burkholderia Cepacia in Escherichia Coli. *European Journal of Inflammation*, *10*(3), 365–369. https://doi.org/10.1177/1721727X1201000312

Ramos, O. S., & Malcata, F. X. (2011). 3.48—Food-Grade Enzymes. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 555–569). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00213-0

Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(1), 16–30. https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D343–D350. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1118

Ray, R., & Mishra, S. (2016). *Microbial Enzymes in Food Applications*.

Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E. M., Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: An overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *16*(3), 381–394. https://doi.org/10.1007/s11157-017-9437-y

Reveil, D. F., Cummings, N. J., Baker, K. C., Collins, M. E., Taylor, M. A. J., Sumner, I. G., Pickersgill, R. W., Connerton, I. F., & Goodenough, P. W. (1993). Nucleotide sequence and expression in Eschericia coli of cDNAs encoding papaya proteinase omega from Carica papaya. *Gene*, *127*(2), 221–225. https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90723-G

Rodarte, M., Dias, D., Vilela, D. M., & Schwan, R. (2011). Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (Coffea arabica L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, *33*, 457–464. https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.6734

Rodríguez-León, J. A., de Carvalho, J. C., Pandey, A., Soccol, C. R., & Rodríguez-Fernández, D. E. (2018). Chapter 4—Kinetics of the Solid-State Fermentation Process. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 57–82). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00004-9

Rosales, E., Pazos, M., & Ángeles Sanromán, M. (2018). Chapter 15—Solid-State Fermentation for Food Applications. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 319–355). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00015-3

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *0*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172

Saengkerdsub, S. (n.d.). *Recombinant Protein Production in Bacillus Species, Isolation and Methionine Production in Methionine-producing Microorganisms*. 178.

Sajjaanantakul, T., & Pitifer, L. A. (1991). CHAPTER 8—Pectinesterase. In R. H. Walter (Ed.), *The Chemistry and Technology of Pectin* (pp. 135–164). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092644-5.50013-3

Sandhir, R., Garg, S. K., & Modi, D. R. (1999). GENETIC ENGINEERING | Modification of Yeasts and Moulds. In R. K. Robinson (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 907–917). Elsevier. https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0730

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Rani, K. Y., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, *34*(1), 5–28. https://doi.org/10.1002/btpr.2581

Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, *52*(1), 1–18. https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00161-6

Scharff, L. B., Ehrnthaler, M., Janowski, M., Childs, L. H., Hasse, C., Gremmels, J., Ruf, S., Zoschke, R., & Bock, R. (2017). Shine-Dalgarno Sequences Play an Essential Role in the Translation of Plastid mRNAs in Tobacco. *The Plant Cell*, *29*(12), 3085–3101. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00524

Schenone, M., Dančík, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology*, *9*(4), 232–240. https://doi.org/10.1038/nchembio.1199

Schillberg, S., Raven, N., Spiegel, H., Rasche, S., & Buntru, M. (2019). Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins. *Frontiers in Plant Science*, *10*. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720

Semenova, M. V., Sinitsyna, O. A., Morozova, V. V., Fedorova, E. A., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., Sokolova, L. M., Koshelev, A. V., Bubnova, I. P., & Sinitsyn, A. P. (2006). [Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry]. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia*, *42*(6), 681–685.

Sewalt, V. J., Reyes, T. F., & Bui, Q. (2018). Safety evaluation of two α-amylase enzyme preparations derived from Bacillus licheniformis expressing an α-amylase gene from Cytophaga species. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, *98*, 140–150. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.015

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, *189*(23), 8746–8749. https://doi.org/10.1128/JB.01368-07

Shan Qin, L., Ngoh, G., Yusoff, R., & Teoh, W. (2017). Acid and Deep Eutectic Solvent (DES) extraction of pectin from pomelo (Citrus grandis (L.) Osbeck) peels. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *13*. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.001

Shen, Q., Zhang, Y., Yang, R., Pan, S., Dong, J., Fan, Y., & Han, L. (2016). Enhancement of isomerization activity and lactulose production of cellobiose 2-epimerase from Caldicellulosiruptor saccharolyticus. *Food Chemistry*, *207*, 60–67. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.067

Shrivastava, S., Shukla, P., & Mukhopadhyay, K. (2011). Purification and preliminary characterization of a xylanase from Thermomyces lanuginosus strain SS-8. *3 Biotech*, *1*(4), 255–259. https://doi.org/10.1007/s13205-011-0032-6

Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (Eds.). (2010). *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success* (1st ed.). Wiley. https://doi.org/10.1002/9783527630233

