



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ

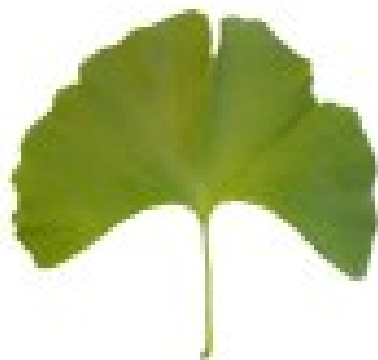
ΚΡΗΤΗΣ

**ΣΧΟΛΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΘΕΜΑ:

**«ΤΑ ΦΥΤΑ ΩΣ ΠΗΓΕΣ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ»**



**ΟΝΟΜΑ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ
ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ**

**ΟΝΟΜΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ ΚΑΘΗΓΗΤΗ
ΤΑΜΠΑΚΑΚΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΜΑΙΟΣ 2006**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΕΣ

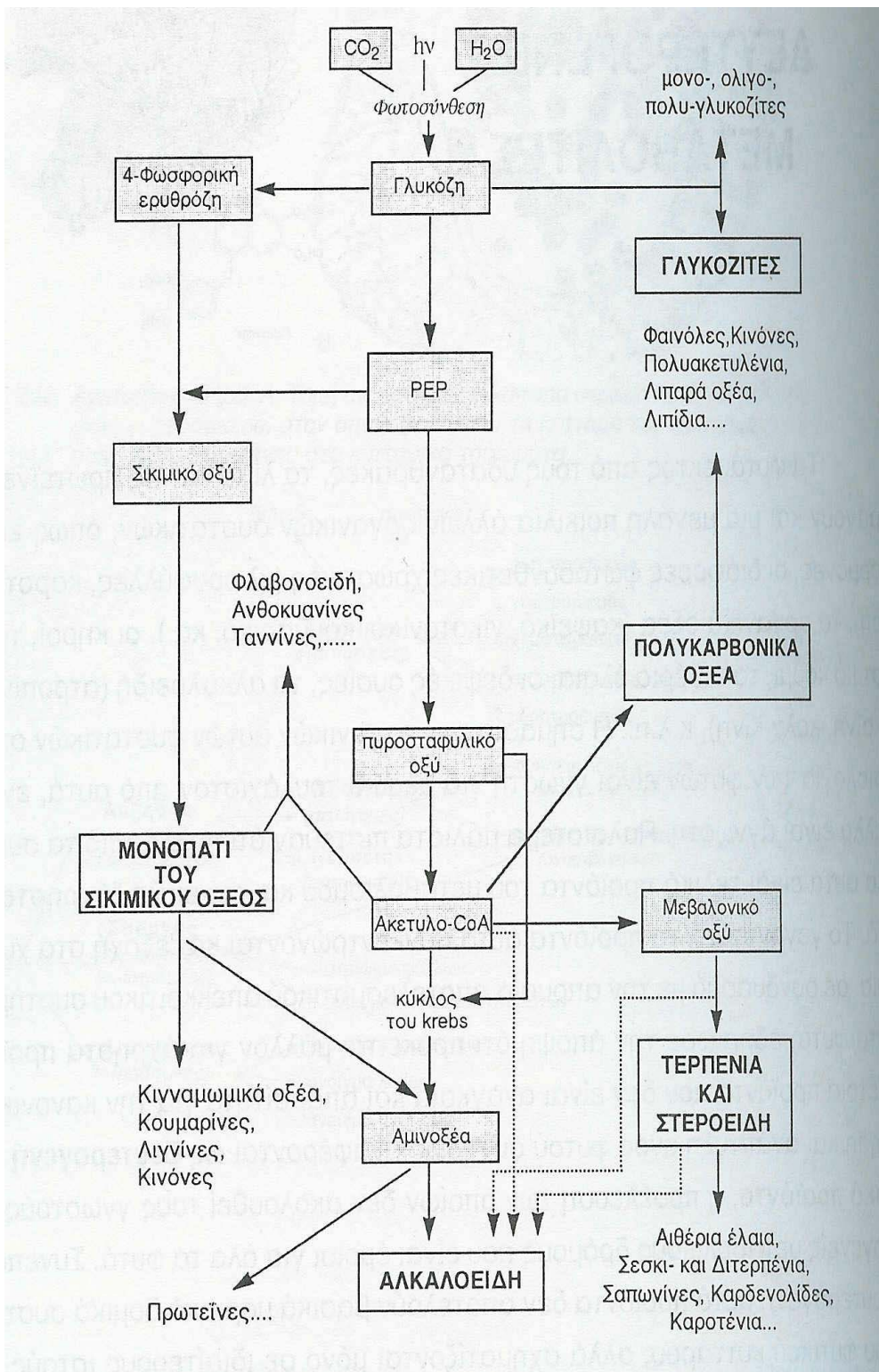
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
ΜΕΡΟΣ Α: ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ	7
A.1 Τι είναι τα φυτοχημικά	8
A.2 Πως λειτουργούν τα φυτοχημικά	9
A.3 Πηγές φυτοχημικών	10
I. Τερπένια -Ισοπρένια	12
I-A. Καροτενοειδή –Τετρατερπένια	12
I-A-1. Λυκοπαΐνη	15
I-A-2. Άλφα-καροτένιο	18
I-A-3. Βήτα-καροτένιο	18
I-A-4. Λουτεΐνη	20
I-A-5. Ζεαξανθίνη	21
I-A-6. Ασταξανθίνη	23
II-B. Τριτερπένια	24
II-B-1. Σαπωνίνες	24
II-B-2. Λεμονοειδή	25
III. Φαινόλες	26
III-A. Φλαβονοειδή	27
III-A-1. Ανθοκυανιδίνες	29
III-A-2. Φλαβόνες-Φλαβονόλες	30
III-A-3. Κατεχίνη	32
III-A-4. Ισοφλαβόνες	34
III-A-5. Hesperetin	36
III-A-6. Naringin	36
III-A-7. Rutin	37
III-A-8. Quercetin	37
III-A-9. Sililymarin	38
III-A-10. Ταννίνες	38
III-B. Φαινολικά οξέα	40
III-B-1. Ελαγικό οξύ	41
III-B-2. Χλωρογενετικό οξύ	42
III-B-3. π-Πουμαρικό οξύ	42
III-B-4. Φυτικό οξύ	43
III-B-5. Κινναμικό οξύ	43
III-C. Άλλες μη φλαβονοειδείς φαινόλες	44
III-C-1. Κουρμουμίνη	44
III-C-2. Ρεσβερατρόλη	44
III-C-3. Λιγνίνη	47
IV. Γλυκοσινολικά	48
IV-A. Ισοθειοκυανικά	48
IV-A-1. Phenethyl	48
IV-A-2. Sulforaphane	49
IV-B. Ινδολία	49
IV-V-1. Indole-3-Carbinol (I3C)	49

V. Thiosulfonates	50
VI. Φυτοστερόλες	51
VI-A. Βήτα -σιτοστερόλη	52
VII Ανθρακινόνες	53
VII-A. Senna	53
VII-B. Barbaloin	54
VII-C. Υπερικίνη	54
VIII. Καψαΐνη	54
IX. Πιπερίνη	55
X. Χλωροφύλλη	56
XII. Πηκτίνη	57
XIII. Οξαλικό οξύ	57
ΜΕΡΟΣ Β: ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ	59
B.1 Εισαγωγή	60
B.2 Ιστορική αναδρομή	62
B.3 Τι είναι μεταβολική μηχανική	64
B.4 Μεταβολική μηχανική βιοχημικών μονοπατιών	65
B.5 Νέα μεταβολικά μονοπάτια μέσω της γενετικής μηχανικής	66
B.6 Επιλογή οργανισμών για τη μεταβολική μηχανική βιοχημικών μονοπατιών	68
B.7 Στρατηγικές μεταβολικής μηχανικής ολόκληρων βιοχημικών μονοπατιών σε ετερόλογους οργανισμούς	71
B.8 Περιορισμοί της μεταβολικής μηχανικής	72
B.9 Σχέση μεταβολικής μηχανικής και βιομηχανίας	75
ΜΕΡΟΣ Γ: ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ	78
Γ.1 Η μεταβολική μηχανική των καροτενοειδών	79
Γ.1.1 Εισαγωγή	79
Γ.1.2 Βιοσύνθεση καροτενοειδών	80

Γ.1.3 Βιοσύνθεση των τερπενίων	81
Γ.1.4 Χημική και βιολογική σύνθεση των καροτενοειδών	86
Γ.1.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χημικής και της βιολογικής σύνθεσης των καροτενοειδών	87
Γ.1.6 Παραγωγή των καροτενοειδών με τη βιοτεχνολογία	88
Γ.1.6.1 Η χρήση του ανασυνδυασμένου DNA για την παραγωγή καροτενοειδών	91
Γ.1.6.2 Επιλογή των ξενιστών	92
Γ.1.7 Συμπεράσματα της μεταβολικής μηχανικής των καροτενοειδών	95
Γ.2 Μεταβολική μηχανική της λυκοπαΐνης	96
Γ.3 Μεταβολική μηχανική της ρεσβερατρόλης	97
Γ.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	97
Γ.3.2 Βιοσύνθεση της ρεσβερατρόλης	98
Γ.3.3 Βιοτεχνολογική παραγωγή ρεσβερατρόλης	99
Γ.4 Βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών I	101
Γ.5 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές	102
Γ.5 Βιβλιογραφία	104

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά, εκτός από τους υδατάνθρακες, τα λίπη και τις πρωτεΐνες, παράγουν και μια μεγάλη ποικιλία οργανικών συστατικών όπως ορμόνες, φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες, καροτενοειδή), οργανικά οξέα (καφεϊκό, νικοτινικό, κουμαρικό κ.α.), κηροί, ελαστικό κόμμι, αιθέρια έλαια, αλκαλοειδή (ατροπίνη, κοκαΐνη, κολχικίνη) κ.α. Η σημασία των οργανικών συστατικών είναι ελάχιστα γνωστή. Παλαιότερα πίστευαν ότι πολλά από αυτά είναι τελικά προϊόντα του μεταβολισμού και συνεπώς 'άχρηστα' υλικά. Τέτοια προϊόντα που δεν είναι αναγκαία και απαραίτητα για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη ενός φυτού συνήθως αναφέρονται ως δευτερογενή προϊόντα ή **φυτοχημικά**. Η σύνθεση των φυτοχημικών δεν ακολουθεί τους γνωστούς πρωτογενείς μεταβολικούς δρόμους που είναι όμοιοι για όλα τα φυτά. Συνεπώς τα δευτερογενή αυτά προϊόντα δεν αποτελούν βασικά μοριακά δομικά συστατικά του φυτικού κυττάρου, αλλά σχηματίζονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα και σε κατάλληλα στάδια της ανάπτυξης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ουσίες που βιοσυντίθενται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων, χρησιμοποιώντας κάποια από τα ενδιάμεσα προϊόντα ως βασικές ουσίες για τη δημιουργία των προϊόντων αυτών (**Σχήμα 1**). Σήμερα γνωρίζουμε μερικές χιλιάδες τέτοια φυτοχημικά, για τα οποία υπάρχουν αρκετές και σοβαρές αποδείξεις ότι πολλά από αυτά, που θεωρήθηκαν ως άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού ξαναχρησιμοποιούνται από τα ίδια τα φυτά. Πολλά από τα φυτοχημικά έχει διαπιστωθεί ότι είναι αναγκαία και απαραίτητα συστατικά για τη βιοσύνθεση βασικών ουσιών που χρειάζονται στην αύξηση και διαφοροποίηση των φυτών, όπως για παράδειγμα οι φυτοορμόνες, οι χρωστικές, τα φυτοχρώματα και τα συνένζυμα.



Σχήμα 1: Οι πιο σημαντικές ομάδες των δευτερογενών φυσικών προϊόντων και η προέλευσή τους από τον πρωτογενή μεταβολισμό (Καράταγλης, 1994).

ΜΕΡΟΣ Α:
ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ

A.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ

Τα τρόφιμα είναι πολύ σημαντικά για τον οργανισμό του ανθρώπου γιατί παρέχουν τα αναγκαία υλικά και την ενέργεια που απαιτείται για την αύξηση και την επιβίωση του. Η σπουδαιότητα των τροφών οφείλεται στις πολυάριθμες χημικές ουσίες που παρέχουν. Οι ουσίες αυτές αναφέρονται συχνά ως **θρεπτικά συστατικά**. Τα φρούτα και τα λαχανικά έχουν μεγάλη θρεπτική αξία επειδή περιέχουν βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Τα φασόλια και τα καρύδια, παραδείγματος χάριν, είναι καλές πηγές πρωτεΐνης. Οι πατάτες περιέχουν μια αφθονία υδατανθράκων. Το γάλα περιέχει το ασβέστιο που χρειάζεται το σώμα. Έτσι δεν είναι απλά τα ίδια τα τρόφιμα που χρειαζόμαστε αλλά οι ενώσεις που περιλαμβάνονται σ'αυτά. Τα περισσότερα τρόφιμα περιέχουν μίγματα εκατοντάδων ή χιλιάδων χημικών ενώσεων. Μερικές θρεπτικές ουσίες - ενώσεις που απαιτούνται από το σώμα είναι οι υδατάνθρακες, τα λίπη, και οι πρωτεΐνες. Πρόσθετες ουσίες μπορούν να παρέχουν οφέλη στην υγεία μας πέρα από τις θρεπτικές απαιτήσεις. Οι ουσίες αυτές καλούνται "**φυτοχημικές ουσίες**." Οι φυτοχημικές ουσίες εμφανίζονται φυσικά στα τρόφιμα και μέχρι σήμερα περισσότερο από 100.000 έχουν απομονωθεί και προσδιοριστεί.

Τα φυτοχημικά είναι μη θρεπτικές χημικές ουσίες των φυτών που έχουν προστατευτικές ή προληπτικές ιδιότητες για πολλές ασθένειες. Αρχικά ταξινομήθηκαν ως βιταμίνες, όμως αυτή η άποψη ήταν λάθος και τώρα οι φυτοχημικές ουσίες ταξινομούνται με βάση τη μοριακή τους δομή και με τη λειτουργία που εκτελούν στο σώμα. Τα φυτοχημικά προστατεύουν τα φυτά από τα βακτήρια, τους ιούς και τους μύκητες. Δεν είναι ουσιαστικές θρεπτικές ουσίες και δεν απαιτούνται από το ανθρώπινο σώμα για τη στήριξη της ζωής. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η κατανάλωση φυτοχημικών ουσιών ως τμήμα της διατροφής του ανθρώπου μπορεί να αποτρέψει διάφορες ασθένειες όπως τις καρδιακές παθήσεις και τον καρκίνο (Dekker, 2004; Oleszek, 2003).

Ορισμένα φυτοχημικά συμβάλλουν στα φωτεινά και ζωηρά χρώματα που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά. Είναι γνωστό ότι τα λαχανικά και τα φρούτα είναι υγιεινά, το οποίο οφείλεται πιθανώς σε κάποια ισορροπία μεταξύ των φυτοχημικών, των καροτενοειδών, των βιταμινών, των ινών και των ανόργανων αλάτων παρά σε μια μόνο ουσία. Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, ολόκληρων σιτηρών/ δημητριακών και φασολιών μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο ορισμένων τύπου καρκίνου, διαβήτη, υπέρτασης και καρδιακές παθήσεις. Πρέπει να τονιστεί ότι

πολύ λίγα έχουν αποδειχθεί σχετικά με τα οφέλη των φυτοχημικών συμπληρωμάτων που πωλούνται στα καταστήματα υγιεινής διατροφής. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των χημικών ουσιών μπορούν να συμπεριφερθούν όπως τα φάρμακα, δηλαδή να είναι τοξικές και ενδεχομένως να συμβάλουν ακόμα και στην αύξηση καρκινικών κυττάρων (Dekker, 2004).

A.2 ΠΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΟΥΝ ΤΑ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ;

Οι κυριότερες λειτουργίες των φυτοχημικών είναι:

- **Αντιοξειδωτική δράση:** τα περισσότερα φυτοχημικά αναπτύσσουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα, προστατεύοντας τα κύτταρά μας από την οξειδωτική ζημία και μειώνοντας τον κίνδυνο ορισμένων τύπων καρκίνου. Φυτοχημικά με αντιοξειδωτική δραστηριότητα είναι: τα σουλφίδια (κρεμμύδια, πράσα, σκόρδο), τα καροτενοειδή (φρούτα, καρότα), τα флаβονοειδή (φρούτα, λαχανικά), οι πολυφαινόλες (τσάι, σταφύλια).
- **Ορμονική δράση:** ισοφλαβονοειδή, που βρίσκονται στη σόγια, μιμούνται τα ανθρώπινα οιστρογόνα και βοηθούν να μειώσουν τα εμμηνοπαυσιακά συμπτώματα και την οστεοπόρωση.
- **Υποκίνηση των ενζύμων:** τα φυτοχημικά που βρίσκονται στα λάχανα, υποκινούν τα ένζυμα που καθιστούν τα οιστρογόνα λιγότερο αποτελεσματικό και θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο για τον καρκίνο του μαστού. Άλλα φυτοχημικά παρεμποδίζουν τα ένζυμα και είναι ανασταλτικοί παράγοντες των πρωτεασών (σόγια και φασόλια).
- **Παρέμβαση στο DNA:** οι σαπωνίνες που βρίσκονται στα φασόλια παρεμποδίζουν την καταστροφή του DNA των κυττάρων, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η καψαΐσίνη, που βρίσκεται στα καυτά πιπέρια, προστατεύει το DNA από τις καρκινογόνες ουσίες.
- **Αντιβακτηριακή δράση:** το φυτοχημικό αλλισίνη που περιέχεται στο σκόρδο έχει αντιβακτηριακές ιδιότητες.

- **Πρόληψη ασθενειών:** του ιού VIH/AIDS, του καρκίνου, των καρδιακών παθήσεων και της οστεοπόρωσης (Wieslaw Oleszek, 2003).

A.3 ΠΗΓΕΣ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ

Τα τρόφιμα που περιέχουν φυτοχημικά είναι ήδη μέρος της καθημερινής διατροφής του ανθρώπου. Στην πραγματικότητα, τα περισσότερα τρόφιμα περιέχουν φυτοχημικά εκτός από μερικά καθορισμένα τρόφιμα όπως η ζάχαρη ή το αλκοόλ. Τρόφιμα πλούσια σε φυτοχημικά είναι: ολόκληροι σπόροι δημητριακών, λαχανικά, φασόλια, φρούτα και χόρτα.

Τα φυτοχημικά με αντιοξειδωτικές ιδιότητες τείνουν να έχουν έντονα χρώματα επειδή περιέχουν χρωμοφόρα, δηλαδή μια σειρά εναλλασσόμενων ατόμων άνθρακα συνδεδεμένα μεταξύ τους με απλούς και διπλούς δεσμούς. Η δομική μονάδα των χρωμοφόρων είναι συνήθως το Ισοπρένιο. Τα πράσινα λαχανικά περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφύλλης και έτσι διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα τερπένια προσδίδουν το πορτοκαλί χρώμα στο καρότο, το πορτοκαλοκίτρινο στα κολοκυνθοειδή, το κόκκινο στην τομάτα και σε πολλά άλλα φυτά. Οι ανθοκυανιδίνες ευθύνονται για το χρώμα των τεύτλων, κερασιών, πορφυρών σταφυλιών και των πορφυρών λαχάνων. Ο ευκολότερος τρόπος να αποκτηθούν τα φυτοχημικά είναι να καταναλωθούν περισσότερα φρούτα (κεράσια, μήλα κ.λ.π.), λαχανικά (κουνουπίδι, λάχανο, καρότα, μπρόκολο κ.λ.π.). Συστήνεται να καταναλώνονται καθημερινά τουλάχιστον 5 έως 9 μερίδες φρούτων ή λαχανικών. Εκτός από τα φυτοχημικά, τα φρούτα και τα λαχανικά είναι πλούσια σε ανόργανα άλατα, βιταμίνες, ίνες και χαμηλά σε κορεσμένα λίπη.

Οι περισσότερες φυτοχημικές ενώσεις έχουν μια ισχυρή μυρωδιά, συνήθως λόγω της παρουσίας θείου (Oleszek, 2003). Έτσι συστήνεται να “ακολουθούμε τη μύτη μας” στην προστασία του καρκίνου καταναλώνοντας κρεμμύδι, σκόρδο, λάχανο, νεαρούς βλαστούς και μπρόκολο (**Πίνακας 1**). Εάν καταναλώνονται οποιαδήποτε από αυτά τα τρόφιμα σε μια κανονική διατροφή, μπορούμε να βοηθήσουμε τον οργανισμό μας να προστατευθεί από πολλές ασθένειες. Πολλά φυτοχημικά έχουν και αντικαρκινική δράση λόγω του ότι επιβραδύνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων προκαλώντας απόπτωση (κυτταρική αυτοκτονία), αναστέλλοντας ένζυμα **φάσης 1** (ένζυμα που μετατρέπουν βλαβερές ουσίες σε

καρκινογόνες), και επάγοντας ένζυμα **φάσης 2** (ένζυμα που μπορούν να προσκολήσουν καρκινογόνα σε μόρια διευκολύνοντας την απέκκριση τους). Τα φυτοχημικά δεν είναι ταξινομημένα ως βιταμίνες με τα επίσημα κριτήρια του “The Recommended Dietary Allowance (RDA)” αλλά μπορούν να συμβάλουν πολύ στην υγεία και την ευημερία του ανθρώπου.

Ο άνθρωπος προσαρμόζεται σε έναν κόσμο που τα φυτοχημικά αρχίζουν να εισέρχονται στη διατροφή του. Η ωχρή κηλίδα του ματιού προσαρμόζεται για να συγκεντρώσει την κίτρινη χρωστική λουτεΐνη και ζεαξανθίνη των καροτενοειδών προστατεύοντας την από το επιβλαβές μπλε φως. Αν και τα φυτοχημικά έχουν θετικά αποτελέσματα, σημειώνουμε ότι πάρα πολλά μπορούν να είναι τοξικά και επιβλαβή για τον άνθρωπο. Τα φυτά που περιέχουν τα επιβλαβέστερα φυτοχημικά συνήθως δεν είναι εδώδιμα (Best Ben, 2002).

Πίνακας 1: Τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε φυτοχημικά.

Μπρόκολο	Κρεμμύδια	Τομάτες	Κόκκινο κρασί	Μούρα
Λάχανο	Βερίκοκα	Ελιές	Κεράσια	Καρπούζι
Λαχανάκια Βρυξελλών	Σκόρδο	Σπανάκι	Σέλινο	Πιπεριές
Μήλα	Πεπόνι	Κράμβες	Κολοκυθιά	Ροδάκινα
Πράσινο τσάι	Φακές	Αχλάδια	Αγκινάρες	Πατάτες
Σόγια	Καρότα	Φράουλες	Εσπεριδοειδή	Φασόλια

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ

Οι κυριότερες ομάδες φυτοχημικών περιλαμβάνουν:

- **Τερπένια:** καροτίνες, λεμονοειδή και σαπωνίνες.
- **Ενώσεις οργανοθειϊκών:** ινδόλια, γλουκοσινολικά, θειοσουλφικά και ισοθειοκυανικά.
- **Φαινόλες:** φαινόλες και ισοφλαβόνες.
- **Οργανικοί όξινοι-πολυσακχαρίτες:** γαλλικό οξύ.

I. ΤΕΡΠΕΝΙΑ-ΙΣΟΠΡΕΝΙΑ

Τα τερπένια ή τερπενοειδή αποτελούν την πιο πολυάριθμη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών. Τα διάφορα συστατικά της ομάδας αυτής είναι αδιάλυτα στο νερό, ενώ έχουν με κοινή βιοσυνθετική προέλευση. Όλα τα τερπένια προέρχονται από τη συνένωση περισσοτέρων της μιας μονάδας ανθρακικών ενώσεων με πέντε άτομα άνθρακα (C_5) που έχουν το διακλαδισμένο ανθρακικό σκελετό του **ισοπρενίου** ή **ισοπεντανίου** C_5 . Η ταξινόμησή τους γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων που περιέχουν στο μόριό τους (**Πίνακας 2**). Έτσι τερπένια με 10 άτομα άνθρακα στο μόριο τους ονομάζονται **μονοτερπένια**, ενώσεις με 3 δομικές μονάδες αποτελούν τα **σεσκιτερπένια**, ενώ ενώσεις με 20 άτομα άνθρακα αποτελούν τα **διτερπένια**. Μεγαλύτερα μόρια τερπενίων είναι τα **τριτερπένια** (με 30 άτομα C) τα **τετρατερπένια** (με 40 άτομα C) και τα πολυτερπένια [με n ισοπρενικές μονάδες (C_5) n >20] (Καράταγλης, 1994).