Song, A. A.-L., In, L. L. A., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A. (2017). A review on Lactococcus lactis: From food to factory. *Microbial Cell Factories*, *16*, 55. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x

Steiner, K., & Schwab, H. (2012). Recent advances in rational approaches for enzyme engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *2*, e201209010. https://doi.org/10.5936/csbj.201209010

Stemmer, W. P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, *370*(6488), 389–391. https://doi.org/10.1038/370389a0

Sulong, M. R., Leow, T. C., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (2017). Characteristics of recombinant maltogenic amylase from *Geobacillus* sp. SK70. *IJBT Vol.16(1) [January 2017]*. http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/42299

Sutay Kocabaş, D., & Grumet, R. (2019). Evolving regulatory policies regarding food enzymes produced by recombinant microorganisms. *GM Crops & Food*, *10*(4), 191–207. https://doi.org/10.1080/21645698.2019.1649531

Takeuchi, R., Choi, M., & Stoddard, B. L. (2015). Engineering of customized meganucleases via in vitro compartmentalization and in cellulo optimization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1239*, 105–132. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_6

Tang, Q., Lan, D., Yang, B., Khan, F. I., & Wang, Y. (2017). Site-directed mutagenesis studies of hydrophobic residues in the lid region of T1 lipase. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *119*(3), 1600107. https://doi.org/10.1002/ejlt.201600107

Tao, X., Wang, T., Su, L., & Wu, J. (2018). Enhanced 2- O-α-d-Glucopyranosyl-l-ascorbic Acid Synthesis through Iterative Saturation Mutagenesis of Acceptor Subsite Residues in Bacillus stearothermophilus NO2 Cyclodextrin Glycosyltransferase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(34), 9052–9060. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03080

Teixeira, M., Lima, J., & Duran, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from Aspergillus japonicus 586. *Brazilian Journal of Microbiology*, *31*, 286–290.

Thorn, K. (2017). Genetically encoded fluorescent tags. *Molecular Biology of the Cell*, *28*(7), 848–857. https://doi.org/10.1091/mbc.E16-07-0504

Tiwari, S., Srivastava, R., Singh, C., Shukla, K., Singh, R., Singh, P., Singh, R., Singh, N., & Sharma, R. (2015). Amylases: An overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*, *4*, 1886–1901.

van de Guchte, M., Kodde, J., van der Vossen, J. M., Kok, J., & Venema, G. (1990). Heterologous gene expression in Lactococcus lactis subsp. lactis: Synthesis, secretion, and processing of the Bacillus subtilis neutral protease. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(9), 2606–2611. https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2606-2611.1990

Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.-D., & Jahn, D. (2007). Bacillus megaterium—From simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *76*(5), 957–967. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1089-3

Verma, D. K., Patel, A. R., & Srivastav, P. P. (2018). *Bioprocessing Technology in Food and Health: Potential Applications and Emerging Scope*. CRC Press.

Verma, S., Dixit, R., & Pandey, K. C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in Pharmacology*, *7*, 107. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107

Vernet, T., Khouri, H. E., Laflamme, P., Tessier, D. C., Musil, R., Gour-Salin, B. J., Storer, A. C., & Thomas, D. Y. (1991). Processing of the papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(32), 21451–21457.

Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., & Parachin, N. S. (2018). Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, *6*(2), 38. https://doi.org/10.3390/microorganisms6020038

Vijayalakshmi, S., Ranjitha, J., & Rajeswari, V. D. (2013). *ENZYME PRODUCTION ABILITY BY BACILLUS SUBTILIS AND BACILLUS LICHENIFORMIS - A COMPARATIVE STUDY*. *6*(4), 5.

Wang, L., & Yang, S.-T. (2007). Chapter 18—Solid State Fermentation and Its Applications. In S.-T. Yang (Ed.), *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 465–489). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50019-0

Ward, O. P. (2011). Proteases. *Comprehensive Biotechnology*, 571–582. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1

Ward, O. P., Rao, M. B., & Kulkarni, A. (2009). Proteases, Production. *Encyclopedia of Microbiology*, 495–511. https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00172-3

Wei, Z.-Y., Zhang, Y.-Y., Wang, Y.-P., Fan, M.-X., Zhong, X.-F., Xu, N., Lin, F., & Xing, S.-C. (2016). Production of Bioactive Recombinant Bovine Chymosin in Tobacco Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(5), 624. https://doi.org/10.3390/ijms17050624

Werner, N., & Zibek, S. (2015). Expression of a Codon-Optimized Carica papaya Papain Sequence in the Methylotrophic Yeast Pichia pastoris. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, *07*. https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000231