I-A. ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ -ΤΕΤΡΑΤΕΡΠΕΝΙΑ

Τα καροτενοειδή (κίτρινα, πορτοκαλόχρωμα και κόκκινα) είναι τετρατερπένια που λειτουργούν ως δευτερογενείς χρωστικές στη φωτοσυνθετική διαδικασία και προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς από τη φωτοοξειδωση. Τα τερπένια ή τα τερπενοειδή αποτελούν την πιο πολυάριθμη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών. Τα διάφορα συστατικά της ομάδας αυτής είναι αδιάλυτα στο νερό, ενώ έχουν κοινή βιοσυνθετική προέλευση. Όλα τα τερπένια προέρχονται από την συνένωση περισσοτέρων της μιας μονάδας ανθρακικών ενώσεων με σαράντα άτομα άνθρακα.

Τα πιο γνωστά τετρατερπένια που είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση είναι τα καροτενοειδή (**Εικόνα 1**). Είναι λιποδιαλυτές χρωστικές, με χρώμα ερυθρό, πορτοκαλί ή κίτρινο και εντοπίζονται στους χλωροπλάστες και χρωμοπλάστες των φυτικών ιστών. Όπως οι χλωροφύλλες έτσι και τα καροτενοειδή είναι βυθισμένα στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών και συμμετέχουν ως βοηθητικές χρωστικές στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζουν ορισμένες οξειδώσεις κατά τη διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης. Από χημική άποψη μπορεί να είναι άκυκλα (λυκοπαΐνη) ή δικυκλικά (α-καροτένιο, β-καροτένιο).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της ομάδας των τερπενίων (Ρουμπελάκη, 2003).

<i>Αριθμός ατόμων άνθρακα</i>	<i>Τύπος βασικού ανθρακικού σκελετού</i>	<i>Κατηγορία ενώσεων</i>	<i>Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι</i>
5	C ₅ H ₈	Ισοπρένιο	Ισοπεντενυλοφωσφορικό
10	C ₁₀ H ₁₆	Μονοτερπένια	Αιθέρια έλαια
15	C ₁₅ H ₂₄	Σεσκιτερπένια	Αιθέρια έλαια, ρητίνες, αμπισσικό οξύ
20	C ₂₀ H ₃₂	Διτερπένια	Αιθέρια έλαια, ρητίνες, γιββεριλλινικό οξύ
30	C ₃₀ H ₄₈	Τριτερπένια	Ρητίνες, ελαστικό κόμμι
40	C ₄₀ H ₆₄	Τετρατερπένια	Καροτενοειδή, φυτοένιο
N	(C ₅ H ₈) _n	Πολυτερπένια	Ελαστικό κόμμι, γουταπέρκα



Εικόνα 1: Καροτενοειδή ανώτερου φυτού όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Τα καροτενοειδή βρίσκονται στα τρόφιμα όπως τα καρότα, οι κολοκύθες, οι γλυκές πατάτες, οι τομάτες, και άλλα πράσινα, κίτρινα, πορτοκαλί, και κόκκινα φρούτα και λαχανικά. Επίσης, βρίσκονται στα πέταλα των ανθέων και στις ρίζες όπου η συγκέντρωσή τους μπορεί να φτάσει σε υψηλά επίπεδα. Εκτιμάται ότι η παγκόσμια ετήσια παραγωγή των χρωστικών αυτών ανέρχεται στα 100 εκατομμύρια τόνους.

Πιστεύεται ότι τα είδη αυτά των καροτενοειδών συμβάλλουν στην προσέλκυση των εντόμων για τη γονιμοποίηση τους. Το ίδιο συμβαίνει και με τα πουλιά, τα οποία χρησιμοποιούν τις χρωστικές αυτές για να δώσουν το κόκκινο, κίτρινο ή πορτοκαλί χρώμα στο φτέρωμά τους με το οποίο θα προσελκύσουν το ταίρι τους. Η α -καροτίνη, η β -καροτίνη, η λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, και λυκοπαΐνη είναι τα πιο κοινά καροτενοειδή (Καράταγλης, 1994).

Τα καροτενοειδή διακρίνονται σε:

- **Πορτοκαλί καροτενοειδή:** α -, β - και γ -καροτένιο
- **Κόκκινα καροτενοειδή:** λυκοπαΐνη και ασταξανθίνη
- **Κίτρινα καροτενοειδή:** λουτεΐνη και ζεαξανθίνη

Περισσότερα από 600 καροτενοειδή έχουν βρεθεί στα φυτά (**Πίνακας 3**), (**Εικόνα 2**). Περίπου τα μισά από αυτά κατά προσέγγιση χρησιμοποιούνται στην ανθρώπινη διατροφή και απορροφώνται από το αίμα.



Εικόνα 2: Τρόφιμα πλούσια σε καροτενοειδή.

Το α-, β-καροτένιο και μερικά άλλα (*εκτός* λυκοπαΐνη και λουτεΐνη) μπορούν να μετατραπούν σε βιταμίνη Α. Η υπερβιταμίνωση της βιταμίνης Α δεν μπορεί να προκληθεί από υπερβολική δόση του α- ή β-καροτένιου γιατί απορροφώνται πολύ αργά από τους οργανισμούς. Το α-, β-καροτένιο έχουν δείχτει ότι λειτουργούν προστατευτικά κατά του καρκίνου του ήπατος και του καρκίνου των πνευμόνων μετά από μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες σε ζώα. Τα καροτενοειδή είναι σχεδόν αδιάλυτα στο νερό και απορροφώνται καλύτερα όταν συνδέονται με τα έλαια. Τα καροτενοειδή μεταφέρονται στον ορό του αίματος και δεσμεύονται στα μόρια της χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Οι ιστοί με τους περισσότερους δέκτες LDL λαμβάνουν τα περισσότερα καροτενοειδή.

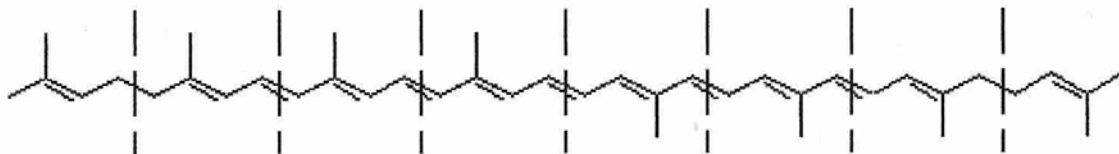
Πίνακας 3: Τρόφιμα τα οποία περιέχουν καροτενοειδή.

<i>Τρόφιμα</i>	<i>β-καροτένιο*</i>	<i>α-καροτένιο*</i>
Γλυκοπατάτα	9.5	0
Καρότο	8.8	4.6
Κολοκύθα	6.9	4.8
Λάχανο	6.2	0
Σπανάκι	5.6	0
	* mg \100 gr	

I-A-1. ΛΥΚΟΠΑΪΝΗ

Η λυκοπαΐνη είναι μια χρωστική ουσία που προσδίδει το κόκκινο χρώμα στις τομάτες, τα κόκκινα σταφύλια, το καρπούζι, το γκρεΐπφρουτ, τη guava, τα βερίκοκα και την παπάγια (**Εικόνες 3, 4, 5**). Όπως και τα καροτενοειδή, η λυκοπαΐνη είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά διαλύεται καλύτερα στα έλαια. Είναι ισχυρά αντιοξειδωτικό (DNA και τις πρωτεΐνες).

Lycopene



Εικόνα 3: Χημικός τύπος της λυκοπαΐνης.

Η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε λυκοπαΐνη συνδέεται με μείωση του καρκίνου του προστάτη, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, του δέρματος, καθώς επίσης συμβάλει στη μείωση των επιπέδων λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) με συνέπεια μείωση του κινδύνου αρτηριοσκλήρωσης. Επίσης, προστατεύει το δέρμα από την υπεριώδη ακτινοβολία λόγω της βήτα-καροτίνης. Στο σώμα, η λυκοπαΐνη εναποτίθεται στο συκώτι, στους πνεύμονες, στον προστατικό αδένα και στο δέρμα.



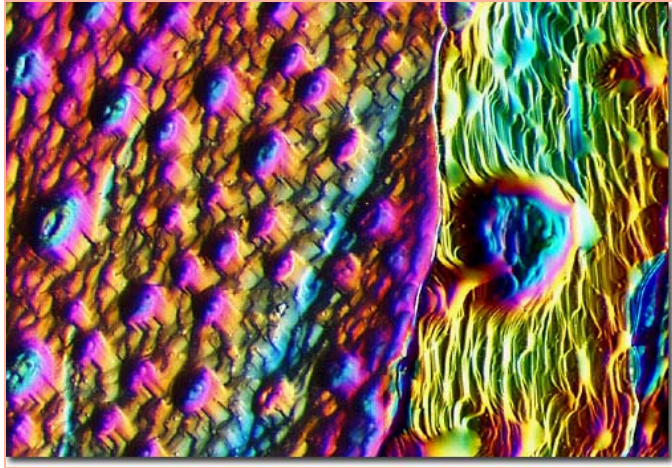
Εικόνα 4: Τρόφιμα πλούσια σε λυκοπαΐνη.

Η συγκέντρωσή της στους ιστούς τείνει να είναι υψηλότερη από όλα τα άλλα καροτενοειδή. Μερικά όργανα, όπως όρχεις και αδένες, αποθηκεύουν μεγαλύτερη ποσότητα λυκοπαΐνης σε σχέση με άλλα όργανα ή ιστούς. Ο τοματοπολιτός έχει σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη βιολογική σημασία από τις φρέσκιες τομάτες (Best Ben, 2002; Kristal AR, 2002; Norrish A.E. et al, 2002).

Μερικά τρόφιμα που είναι καλές πηγές λυκοπαΐνης παρατίθενται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τρόφιμα πλούσια σε λυκοπαΐνη (USDA/NCC Carotenoid Database for U.S. Foods 1998 & Tomato Research Council).

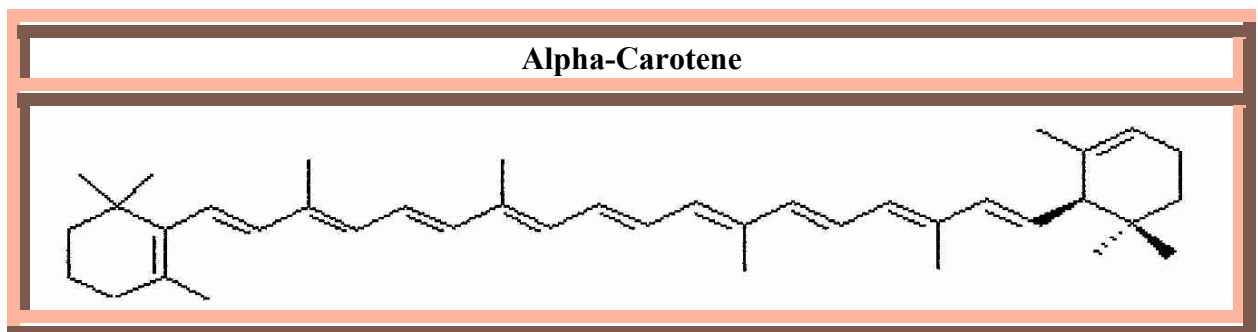
<i>Τρόφιμα</i>	<i>Λυκοπαΐνη(mcg)</i>
Τοματοπολτός	75,362
Πουρές τομάτας	54,385
Σάλτσα marinara	39,975
Τοματόσουπα	25,615
Κοκτέιλ φυσικού χυμού	23,337
Τοματοχυμός	21,960
Καρπούζι	12,962
Τομάτες	4,631
Κέτσαπ	2,551
Γκρέιπφρουτ	1,745
Φασόλια	1,298
Κόκκινη γλυκοπιπεριά	459



Εικόνα 5: Η δομή της λυκοπαΐνης κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

I-A-3. ΑΙΦΑ-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ

Έχει ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με το β-καροτένιο αλλά με την μόνη διαφορά ότι έχει δεκαπλάσια αντικαρκινική δράση από το β-καροτένιο και επιπλέον ενισχύει την απελευθέρωση των ανοσοποιητικών κυτοκινίνων IL-1 και άλφα-TNF (Εικόνα 9) (Best Ben, 2002).

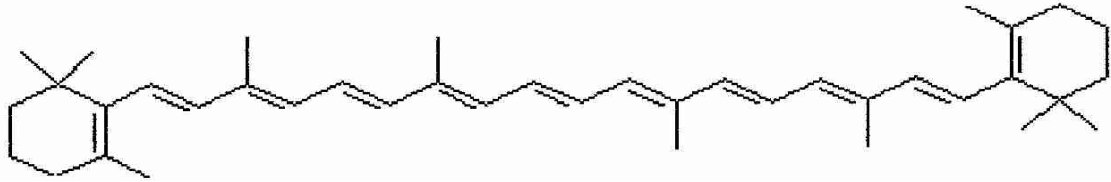


Εικόνα 6: Χημικός τύπος άλφα-καροτένιου

I-A-2. ΒΗΤΑ-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ

Το β-καροτένιο είναι πρόδρομη ένωση για τη δημιουργία της προβιταμίνης Α, που σημαίνει ότι μπορεί να μετατραπεί στο σώμα σε ρετινόλη. Βρίσκεται σε πολλά κίτρινα φρούτα και λαχανικά (Εικόνες 6, 7). Το β-καροτένιο είναι το πιο μελετημένο καροτενοειδές.

Beta-Carotene



Εικόνα 7: Χημικός τύπος βήτα-καροτένιου

Οι λιποδιαλυτές ενώσεις της βιταμίνης Α περιλαμβάνουν το αμφιβληστροειδικό και ρετινικό οξύ. Η ομάδα αυτή των βιταμινών είναι ζωτικής σημασίας για το μάτι και τη λειτουργία του αμφιβληστροειδή. Επίσης προστατεύει τις βλεννώδεις μεμβράνες του στόματος, της μύτης, του λαιμού και των πνευμόνων από τη ζημιά και μειώνει τον κίνδυνο του καρκίνου καθώς και της μόλυνσης από διάφορους μικροοργανισμούς (ανοσία). Επιπλέον υποκινεί τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την αντιγραφή του DNA και μπορεί να καταστείλει την δραστηριότητα των φυσικών κυττάρων-δολοφόνων.



Εικόνα 8: Η δομή του β-καροτένιου κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης Α συσχετίζονται με την αυξανόμενη εμφάνιση διαφόρων ειδών καρκίνου, ειδικότερα εκείνων του πνεύμονα, του λάρυγγα, του οισοφάγου, του στόματος, του στομαχιού, του κόλου, του προστάτη και του τραχήλου της μήτρας.

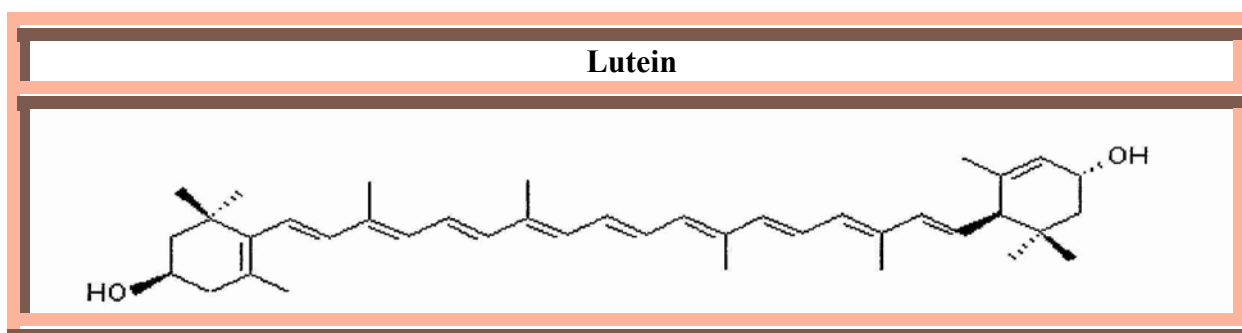


Εικόνα 9: Βασική πηγή β-καροτένιου.

Τα φυτά που είναι πλούσια σε β - καροτένιο όπως τα καρότα, το μπρόκολο, το σπανάκι, το λάχανο, τα πορτοκάλια και τα κίτρινα φρούτα αποτελούν μια εξαιρετικά ισχυρή πηγή αντιοξειδωτικών (**Εικόνα 8**) (Best Ben, 2002).

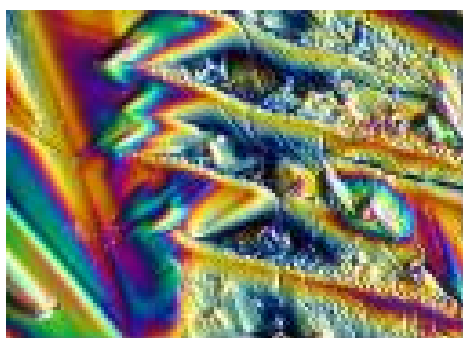
I-A-4. ΛΟΥΤΕΪΝΗ

Η λουτεΐνη (LOO-teen) είναι ένα λιπόφιλο μόριο και γενικά αδιάλυτο στο νερό. Η λουτεΐνη είναι συνδεδεμένη με ένα ή περισσότερα λιπαρά οξέα που είναι παρόντα σε μερικά φρούτα και λουλούδια (**Εικόνες 10, 11**).

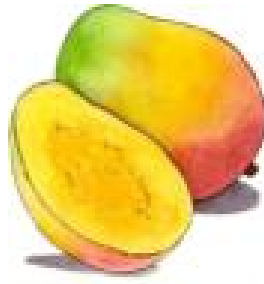


Εικόνα 10: Χημικός τύπος της λουτεΐνης.

Η αλυσίδα πολυαινίου είναι ευαίσθητη στο φως και στη θερμότητα και είναι χημικά ασταθής στα οξέα. Η λουτεΐνη δίνει ένα κίτρινο χρώμα στη λέκιθο του καλαμποκιού, του μάνγκο και των αυγών (**Εικόνα 12**).

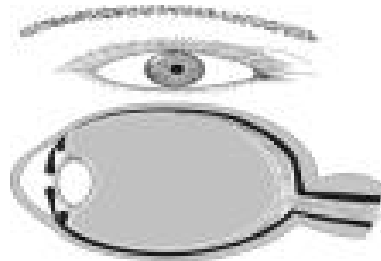


Εικόνα 11: Η λουτεΐνη κάτω από το μικροσκόπιο.



Εικόνα 12:Το μάγγκο είναι πλούσιο σε λουτεΐνη.

Η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη αποτελούν τα μισά από τα καροτενοειδή που υπάρχουν στον αμφιβληστροειδή του ματιού και είναι τα μόνα καροτενοειδή στην ωχρή κηλίδα του ματιού που απορροφούν το καταστρεπτικό μπλε φως και προφυλάσσουν το μάτι από τον κηλιδικό εκφυλισμό και τους καταρράκτες (**Εικόνα 13**).



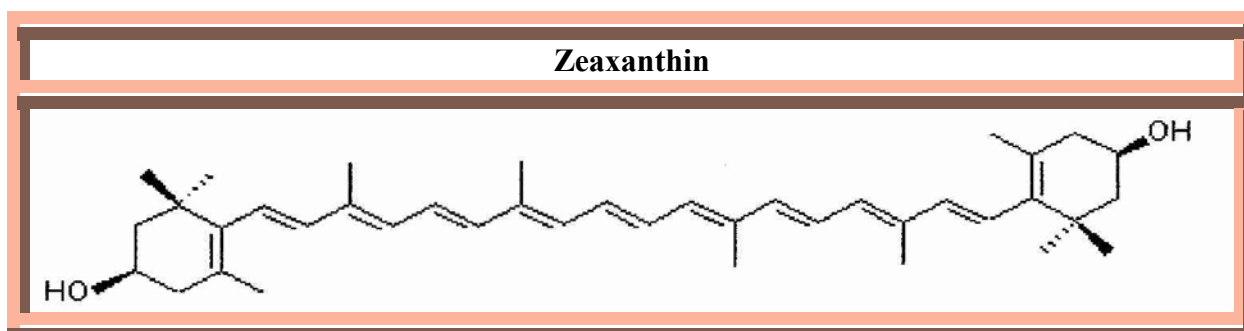
Εικόνα 13:Ο αμφιβληστροειδής του ματιού αποτελείται από λουτεΐνη.

Επίσης μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό από τον καρκίνο του κόλου. Η λουτεΐνη περιέχεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο λάχανο, στο σπανάκι, στο κάρδαμο και στον μαϊντανό (Ben Best, 2002; Seddon JM et al, 1994; Hankinson SE, et al,1992; Roodenburg Aj et al, 2000).

1-A-5. ΖΕΑΞΑΝΘΙΝΗ

Η ζεαξανθίνη είναι ένα οξειδωμένο υδροξύ-παράγωγο του βήτα-καροτένιου. Είναι μια λιποδιαλυτή ξανθοφύλλη και αποτελεί την κύρια χρωστική ουσία των καροτενοειδών που βρίσκεται στα υδρόβια ζώα και επίσης είναι άφθονη στο σπανάκι, στα πράσινα λαχανικά και στο καλαμπόκι (**Εικόνες 14, 15**). Η κόκκινη-πορτοκαλί αυτή χρωστική ουσία συσχετίζεται πολύ με άλλα γνωστά καροτενοειδή όπως το β-

καροτένιο ή η λουτεΐνη, αλλά αναπτύσσει μια ισχυρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα (10 φορές υψηλότερη από το β-καροτένιο).



Εικόνα 14: Χημικός τύπος της ζεαξανθίνης.

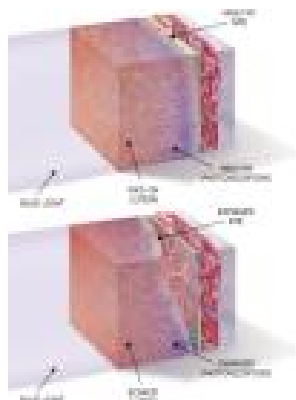
Η ζεαξανθίνη θεωρείται ότι λειτουργεί στο επιβλαβές μπλε φως ως φίλτρο, προστατεύοντας το μάτι από τον ηλικιακό κηλιδικό εκφυλισμό, την κύρια αιτία της τύφλωσης άνω των 65 (**Εικόνα 16**). Σε πολλά από τα υδρόβια ζώα όπου έχει βρεθεί, η ζεαξανθίνη έχει διάφορες ουσιαστικές βιολογικές λειτουργίες, όπως προστασία ενάντια στην οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, προστασία της όρασης, ανοσία, επικοινωνία και βελτίωση της αναπαραγωγικής ικανότητας.



Εικόνα 15: Η ζεαξανθίνη κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Στα είδη όπως ο σολομός ή οι γαρίδες, η ζεαξανθίνη θεωρείται σημαντική για την κανονική αύξηση και επιβίωση. Μπορεί να βρεθεί σε πολλά εδάδιμα θαλασσινά, όπως ο σολομός, η πέστροφα, οι γαρίδες, ο αστακός και τα αυγά ψαριών, καθώς και σε διάφορα είδη πουλιών. Η ζεαξανθίνη δεν μπορεί να συντεθεί από τα ζώα και πρέπει να λαμβάνεται με τη διατροφή, όπως συμβαίνει με άλλα καροτινοειδή. Ορισμένα ψάρια (π.χ. σολομός) είναι ανίκανα να μετατρέψουν τα διάφορα

καροτενοειδή σε ζεαξανθίνη άλλα όμως, όπως οι γαρίδες έχουν μια περιορισμένη ικανότητα να μετατρέψουν τα καροτενοειδή σε ζεαξανθίνη.



Εικόνα 16: Οι λειτουργίες της λουτεΐνης και της ζεαξανθίνης.

Αυτά τα καροτενοειδή προστατεύουν από την ανάπτυξη καταρράκτη και μπορούν να έχουν άλλα οφέλη υγείας στους ανθρώπους. Η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη αποθηκεύονται και οι δύο στον αμφιβληστροειδή του ματιού (**Εικόνα 13**), αλλά καμία από τις δύο δεν μετατρέπεται σε βιταμίνη Α. Είναι ισχυρά αντιοξειδωτικές ουσίες και οι δύο και απαραίτητες για υγιή μάτια (Best Ben,2002; M Mozaffarieh et al, 2003; CR Gale et al, 2003; RA Bone et al, 2003).

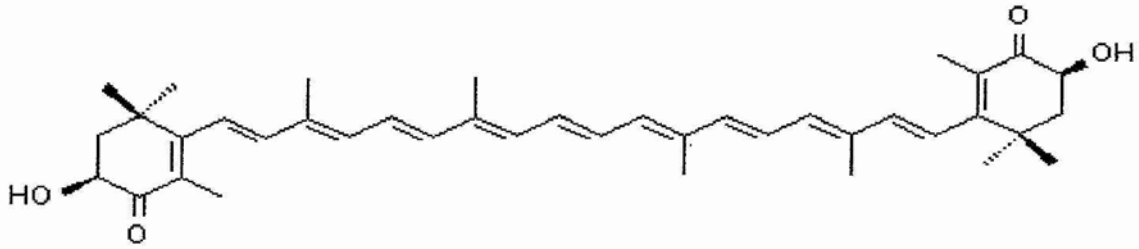
I-A-6. ΑΣΤΑΞΑΝΘΙΝΗ

Η ασταξανθίνη είναι η κύρια χρωστική ουσία καροτενοειδών που βρίσκεται στα υδρόβια ζώα. Δίνει το χαρακτηριστικό χρώμα στο σολομό, τις γαρίδες και στο καβούρι (**Εικόνα 17, 18**). Αυτή η κόκκινη-πορτοκαλιά χρωστική ουσία συσχετίζεται πολύ με άλλα γνωστά καροτενοειδή όπως το β-καροτένιο ή η λουτεΐνη, αλλά αναπτύσσει μια ισχυρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα (10 φορές υψηλότερη από το β-καροτένιο).



Εικόνα 17: Ο σολομός περιέχει μεγάλη ποσότητα ασταξανθίνης.

Astaxanthin

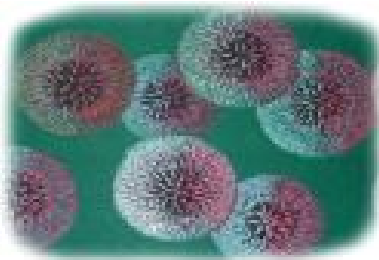


Εικόνα 18: Χημικός τύπος της ασταξανθίνης.

II-B. ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ

II-B-1. ΣΑΠΩΝΙΝΕΣ

Οι σαπωνίνες είναι τριτερπενικοί γλυκοζίτες στεροειδών, οι οποίοι ονομάστηκαν έτσι διότι με το νερό σχηματίζουν αφρό (Εικόνα 19). Εκτός από τις απορρυπαντικές ιδιότητες, μερικές εμφανίζουν και τοξικές ιδιότητες, αφού έχουν την ικανότητα να αποδιοργανώνουν τις μεμβράνες και να προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.



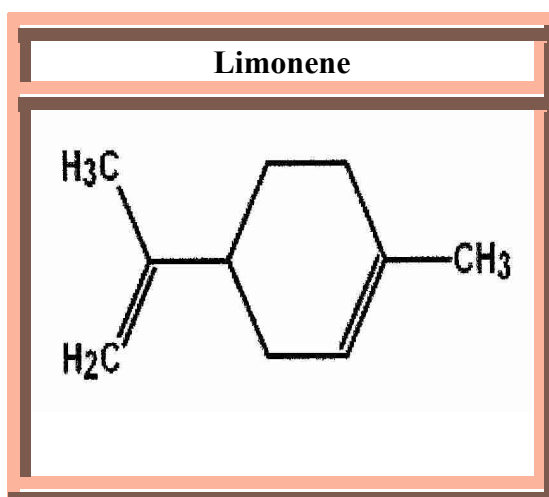
Εικόνα 19 :Μόρια από σαπωνίνες

Λόγω της ομοιότητας του μορίου τους με τις στεροειδείς ορμόνες του ανθρώπου χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τη σύνθεση αντισυλληπτικών ουσιών (Best Ben, 2002; και Linus, 2003).

II-B-2. ΛΕΜΟΝΟΕΙΔΗ

Τα λεμονοειδή βρίσκονται στις φλούδες και τις μεμβράνες των εσπεριδοειδών (Εικόνα 20, 21). Είναι 45 φορές περισσότερο καρκινογόνα από το hesperetin. Έχουν

γεύση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες και καθαριστικά. Τα λεμονοειδή μυρίζουν σαν "piney" (όπως την τερεβινθίνη). Επιπλέον επάγουν το ένζυμο μεταφοράς του γλουταθείου (αποτοξίνωση από την προσθήκη γλουταθείου) (Best Ben, 2002).



Εικόνα 20: Χημικός τύπος των λεμονοειδών.



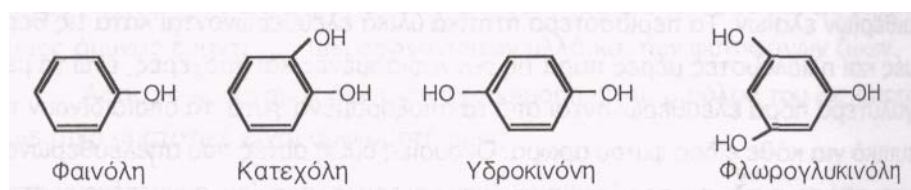
Εικόνα 21: Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των λεμονοειδών.

III - ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Σχεδόν όλα τα ανώτερα φυτά και πολλοί μικροοργανισμοί περιέχουν διάφορα είδη και διαφορετικές ποσότητες φαινολικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά ίσως είναι τα πιο άφθονα από όλες εκείνες τις φυτικές χημικές ενώσεις που περιλαμβάνονται στην κατηγορία των φυσικών ή δευτερογενών μεταβολιτών. Αν εξαιρέσουμε μεμονωμένες περιπτώσεις, η λειτουργία των περισσότερων φαινολών είναι ασαφής. Σήμερα για τις περισσότερες γνωρίζουμε ότι είναι παραπροϊόντα του μεταβολισμού με ενεργή δραστηριότητα, όπως φυτικές ορμόνες, οξειδοαναγωγικοί συμπαράγοντες (π.χ. το συνένζυμο Q –ουβικινόνη), χρωστικές των φλαβονοειδών

κ.λ.π. Στη φύση απαντούν πολλές φορές υπό την μορφή γλυκοζιτών, παρά σε ελεύθερη κατάσταση και συνεπώς πολλές φυτικές φαινόλες αποτελούν το άγλυκο τμήμα των γλυκοζιτών. Το σάκχαρο που συμμετέχει μπορεί να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη κ.α. Όλα τα φαινολικά συστατικά έχουν ένα αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει τουλάχιστον μια υδροξυλική ομάδα συνδεδεμένη με άνθρακα του πυρήνα ή δραστικά παράγωγα, όπως καρβοξυλικές ή μεθοξυλικές ομάδες (-O-CH₃), καθώς επίσης και άλλες δομές μη αρωματικού δακτυλίου.

Οι πιο γνωστές φαινόλες είναι η φαινόλη, η κατεχόλη, η υδροκινόνη και η φλωρογλυκινόλη (Εικόνα 22). Οι φυτικές φαινόλες παρουσιάζουν μια ετερογένεια ως προς τη διαλυτότητα τους, αφού μερικές είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, μερικές είναι υδατοδιαλυτές (κυρίως καρβοξυλικά οξέα και γλυκοζίτες), ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Οι ιδιότητες αυτές προσδίδουν ξεχωριστούς χαρακτήρες στις φαινόλες και ταυτόχρονα τις ξεχωρίζουν από τα άλλα χημικά

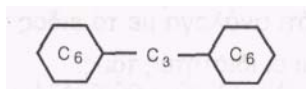


Εικόνα 22: Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της ομάδας των φαινολών.

Σε σχέση με τη χημική τους ποικιλότητα οι φαινόλες εκδηλώνουν διάφορους ρόλους στα φυτά. Μερικές έχουν αμυντικό ρόλο κατά των φυτοφάγων ζώων και των παθογόνων οργανισμών. Άλλες λειτουργούν για μηχανική υποστήριξη, άλλες για την προσέλκυση επικονιαστών και τη διασπορά των σπερμάτων, ενώ άλλες για τη μείωση της αύξησης των γειτονικών ανταγωνιστικών φυτών (Καράταγλης,1994).

III-A. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Μια από τις μεγαλύτερες κλάσεις των φυτικών φαινολών είναι τα φλαβονοειδή. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς παρουσιάζεται στην **εικόνα 23** περιέχει 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτυλίους, που συνδέονται με μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα. Η γέφυρα αυτή αναφέρεται και ως κεντρικός ετεροδακτύλιος.



Εικόνα 23: Χαρακτηριστική δομή ενός φλαβονοειδούς.

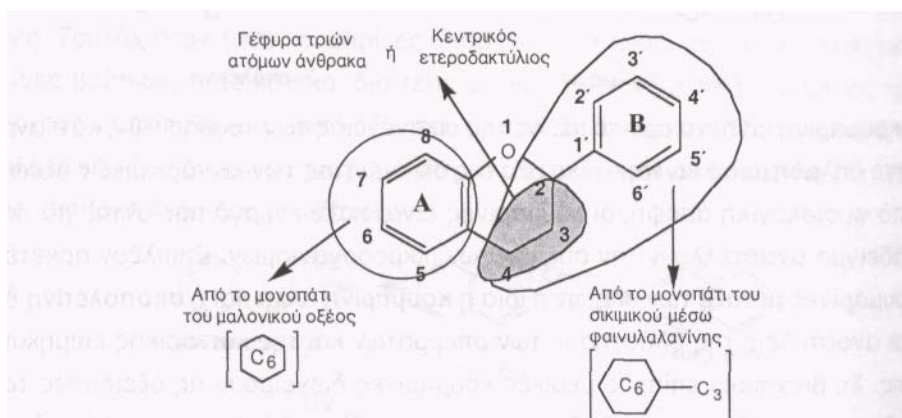
Η δομή αυτή είναι το αποτέλεσμα της συνένωσης δύο προϊόντων που προέρχονται από δύο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια. Ο αρωματικός δακτύλιος B και η γέφυρα των τριών ατόμων του άνθρακα είναι μια φαινυλοπροπανική μονάδα που προέρχεται μέσω φαινυλαλανίνης από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Τα 6 άτομα του άνθρακα του άλλου αρωματικού δακτυλίου (δακτύλιος A) προέρχονται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος.

Η ονομασία τους προέρχεται από το κίτρινο χρώμα (flavus=κίτρινος) μερικών ενώσεων της ομάδας αυτής. Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες που βασίζονται πρωτογενώς στο βαθμό οξειδωσης των ατόμων του άνθρακα της γέφυρας (**Εικόνα 24, Πίνακας 5**).

Τα φλαβονοειδή περιέχουν ουσίες με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Τα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη είναι παρόντα στο κόκκινο κρασί αλλά όχι στο λευκό για το λόγο ότι η ζύμωση του κόκκινου κρασιού πραγματοποιείται με την επιδερμίδα και τα σπέρματα των σταφυλιών, ενώ στο λευκό έχει απομακρυνθεί η επιδερμίδα (Καράταγλης, 1994).

Πίνακας 5: Οι σημαντικότερες κατηγορίες φλαβονοειδών και η βιολογική σημασία τους (Nach J. B. HARBORNE, 1980).

<i>Οι σημαντικότερες κατηγορίες φλαβονοειδών και η βιολογική σημασία τους</i>		
<i>Κατηγορία</i>	<i>Αριθμός γνωστών μελών</i>	<i>Βιολογική σημασία</i>
anthocyanin(s)	250	κόκκινες και μπλε χρωστικές ουσίες
chalcones	60	κίτρινες χρωστικές ουσίες
aurones	20	κίτρινες χρωστικές ουσίες
Flavones	350	κρεμ χρώματος χρωστικές ουσίες των λουλουδιών
flavonols	350	αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση
dihydrochalcones	10	πικρή γεύση
proanthocyanidins	50	στυπτικές ουσίες
catechins	40	έχουν ιδιότητες όπως οι ταννίνες
biflavonoids ?	65	δεν γνωρίζουμε ακριβώς την λειτουργία τους
isoflavonoids	15	επίδραση οιστρογόνων



Εικόνα 24: Βασικός σκελετός των φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή είναι υψίστης σημασίας για την ανθρώπινη υγεία λόγω των συστατικών που περιέχουν με αποτέλεσμα την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών. Σε πειράματα κυτταροκαλλιέργειας αποδείχθηκε ότι επάγουν τα ένζυμα **φάσης 2**, συμβάλουν στην μείωση των μεταλλάξεων του κύτταρου μειώνοντας την πιθανότητα για καρκίνο, εμποδίζουν την απόπτωση και τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Μπορούν να προλάβουν τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Ben Best, 2002).

Τρεις ομάδες των φλαβονοειδών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη φυσιολογία των φυτών. Οι ομάδες αυτές είναι: οι **ανθοκυανιδίνες**, οι **φλαβόνες** και οι **φλαβονόλες**.

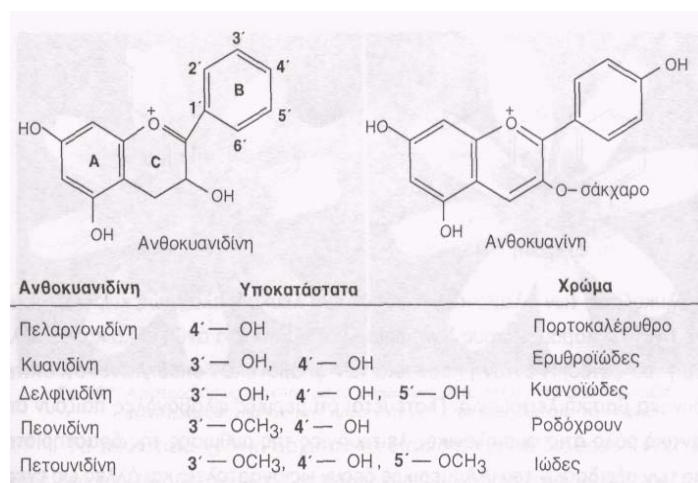
III-A-1. ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΔΙΝΕΣ

Η πιο διαδεδομένη ομάδα των φλαβονοειδών χρωστικών είναι οι **ανθοκυανιδίνες**, οι οποίες είναι υπεύθυνες για πάρα πολλά από τα κόκκινα, ροζ, ιώδη και μπλε χρώματα που παρατηρούνται σε διάφορα φυτικά όργανα. Οι ανθοκυανιδίνες προσδίδουν το κόκκινο χρώμα στα άνθη του τριαντάφυλλου, του κερασιού και στις φράουλες, καθώς επίσης το μπλε στις βιολέτες και στα βατόμουρα. Στα έγχρωμα άνθη και καρπούς, οι ανθοκυανιδίνες είναι ζωτικής σημασίας στην προσέλκυση των εντόμων για τη γονιμοποίηση των ανθέων και τη διασπορά των σπερμάτων. Την άποψη αυτή είχε εκφράσει και ο Δαρβίνος λέγοντας ότι η ελκυστικότητα ενός καρπού εξυπηρετεί την προσέλκυση των πουλιών και εντόμων,

έτσι ώστε τρώγοντας τους καρπούς να διασπείρονται τα σπέρματά τους σε μεγάλη έκταση με τα περιττώματά των ζώων.

Η βιοσύνθεση των ανθοκυανιδινών επηρεάζεται από την παρουσία της άμεσης ακτινοβολίας, (για παράδειγμα τα πιο κόκκινα μήλα βρίσκονται στην έντονα φωτιζόμενη πλευρά του δένδρου). Η έλλειψη αζώτου, φωσφόρου ή θείου οδηγεί στη συσσώρευση ανθοκυανιδινών σε μερικά φυτικά είδη καθώς επίσης και οι χαμηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το σχηματισμό τους όπως φαίνεται στα φθινοπωρινά τους φύλλα. Τα έντονα ζωνηρά χρώματα των φθινοπωρινών φύλλων οφείλονται κατά μεγάλο μέρος στη συσσώρευση ανθοκυανιδινών κατά τις ηλιόλουστες και κρύες μέρες του φθινοπώρου. Σε μερικά φυτικά είδη, παρόλο που οι κίτρινες και οι πορτοκαλί χρωστικές των καροτενοειδών υπερισχύουν στα φθινοπωρινά φύλλα, το ζωνηρό τους χρώμα οφείλεται κυρίως στις ανθοκυανιδίνες.

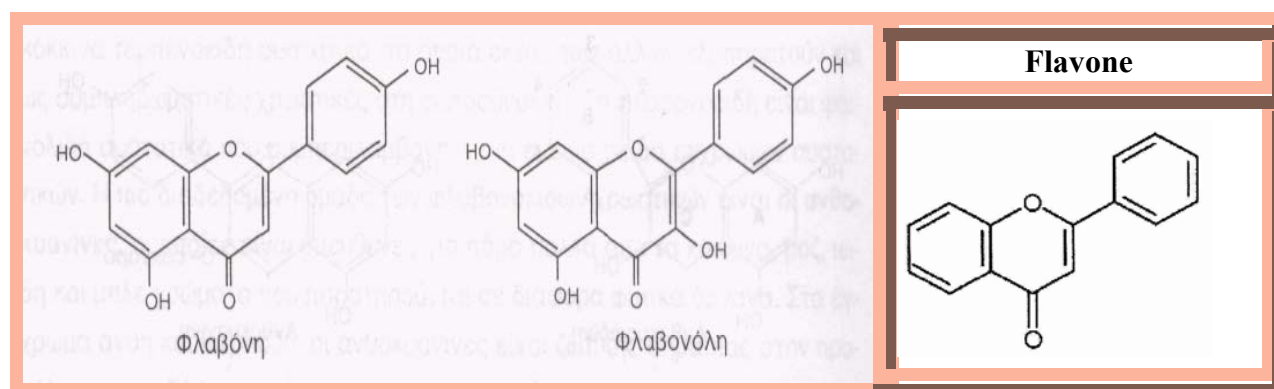
Οι ανθοκυανιδίνες είναι γλυκοζίτες που έχουν σάκχαρο στη θέση 3 (Εικόνα 25) και μερικές φορές σε κάποιες άλλες θέσεις (π.χ. Πελαργονιδίνη, Μαλβιδίνη). Οι ανθοκυανίνες δίχως τα σάκχαρά τους, είναι γνωστές ως **ανθοκυανιδίνες (ανθοκυανίνες = ανθοκυανιδίνες + σάκχαρο)**. Οι πιο κοινές ανθοκυανιδίνες δίνονται στην εικόνα 25 (Καράταγλης, 1994).



Εικόνα 25: Βασική δομή των ανθοκυανινών και οι πιο ενδιαφέρουσες ανθοκυανιδίνες.

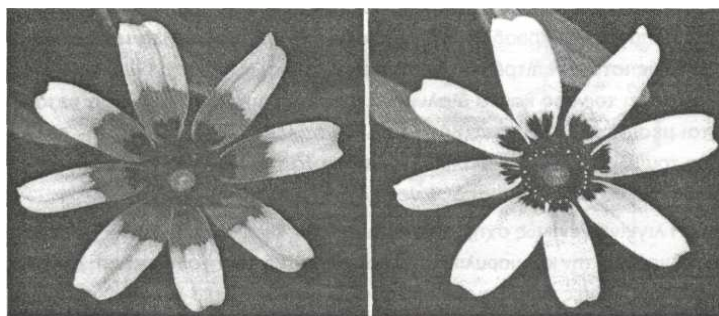
III-A-2. ΦΛΑΒΟΝΕΣ -ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ

Δύο άλλες μεγάλες ομάδες των φλαβονοειδών που βρίσκονται στα άνθη είναι οι **φλαβόνες** και οι **φλαβονόλες**. Αν μια υδροξυλική ομάδα εισέλθει στην 3-θέση της γέφυρας μιας φλαβόνης τότε προκύπτουν οι φλαβονόλες (**Εικόνα 26**). Οι γλυκοζίτες των φλαβονολών δίδουν ένα λευκό ή ελαφρώς κίτρινο χρώμα στα άνθη. Η παρουσία τους δεν περιορίζεται μόνο στα άνθη αλλά και σε άλλα μέρη του φυτού. Η έντονη παρουσία των φλαβονολών υποδηλώνει ότι επιτελούν μια βασική λειτουργία. Πιστεύεται ότι μερικές φλαβονόλες παίζουν σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές λειτουργίες της ρύθμισης της δραστηριότητας των οξειδασών του IAA (μερικές δρουν ως αναστολείς και άλλες ως ενεργοποιητές της οξειδάσης του IAA).



Εικόνα 26: Βασικός σκελετός της φλαβόνης και της φλαβονόλης.

Μια άλλη βασική λειτουργία των φλαβονών και φλαβονολών είναι ότι απορροφούν φως σε μικρά μήκη κύματος που δεν είναι ορατά από ανθρώπινο μάτι. Ακόμη και οι άχρωμες φλαβόνες και φλαβονόλες έχουν την ιδιότητα αυτή με αποτέλεσμα να προσελκύουν τις μέλισσες και άλλα έντομα που έχουν τη δυνατότητα οράσεως σ' αυτά τα μήκη κύματος. Οι ερευνητές, με φωτογράφιση σε υπεριώδες φως έδειξαν ότι οι φλαβονόλες σ' ένα άνθος σχηματίζουν συμμετρικά σχήματα ακτινωτά ή κυκλικά, τα οποία ονόμασαν **οδηγούς νέκταρος** (**Εικόνα 27**). Τα σχήματα αυτά είναι ορατά από τα έντομα και πιστεύεται ότι βοηθάνε στο να εντοπίζουν την τοποθεσία της γύρης και του νέκταρος. Οι φλαβονόλες προστατεύουν τα κύτταρα από υπερβολική υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, επειδή απορροφούν έντονα την ακτινοβολία στην υπεριώδη περιοχή, ενώ επιτρέπουν το ορατό μήκος κύματος (φωτοσυνθετικά δραστικό) να περάσει ανεμπόδιστα.

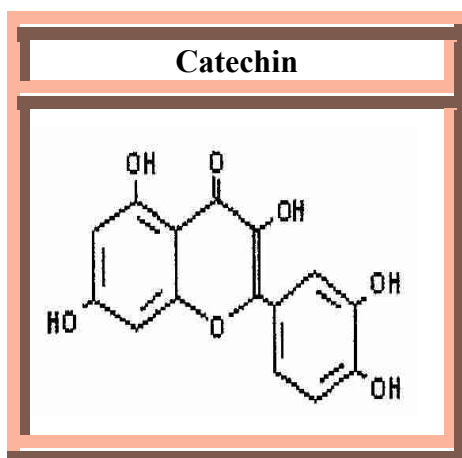


Εικόνα 27: Αριστερά όπως φαίνεται με το ανθρώπινο μάτι. Δεξιά, μετά από υπεριώδη φωτογράφιση, όπως φαίνεται το άνθος από τα έντομα.

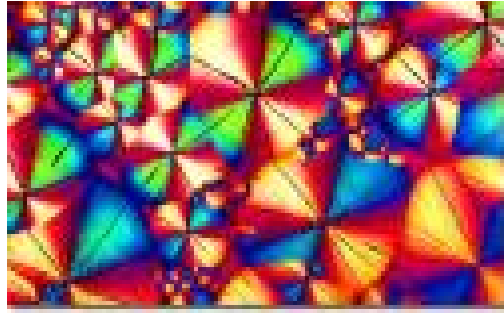
Τα τελευταία χρόνια άρχισαν να διαπιστώνονται διάφορες νέες λειτουργίες των φλαβονοειδών. Για παράδειγμα, φλαβόνες και φλαβονόλες εκκρίνονται από τις ρίζες των ψυχανθών στη ριζόσφαιρα, οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια των ριζικών τους φυματίων. Προσφάτως έχει αποδειχθεί ότι η φλαβονόλη κερκιτίνη και η φλαβόνη **οπιγενίνη** λειτουργούν ως ενδογενείς ρυθμιστές της πολικής μεταφοράς της αυξίνης, αποδεικνύοντας κατ' αυτό τον τρόπο ότι τα δευτερογενή προϊόντα παίζουν σημαντικούς φυσιολογικούς και οικολογικούς ρόλους (Καράταγλης, 1994).

III-A-3. KATEXINH

Κατατάσσονται στην κατηγορία των φλαβονοειδών (**Εικόνες 28, 29**). Είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται στην μαύρη σοκολάτα, περιέχεται και στα σταφύλια αλλά όμως χάνεται μετά από την ξήρανσή τους (σταφίδα).



Εικόνα 28: Χημικός τύπος της καχετίνης.



Εικόνα 29: Η κατεχίνη κάτω από το μικροσκόπιο.

Αποτελεί ενεργό συστατικό του τσαγιού σε ποσοστό 15-20% των στερεών συστατικών στο πράσινο τσάι και 5-10% των στερεών συστατικών στο μαύρο τσάι (Εικόνα 30). Έκτος από αντιοξειδωτικό έχει και αντικαρκινικές ιδιότητες προστατεύοντας το γενετικό υλικό των κυττάρων (DNA) και επομένως είναι χρήσιμο για τους ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή σε θεραπεία με ακτινοβολίες.



Εικόνα 30: Η κατεχίνη είναι βασικό συστατικό του τσαγιού.