Wilson, D. S., & Keefe, A. D. (2001). Random mutagenesis by PCR. *Current Protocols in Molecular Biology*, *Chapter 8*, Unit8.3. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0803s51

Wingfield, P. T. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, *80*(1), 6.1.1-6.1.35. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80

Wong, M. K. S. (2016). Subchapter 29A - Renin. In Y. Takei, H. Ando, & K. Tsutsui (Eds.), *Handbook of Hormones* (pp. 255-e29A-2). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00176-8

Woolfson, D. N. (2021). A Brief History of De Novo Protein Design: Minimal, Rational, and Computational. *Journal of Molecular Biology*, 167160. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167160

Wrublewski, D. T. (2019). Analysis for Science Librarians of the 2018 Nobel Prize in Chemistry: Directed Evolution of Enzymes and Phage Display of Peptides and Antibodies. *Science & Technology Libraries*, *38*(1), 51–69. https://doi.org/10.1080/0194262X.2019.1579159

Wu, H.-C., Bulgakov, V. P., & Jinn, T.-L. (2018). Pectin Methylesterases: Cell Wall Remodeling Proteins Are Required for Plant Response to Heat Stress. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1612. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01612

Xiao, H., Bao, Z., & Zhao, H. (2015). High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *54*(16), 4011–4020. https://doi.org/10.1021/ie503060a

Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Purification and characterization of pectin lyase secreted by Penicillium citrinum. *Biochemistry (Moscow)*, *74*(7), 800–806. https://doi.org/10.1134/S0006297909070141

Yang, T., Xu, X., He, C., & Li, L. (2003). Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chemistry - FOOD CHEM*, *80*, 473–481. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00315-1

Yi, Y. (2021). Chapter 7 - Tiny bugs play big role: Microorganisms' contribution to biofuel production. In X. Lü (Ed.), *Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production* (pp. 113–136). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818862-0.00007-8

Yu, S., Zhang, Y., Zhu, Y., Zhang, T., Jiang, B., & Mu, W. (2017). Improving the Catalytic Behavior of DFA I-Forming Inulin Fructotransferase from Streptomyces davawensis with Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(34), 7579–7587. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02897

Yu, X.-W., Yang, M., Jiang, C., Zhang, X., & Xu, Y. (2017). N-Glycosylation Engineering to Improve the Constitutive Expression of Rhizopus oryzae Lipase in Komagataella phaffii. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(29), 6009–6015. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01884

Zboray, K., Sommeregger, W., Bogner, E., Gili, A., Sterovsky, T., Fauland, K., Grabner, B., Stiedl, P., Moll, H. P., Bauer, A., Kunert, R., & Casanova, E. (2015). Heterologous protein production using euchromatin-containing expression vectors in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, *43*(16), e102–e102. https://doi.org/10.1093/nar/gkv475

Zhang, J.-H., Dawes, G., & Stemmer, W. P. C. (1997). Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9), 4504–4509.

Zhang, W., Jia, M., Yu, S., Zhang, T., Zhou, L., Jiang, B., & Mu, W. (2016). Improving the Thermostability and Catalytic Efficiency of the d-Psicose 3-Epimerase from Clostridium bolteae ATCC BAA-613 Using Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(17), 3386–3393. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01058

Zhang, Y., Nie, Y., Zhou, X., Bi, J., & Xu, Y. (2020). Enhancement of pullulanase production from recombinant Bacillus subtilis by optimization of feeding strategy and fermentation conditions. *AMB Express*, *10*(1), 11. https://doi.org/10.1186/s13568-020-0948-5

Zhao, H., Blazanovic, K., Choi, Y., Bailey-Kellogg, C., & Griswold, K. E. (2014). Gene and Protein Sequence Optimization for High-Level Production of Fully Active and Aglycosylated Lysostaphin in Pichia pastoris. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(9), 2746–2753. https://doi.org/10.1128/AEM.03914-13

Zhao, H.-Y., & Feng, H. (2018). Engineering Bacillus pumilus alkaline serine protease to increase its low-temperature proteolytic activity by directed evolution. *BMC Biotechnology*, *18*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s12896-018-0451-0

Zhu, D., Wu, Q., & Hua, L. (2019). 3.01—Industrial Enzymes☆. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 1–13). Pergamon. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00148-8

Zhu, F., Jiang, T., Wu, B., & He, B. (2018). Enhancement of Z-aspartame synthesis by rational engineering of metalloprotease. *Food Chemistry*, *253*, 30–36. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.108