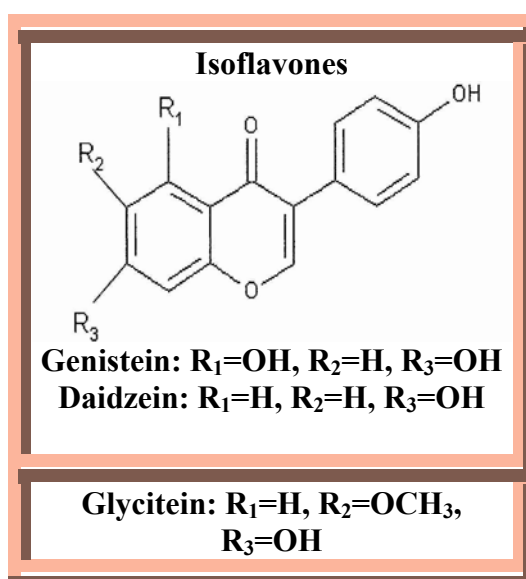
Το EpiGalloCatechin Galleate (EGCG) είναι αφθονότερο στο πράσινο τσάι ενώ δεν το συναντάμε καθόλου στο μαύρο τσάι. Το EGCG μπορεί να αυξήσει τον βασικό μεταβολισμό και να ενισχύσει τα τριχοειδή αγγεία. Η κατεχίνη εμποδίζει το ένζυμο catechol-O-methyltransferase norepinephrine. Ο πολυμερισμός ταννινών στο μαύρο τσάι είναι μια άλλη ιδιότητα της κατεχίνης. Οι ταννίνες είναι συνδετικές πρωτεΐνες που βοηθούν το μαύρισμα της επιδερμίδας του δέρματος. Τα φύλλα τσαγιού περιέχουν επίσης πολυφαινόλες και διάφορα ένζυμα (οξειδάση). Όταν τα φύλλα τσαγιού σπάζουν σκόπιμα ή κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, η επαφή της πολυφαινόλης με την οξειδάση αναγκάζει τις κατεχίνες να ενωθούν μεταξύ τους και να σχηματίζουν διμερή και πολυμερή σώματα γνωστά ως θειοφλαβίνες και θειουβικονόνες, αντίστοιχα. Αυτή η διαδικασία οξείδωσης είναι γνωστή στη βιομηχανία τσαγιού ως "ζύμωση". Η κατανάλωση του τσαγιού έχει συνδεθεί με

πρόληψη ορισμένων ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, ενδοθηλιακή λειτουργία, μείωση του καρκίνου του κόλου, του στομάχου, της ωοθήκης, του προστάτη και της στοματικής κοιλότητας, καθώς επίσης, την οστεοπόρωση, μείωση της οδοντικής πλάκας, πέτρες των νεφρών και απώλεια βάρους (Best Ben, 2002).

III-A-4. ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΕΣ

Οι ισοφλαβόνες είναι μια κατηγορία ενώσεων που παράγονται από τα φυτά και έχουν παρόμοια δομή με τα οιστρογόνα του ανθρώπου γι' αυτό το λόγο είναι ταξινομημένα ως **φυτοοιστρογόνα** (Εικόνα 31).

Οι σπόροι των ροδιών, ο μαϊντανός, τα σιτάρια και τα όσπρια, όπως τα φασόλια και ιδιαίτερα η σόγια είναι από τις πλουσιότερες πηγές ισοφλαβονών στην ανθρώπινη διατροφή (Εικόνα 32).



Εικόνα 31: Χημικός τύπος ισοφλαβονοειδούς.



Εικόνα 32: Τρόφιμα που είναι πλούσια σε ισοφλαβονοειδή.

Στη σόγια, οι ισοφλαβόνες είναι παρόντα ως γλυκοσίδια (που δεσμεύονται σε ένα μόριο σακχάρου). Η ζύμωση ή η πέψη της σόγιας ή των προϊόντων της οδηγεί στην απελευθέρωση του σακχάρου από το γλυκοσίδιο ισοφλαβόνης, αφήνοντας την ισοφλαβόνη χωρίς σάκχαρο. Τα γλυκοσίδια ισοφλαβόνης της σόγιας είναι τα: genistin, daidzin και glycitin, ενώ οι αγλυκόνες είναι genistein, daidzein και glycitein αντίστοιχα. Τα βιολογικά αποτελέσματα των ισοφλαβονών σόγιας επηρεάζονται έντονα από τον μεταβολισμό, ο οποίος εξαρτάται από τη δραστηριότητα των βακτηρίων που συμβιώνουν στο ανθρώπινο έντερο.

Οι ισοφλαβόνες σόγιας είναι γνωστά για την ομοιότητα που διαθέτουν με τα οιστρογόνα του ανθρώπου και την ικανότητα τους να δεσμεύονται στους δέκτες του οιστρογόνου μέσα στο κύτταρο. Το σύμπλοκο οιστρογόνο-υποδοχέα επιδρά με το DNA για να αλλάξει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από οιστρογόνα. Οι υποδοχείς οιστρογόνου είναι παρόντες σε πολυάριθμους ιστούς εκτός από εκείνους που συνδέονται με την αναπαραγωγή συμπεριλαμβανομένου των οστών, του ήπατος, της καρδιάς και του εγκεφάλου. Οι ισοφλαβόνες της σόγιας και των άλλων φυτοοιστρογόνων μπορούν να δεσμεύσουν τους υποδοχείς οιστρογόνου τα οποία μιμούνται τα αποτελέσματα των διαφόρων ιστών και μπλοκάρουν τα αποτελέσματα των άλλων οιστρογόνων. Οι επιστήμονες ενδιαφέρονται για τις ιστο-εκλεκτικές δραστηριότητες των φυτοοιστρογόνων, επειδή τα αντι-οιστρογονικά αποτελέσματα που επιφέρουν στους ιστούς θα μπορούσαν να βοηθήσουν να μειωθεί ο κίνδυνος σχετικά με τη δημιουργία της καρκινικής ορμόνης (στήθος, μήτρας και προστάτη), ενώ τα αποτελέσματα σε άλλους ιστούς θα μπορούσαν να βοηθήσουν να διατηρηθεί η πυκνότητα των οστών και να βελτιωθεί η κανονική ροή του αίματος που οφείλεται στα επίπεδα χοληστερόλης. Οι ισοφλαβόνες είναι επίσης γνωστές ότι ενεργούν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά ενάντια στο υπεροξειδίο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε δοκιμές που έγιναν *in vitro*.

Οι ισοφλαβόνες έχουν παρά πολύ καλά αποτελέσματα στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, πρόληψη της οστεοπόρωσης στις γυναίκες με εμμηνόπαυση και στην αρτηριακή λειτουργία. Επίσης συμβάλει στην αύξηση της χοληστερόλη HDL (καλή χοληστερόλη) ενώ αντίθετα μειώνει τη LDL χοληστερόλη (κακή χοληστερόλη). Η genistein μπορεί να προλάβει τον καρκίνο του μαστού καθώς επίσης και να βοηθήσει στην αντιμετώπιση του καρκίνου του ενδομήτριου. Τέλος,

μπορεί να μειώσει την παρουσία του προστάτη κατά 30% (Ben Best, 2002 και Linus, 2005).

III-A-5. HESPERETIN

Κατατάσσεται στην ομάδα των φλαβονολών. Είναι συστατικό των εσπεριδοειδών και κυρίως των πορτοκάλιων. Είναι φυσικό αντιοξειδωτικό γιατί παράγει την βιταμίνη C. Η βιταμίνη C μπορεί να προλάβει τις καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο και τον καταρράκτη, επίσης μπορεί να θεραπεύσει τις καρδιαγγειακές παθήσεις, το καρκίνο και το διαβήτη. Άλλη μια εξίσου σημαντική ιδιότητα της hesperetin είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των ιών συμπεριλαμβανομένης της πολιομυελίτιδας, του έρπη και της γρίπης (Best Ben, 2002).

III-A-6. NARINGIN

Κατατάσσεται και αυτό στην ομάδα των φλαβονολών. Δίνει την πικρή γεύση στο γκρέιφρουτ. Η σπουδαιότητα του Naringin στον άνθρωπο οφείλεται στις ιδιότητες που παρέχει όπως μείωση της χοληστερόλης LDL αλλά όχι της χοληστερόλης HDL (**Εικόνα 33**). Ενισχύει το μεταβολισμό των οξέων και των λιπιδίων στο ήπαρ, αυξάνοντας την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του ήπατος, προστατεύει το στομάχι από το έλκος εξασφαλίζοντας την αποτοξίνωση του οργανισμού από το οινόπνευμα και αυξάνει την καλύτερη απορρόφηση των φαρμάκων παρεμποδίζοντας τα εντερικά ένζυμα.



Εικόνα 33: Το γκρέιφρουτ είναι πλούσιο σε naringin.

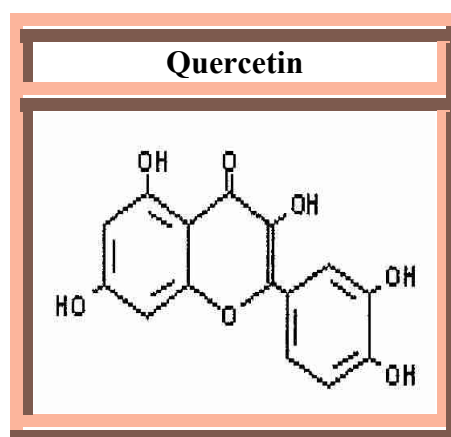
Ίσως η σημαντικότερη λειτουργία του είναι η προστασία του γενετικού υλικού (DNA) από την ζημιά που προκαλεί η ακτινοβολία. Τέλος έχει και αντισηπτικές ιδιότητες (Best Ben, 2002).

III-A-7. RUTIN

Εμφανίζεται στο σπαράγγι, και τα εσπεριδοειδή αλλά όμως χάνεται στην ξήρανση των σταφυλιών. Η ιδιότητα του είναι η ενίσχυση των τριχοειδών κυτταρικών τοιχωμάτων (Best Ben, 2002).

III-A-8 QUERCETIN

Κατατάσσεται στις φλαβόνες. Είναι δομικό συστατικό των φλαβονοειδών των εσπεριδοειδών της hesperetin και της ερυθρίνης (**Εικόνα 34**). Απαντά σε υψηλά ποσοστά στα κόκκινα κρεμμύδια, στα κόκκινα σταφύλια, στη σίκαλη, στο πράσινο τσάι και στην επιδερμίδα των μήλων.



Εικόνα 34: Χημικός τύπος *Quercetin*.

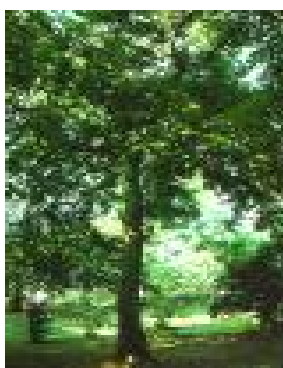
Είναι ισχυρά αντιοξειδωτικό, μειώνει τη χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας (LDL), την αγγειοδιαστολή του αίματος, αναστέλλει την δράση των ιόν όπως ο έρπης. Η αντισταμινική ιδιότητα που έχει μπορεί να ανακουφίσει από τα συμπτώματα της αλλεργίας. Επίσης εμποδίζει το ένζυμο COMT (Catechol-O-MethylTransferase). Με αυτόν τον τρόπο μειώνοντας έτσι τη διακοπή επινεφρίνης (η αυξανόμενη επινεφρίνη αυξάνει τις δαπάνες οξείδωσης και ενέργειας "θερμογένεση") (Best Ben, 2002).

III-A-9. SILILYMARIN

Βρίσκεται στις αγκινάρες και στο γάλα. Προστατεύει από τον καρκίνο του δέρματος και την αρτηριοσκλήρυνση. Είναι ισχυρό αντιοξειδοτικό, έχει αντιφλεγμονώδη δράση και μειώνει τη χοληστερίνη (Best Ben, 2002).

III-A-10. TANNINES

Η ταννίνη είναι ένας λειτουργικός όρος παρά μια ευδιάκριτη χημική ομάδα. Οι ταννίνες έχουν χρησιμοποιηθεί στο μαύρισμα και την προστασία του δέρματος από το 18^ο αιώνα. Είναι ένα σημαντικό πολυμερές των φυτικών φαινολών. Το όνομά τους προέρχεται από την κελτική λέξη "tan" που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες ταννινών (**Εικόνα 35**). Επίσης ο όρος ταννίνες χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ουσίες εκείνες, που θα μπορούσαν να μετατρέψουν τα ακατέργαστα ζωικά δέρματα σε κατεργασμένα άσηπτα δέρματα με τη διαδικασία της δέψης.



Εικόνα 35: Η βελανιδιά είναι πλούσια σε ταννίνες.

Οι ταννίνες, με τη διαδικασία της δέψης, συνδέονται με τις πρωτεΐνες του κολλαγόνου του δέρματος των ζώων αυξάνοντας την αντοχή τους έναντι της θερμοκρασίας, της σήψης, της δράσης των μικροβίων και της διαπερατότητας του νερού. Οι ταννίνες βρίσκονται σε πολλά φυτικά είδη, όπως το μαύρο τσάι τα ρόδια και τα μούρα προσδίδοντας τη χαρακτηριστική πικρή γεύση κυρίως όμως συντίθενται εντονότερα μετά από τραυματισμό του φυτικού ιστού, κατά συνέπεια την καταστροφή των κυττάρων. Λόγω αυτής της καταστροφής έρχονται σε επαφή οι **πολυφαινολικές οξειδάσες** με τα φαινολικά υποστρώματα όπως το γαλλικό οξύ, το

χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή. Η οξειδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν ταννίνες. Οι τελευταίες θεωρούνται προστατευτικές ουσίες απέναντι στην προσβολή των φυτών από μικροοργανισμούς.

Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των ταννινών αποδίδονται στην ικανότητα τους να συνδέονται με τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας αδιάλυτα σύμπλοκα και σ' αυτό ενδεχομένως να οφείλονται οι αντισηπτικές τους ιδιότητες. Πιστεύεται ότι οι φυτικές ταννίνες ενώνονται με τις πρωτεΐνες στο έντερο των φυτοφάγων ζώων με υδρογονικούς δεσμούς, μεταξύ των υδροξυλικών ομάδων των φαινολών και των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να αδρανοποιούνται τα πεπτικά ένζυμα των φυτοφάγων και τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα ταννινών και φυτικών πρωτεϊνών που είναι δύσκολη η πέψη τους. Τέλος πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για το **φαιό χρώμα** μερικών φύλλων κατά το φθινόπωρο και το χρώμα που παίρνει το κομμένο μήλο ή η πατάτα όταν αφεθεί στον αέρα.

Οι ταννίνες, μαζί με τη βιταμίνη C, βοηθούν στη δημιουργία του κολλαγόνου. Οι ταννίνες προλαμβάνουν τη μόλυνση παρεμποδίζοντας τα βακτήρια να προσκολλούνται στα κυτταρικά τοιχώματα. Ο συνδυασμός ταννίνης και ανθοκυάνης (όπως στο χυμό ροδιών) μπορεί να μειώσει την χοληστερίνη με αποτέλεσμα μείωση της αρτηριοσκλήρυνσης και καλύτερη κυκλοφορία του αίματος.

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον από τους τεχνολόγους τροφίμων, επειδή οι ταννίνες προκαλούν μια θολότητα στην μύρα και στα κρασιά λόγω της σύνδεσης τους με τις πρωτεΐνες. Επίσης προκαλούν ανεπιθύμητες γεύσεις σε μερικές τροφές και κυρίως από αυτές που προέρχονται από τα φρούτα. Η έντονη στιβάδα ορισμένων τροφών οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία των ταννινών (Καράταγλης, 1994 και Best Ben, 2002).

III-B. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Ο χυμός των μούρων είναι πλούσιος σε φαινολικά οξέα, τα οποία ελαττώνουν την προσκόλληση των βακτηρίων στα δόντια και στην εσωτερική επιφάνεια των κύτταρων της κύστης και έτσι ελαττώνεται η οδοντική τερηδόνα και συχουορία. Η γλυκιά γεύση που έχουν οι φαινολικές ενώσεις δεν επιτρέπουν να προσκολληθούν τα διάφορα βακτήρια. Τα κυριότερα φαινολικά οξέα παρατίθενται στον **Πίνακα 6**.

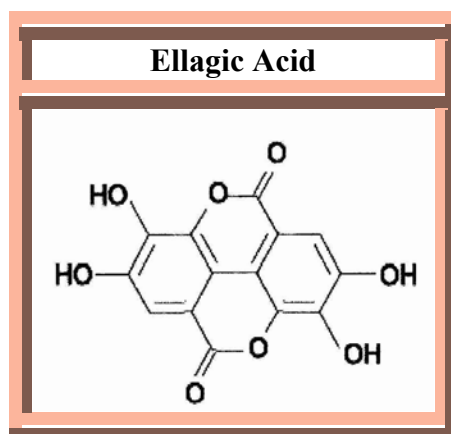
Πίνακας 6: Οι σημαντικότερες κατηγορίες φαινολικών οξέων (J. B. HARBORNE 1980).

<i>Οι σημαντικότερες κατηγορίες φαινολικών οξέων στα φυτά</i>		
Αριθμός ατόμων-C	Βασικός σκελετός	Κατηγορία
6	C ₆	simple phenols, benzoquinones
7	C ₆ - C ₁	phenolics acids
8	C ₆ - C ₂	acetophenone, phenylacetic acid
9	C ₆ - C ₃	Hydroxycinnamic acid, polypropene, coumarin, isocoumarin
10	C ₆ - C ₄	naphtoquinone
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	xanthone
14	C ₆ - C ₂ - C ₆	stilbene, anthrachinone
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	Isoflavonoids, flavonoids
18	(C ₆ - C ₃) ₂	lignans, neolignans
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	biflavonoids
n	(C ₆ - C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ - C ₃ - C ₆) _n	lignins catecholmelanine

Τα φαινολικά οξέα επίσης μειώνουν την οξειδωση της χοληστερόλης LDL και έχουν και αντικαρκινική δράση. Οι σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις υπάρχουν στα σταφύλια (κόκκινο κρασί, χυμός σταφυλιών) και είναι προανθοκυανίνες, η ρεσβερατρόλη και το ελαγικό οξύ (Best Ben, 2002).

III-B-1. ΕΛΑΓΙΚΟ ΟΞΥ

Μειώνει σημαντικά το καρκίνο του κόλου, εμποδίζει το σχηματισμό των συμπλεγμάτων DNA, αναστέλλει τα ένζυμα **φάσης 1** και επάγει τα ένζυμα **φάσης 2** (**Εικόνα 36**). Βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στις φράουλες αλλά το 50% στα βατόμουρα (κυρίως ellagitannins) (**Εικόνα 37**) (Best Ben, 2002).



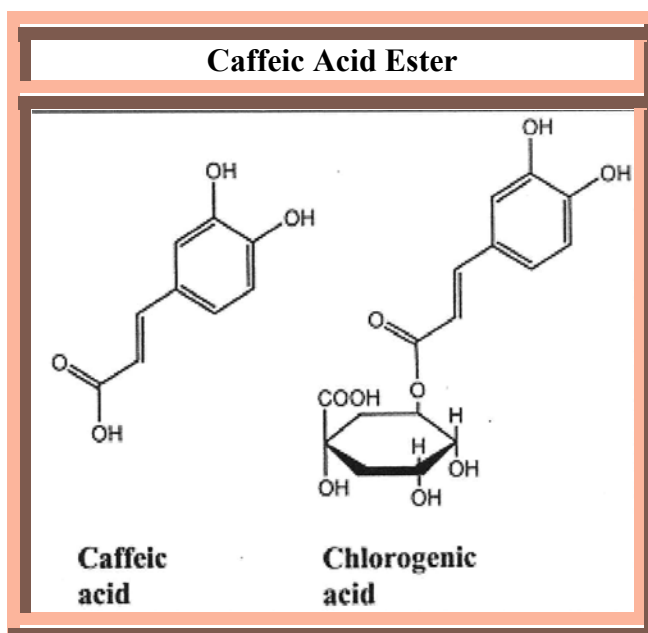
Εικόνα 36: Χημικός τύπος του ελαγικού οξέος.



Εικόνα 37: Τα βατόμουρα είναι πλούσια πηγή ελαγικού οξέος.

III-B-2 ΧΛΩΡΟΓΕΤΙΚΟ ΟΞΥ

Απαντά σε πολύ υψηλά επίπεδα στα μούρα στις τομάτες, στις πιπεριές, στην επιδερμίδα των σταφυλιών μαζί με το ελαγικό οξύ. Πολύ συχνά είναι εστέρας του καφεϊκού οξέος. Το καφεϊκό οξύ είναι ένα υδροξυκιναμικό οξύ που έχει την δυνατότητα να μειώνει τη μεταλλαξιγόνο δράση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, να παράγει τη βιταμίνη E και μπορεί να μειώσει την χοληστερίνη (LDL). Ο καφές έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες όταν όμως ψηθεί αυξάνεται η αντιοξειδωτική δραστηριότητα (**Εικόνα 38**) (Best Ben, 2002).



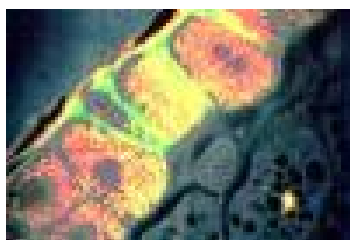
Εικόνα 38: Χημικός τύπος του χλωρογενετικού οξέος.

III-B-3. π-ΠΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ

Το π-κουμαρικό οξύ είναι πρόδρομη ένωση για τη δημιουργία των φλαβονοειδών. Δεσμεύει το νιτρικό οξύ και τα παράγωγά του και συνδυάζεται με τις πρωτεϊνικές αμίνες για το σχηματισμό της νιτροδαμίνης. Έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Απαντά σε υψηλές συγκεντρώσεις στις κόκκινες και πράσινες πιπεριές (Best Ben, 2002).

III-B-4. ΦΥΤΙΚΟ ΟΞΥ

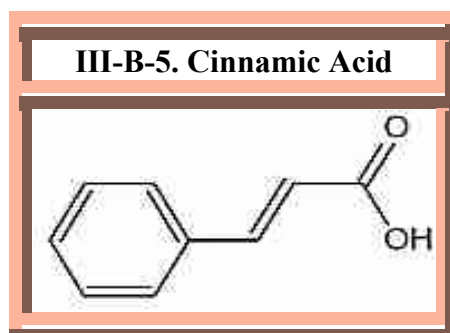
Τα τρόφιμα που είναι πλούσια σε φυτικό οξύ είναι τα όσπρια τα σιτάρια, το πίτουρο σίτου και ο λιναρόσπορος (Εικόνα 39). Σημαντικές ιδιότητες που παρέχει είναι πλούσιο σε φωσφορικό άλας, δεσμεύει το ασβέστιο και το σίδηρο (σίδηρος είναι αναγκαίος για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων), δεσμεύει και μειώνει τις ελεύθερες ρίζες, μειώνει την απορρόφηση ασβεστίου από το έντερο, μειώνει την πέψη του αμύλου (χαμηλώνει τη γλυκόζη αίματος). Τέλος επιβραδύνει την αύξηση καρκίνου και μειώνει την καρδιαγγειακή πάθηση (Best Ben, 2002).



Εικόνα 39: Το μόριο φυτικού οξέος κάτω από το μικροσκόπιο.

III-B-5. KINNAMΙΚΟ ΟΞΥ

Είναι το φαινυλο-ακρυλικό οξύ (Εικόνα 40). Δίνει τη χαρακτηριστική μυρωδιά και γεύση στην κανέλα. Ο εσωτερικός φλοιός του δένδρου είναι πλούσιος σε ταννίνες, σε κινναμική αλδεΐδη που παρέχουν αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιπαρασιτικές ιδιότητες. Το κινναμικό οξύ είναι βασική μονάδα για τη δημιουργία της λιγνίνης (Best Ben, 2002).



Εικόνα 40: Χημικός τύπος του κινναμικού οξέος.

III-C ΑΛΛΕΣ ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ

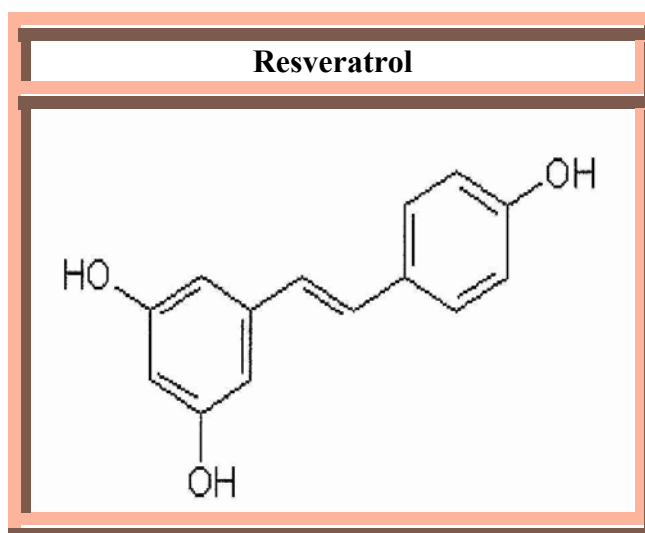
III- C -1. ΚΟΥΡΜΟΥΜΙΝΗ

Η κουρκουμίνη είναι μια φυτοχημική ένωση καρυκευμάτων που χρησιμοποιείται για να γίνει το κάρυ (το καρύκευμα "κύμινο" δεν περιέχει *καμία* κουρκουμίνη, παρά μόνο παρόμοιο όνομα). Έχει έντονο κίτρινο χρώμα που καθιστά το κάρυ κίτρινο. Η κουρκουμίνη εμποδίζει το γονίδιο που παράγει το COX-2 ένζυμο, αποτρέποντας την παραγωγή του.(το σκεύασμα Celebrex εμποδίζει απλά COX-2 ένζυμο). Η κουρκουμίνη είναι επίσης έντονα αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική,

μειώνει τις ελεύθερες ρίζες, εμποδίζει την απελευθέρωση της κυτοκινίνης α -TNF και τέλος μπορεί να αποτρέψει τον καρκίνο του κόλου. Επιπλέον, μπλοκάρει τα αμυλοειδή στα οποία οφείλεται η ασθένεια του Alzheimer. Από την κουρκουμίνη προέρχεται η ασπιρίνη, αλλά σε μεγάλες ποσότητες προκαλεί έλκος στο στομάχι (Best Ben, 2002).

III-C-2.ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

Η ρεσβερατρόλη (3,4',5-trihydroxystilbene) ανήκει στην κατηγορία των πολυφαινολικών ενώσεων αποκαλούμενων στυλβένια (**Εικόνα 41**). Μερικά φυτά παράγουν ρεσβερατρόλη και άλλα στυλβένια όταν βρεθούν σε συνθήκες στρες, τραυματισμού, μυκητιακής μόλυνσης και υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας.

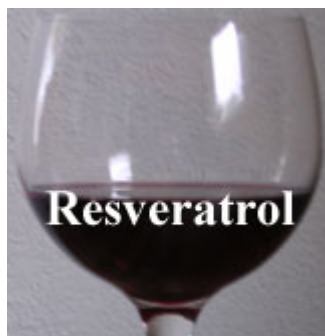


Εικόνα 41: Χημικός τύπος της ρεσβερατρόλης.

Η ρεσβερατρόλη είναι μια λιποδιαλυτή ένωση που εμφανίζεται σε *trans* και *cis* διαμόρφωση. Και οι δύο διαμορφώσεις της ρεσβερατρόλης εμφανίζονται ως γλυκοζυλιωμένες (συνδεδεμένες σε ένα μόριο γλυκόζης).

Η παρουσία της ρεσβερατρόλης στο κόκκινο κρασί αναφέρθηκε το 1992 και οι επιστήμονες άρχισαν να ερευνούν τα πιθανά οφέλη της ρεσβερατρόλη, στην υγεία προσπαθώντας να εξηγήσουν το "**γαλλικό παράδοξο**". Ονομάστηκε έτσι γιατί εμφανίστηκε στην Γαλλία και είναι παράδοξο γιατί ενώ οι Γάλλοι καταναλώναν μεγάλες ποσότητες κορεσμένου λίπους και κάπνιζαν παρά πολύ, παρατηρήθηκε ότι

είχαν μειωμένη θνησιμότητα από καρδιακές παθήσεις. Εκτός όμως από κατανάλωση λίπους κατανάλωναν και κόκκινο κρασί που οδήγησε στην ιδέα ότι η κανονική κατανάλωση κόκκινου κρασιού παρέχει την πρόσθετη προστασία από την καρδιαγγειακές παθήσεις (Εικόνα 42).



Εικόνα 42: Το κρασί είναι βασική πηγή ρεσβερατρόλης.

Πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη δυνατότητα της ρεσβερατρόλης να εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου και την επέκταση της διάρκειας ζωής έχει συνεχίσει να κινεί το επιστημονικό ενδιαφέρον. Η ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί να ασκεί *in vitro* θετικά αποτελέσματα σε βιολογικές δραστηριότητες σχετικά με την πρόληψη καρκίνου του δέρματος και μαστού και πρόληψη καρδιαγγειακών ασθενειών. Τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών προτείνουν ότι οι υψηλές δόσεις της ρεσβερατρόλης θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο θρόμβωσης (σχηματισμός θρόμβων) και αρτηριοσκλήρωσης. Έχει την ικανότητα διατήρησης του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου, παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού και της επαγωγής της απόπτωσης και παρεμπόδιση της αγγειογένεσης. Επιπλέον έχει αντιφλεγμονώδη δράση και μπορεί να παρεμποδίσει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων.

Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται στα σταφύλια, στο χυμό των σταφυλιών, στο κρασί, στα φιστίκια και τα μούρα των ειδών *Vaccinium*. Στα σταφύλια, η ρεσβερατρόλη βρίσκεται μόνο στην επιδερμίδα. Η ποσότητα ρεσβερατρόλης στην επιδερμίδα των σταφυλιών ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, τη γεωγραφική προέλευσή τους, και την έκθεση τους στους μύκητες. Ο χρόνος που ζυμώνεται το κρασί σε επαφή με την επιδερμίδα των σταφυλιών είναι ένας καθοριστικός παράγοντας της περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη. Η συνολική περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη μερικών ποτών και τροφίμων παρατίθενται, στους πίνακες 7 και 8. Οι

τιμές πρέπει να θεωρηθούν κατά προσέγγιση δεδομένου ότι η περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης των τροφίμων και ποτών ποικίλλει αρκετά (Linus, 2005 και Best Ben, 2002).

Πίνακας 7: Συνολική περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης σε διάφορα είδη κρασιού και στους χυμούς των σταφυλιών.

<i>Συνολικό περιεχόμενο ρεσβερατρόλης των κρασιών και του χυμού σταφυλιών (Linus)</i>		
<i>Είδη κρασιού</i>	<i>Συνολική ποσότητα ρεσβερατρόλης (mg/λίτρο)</i>	<i>Συνολική ποσότητα ρεσβερατρόλης σε ένα ποτήρι 5 ουγγιών (mg)</i>
Άσπρα κρασιά (ισπανικά)	0.05-1.80	0.01-0.27
Ροζέ κρασιά (ισπανικά)	0.43-3.52	0.06-0.53
Κόκκινα κρασιά (ισπανικά)	1.92-12.59	0.29-1.89
Κόκκινα κρασιά	1.98-7.13	0.30-1.07
Χυμός κόκκινων σταφυλιών (ισπανικά)	1.14-8.69	0.17-1.30

Πίνακας 8: Συνολική ποσότητα ρεσβερατρόλης σε επιλεγμένα τρόφιμα.

<i>Τρόφιμα</i>	<i>Συνολική ποσότητα ρεσβερατρόλης (mg)</i>
Φυστίκια	0.01-0.26
Βούτυρο φιστικιών	0.04-0.13
Κόκκινα σταφύλια	0.24-1.25

III-C-3.ΛΙΓΝΙΝΗ

Μετά την κυτταρίνη, η πιο διαδεδομένη οργανική ουσία στα φυτά είναι η λιγνίνη, ένα πολυδιακλαδιζόμενο πολυμερές της φαινυλοπροπανικής ομάδας (**Εικόνα 43**). Έχει υπολογιστεί ότι το 15-20% του άνθρακα που δεσμεύεται στη βιόσφαιρα κάθε χρόνο, τελικώς ενσωματώνεται σ' αυτό το άκαμπτο πολυμερές του κυτταρικού τοιχώματος. Η ακριβής δομή της λιγνίνης δεν είναι γνωστή, γιατί είναι δύσκολο να εκχυλιστεί από τα φυτά, αφού είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά με την κυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Η λιγνίνη βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των διαφόρων τύπων των στηρικτικών ιστών και αγωγών ιστών κυρίως στις τραχεΐδες και τα αγγεία του ξυλώματος.



Εικόνα 43: Η λιγνίνη κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η ακαμψία που προσδίδει η λιγνίνη στους ενισχυμένους βλαστούς και τους αγγειώδεις ιστούς, επιτρέπει την αύξηση των φυτών προς τα πάνω και επιπλέον επιτρέπει στο νερό και στα διαλυτά συστατικά να μεταφέρονται μέσα σε αυτό. Εκτός από μηχανική στήριξη του φυτού, η λιγνίνη προσφέρει και σημαντικές προστατευτικές λειτουργίες. Η φυσική σκληρότητα που διαθέτει και η δυσκολοχώνευσή της δεν επιτρέπει στα φυτοφάγα ζώα να τρώνε τον φλοιό λόγω ότι η λιγνίνη είναι συνδεδεμένη με την κυτταρίνη και με πρωτεΐνες. Επιπλέον προστατεύει από τους παθογόνους οργανισμούς, ενώ καθιστά τα φυτά ανθεκτικά ενάντια στους τραυματισμούς. Στις γυναίκες μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου λόγω των φυτοιστρογόνων που περιέχει (Linus, 2005; Best Ben, 2002 και Καράταγλης, 1994).

IV. ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΑ

Τα γλυκοσινολικά διακρίνονται σε **ισοθειοκυανικά** (περιέχει θείο) και **ινδόλια** (δεν περιέχει θείο). Είναι σε υψηλά ποσοστά στα σταυρανθή λαχανικά, ιδιαίτερα στο κουνουπίδι και το λάχανο και σε μια μικρότερη έκταση στους νεαρούς βλαστούς μπρόκολου και στα λαχανάκια Βρυξελλών. Ενεργούν κατά του καρκίνου επάγοντας τα ένζυμα **φάσης 2**. Το μπρόκολο και το λάχανο παρουσιάζουν μέγιστη προστασία κατά του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Best Ben, 2002).

IV-A. ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΑ

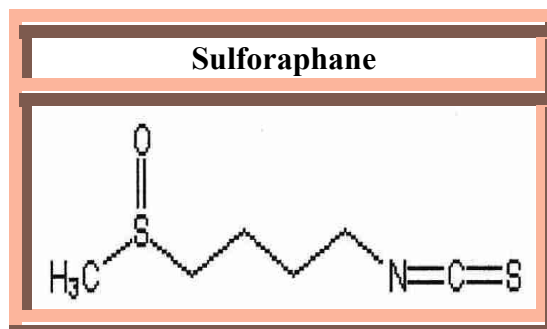
Τα ισοθειοκυανικά (-N=C=S) είναι υπεύθυνα για την πικρότητα του ραδικιού και της μουστάρδας. Αλλυλικό ισοθειοκυανικό καλείται επίσης και το λαδί της μουστάρδας (Best Ben, 2002).

IV-A-1. PHENETHL

Δίνει την πικρή γεύση στο κάρδαμο. Εμποδίζει την ογκογέννεση από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, προκαλεί την ενεργοποίηση απόπτωσης από caspase-8 (όχι p53), είναι ιδιαίτερα καλό ενάντια στις νιτροαμίνες του καπνού του τσιγάρου (νιτρικό οξείδιο + νικοτίνη = > νιτρονικοτίνη, κύρια καρκινογόνος ουσία του καπνού του τσιγάρου) (Best Ben, 2002).

IV-A-2. SULFORAPHANE

Επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων προκαλώντας απόπτωση και επάγει τα ένζυμα **φάσης 2**. Επίσης βοηθάει στην κανονική λειτουργία του κυτταρικού κύκλου (**Εικόνα 44**). Είναι ιδιαίτερα πλούσιο στο μπρόκολο (**Εικόνα 45**). Παράγει το D-glucarolactone, ένας σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας του καρκίνου του μαστού (Best Ben, 2002).



Εικόνα 44: Χημικός τύπος του *sulforaphane*.



Εικόνα 45: Το μπρόκολο είναι πλούσιο σε *sulforaphane*.

IV-B INΔΟΛΙΑ

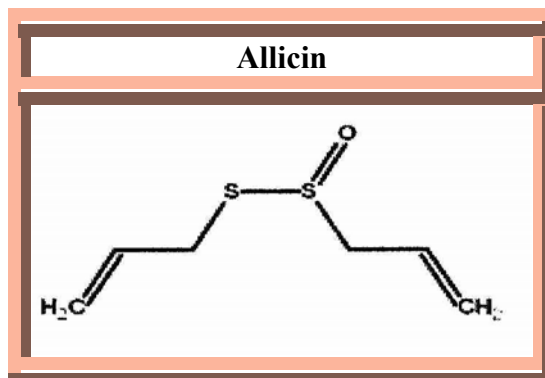
IV-V-1. INDOLE-3-CARBINOL (I3C)

Το σημαντικότερο ινδόλιο υπάρχει στο μπρόκολο (**Εικόνα 45**). Σημαντικές ιδιότητες είναι η εμπόδιση του ιού papilloma (HPV) στον άνθρωπο, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει τον καρκίνο της μήτρας και του μαστού, μπλοκάρει τους υποδοχείς οιστρογόνων, υποβαθμίζει το CDK6, αναβαθμίζει τα p21 και p27 στα καρκινικά κύτταρα προστάτη. Επηρεάζει τη G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου προκαλώντας απόπτωση των κυττάρων του καρκίνου του στήθους και του προστάτη (Best Ben, 2002).

V. THIOSULFONATES

Τα οργανοθειικά φυτοχημικά υπάρχουν στο σκόρδο και στο κρεμμύδι. (το σκόρδο έχει περισσότερο θείο από το κρεμμύδι). Περιλαμβάνει τις μερκαπτοκουστεΐνες και τα αλλυλικά σουλφίδια (**αλλυλικός** είναι ένας δεσμός

υδρογονάνθρακας-θείου) (**Εικόνα 46**). Τα αλλυλικά σουλφίδια συμβάλλουν στην ισχυρή μυρωδιά του σκόρδου (**Εικόνα 47**).



Εικόνα 46: Χημικός τύπος του *thiosulfonates*.



Εικόνα 47: Το σκόρδο είναι πλούσιο σε αλλυλικά σουλφίδια.

Το σκόρδο προστατεύει από τα παράσιτα, είναι τοξικό στα έντομα και τους μικροοργανισμούς, προστατεύει από τα έλκη που δημιουργεί το βακτήριο *Helicobacter pylori*. Η σπουδαιότητα του σκόρδου για τον άνθρωπο οφείλεται στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού, του ενδομητρίου και του κόλου. Επιπλέον το σκόρδο μπορεί να ελαττώσει τη χοληστερόλη και την πίεση σε ποσοστό 10% στη ροή του αίματος. Εμποδίζει τη συγκόλληση αιμοπεταλίων από το αραχιδονικό οξύ, την επινεφρίνη και άλλους αγωνιστές αιμοπεταλίων. Το σκόρδο μπορεί να προκαλέσει τη σύνθεση νιτρικών οξειδίων (Best Ben, 2002).

VI. ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ

Οι στερόλες και οι στανόλες των φυτών είναι συλλογικά γνωστές ως φυτοστερόλες. Οι στερόλες, έχουν έναν διπλό δεσμό στο δαχτύλιο της στερόλης, ενώ οι στανόλες στερούνται ένα διπλό δεσμό. Οι στερόλες των φυτών είναι ενώσεις με παρόμοιες χημικές δομές με αυτήν της χοληστερόλης. Εντούτοις, αντίθετα από τη χοληστερόλη που προέρχεται από ζωικές πηγές απορροφάται εύκολα και είναι σε υψηλά επίπεδα στο σώμα, οι φυτοστερόλες υπάρχουν μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο σώμα επειδή είναι δύσκολο να απορροφηθούν. Οι φυτοστερόλες εμποδίζουν την εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης, ελαττώνοντας τη χοληστερόλης LDL στον ορό του αίματος.

Παρατηρούνται σε υψηλά επίπεδα στο πίτουρο ρυζιού, στα σιτηρά, στα φυτικά έλαια, στα έλαια του καλαμποκιού, τη σόγια, στα καρύδια και τα όσπρια (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Τα αμύγδαλα είναι πλούσια πηγή φυτοστερόλης.

Οι φυτοστερόλες που περιέχονται σε ορισμένα τρόφιμα παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9: Τρόφιμα τα οποία περιέχουν φυτοστερόλες σε mg.

Πηγές	Φυτοστερόλη(mg)
Σιτηρά	197
Έλαιο καλαμποκιού	102
Έλαιο Canola	91

Φυστίκια	62
Πίτουρο σίτου	58
Αμύγδαλα	34
Λαχανάκια Βρυξελλών	34
Ψωμί σίκαλης	33
Καρύδια macadamia	33
Ελαιόλαδο	22
Benecol® spread	850 mg (500 mg στανόλες)

Οι φυτοστερόλες έχουν την ικανότητα πρόληψης και θεραπείας ορισμένων ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος του προστάτη, η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), ο διαβήτης, ο HIV, η ηπατίτιδα γ και μείωση του συνδρόμου κοπώσεως. Υπάρχουν όμως και κάποια μειονεκτήματα όπως αλλαγές στις ιδιότητες των μεμβρανών των κυττάρων, αλλαγές στο μεταβολισμό τεστοστερόνης, επαγωγή του κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα του καρκίνου και αντιφλεγμονώδη δράση (Best Ben,2002 και Linus,2005).

VI-A. ΒΗΤΑ-ΣΙΤΟΣΤΕΡΟΛΗ

Η δομή της είναι παρόμοια με της χοληστερόλης. Γι'αυτό το λόγο μπορεί να μειώσει τη δημιουργία χοληστερόλης από το ήπαρ. Επιβραδύνει την αύξηση των κυττάρων του καρκίνου και παρεμποδίζει την κυτταροδιαίρεση του επιθηλίου μειώνοντας το φαινόμενο της αρτηριοσκλήρωσης. Τα σημαντικότερα τρόφιμα που περιέχουν βήτα-σιτοστερόλη αναφέρονται στον **πίνακα 10** (Best Ben, 2002 και Linus, 2005).

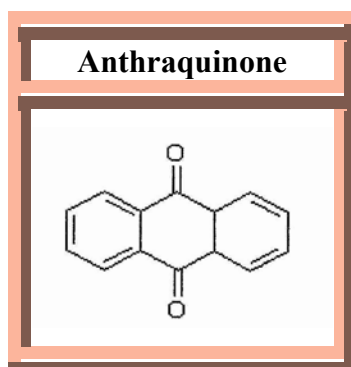
Πίνακας 10: Τρόφιμα που περιέχουν βήτα σιτοστερόλη.

<i>Τρόφιμα</i>	<i>Βήτα-σιτοστερόλη *</i>
Βούτυρο φυσιτικών	135
Τα δυτικά ανακάρδια	130
Αμύγδαλα	122
Μπιζέλια	106
Φασόλια	91
Αβοκάντο	76
*μιλιγραμμάρια /100 γραμ.	

VII ANΘΡΑΚΙΝΟΝΕΣ

VII-A.SENNA

Τα σενοσίδια είναι διανθρόνες. Παράγονται από ξηρά φύλλα της οικογένειας των ψυχανθών. Μπορούν να αυξήσουν τις περισταλτικές μετακινήσεις του κόλου. Εμποδίζουν την εμφάνιση των αιμορροΐδων ή τον ερεθισμό (**Εικόνα49**) (Best Ben, 2002).



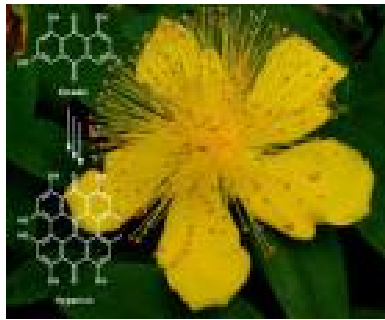
Εικόνα 49: Χημικός τύπος της anthraquinone.

VII-B. BARBALOIN

Προέρχεται από το φυτό αλόη. Η ουσία που περιέχει είναι η αλοεΐδη. Το παράγγυμα του φυτού είναι βάλσαμο για την επιδερμίδα. Ενυδατώνει, θεραπεύει εγκαύματα και έλκη του δέρματος. Η αλοεΐδη είναι κίτρινη ουσία, με πικρή γεύση και καθαρτικές ιδιότητες μπορεί να προκαλέσει γαστρίτιδα και διάρροια (Best Ben, 2002).

VII-C. ΥΠΕΡΙΚΙΝΗ

Η υπερικίνη είναι ένα βασικό συστατικό του βαλσαμέλαιου που προέρχεται από το Βαλσαμόχορτο ή Σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*) (Εικόνα 50). Είναι χρώματος πορφυροκόκκινου και κατασκευάζεται από τις ανθισμένες κεφαλές του φυτού, που έχουν τοποθετηθεί στο λάδι για ένα μήνα στον ήλιο.



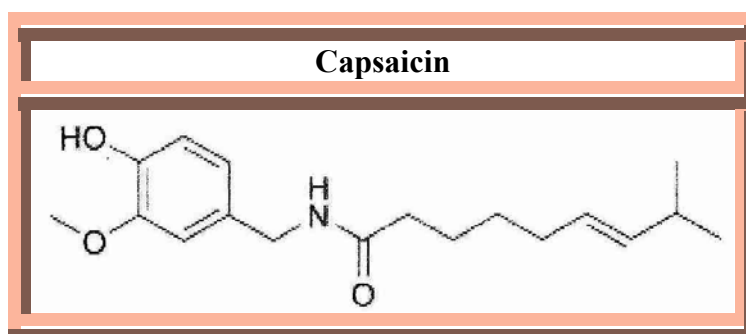
Εικόνα 50: Βαλσαμόχορτο ή Σπαθόχορτο για την παραγωγή της υπερικίνης.

Αφέψημα αυτού χρησιμοποιείται για την κατάθλιψη και για την νευρική κατάσταση την περίοδο της εμμηνόπαυσης. Σε εξωτερική χρήση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εγκαύματα, επούλωση πληγών και τραυμάτων. Χρειάζεται προσοχή γιατί μπορεί να προκαλέσει φωτοευαισθησία (Best Ben, 2002).

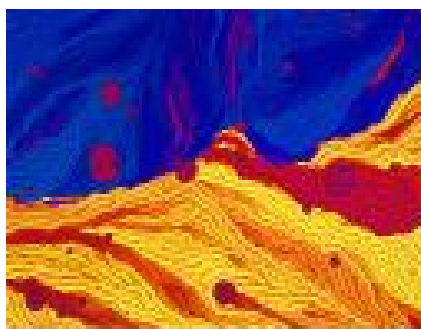
VIII. ΚΑΨΑΪΝΗ

Χαρακτηριστική ουσία που περιέχει το πιπέρι. Καθιστά το τσίλι καυτό. Η ουσία αυτή υποκινεί τα νεύρα για την αίσθηση καψίματος, γδαρσίματος και φτερνίσματος. Η αίσθηση του καψίματος εμφανίζεται μόνο στα θηλαστικά, και όχι στα πουλιά. Διαλύεται στο λίπος και στο οινόπνευμα, αλλά όχι στο νερό (Εικόνες 51,

52). Προεπάγει απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος αντίθετα δεν έχει καμία επίδραση στα φυσιολογικά παγκρεατικά κύτταρα (Best Ben, 2002).



Εικόνα 51: Χημικός τύπος της καψαΐνης.



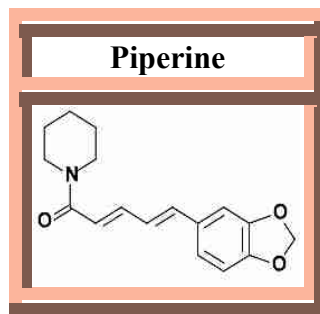
Εικόνα 52: Η καψαΐνη κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

ΙΧ. ΠΙΠΕΡΙΝΗ

Προέρχεται από το μαύρο πιπέρι (peppercorns, καυτά πιπέρια jalapeno). Παράγει τη θερμότητα, προκαλεί φτέρνισμα (πικάντικη προτίμηση). Έχει εντομοαπωθητική δράση και ικανότητα αύξησης της εντερικής απορρόφησης των τροφίμων. Από το παρελθόν χρησιμοποιούνταν ως καρύκευμα για να καλύψει και να προφυλάξει το κρέας λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων (Εικόνες 53, 54) (Ben Best, 2002).



Εικόνα 53: Φυτό πιπεριάς



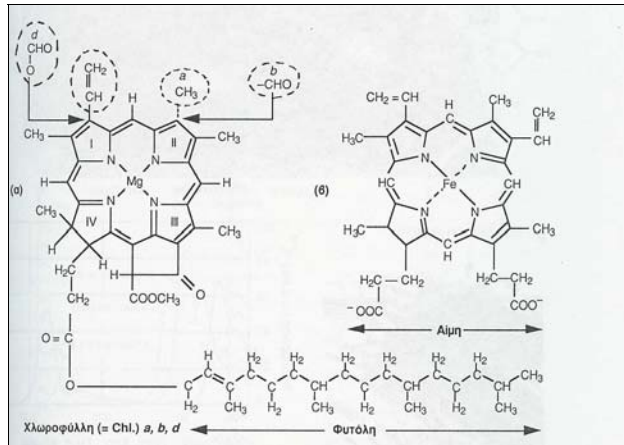
Εικόνα 54: Χημικός τύπος της πιπερίνης.

X. ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ

Υπάρχουν περισσότερα του ενός είδη χλωροφυλλών, που διαφέρουν μεταξύ τους μόνο σε λεπτομέρειες της μοριακής τους δομής. Η χλωροφύλλη προέρχεται από τα ελληνικά *chloros* "κιτρινωπός πράσινος". Το μόριο της χλωροφύλλης περιέχει μια πορφυρινική <<κεφαλή >> και μια <<ουρά>> φυτόλης. Ο πυρήνας της κεφαλής αποτελείται από ένα τετραπυρολικό δακτύλιο ενωμένα με ένα άτομο μαγνησίου.

Μέσα στις μεμβράνες των θυλακοειδών το πορφυρινικό μέρος (υδρόφιλο) αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες, ενώ η υδρόφοβη αλυσίδα της φυτόλης εκτείνεται μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των θυλακοειδών. Οι χλωροφύλλες που υπάρχουν σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι η a, b, c, d, η βακτηριοχλωροφύλλη και σε αρκετά άλλα παράγωγά τους. Η χλωροφύλλη a εμφανίζεται σ' όλους τους φωτοσυνθετικά ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια. Κατά συνέπεια οι χλωροφύλλες a, b μαζί με τα καροτενοειδή είναι τυπικές χρωστικές των φωτοσυνθετικών οργανισμών (Εικόνα 55).

Όλοι όμως οι οργανισμοί αυτοί περιέχουν περισσότερες της μια χρωστικές, η κάθε μια από τις οποίες παρέχει και μια ειδική λειτουργία. Η χλωροφύλλη a απορροφάει στα 663/430 nm μήκος κύματος και η χλωροφύλλη b απορροφά στα 645/455nm. Έτσι η χλωροφύλλη b θεωρείται ως μια δευτερεύουσα χρωστική, που βοηθάει στο φάσμα απορρόφησης του φωτός κατά την φωτοσύνθεση (Καράταγλης, 1994).



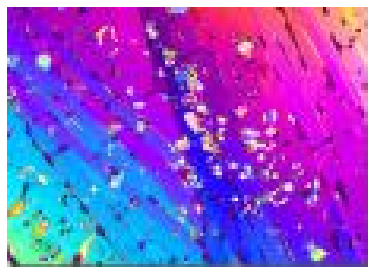
Εικόνα 55: (α) Η χλωροφύλλη b είναι όμοια με την a, με τη διαφορά ότι η ομάδα $-CH_3$ του δακτυλίου II αντικαθίσταται από την ομάδα $-CHO$. Η βασική διάφορα της Ch. a με την Ch. c είναι ότι από την Ch. c απουσιάζει η <ουρά> της φυτόλης. Τέλος η Ch d διαφέρει από την a ως προς την ομάδα $CH_2=CH-$ του δακτυλίου I, η οποία αντικαθιστάται από την ομάδα $-OCHO$. (β) Η Αίμη είναι συστατικό της αιμοσφαιρίνης. Ο πορφυρινικός δακτύλιος της αιμής περιέχει Fe αντί του Mg της Chl.

XII. ΠΗΚΤΙΝΗ

Βρίσκεται στα μήλα και είναι διαλυτή ίνα (ευθύνεται για το συναίσθημα πληρότητας όταν καταναλώνεται). Δεσμεύει την ζάχαρη, απελευθερώνοντας την αργά και κρατάει τα επίπεδα σακχάρου του αίματος σταθερά. Τέλος ελαττώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης (Best Ben, 2002).

XIII. ΟΞΑΛΙΚΟ ΟΞΥ

Παρατηρείται ιδιαίτερα σε υψηλά επίπεδα στο guarb. Επίσης βρίσκεται στο σπανάκι, στα τεύτλα, στο κακάο, στα καρύδια, στο μαϊντανό και στο τσάι. Δεσμεύει το ασβέστιο, προφυλάσσοντας τον οργανισμό από δημιουργία πέτρας στα νεφρά (Εικόνα 56) (Best Ben, 2002).



Εικόνα 56: Το οξάλικο οξύ κάτω από το ηλεκτρικό μικροσκόπιο.

Πίνακας των κυρίων φυτοχημικών χρωστικών ουσιών

Ο ακόλουθος πίνακας δίνει τη φυτοχημική κατηγορία που παρέχει την κύρια πηγή χρωματισμού για τα συγκεκριμένα φρούτα ή τα λαχανικά (Πίνακας 11) (Best Ben, 2002).

Πίνακας 11: Οι κυριότερες φυτοχημικές χρωστικές ουσίες.

ΚΥΡΙΕΣ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ		
ΧΡΩΜΑ	ΧΡΩΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΦΡΟΥΤΑ Η' ΛΑΧΑΝΙΚΑ
ΚΟΚΚΙΝΟ	Anthocyanins	Φράουλες, σμέουρα, κεράσια, βακκίνια, ρόδια, μήλα, κόκκινα σταφύλια
	Lycopene	Τομάτες, ρόδινο γκρέιπφρουτ, καρπούζι
	Betacyanins	Τεύτλα
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ	Beta-carotene	Καρότα, μάγκο, βερίκοκα, καντελούπη, κολοκύθα, γλυκοπατάτα
	Beta-cryptoxanthin	Πορτοκάλι, tangerines
ΜΠΛΕ / ΜΩΒ	Anthocyanins	Βακκίνια, δαμάσκηνα, μελιτζάνα, σταφύλια
ΚΙΤΡΙΝΟ	Lutein, Zeaxantin	Καλαμπόκι, αβοκάντο
	Curcumin	Tumeric (Curry)
ΠΡΑΣΙΝΟ	Chlorophyll	Μπρόκολο, κατσαρό λάχανο, σπανάκι, λάχανο, σπαράγγι, πράσινο τσάι
ΜΑΥΡΟ	Thearubigens	Μαύρο τσάι
	Anthocyanins	Βατόμουρα

ΜΕΡΟΣ Β:
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ
ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΩΝ
ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ

B.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φύση παράγει ένα καταπληκτικό πλούτο πρωτογενών μεταβολιτών με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Τα φυτά αποτελούνται από πρωτογενή σημαντικά συστατικά όπως οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες τα οποία υπάρχουν σε επίπεδα γραμμαρίου (100 g/μερίδα φαγητού). Τα δευτερογενή συστατικά περιλαμβάνουν τις βιταμίνες, τους δευτερογενείς μεταβολίτες και τα ανόργανα άλατα με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία. Τα συστατικά αυτά γενικά περιέχονται στα φυτά σε μικρογραμμάρια του χλιοστογραμμρίου (100 g/τροφίμων). Τα δευτερογενή συστατικά μπορεί να ταξινομηθούν ευρέως ως **φυτοχημικά** και εμφανίζονται με αφθονία στα φυτά. Οι στρατηγικές βελτίωσης μπορούν να αναπτυχθούν τόσο για τα πρωτογενή όσο και για τα δευτερογενή συστατικά. Η επιτυχία και ο αντίκτυπος της βελτίωσης θα εξαρτηθεί από την υιοθέτηση μιας ποσοτικής ή ποιοτικής μεθόδου της εφαρμοσμένης μηχανικής.

Οι ποσοτικές αλλαγές είναι περισσότερο εφικτές για τα δευτερογενή συστατικά, όπου οι μεταβολές μικρογραμμαρίων απαιτούν ελάχιστη παρεκτροπή των προδρόμων ενώσεων και των περιορισμένων τροποποιήσεων των φυτών με την ικανότητα αποθήκευσης ή διαχωρισμού των φυτοχημικών στόχων. Για παράδειγμα, η καροτίνη που περιέχεται στο ρύζι (1.6 g/g ξηρού βάρους), η υψηλή περιεκτικότητα σιδήρου στο ρύζι (δύο φορές αύξηση), η αύξηση του ασκορβικού οξέος στο μαρούλι (εφτά φορές αύξηση) και η αύξηση των φλαβονοειδών στην τομάτα (~60-φορές αύξηση). Αν και αυτές οι αλλαγές είναι ποσοτικά μικρές, εν τούτοις μεγάλες αλλαγές προκύπτουν στη λειτουργικότητα των τροφίμων, επειδή τα φυτοχημικά παρέχουν οφέλη για την υγεία σε χαμηλές δόσεις (Grusak, 2002).

Η εφαρμοσμένη μηχανική των ποιοτικών αλλαγών είναι δυνατή για όλα τα φυτοχημικά, εντούτοις οι στρατηγικές που έχουν σκοπό την εκτροπή των μεταβολιτών από ένα τελικό προϊόν σε άλλο προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα πρωτογενή συστατικά όπως τα λιπίδια ή οι υδατάνθρακες. Αυτός ο τύπος στρατηγικής επιτρέπει σημαντικές συνθετικές αλλαγές στα φυτοχημικά χωρίς την ανάγκη για συνακόλουθες τροποποιήσεις στη σφαιρική παραγωγικότητα των φυτών. Η μεταβολική μηχανική αναφέρεται γενικά ως στοχευμένη και καθορισμένη αλλαγή των μεταβολικών μονοπατιών που βρίσκονται σε έναν οργανισμό προκειμένου να γίνουν κατανοητά και να χρησιμοποιηθούν καλύτερα οι κυτταρικές μεταβολικές οδοί με σκοπό το χημικό μετασχηματισμό, την ενεργειακή μεταγωγή, και τη δημιουργία

νέων ενώσεων (Lessard, 1996). Ο διεπιστημονικός αυτός τομέας περιλαμβάνει αρχές από τη χημική μηχανική, της επιστήμης των υπολογιστών, τη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία. Στην ουσία, η μεταβολική μηχανική είναι η εφαρμογή των αρχών της μηχανικής του σχεδίου και της ανάλυσης των μεταβολικών μονοπατιών προκειμένου να επιτευχθεί ένας ιδιαίτερος στόχος. Ο στόχος αυτός μπορεί να είναι η αύξηση της παραγωγικής διαδικασίας, όπως η παραγωγή αντιβιοτικών, βιοσυνθετικών προδρόμων ενώσεων ή πολυμερών σωμάτων ή η επέκταση της μεταβολικής ικανότητας από την προσθήκη των εξωγενών δραστηριοτήτων για χημική παραγωγή ή υποβάθμιση. Δύο άρθρα στις αρχές της δεκαετίας του '90 υποστήριξαν μια συστηματικότερη και λογικότερη προσέγγιση (Bailey, 1991; Stephanopoulos και Vanillo, 1991), η οποία περιελάμβανε τη χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των μεταβολικών μονοπατιών για την τροποποίηση του ενδιάμεσου μεταβολισμού.

Το ενδιαφέρον για τη μεταβολική μηχανική υποκινείται από εμπορικές εφαρμογές που σχετίζονται με την αύξηση της παραγωγής με χρήσιμους μεταβολίτες. Οι πρόσφατες προσπάθειες έχουν εστιαστεί στη χρησιμοποίηση των βιολογικά παραγωγικών διαδικασιών ως εναλλακτικές λύσεις στις χημικές διαδικασίες. Μια τέτοια εφαρμογή ακολουθεί τους στόχους των «βιώσιμων εξελίξεων» και της «πράσινης χημείας» καθώς επίσης και τη τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Μερικά παραδείγματα αυτών των νέων διαδικασιών περιλαμβάνουν τη μικροβιακή παραγωγή του λουλακιού (Genencor), τη γλυκόλη του προπυλενίου (DuPont), τη βελτίωση των αντιβιοτικών από τις παραδοσιακές μεθόδους και την υψηλή παραγωγή αμινοξέων από εταιρίες.

Η έκφραση του ενζύμου Δ6 desaturase από το *Pythium irregulare* σε *Brassica juncea*, παραδείγματος χάριν, οδήγησε στη αύξηση του λινολενικού (linolenic) οξέος στους σπόρους, εις βάρος των λινελαϊκού (linoleic) και λινολενικού (linolenic) οξέος. Ομοίως, η έκφραση ενός συνθετικού γονιδίου για φρουκτάνιο (1-sucrose:sucrose fructosyl transferase από το *Helianthus tuberosus*) στο ζαχαρότευτλο οδήγησε σχεδόν στη πλήρη μετατροπή της σακχαρόζης σε φρουκτάνιο χωρίς αλλαγή στα ολικά σάκχαρα (Grusak, 2002).

Η μεταβολική μηχανική είναι μια επιστήμη που έχει εντείνει τους στόχους της στην παραδοσιακή βελτίωση με την εφαρμογή των σύγχρονων τεχνολογιών μοριακής βιολογίας. Συγκεκριμένα, η μεταβολική μηχανική περιλαμβάνει τη βελτίωση και την

αύξηση της παραγωγικότητας ενός οργανισμού, καθώς επίσης την ανάλυση και την τροποποίηση της μεταβολικής ροής, την αποβολή της μεταβολικής υπερχειλίσης και την απενεργοποίηση ανεπιθύμητων ή ανταγωνιστικών μεταβολικών μονοπατιών. Τέλος περιλαμβάνει τη βελτίωση του οργανισμού για τη προστασία του από ορισμένες ουσίες (Stephanopoulos, 1999). Εντούτοις, οι περισσότερες από τις ιστορικές προσεγγίσεις για τη βελτίωση της παραγωγής έχουν εξαρτηθεί από την επιλογή ενός επιθυμητού γνωρίσματος μετά από τη χημική μεταλλαξιγένεση ή μια τυχαία προσέγγιση. Η χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή νέων προϊόντων, την αύξηση της παραγωγής επιθυμητών χαρακτηριστικών και την αποβολή ανεπιθύμητων μεταβολιτών. Επιπλέον ο τομέας της μεταβολικής μηχανής έχει χρησιμοποιηθεί στις διάφορες επιχειρήσεις της βιοτεχνολογίας. Σκοπός είναι η δυνατότητα κατασκευής νέων προϊόντων καθώς και η ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Καθώς παρακάμπτονται τα τεχνολογικά εμπόδια, δεν επιτρέπεται να ξεχάσουμε τις παραδοσιακές προσεγγίσεις μεταλλαγής και επιλογής. Στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται ακόμα οι παραδοσιακές μέθοδοι επειδή είναι γρήγορες και αξιόπιστες.

B.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Περίπου πριν από 15 χρόνια, η κατάσταση προόδου στη μεταβολική μηχανική είχε προαχθεί από τα διάφορα πειράματα που διεξάχθηκαν με ελάχιστη γενετική γνώση και με ιδιαίτερα συγκεκριμένες και περίπλοκες μεθόδους χειρισμού των γονιδίων. Με τη διαθεσιμότητα των γονιδίων, των ξενιστών και των τυποποιημένων μοριακών βιολογικών εργαλείων, αναμένεται η μεταβολική μηχανική να μεταφραστεί σε βιομηχανική πραγματικότητα. Υπό την ευρύτερη έννοια, αυτός ο τομέας της βιοτεχνολογίας έχει έναν μακρύ και ιστορικό παρελθόν με πολλές προσεγγίσεις που είχαν όντως επιτυχίες κατά τη διάρκεια του προηγούμενου μισού αιώνα. Ο όρος **μεταβολική μηχανική** πρωτοαναφέρθηκε από τον J.Bailey (1991) και περιλαμβάνει μια ευρεία σειρά χειρισμών και πειραματικών προσεγγίσεων για να βελτιώσει την παραγωγικότητα ενός επιθυμητού μεταβολίτη από ένα οργανισμό.

Ο David Horwood και οι συνάδελφοί του (1985) ήταν οι πρώτοι που κατασκεύασαν το "αντιβιοτικό υβρίδιο" με συνδυασμό του granaticin και του actinorhodin στο *Streptomyces violaceoruber* Tu_22, με συνέπεια το σχηματισμό του

dihydrogranatirhodin. Επίσης μετασημάτισαν και ένα μικρό μέρος γονιδίων του actinorhodin με αποτέλεσμα το σχηματισμό των mederrhodins A και B. Ο Sir David Horwood και οι συνάδελφοί του, σε συνεργασία με τους Heinz Floss και Satoshi Omura και των συναδέλφων τους, περιέγραψαν το σχηματισμό του νέου μεταβολίτη isochromanequinone ως αποτέλεσμα γενετικής μηχανικής. (Horwood et al, 1985). Πέντε χρόνια αργότερα, ο Bartel και οι συνεργάτες του (1990) εξέθεσαν τις πρώτες ενώσεις που παρήχθησαν μέσω των βιοσυνθετικών μονοπατιών. Τα υποκλωνοποιημένα συστατικά του actinorhodin II polyketide synthase (PKS) από το *Streptomyces coelicolor* τοποθετήθηκαν στο *Streptomyces galilaeus* που παράγει anthracycline για τη παραγωγή νέων πυρηνικών δομών. Τα anthraquinones, aloesaponarin II, desoxyerythrolaccin, και 1-O-methyl-desoxyerythrolaccin, είναι ενώσεις που παράγονται κατά αποκλειστικότητα στα φυτά. Η εργασία αυτή βοήθησε να διευκρινιστεί η δομή των ενζύμων και η βιοσύνθεση του actinorhodin και anthracycline. Σχεδόν τον ίδιο χρόνο ο Leonard Katz και οι συνάδελφοί του παρήγαγαν την πρώτη γενετικά τροποποιημένη ερυθρομυκίνη PKS. Αυτός ο άθλος άνοιξε το δρόμο για λεπτομερείς αναλύσεις στη βιοχημεία για τη βιοσύνθεση της ερυθρομυκίνης. Ένα άλλο σημαντικό και συναρπαστικό αποτέλεσμα που επιτεύχθηκε πρόσφατα είναι τα πεπτίδια. Τα πεπτίδια έχουν την ικανότητα αλλαγής θέσης μεταξύ τους με συνέπεια τη βιοσύνθεση νέων ενώσεων.

Ο Marahiel, ο Townsend και οι συνάδελφοί τους χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό βιοπληροφορικής, βιοχημείας και μοριακής βιολογίας, είχαν αρχίσει να διευκρινίζουν την ιδιομορφία των αμινοξέων NRPS (nonribosomal peptide synthetases). Αυτά τα σημαντικά βήματα προμήνυσαν τη δημιουργία νέων ενώσεων και βιβλιοθήκες πεπτιδίων. Τα πειράματα αυτά που πραγματοποιήθηκαν με τις ελάχιστες γενετικές πληροφορίες, έθεσαν τα θεμέλια για ένα τομέα που έχει γίνει τόσο παραγωγικός για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων προϊόντων (Strohl W. R., 2001).

B.3 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Η μεταβολική μηχανική περιλαμβάνει τη τροποποίηση των ενδογενών μονοπατιών με σκοπό την αύξηση ροής για τη δημιουργία επιθυμητών μορίων. Σε μερικές περιπτώσεις ο στόχος είναι η αύξηση της παραγωγής ενός φυσικού προϊόντος, ενώ σε άλλες η δημιουργία-σύνθεση νέων ενώσεων ή μακρομορίων

Η μεταβολική μηχανική των μονοπατιών επιτυγχάνεται, μέσω της επαγωγής, της απενεργοποίησης ενζύμων ή και της **τροποποίησης των μεταβολικών μονοπατιών** με την εφαρμογή του ανασυνδυασμένου DNA και άλλων τεχνικών μοριακής βιολογίας (Lee, 1999). Με άλλα λόγια η μεταβολική μηχανική είναι η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών μέσα σε ετερόλογους μικροοργανισμούς (ζύμες, βακτήρια, μύκητες, άλγη κ.α.) με σκοπό τη σύνθεση νέων προϊόντων και την αύξηση της παραγωγής. Βασικά, ο στόχος είναι να **προβλεφθεί** πώς οι αλλαγές στο περιβάλλον ενός κυττάρου έχουν επιπτώσεις στα υπάρχοντα μεταβολικά μονοπάτια. Εάν μπορεί να προβλεφθεί πώς οι αλλαγές θα επηρεάσουν τα βιοσυνθετικά μονοπάτια, τότε μπορεί να τροποποιηθεί ένας οργανισμός για να παραχθεί ένα **χρήσιμο και κερδοφόρο προϊόν**.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές πρόοδοι στη μεταβολική μηχανική μέσω της γονιδιωματικής και πρωτεομικής τεχνολογίας για να διευκρινιστούν και να χαρακτηριστούν τα μεταβολικά μονοπάτια με ένα καθολικό τρόπο παρά με μια βήμα προς βήμα ανάλυση. Αυτό έχει υποστηριχθεί από πολυάριθμες μελέτες στο επίπεδο του μεταβολισμού. Περαιτέρω εργασία έχει υλοποιηθεί στη «μοντελοποίηση» των μεταβολικών μονοπατιών σύμφωνα με μια γενωμική κλίμακα. Τέτοιες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεταβολικά μονοπάτια ελέγχονται σε πολλαπλά επίπεδα και οποιαδήποτε μορφή διαταραχής μπορεί να έχει εκτεταμένα αποτελέσματα σε ολόκληρο το σύστημα. (A. L. der Boer και C. Schindt-Danner, 2003).

Η μεταβολική μηχανική περιλαμβάνει:

1. Χειρισμό των πρωτεϊνικών μονοπατιών καθώς επίσης και των μονοπατιών που περιλαμβάνουν τους μικρότερους μεταβολίτες.
2. Ανάπτυξη και εφαρμογή των κατάλληλων βιοεπεξεργαστών για την παραγωγή και τη συγκομιδή του στοχοθετημένου μεταβολίτη.

3. Ανάπτυξη των αλγορίθμων που καθορίζουν τα χαρακτηριστικά αύξησης ή και μείωσης των στοχοθετημένων μεταβολιτών μετά από το γενετικό χειρισμό (Lee, 1999).

B.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ

Το μονοπάτι που παράγει ένα συγκεκριμένο προϊόν μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορους τρόπους έτσι ώστε να παραχθούν νέα προϊόντα, υπό τον όρο ότι τα ένζυμα στο μονοπάτι αυτό είναι αρκετά ετερόκλητα προς τα τροποποιημένα υποστρώματα για να επιτρέψουν την ενσωμάτωσή τους στις νέες δομές. Τα γονίδια μπορούν να απαλειφθούν ή να ενσωματωθούν σε ένα μονοπάτι ή οι συνδυασμοί γονιδίων από διαφορετικά μονοπάτια μπορούν να συνδυαστούν σε νέα βιοσυνθετικά μονοπάτια (συνδυαστική βιοσύνθεση). Η μεταλλαγή των γονιδίων σε ένα μονοπάτι υιοθετείται συχνά για να μελετηθεί η λειτουργία των γονιδίων.

Υπάρχουν τρεις βασικοί στόχοι της μεταβολικής μηχανικής: **α)** η υψηλή παραγωγή μιας συγκεκριμένης επιθυμητής ένωσης, **β)** η μειωμένη παραγωγή μιας συγκεκριμένης ανεπιθύμητης ένωσης και **γ)** η παραγωγή μιας νέας ένωσης (δηλαδή ένα μόριο που παράγεται στη φύση, αλλά όχι συνήθως στα φυτά ξενιστές, ή απολύτως μια νέα ένωση). Οι στρατηγικές για την επίτευξη αυτών των στόχων περιλαμβάνουν τη μεταβολική μηχανική απλών βημάτων σε ένα μονοπάτι για να αυξήσουν ή να μειώσουν τη μεταβολική ροή προς ενώσεις στόχους, για να μπλοκάρουν ανταγωνιστικά μονοπάτια ή για να εισάγουν σύντομες οδούς που εκτρέπουν τη μεταβολική ροή με έναν ιδιαίτερο τρόπο. Εντούτοις, αυτή η προσέγγιση έχει περιορισμένη αξία, επειδή τα αποτελέσματα της τροποποίησης απλών ενζυματικών βημάτων απορροφώνται συχνά από το σύστημα σε μία προσπάθεια να αποκατασταθεί η ομοιόσταση. Η στόχευση των πολλαπλών βημάτων στο ίδιο μονοπάτι θα μπορούσε να βοηθήσει για να ελεγχθεί η μεταβολική ροή με ένα πιο προβλέψιμο τρόπο. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει την ενεργοποίηση διαφόρων διαδοχικών ενζύμων σε ένα μονοπάτι, ενεργοποιώντας τα ένζυμα σε ένα μονοπάτι και καταστέλλοντας εκείνα από ένα ανταγωνιστικό μονοπάτι ή χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά γονίδια για να δημιουργηθεί ένας πολυσημειακός έλεγχος σε ένα ή περισσότερα μονοπάτια μέσα στο κύτταρο. Τα παραδείγματα που παρέχονται

παρακάτω αποδεικνύουν τις στρατηγικές που εφαρμόζονται για να χειριστούν τη παραγωγή διαφορετικών ενώσεων (A. L. der Boer και C. Schindt-Danner, 2003).

Παραδείγματος χάριν, η καταστροφή ενός μόνο γονιδίου *pimD*, στο *Streptomyces natalensis* που κωδικοποιεί το ένζυμο epoxidase που συμμετέχει στη σύνθεση της ένωσης pimaricin κατέληξε στην παραγωγή του νέου αντιβιοτικού 4,5-deeroxyrimaricin. Ο συνδυασμός των γονιδίων από διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια έχει αποδειχθεί μια επιτυχής μέθοδος για την παραγωγή νέων ενώσεων. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για να κατασκευαστούν τα αντιβιοτικά πολυκετίδια με νέα μοτίβα γλυκοζυλίωσης, όπως περιγράφεται από τα ακόλουθα παραδείγματα. Ο μύκητας *Streptomyces venezuelae* παράγει τέσσερα αντιβιοτικά πολυκετίδια, και όλα περιέχουν D-desosamine ως σάκχαρο. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σακχάρου D-desosamine στο *S. Venezuelae* μοιράζεται ενδιάμεσα μόρια με τα μονοπάτια για διαφορετικά σάκχαρα των αντιβιοτικών streptomycin και το calicheamicin, που παράγονται από το *Streptomyces griseus* και *Micromonospora echinospora sp.* αντίστοιχα. Η εισαγωγή των γονιδίων *strL* και *strM* (περιλαμβάνονται στη βιοσύνθεση dihydrostreptose) από τον πρώτο οργανισμό στο μετάλλαγμα KdesI του *S. Venezuelae* που έχει ένα ημιτελές βιοσυνθετικό μονοπάτι desosamine παρήγαγε νέα μακρολίδια με L-rhamnose ως σάκχαρο. Κατά συνέπεια, ο *S. venezuelae* έχει μια τρανσγλυκοσυλάση που μπορεί να μεταφέρει και δύο D-desosamine και L-rhamnose, επεξηγώντας τη μην επιλεκτικότητα που έχει παρατηρηθεί συχνά για τις τρανσγλυκοσυλάσεις που περιλαμβάνονται στη βιοσύνθεση των αντιβιοτικών πολυκετιδίων (A. L. der Boer. και C. Schindt-Danner, 2003).

B.5 ΝΕΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Αν και η μεταβολική μηχανική χρησιμοποιείται συχνά για να τροποποιήσει ή να επεκτείνει τα υπάρχουσα μονοπάτια των ξενιστών, υπάρχουν μερικά παραδείγματα όπου η μεταβολική μηχανική πολυγονιδίων έχει χρησιμοποιηθεί για να εισάγει νέα μονοπάτια με σκοπό την παραγωγή νέων προϊόντων.

Οι πρόσφατες ανακαλύψεις στη μεταβολική μηχανική φυσικών και ετερόλογων οργανισμών που παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν οδηγήσει σε

υψηλά επίπεδα παραγωγής, κατευθυνόμενης σύνθεσης επιθυμητών προϊόντων και βιοσύνθεσης νέων προϊόντων. Η μεταβολική μηχανική χρησιμοποιεί τη γνώση του κυτταρικού μεταβολισμού για να αλλάξει τα βιοσυνθετικά μονοπάτια, έχοντας πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους βελτίωσης. Η συνδυαστική μεταβολική μηχανική είναι μια επέκταση αυτής της διαδικασίας από την οποία τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τα μεμονωμένα μεταβολικά μονοπάτια από διαφορετικούς οργανισμούς συνδυάζονται για να παράγουν νέους κλάδους στα μεταβολικά μονοπάτια και νέα προϊόντα που ήταν προηγουμένως απρόσιτα. Ένα από τα πειράματα αναφέρεται σε δύο πολυλειτουργικά ένζυμα, το κυτόχρωμα P450 και μια uridine diphosphate glucose (UDPG)-glucosyl transferase που μεταφέρθηκαν από το σόργο (*Sorghum bicolor*) στο φυτό *A. thaliana*, με συνέπεια την παραγωγή του cyanogenic glucoside dhurrin (το οποίο παρέχει ανθεκτικότητα στους ψύλλους *Phyllotreta nemorum*) (A. L. der Boer. και C. Schindt-Danner, 2003). Οι επιστήμονες δημιούργησαν διαγονιδιακά φυτά που φέρουν το ένα ή και τα δύο ένζυμα του κυτοχρώματος P450, αλλά δεν έχουν το UDPG-glucosyltransferase και κατέδειξαν τη συσσώρευση κατάλληλων μεταβολικών ενδιάμεσων.

Ένα άλλο παράδειγμα της γενικής προσέγγισης είναι η παραγωγή πολυμερών (π.χ. polyhydroxyalkanoate-PHA) στα διαγονιδιακά φυτά. Τα PHAs είναι πολυεστέρες από υδροξυοξέα που συντίθεται από ένα εύρος βακτηρίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά. Το PHA, poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), μπορεί να συσσωρευτεί στα πλαστίδια του διαγονιδιακού φυτού *A. thaliana* σε επίπεδα που υπερβαίνουν το 40% του ξηρού βάρους των βλαστών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της εισαγωγής τριών βακτηριακών γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα 3-ketothiolase, αναγωγή του συνένζυμου A και PHA. Το PHB είναι ένα εύθραυστο πλαστικό με ελάχιστες χρήσεις. Το συμπλοκοπολυμερές poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) είναι πιο εύχρηστο και το εμπορικό του όνομα είναι Biopol. Το Biopol έχει παραχθεί στην *A. thaliana* και στο σιναπόσπορο μέσω της συντονισμένης έκφρασης τεσσάρων βακτηριακών γονιδίων, τα προαναφερθέντα συν το απαμινάση θρεονίνης που υπάρχει στο *E. coli*. Αν και η υψηλή παραγωγή των πλαστικών προκαλεί δυσμενείς συνθήκες στην ανάπτυξη των φυτών το PHB και το Biopol έχουν παραχθεί πρόσφατα σε σχετικά υψηλά επίπεδα στην Άλφα-Άλφα χωρίς δυσμενή αποτελέσματα (A. L. der Boer. και C. Schindt-Danner, 2003).

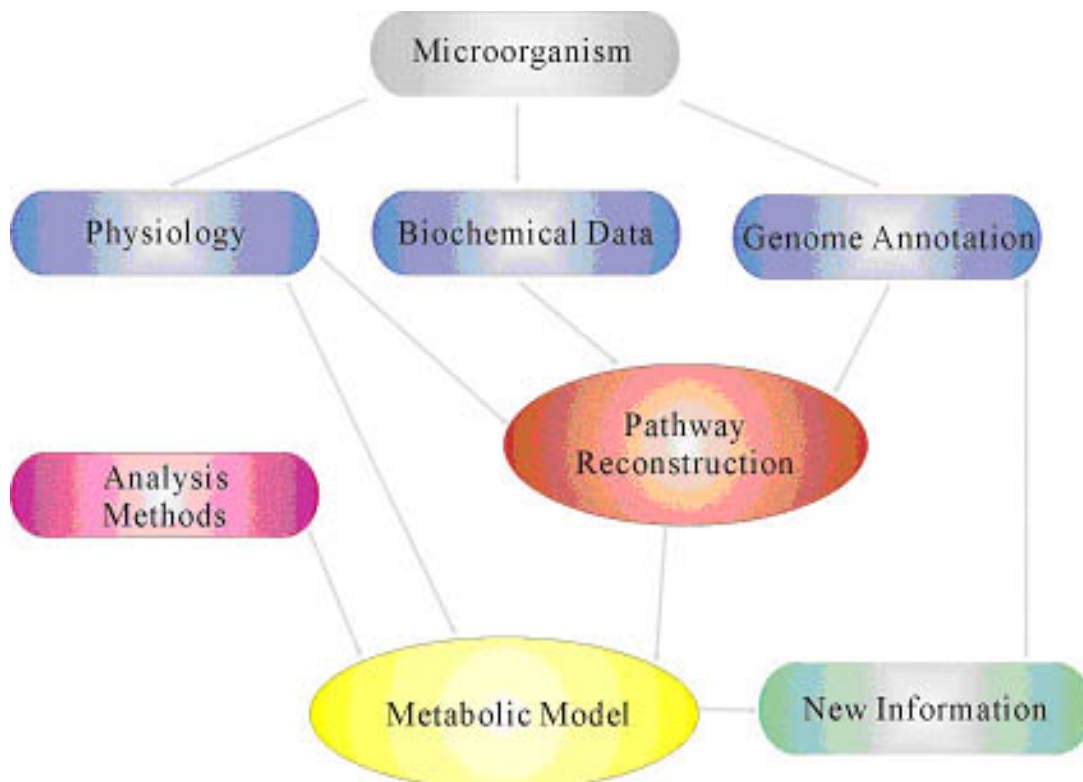
B.6 ΕΠΙΛΟΓΗ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ

Η μεταβολική μηχανική χρησιμοποιεί τη γνώση του κυτταρικού μεταβολισμού για να αλλάξει τα βιοσυνθετικά μονοπάτια, έχοντας πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους βελτίωσης. Η συνδυαστική μεταβολική μηχανική είναι μια επέκταση αυτής της διαδικασίας από την οποία τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τα μεμονωμένα μεταβολικά μονοπάτια από διαφορετικούς οργανισμούς συνδυάζονται για να παράγουν νέους κλάδους στα μεταβολικά μονοπάτια και νέα προϊόντα που ήταν προηγουμένως απρόσιτα.

Η οριζόντια μεταφορά του φυσικού μονοπατιού ενός επιθυμητού προϊόντος σε έναν καλά αντιπροσωπευτικό ετερόλογο οργανισμό αποτελεί μια ελκυστική εναλλακτική λύση για την παραγωγή επιθυμητών ενώσεων σε υψηλά επίπεδα ή για να παρέχει βάσεις για τις επόμενες συνδυαστικές προσεγγίσεις. Διευκολύνει επίσης τις λεπτομερείς μελέτες για τους σύνθετους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς και παρέχει την ευκαιρία να αποκρυπτογραφηθούν τα αντίστοιχα προϊόντα ομάδων βιοσυνθετικών γονιδίων που είναι ανενεργά. Η ανασύσταση ενός μονοπατιού σε έναν ετερόλογο οργανισμό μπορεί να προτιμηθεί για ποικίλους λόγους, όπως οι ιδιότητες αύξησης του οργανισμού και η διαθεσιμότητα των διαδικασιών της γενετικής μηχανικής. Ένα μεταβολικό μονοπάτι μπορεί να ανασυσταθεί σε ένα οργανισμό της επιλογής μας από την συνέκφραση των απαιτητών γονιδίων. Τα γονίδια μπορούν να κλωνοποιηθούν όλα από έναν ή από διαφορετικούς οργανισμούς και να συναρμολογηθούν σε ένα νέο βιοσυνθετικό μονοπάτι. Παραδείγματος χάριν, τα βιοσυνθετικά γονίδια των καροτενοειδών που κλωνοποιούνται από διάφορους φυσικούς καροτενογενείς οργανισμούς (που φυσικά παράγουν καροτενοειδή) έχουν συνδυαστεί στο μη-καροτινογενές βακτήριο *Escherichia coli* για την ανασύσταση λειτουργικών μονοπατιών καροτινοειδών. Γονίδια μικροβιακής και φυτικής προέλευσης συνδυάστηκαν στο *E. coli* παράγοντας taxadiene, που μεσολαβεί για την βιοσύνθεση του taxol (A. L. και C. Schindt-Danner, 2003).

Η επιλογή του ξενιστή όπου θα γίνει η ανασύσταση του μεταβολικού μονοπατιού είναι σημαντική για την επιτυχή παραγωγή των φυσικών προϊόντων. Τα μικρόβια είναι ανεκτίμητου ενδιαφέροντος ως εργοστάσια κυττάρων για την παραγωγή ενώσεων που είναι δύσκολο ή αδύνατο να δημιουργηθούν από τη χημική σύνθεση λόγω της πολυπλοκότητας των δομών τους και ή των ειδικών

στερεοχημικών τους απαιτήσεων. Η ανασύσταση της βιοσύνθεσης των φυσικών προϊόντων απαιτεί να εκφραστούν λειτουργικά μεγάλα πολυενζυμικά συστήματα, το οποίο καθιστά την επιλογή του κατάλληλου ξενιστή σημαντική. Εκτός από τον κατάλληλο εργαστηριακό εξοπλισμό, με ότι αυτό συνεπάγεται, ο ξενιστής πρέπει να κατέχει την κυτταρική μηχανή που απαιτείται για την επιτυχή παραγωγή πρωτεϊνών και τη διατήρηση της ενεργότητάς τους. Δεδομένου ότι η χρήση του γενετικού κώδικα είναι συνήθως κρίσιμη παράμετρος για την αποδοτική έκφραση, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το περιεχόμενο GC των ξένων γονιδίων και του γονιδιώματος του ξενιστή πρέπει να είναι παρόμοιο (A. L. der Boer. και C. Schindt-Danner, 2003). Η λειτουργικότητα των ρυθμιστικών στοιχείων και υποκινητών καθώς επίσης και η σταθερότητα του mRNA πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την επιλογή του ξενιστή. Για να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή, τα απαραίτητα υποστρώματα πρέπει να είναι διαθέσιμα σε επαρκείς ποσότητες στο σωστό χρόνο, το οποίο απαιτεί κατάλληλα πρωτόκολλα ζύμωσης. Εάν πρόκειται να παραχθούν αντιμικροβιακές ή τοξικές ουσίες, τότε θα πρέπει να εκφραστούν στον ξενιστή μηχανισμοί αυτοάμυνας. Εναλλακτικά επαγώγιμοι υποκινητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι οποίοι ενεργοποιούνται όταν τα κύτταρα φθάσουν στη στατική φάση ανάπτυξης. Λαμβάνοντας υπ' υπόψη, τα παραπάνω μόνο μερικά βακτήρια (π.χ. *E coli*, *Streptomyces*, *Pseudomonads* και Βάκιλος) έχουν καταδειχθεί ως κατάλληλοι ξενιστές για την έκφραση γονιδίων. Η παραγωγή ενός φυσικού προϊόντος σ' ένα ετερόλογο ξενιστή δεν απαιτεί μόνο τη σωστή επιλογή του ξενιστή-παραγωγού αλλά επιπλέον απαιτεί : **α)** την κατανόηση της βιοχημείας του μεταβολικού μονοπατιού, **β)** την επίτευξη αυξημένης παραγωγής του προϊόντος στο ξενιστή, **γ)** την εύκολη διατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας και **δ)** τη γνώση της αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού (**Εικόνα 57**).



Εικόνα 57: Τα βήματα της μεταβολικής μηχανικής.

Έτσι για τη μεταφορά ενός βιοσυνθετικού μονοπατιού από τον αρχικό “παραγωγό” σε ένα ξενιστή πρέπει να προσδιοριστούν τα αντίστοιχα βιοσυνθετικά γονίδια. Κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας, ο αριθμός κλωνοποιημένων και αλληλουχημένων ομάδων βιοσυνθετικών γονιδίων έχει αυξηθεί δραματικά. Επιπλέον, περισσότερα από 250 πλήρη χαρτογραφημένα μικροβιακά γονιδιώματα έχουν αναφερθεί μεταξύ των οποίων είναι καλά γνωστοί παραγωγείς δευτερογενών μεταβολιτών (στρεπτομύκητες, βάκιλοι και κυανοβακτήρια). Αυτά τα στοιχεία αποκαλύπτουν έναν μεγάλο αριθμό ομάδων βιοσυνθετικών γονιδίων για την παραγωγή των πρόσθετων, και μέχρι σήμερα μη αναγνωρισμένων, ενώσεων (A. L. der Boer και C. Schindt-Danner, 2003). Η παρουσία ‘ανεργών’ ή ‘κρυμμένων’ δευτερογενών μεταβολικών μονοπατιών δείχνει ότι η γονιδιωματική ικανότητα αυτών των μικροοργανισμών να συνθέτουν φυσικά προϊόντα με βιολογική δραστηριότητα είναι πολύ υψηλότερη απ’ ό τι αρχικά αναμενόταν. Για να ταυτοποιηθούν και να απομονωθούν αυτά τα υποθετικά προϊόντα και για να χρησιμοποιηθεί το τεράστιο γενετικό δυναμικό απαιτούνται αποτελεσματικές μέθοδοι ετερόλογης έκφρασης γονιδίων. Σήμερα, τεχνικές αναπτύσσονται για να γίνει σάρωση σε βιβλιοθήκες έκφρασης πολλαπλών γονιδιωμάτων από μια πηγή-στόχο (π.χ. έδαφος) για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, μια τεχνική γνωστή ως μεταγονιδιωματική (A.

L. der Boer και C. Schindt-Danner, 2003). Περίπου το 99.8% από τα μικρόβια που είναι παρόντα στο περιβάλλον δεν μπορούν να καλλιεργηθούν κάτω από εργαστηριακές συνθήκες όμως, το βιοσυνθετικό δυναμικό αυτής της σχεδόν ανεξερεύνητης πηγής φαίνεται σχεδόν ατελείωτο. Η μεταφορά μονοπατιών φυσικών προϊόντων σε καλά αναπτυσσόμενους ετερόλογους ξενιστές αντιπροσωπεύει όχι μόνο μια ελκυστική εναλλακτική λύση για τη παραγωγή φυσικών προϊόντων, αλλά είναι επίσης ένα χρήσιμο εργαλείο για να παραχθούν νέα προϊόντα (ανάλογα) μέσω της βιοσυνθετικής μηχανικής. Η γενετική πληροφορία των αρχικών ομάδων γονιδίων χρησιμοποιούνται για στοχοθετημένες τροποποιήσεις, που παράγουν νέες ενώσεις σε μια προσέγγιση που καλείται συνδυαστική βιοσύνθεση (A. L. der Boer και C. Schindt-Danner, 2003).

Η ανασύσταση ενός νέου μονοπατιού σε έναν οργανισμό απαιτεί τα ετερόλογα γονίδια να εκφράζονται λειτουργικά στον ετερόλογο οργανισμό και να μην οδηγούν στο σχηματισμό τοξικών προϊόντων. Το *E. coli*, για πολλούς λόγους, προτιμάται ως ετερόλογος οργανισμός. Η γενετική μηχανική χρησιμοποιεί το *E. coli* γιατί είναι πολύ μικρός οργανισμός, το γονιδιωμά του έχει όλο αλληλουχηθεί, πολλαπλασιάζεται πάρα πολύ εύκολα και γρήγορα και επιπλέον η διαθεσιμότητα των διαφόρων πλασμιδίων που ανήκουν στις διαφορετικές ομάδες ασυμβατότητας (και με διαφορετικούς αντιβιοτικούς δείκτες) επιτρέπει την ταυτόχρονη έκφραση πολλών ετερόλογων γονιδίων. Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την εύκολη ενσωμάτωση γονιδίων σε διάφορες καθορισμένες θέσεις του γονιδιώματος του *E. coli* (A. L. der Boer και C. Schindt-Danner, 2003).

B.7 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΕ ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΥΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Μια εναλλακτική λύση των κλασσικών και χρονοβόρων διαδικασιών κλωνοποίησης που περιγράφονται παραπάνω είναι η ανασύσταση των βιοσυνθετικών μονοπατιών φυσικών προϊόντων σε μια φυσική οντότητα (π.χ. κοσμίδια ή BAC) πριν από τη μεταφορά στον ετερόλογο ξενιστή. Η μέθοδος επιτρέπει την ανασύσταση των βιοσυνθετικών μονοπατιών με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής των βιοσυνθετικών γονιδίων που αρχίζουν από τα κοσμίδια ή BACs διευκολύνοντας τις περαιτέρω τροποποιήσεις που απαιτούνται για την ετερόλογη έκφραση τους στον

ξενιστή (π.χ. αντικατάσταση υποκινητών). Με τη βοήθεια του ανασυνδυασμένου DNA, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες προσεγγίσεις για τη τροποποίηση του ετερόλογου κυττάρου και την επίτευξη του επιθυμητού στόχου.

Η γενετική τροποποίηση περιλαμβάνει: **α)** την απαλοιφή ενός ενζύμου ή την παρεμπόδιση του να αποβάλει ένα ανταγωνιστικό μονοπάτι ή μια τοξική ουσία από το προϊόν, **β)** την ενίσχυση ενός γονιδίου ή μιας ομάδας γονιδίων για να βελτιώσει τη σύνθεση των υπαρχόντων προϊόντων, **γ)** την έκφραση ενός ετερόλογου ενζύμου για την επέκταση των υποστρωμάτων και τη δημιουργία νέου προϊόντος, **δ)** τη μείωση τοξικών ενώσεων που δημιουργούνται στα βιοσυνθετικά μονοπάτια.

Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι ο έλεγχος των ενζύμων είναι απαραίτητος για να υπερνικήσει τους υπάρχοντες μηχανισμούς ελέγχου. Ένας συνδυασμός τροποποιήσεων μπορεί να λειτουργήσει θετικά για την επίτευξη του στόχου. Ο χειρισμός των αρχικών βιοσυνθετικών μονοπατιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη παραγωγή πρόδρομων ενώσεων, συμπαραγόντων και την ενέργεια που απαιτείται για να στηρίξει το τροποποιημένο μονοπάτι.

B.8 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Ορισμένα φυτοχημικά λόγω της πολυπλοκότητας των βιοσυνθετικών μονοπατιών που τα διέπουν, χρειάζεται προσδιορισμός γονιδίων με στόχο τη καλύτερη διαγενετική βελτίωση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί από τη σφαιρική ανάλυση των γονιδίων, χρησιμοποιώντας τμηματικές αλληλουχίες DNA που αυξάνονται για συγκεκριμένα φυτά ή για πρότυπα είδη. Η επιτυχία αυτών των αναλύσεων εξαρτάται από τη φύση των γονιδίων και την ευφυΐα του ερευνητή για τη επιλογή κατάλληλων ιστών για την εξαγωγή του mRNA. Το *Arabidopsis* και το ρύζι είναι δύο από τα εκατομμύρια φυτά που υπάρχουν στον πλανήτη και το γονιδίωμα τους έχει αλληλουχηθεί εξολοκλήρου, ενώ προσπάθειες επιτελούνται και σε διάφορα άλλα φυτά. Εντούτοις, λίγα είναι γνωστά όσον αφορά τη λειτουργία χιλιάδων γονιδίων που βρίσκονται στα φυτά. Κατά συνέπεια η ανακάλυψη των γονιδίων και η λειτουργία των ενζύμων θα συνεχίσει να είναι κρίσιμο ζήτημα στην ανάπτυξη της βελτίωσης των διαγενετικών φυτών. Αυτό ισχύει για τους δευτερογενείς μεταβολίτες, των οποίων το ποσοστό-περιορισμού των γονιδίων, απαιτεί πολυάριθμα ένζυμα που αποτελούν τα κρίσιμα σημεία των βιοσυνθετικών μονοπατιών. Τα γνωστά

βιοσυνθετικά μονοπάτια των διαφόρων φυτικών ειδών επιτρέπουν στους επιστήμονες να χρησιμοποιήσουν τα γονίδια που περιέχονται σε αυτά και να τα μεταφέρουν σε άλλους οργανισμούς με σκοπό τη δημιουργία νέων προϊόντων (Grusak, 2002).

Οι λειτουργικές γενομικές προσεγγίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελέγξουν τα υποθετικά γονίδια στα βιοσυνθετικά μονοπάτια. Οι πρόσφατες ανακαλύψεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν, με γονίδια του *Arabidopsis*, για τη κατασκευή γενετικά τροποποιημένης ζύμης συντέλεσαν αρκετά στο προσδιορισμό των κρίσιμων ενζύμων του μεταβολισμού του φολικού οξέος. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση των γονιδίων σόγιας στο *Arabidopsis*, για το προσδιορισμό του ενζύμου των ισοφλαβονοειδών το οποίο αποτελεί το κλειδί για τη σύνθεση των φυτοιστρογόνων genistein και daidzein. Τέλος η χρησιμοποίηση ενός ισομερούς ενζύμου αποτέλεσε τη βάση για το προσδιορισμό της σύνθεσης β – καροτίνης τα οποία κλωνοποιήθηκαν στο *Arabidopsis* και στην τομάτα.

Η μεταφορά του πολυγονιδίου από το ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι στο άλλο είναι δύσκολη, έχουν σημειωθεί όμως και μερικές επιτυχίες. Ο Ye και η ομάδα του ανακάλυψαν τρία γονίδια απαραίτητα για τη σύνθεση 4α-καροτίνης στο ρύζι, η οποία δεν υπάρχει κανονικά. Η διαθεσιμότητα σιδήρου στο ρύζι προλαμβάνει τη νόσο του Alzheimer. Έκτος από τη βιολογική διαθεσιμότητα σιδήρου στο ρύζι, υπάρχει ικανότητα αποθήκευσης στο φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) και στον *Aspergillus fumigatus*. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τις τυποποιημένες προσεγγίσεις αναπαραγωγής για να διασχίσουν τις διαγενετικές σειρές σε μία προσπάθεια να συνδυαστούν τα διάφορα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Σε μερικές περιπτώσεις, η δυσκολία εισαγωγής των πολλαπλών γονιδίων θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί μέσω μιας εναλλακτικής προσέγγισης (Grusak, 2002).

Η επιτυχής υπερέκφραση ενός μεταγραφικού παράγοντα που ρυθμίζει συνεργατικά τα διάφορα γονίδια στο βιοσυνθετικό μονοπάτι θα μπορούσε να απλοποιήσει τη προσπάθεια μετασχηματισμού. Ο μεταγραφικός παράγοντας θα πρέπει να είναι εκλεκτικός για τα βιοσυνθετικά μονοπάτια και τα φυτά θα πρέπει να παρέχουν τα απαραίτητα γονίδια. Μια τέτοια στρατηγική έχει αποδειχθεί επιτυχής στις κυτταροκαλλιέργειες αραβόσιτου, όπου η επαγωγή των φλαβονοειδών μονοπατιών ολοκληρώθηκε από την απομάκρυνση των μεταγραφικών παραγόντων R/C1 ή P, αναγκάζοντας τα κύτταρα να συσσωρεύσουν cyanidin και τα παράγωγα του 3-deoxy φλαβονοειδών.

Επειδή τα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια έχουν πολυάριθμα σημεία διασταυρώσεων, λόγω κοινής ομάδας μεταβολιτών, η οποιαδήποτε διαγενετική προσπάθεια για τη κατασκευή νέου φυτοχημικού πρέπει να λάβει υπόψη τις συνέπειες των μη-ανεπιθύμητων ενώσεων (Grusak, 2002). Για παράδειγμα, πρέπει να εξεταστεί εάν μια έμμεση απώλεια ή μια απρομελέτητη αύξηση φυτοχημικών θα ασκούσε καταστρεπτική επίδραση στην αύξηση και εξέλιξη των φυτών. Επίσης, μια απρόβλεπτη απώλεια φυτοχημικού οδηγεί σε μείωση της θρεπτικής ποιότητας των τροφίμων. Οι προσπάθειες για την αύξηση του σιδήρου (Fe) ή ψευδαργύρου (Zn) στους εδώδιμους ιστούς, προκαλεί την εγκαθίδρυση βαρέων μετάλλων (το κάδμιο ή ο μόλυβδος) άμεσα ή έμμεσα, αυξάνοντας τα επίπεδα τοξικότητας για την υγεία. Ο λειτουργικός χαρακτήρας των περισσότερων μεμβρανικά εντοπιζόμενων μεταφορέων μετάλλων αποδεικνύει ότι δεν είναι μεμονωμένα εκλεκτικοί, έτσι ώστε όταν άλλα βαρέα μέταλλα είναι διαθέσιμα στο έδαφος μπορούν επίσης να συσσωρευθούν στα φυτά. Επομένως φαίνεται συνετό για οποιαδήποτε θρεπτική ενίσχυση των φυτών με οργανικά ή ανόργανα υλικά να εξεταστεί σχολαστικά πριν από την εμπορευματοποίηση.

Για την παραγωγή των οργανικών-ανόργανων συστατικών χρειάζεται να κατανοηθεί η μετακίνηση των συστατικών δια μέσου των αγωγών ιστών. Αντίθετα τα φυτοχημικά μπορούν να συντεθούν στους ιστούς όταν δίνονται οι κατάλληλες πρόδρομες ενώσεις και τα ένζυμα. Τα ανόργανα συστατικά απορροφούνται μέσω του συστήματος της ρίζας. Μεταφέρονται από τις ρίζες στους βλαστούς και στους διάφορους ιστούς μέσω των πολυάριθμων αγγείων του ξύλου. Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να αυξήσουμε την απορροφητικότητα της ρίζας αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα του συστατικού μέσα στα φυτά. Ας σημειωθεί ότι τα περισσότερα συστατικά αντιμετωπίζονται ως ιονισμένα ως εκ τούτου μια αύξηση στη σύνθεση και αποθήκευση των πρωτεϊνών, δεν επιτρέπει την εισαγωγή των ιόντων στο φυτό (Grusak, 2002).

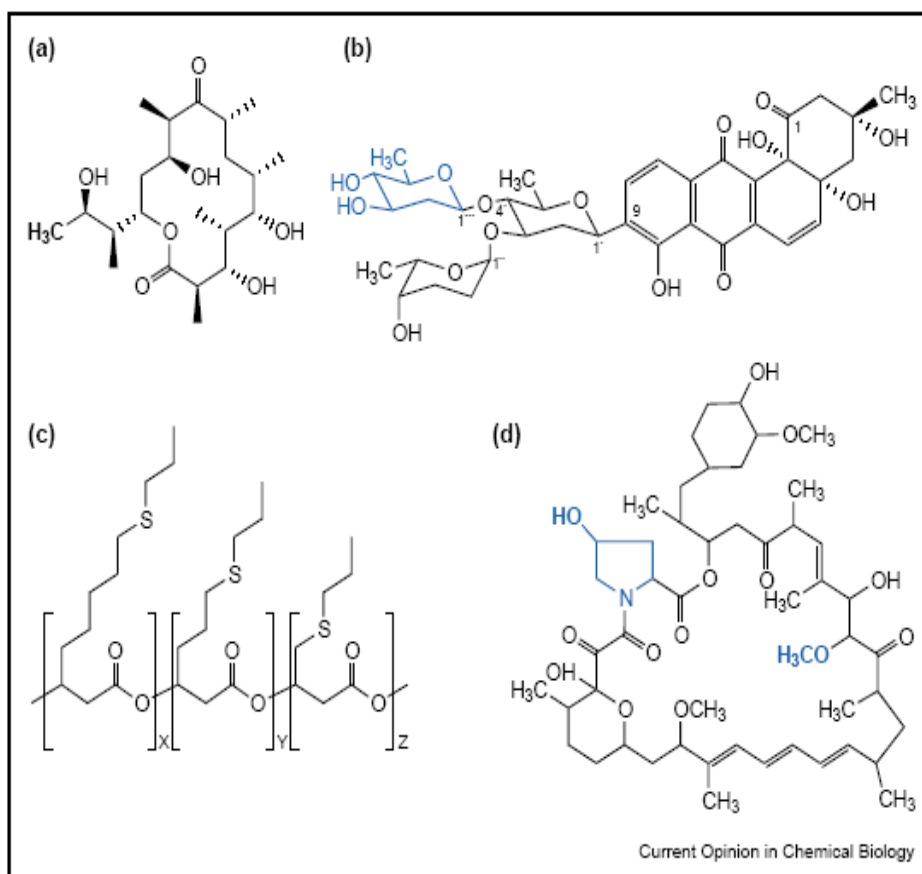
B.9 ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ

Η μεταβολική μηχανική έχει άμεση σχέση με τη βιομηχανία για τους εξής λόγους: **α)** αύξηση της παραγωγής των μεταβολιτών (π.χ. αιθανόλη, φαινυλαλανίνη),

β) παραγωγή νέων μεταβολιτών (παραγωγή των polyhydroxyalkanoates από το *E.coli*), **γ)** διεύρυνση υποστρωμάτων για τη δημιουργία προϊόντων (παραγωγή αιθανόλης από τη λακτόζη και ξυλόζης από το *S. cerevisiae*), **δ)** βελτίωση ή σχεδιασμός νέων μεταβολικών μονοπατιών για την υποβάθμιση των χημικών ουσιών (η υποβάθμιση του βενζολίου, από το βακτήριο *Pseudomonas putida*) και **ε)** την τροποποίηση των κυτταρικών ιδιοτήτων που διευκολύνουν τη βιοεπεξεργασία (καλύτερη ανάπτυξη των κυττάρων *E. coli* κάτω από αναερόβιες συνθήκες).

Νέες ενώσεις μπορούν να σχηματιστούν από την ενσωμάτωση των δομικών μονάδων μέσα στα βιομόρια. Οι δομικές μονάδες εισάγονται στο μέσον αύξησης των οργανισμών. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να παράγει το polyhydroxyalkanoates, τα αντιβιοτικά πολυκετίδια και το NRPs .

Για παράδειγμα, οι νέοι βακτηριακοί πολυεστέρες που περιέχουν θείο παρήχθησαν από το *Ralstonia eutropha*, ενώ το polyhydroxyalkanoate synthase από τη *Pseudomonas mendocina* όταν τα λιπαρά οξέα thia propylthiooctanoic και propylthiohexanoic προστέθηκαν στο μέσο αύξησης (**Εικόνα 58**). Το rapamycin είναι ένα μακροκυκλικό πολυκετίδιο που συντίθεται από το *Streptomyces hygroscopicus* και περιέχει τη δομική μονάδα L-ripecolate, που προέρχεται από τη λυζίνη στο rapL. Η μετάλλαξη του L-proline σε rapL παράγει propylrapamycin. Τέλος η L-trans-4-hydroxyproline παράγει 4-hydroxypropylrapamycin και 4-hydroxypropyl-26-demethoxy-rapamycin (**Εικόνα 58**).



Εικόνα 58: Παραδείγματα νέων ενώσεων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς. (α) Αντιβιοτικό με εκτεταμένη πολυκετιδιακή αλυσίδα, (β) Urdamycin P, νέο αντιβιοτικό πολυκετίδιο που διακλαδίζεται σε γλυκοσυλίωση. (γ) Ένα νέο, θειούχο-συμπολυμερές που περιέχει 3-hydroxypropylthiobutyric acid, 3-hydroxypropylthiohexanoic acid και 3 hydroxypropylthiooctanoic acid, (δ) 4-Hydroxypropylrapamycin, μια νέα παραλλαγή ανοσοκατασταλτικής rapamycin.

Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για να κατασκευαστούν τα αντιβιοτικά πολυκετίδια με τη βοήθεια της γλυκοζυλίωσης με τα ακόλουθα παραδείγματα. Ο *S. venezuelae* παράγει τέσσερα αντιβιοτικά πολυκετίδια με D-desosamine ως σάκχαρο. Το D-desosamine συντίθεται μέσα στο *S. venezuelae* και μοιράζεται στα ενδιάμεσα βιοσυνθετικά μονοπάτια με το streptomycin και το calicheamicin (αντιβιοτικά), που παράγονται από το *Streptomyces griseus* και *Micromonospora echinospora ssp.* αντίστοιχα (Πίνακας 12).

Η εισαγωγή των γονιδίων *strL* και *strM* (περιλαμβάνονται στη βιοσύνθεση dihydrostreptose) από το *S. venezuelae* και η μετάλλαξη που προήλθε από την έλλειψη ενός βιοσυνθετικού μονοπατιού, δημιούργησε ένα νέο μακρολίδιο με L-

ραμνόζη. Κατά συνέπεια, ο *S. venezuelae* έχει μια τρανσγλυκοσυλάση που μπορεί να μεταφέρει και δύο D-desosamine και L-ραμνόζη, επεξηγώντας την επιπολαιότητα που έχει παρατηρηθεί συχνά για τα τρανσγλυκοσυλάση που περιλαμβάνονται στη βιοσύνθεση των αντιβιοτικών πολυκετιδίων (A. L. der Boer. και C. Schindt-Danner, 2003).

Πίνακας 12: Παραγωγή νέων ενώσεων στους μικροοργανισμούς.

Recent literature on the production of novel compounds in microorganisms.	
Modification	Method
Polyhydroxyalkanoates	
Polyhydroxyalkanoates containing sulfur	Precursor feeding
Carotenoids	
Hydroxylation pattern	Gene combination
New glycosylated carotenoid	Gene combination
Novel carotenoid pathways	Directed evolution and gene combination
Polyketide antibiotics	
Macrolide without epoxidation	Gene disruption
Extension of polyketide chain	Module combination
New macrolide structures	Module combination
New macrolide structures	Precursor feeding
New modification in macrolide ring	Gene disruption and feeding
Glycosylation pattern	Gene combination
Glycosylation pattern	Directed evolution
Nonribosomal peptides	
Bacterial/fungal NRP hybrids	Module combination
New non-proteinogenic amino acids as building blocks	Gene disruption and precursor feeding

ΜΕΡΟΣ Γ:
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ
ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ

Γ.1 Η ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΩΝ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

Γ.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα καροτενοειδή αποτελούν μια σημαντική ιατρική και βιοτεχνολογική κατηγορία φυσικών χρωστικών ουσιών που παράγονται από πολλούς μικροοργανισμούς και φυτά. Αυτές οι δομικές χρωστικές ουσίες έχουν ποικίλες βιολογικές λειτουργίες, όπως ο χαρακτηριστικός χρωματισμός διαφόρων ειδών, η προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, απορρόφηση ηλιακής ακτινοβολίας και η χρησιμότητα τους ως πρόδρομες ενώσεις για πολλές ορμόνες (Vershinin, 1999). Παραδοσιακά τα καροτενοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί στη διατροφή ενώ εμπορικά χρησιμοποιούνται ως χρωστικές ουσίες τροφίμων, συμπληρώματα ζωικών τροφών και πιο πρόσφατα, σε καλλυντικά και φαρμακευτικά παρασκευάσματα. Έρευνες απέδειξαν ότι τα καροτενοειδή παρέχουν ευεργετικές και φαρμακευτικές ιδιότητες στην υγεία μας. Η παραγωγή των καροτενοειδών από βιολογικές πηγές είναι ένας τομέας εντατικής έρευνας. Λόγω της έμφυτης βιοσυνθετικής ικανότητας των διαφορετικών οργανισμών έχει γίνει μια ιδιαίτερη προσπάθεια για τη δημιουργία συστημάτων με σκοπό την εμπορική παραγωγή των καροτενοειδών από βιολογικούς ξενιστές. Προς το παρόν, μόνο μερικά καροτενοειδή όπως το β-καροτένιο, η λυκοπαΐνη, η ασταξανθίνη, η κανθαξανθίνη, η καψανθίνη, η λουτεΐνη, η annatto, το β-aro-8-carotenal, το β-aro-8-carotenal-εστέρας μπορούν να παραχθούν εμπορικά με χημική σύνθεση, με ζύμωση ή με απομόνωση μικρού ποσοστού γενετικού υλικού από άφθονες φυσικές πηγές (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002).

Μέχρι σήμερα αυτή η ερευνητική προσπάθεια έχει στεφθεί με οριακή μόνο επιτυχία. Με τις νέες τεχνικές της βιοεπεξεργασίας και της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA η ανάπτυξη διαφόρων βιολογικών συστημάτων για τη παραγωγή καροτενοειδών είναι σε εξέλιξη. Η διαθεσιμότητα ενός αξιοσημείωτου αριθμού μικροβιακών και φυτικών καροτενοειδών που μπορούν να εκφραστούν λειτουργικά σε ετερόλογους ξενιστές, ανοίγει το δρόμο για τη ετερόλογη παραγωγή καροτενοειδών. Η απαίτηση και η αγορά για τα καροτενοειδή αυξήθηκε τόσο πολύ λόγω της ανακάλυψης ότι διαθέτουν αντικαρκινικές ιδιότητες και διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη πρόληψη των χρόνιων παθήσεων (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002). Ενδεικτικά η παγκόσμια αγορά το 1999 για τα καροτενοειδή ήταν

750–800 εκατομμύρια δολάρια, ενώ το 2005 έφτασε γύρω 1 δισεκατομμύριο δολάρια (Business Communications Co. 2000).

Γ.1.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

Τα καροτενοειδή είναι ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους 40 άτομα άνθρακα και συνεπώς προέρχονται από οκτώ ισοπρενικές ομάδες. Ο σχηματισμός του σκελετού των καροτενίων προέρχεται από τη συμπύκνωσή ‘**ουρά με ουρά**’ δύο μορίων πυροφωσφορικού γερανυλο-γερανυλίου, οπότε σχηματίζεται το φυτοένιο το οποίο θεωρείται πρόδρομη ένωση όλων των καροτενοειδών. Με βάση το φυτοένιο, τα καροτενοειδή σχηματίζονται με αφυδρογόνωση και κυκλοποίηση των ακραίων ομάδων. Με τη διαδικασία αυτή από το φυτοένιο σχηματίζεται η λυκοπαΐνη η οποία αποτελεί τη κόκκινη χρωστική της τομάτας. Περαιτέρω αφυδρογόνωση και κυκλοποίηση των ακραίων ομάδων καταλήγει στο σχηματισμό των καροτενίων (Καράταγλης, 1994). Η βιοχημική ανάλυση της βιοσύνθεσης των καροτενοειδών, περιλαμβάνει τη μοριακή γενετική και πιο πρόσφατα τη γονιδιωματική γενετική (genomics), η οποία οδήγησε στη διαλεύκανση των κύριων μεταβολικών οδών της σύνθεσης των ακυκλικών και κυκλικών καροτενοειδών σε μοριακό επίπεδο (P.C. Lee και C. Schmidt-Dannert, 2002). Υπάρχουν περισσότερα από 150 γονίδια που κωδικοποιούν 27 διαφορετικά καροτενοειδή (*crt*) και τα ένζυμα αυτών έχουν κλωνοποιηθεί από βακτήρια, φυτά, άλγη και μύκητες (**Πίνακας 13**).

Έκτος από λίγες εξαιρέσεις τα γονίδια των καροτενοειδών μπορούν να εκφραστούν λειτουργικά σε ποικίλους ξενιστές και τα ένζυμα από απομακρυσμένα φυλογενετικά είδη μπορούν να ανασυσταθούν λειτουργικά στα κύτταρα με σκοπό τη βιοσύνθεση των καροτενοειδών που λαμβάνουν χώρα σε αυτά (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002). Οι γνώσεις είναι ελάχιστες για τη βιοσύνθεση των καροτενοειδών που περιέχουν τις πρόσθετες τροποποιήσεις των ομάδων. Η αλυσίδα πολυενίου και οι μεθυλικές ομάδες συμβάλλουν στη τεράστια δομική ποικιλομορφία των καροτενοειδών. Μέχρι στιγμής, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί εκατοντάδες μεμονωμένα καροτενοειδή και η προσπάθεια συνεχίζεται.

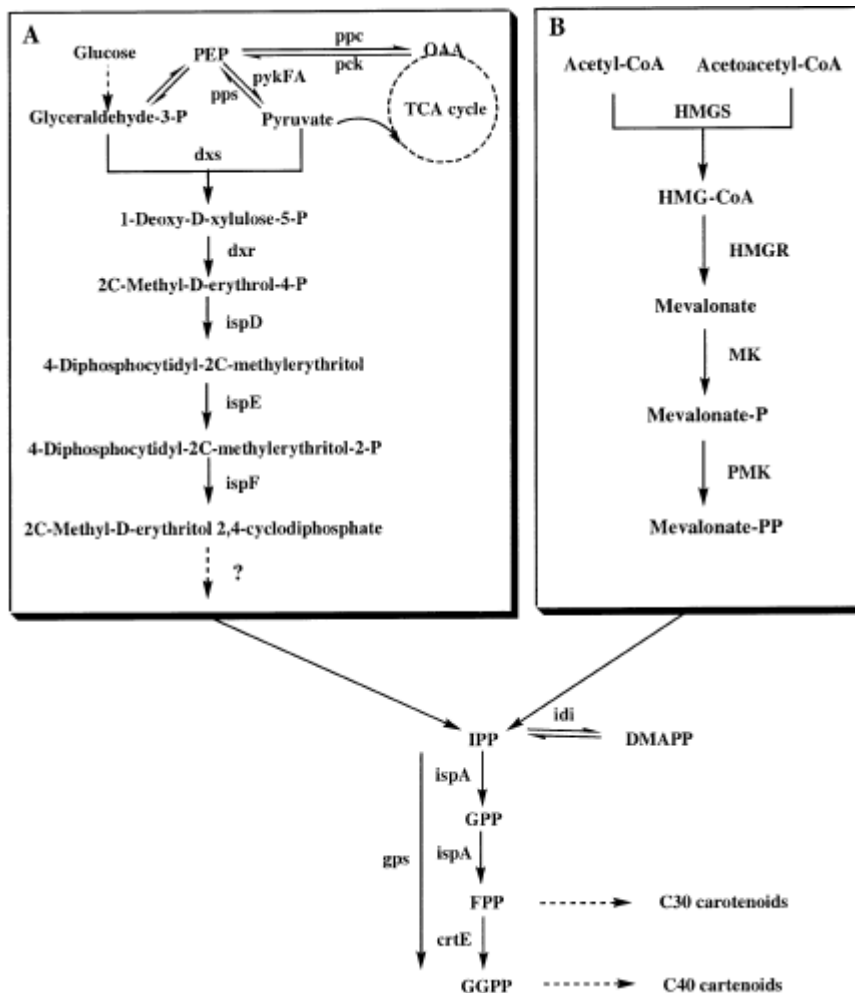
Πίνακας 13: Επιλογή γονιδίων που κωδικοποιούν τα βιοσυνθετικά ένζυμα των καροτενοειδών.

Enzyme	Gene	Organism	Accession number
Formation of carotenoid backbone			
Dehydrosqualene synthase ^a	<i>crtM</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	X73889
GGPP synthase	<i>crtE</i>	<i>Erwinia uredevora</i>	D90087
	<i>crtE</i>	<i>Synechocystis</i> PCC6803	D90899
	<i>al-3</i>	<i>Neurospora crassa</i>	X53979
	<i>gps</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	L25813
Phytoene synthase	<i>crtB</i>	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	D58420
	<i>crtB</i>	<i>Synechocystis</i> PCC6803	X69172
	<i>crtB</i>	<i>Brevibacterium linens</i>	T51118
	<i>al-2</i>	<i>Neurospora crassa</i>	L27652
	<i>psy</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	L25812
Formation of acyclic carotenoids and their derivatives			
Dehydrosqualene desaturase ^a	<i>crtN</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	X73889
Phytoene desaturase			
Two desaturations	<i>crtP</i>	<i>Synechocystis</i> PCC6803	X62574
	<i>pds1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	L16237
Three desaturations	<i>crtI</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Z11165
Four desaturations	<i>crtI</i>	<i>Erwinia uredevora</i>	D90087
Up to five desaturations	<i>al-1</i>	<i>Neurospora crassa</i>	M57465
ζ-Carotene desaturase	<i>crtQ</i>	<i>Synechocystis</i> PCC6803	X62574
	<i>zds</i>	<i>Capsicum annuum</i>	X68058
Hydroxyneurosporene synthase	<i>crtC</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	X82458
	<i>crtC</i>	<i>Rubrivivax gelatum</i>	U73944
Methoxyneurosporene desaturase	<i>crtD</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Z11165
	<i>crtD</i>	<i>Rubrivivax gelatum</i>	U73944
Hydroxyneurosporene-O-methyltransferase	<i>crtF</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	X82458
Spheroidene monooxygenase	<i>crtA</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Z11165
Lycopene elongase ^b	<i>crtEb</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AF159510
Formation of cyclic carotenoids and their derivatives			
Lycopene-β-cyclase	<i>crtY</i>	<i>Erwinia uredevora</i>	D90087
	<i>crtY</i>	<i>Synechocystis</i> PCC6803	X74599
	<i>crtL-b</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Z29211
Lycopene-ε-cyclase	<i>crtL-e</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	U50738
β-Carotene hydroxylase	<i>crtZ</i>	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	D58420
	<i>crtR-b1</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Y09225
Zeaxanthin glucosylase	<i>crtX</i>	<i>Erwinia herbicola</i> Eho1	M87280
β-Carotene C(4) oxygenase	<i>crtW</i>	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	D58420
	<i>crtO</i>	<i>Synechocystis</i> PCC6803	D64004
	<i>crtW</i>	<i>Alcaligenes</i> PC1	D58422
	<i>crtO/bkt</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>	X86782/D45881
Zeaxanthin epoxidase	<i>zep1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	T45502
Violaxanthin deepoxidase	<i>vde1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	N37612
Violaxanthin cleavage	<i>vp14</i>	<i>Zea mays</i>	U95953
Capsanthin/capsorubin synthase	<i>ccs</i>	<i>Capsicum annuum</i>	X77289
β-Carotene desaturase	<i>crtU</i>	<i>Streptomyces griseus</i>	X95596
	<i>crtU</i>	<i>Brevibacterium linens</i>	AAF65586
Decaprenoxanthin synthase ^b	<i>crtYe/Yf</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AF159510

Γ.1.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΤΕΡΠΗΝΙΩΝ

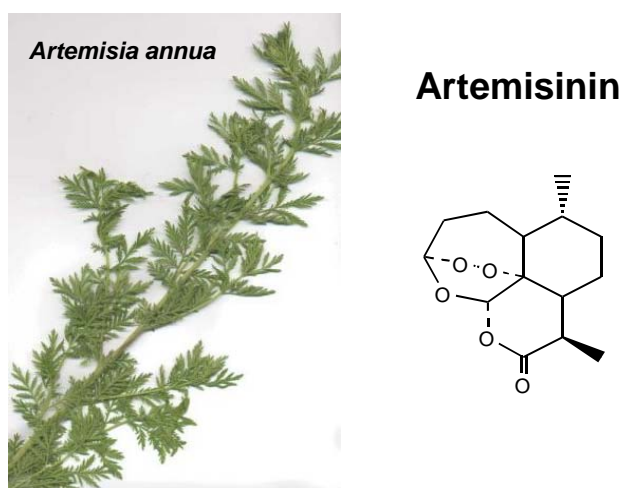
Η βιοσύνθεση των τερπενίων αρχίζει με το Ακετυλο-CoA και προχωράει μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (Εικόνα 60). Σ' αυτή τη διαδικασία, 3 μόρια του Ακετυλο-CoA ενώνονται σταδιακά, για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ με 6 άτομα άνθρακα. Η ένωση αυτή πυροφωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματίσει το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). Το τελευταίο μαζί με το ισομερές του, που είναι το πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP) είναι ενεργά C₅ δομικά συστατικά των

τερπενίων. Στα κύτταρα, τα δύο αυτά συστατικά βρίσκονται σε ισορροπία και συνδυάζονται για να σχηματίσουν τις διάφορες ομάδες των τερπενοειδών με άτομα άνθρακα πολλαπλάσια του πέντε. Το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο και το πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο αντιδρούν και δίνουν το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) που αποτελεί την πρόδρομο μορφή σχεδόν όλων των μονοτερπενίων με 10 άτομα C. Στη συνέχεια το πυροφωσφορικό γερανύλιο μπορεί να συνδεθεί με ένα άλλο μόριο πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου για να δώσει το πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP) (C₁₅), την πρόδρομη μορφή σχεδόν όλων των σεσκιτερπενίων. Το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) είναι η πρόδρομη μορφή για τη παραγωγή καροτενοειδών σε φυτά, ζώα και μύκητες (**Εικόνα 59**) (Ρουμπελάκη, 2003).



Εικόνα 59: Βιοσύνθεση του ισοπρενίου ή τερπενίου με το μη μεβαλονικό (A) και το μεβαλονικό μονοπάτι (B).

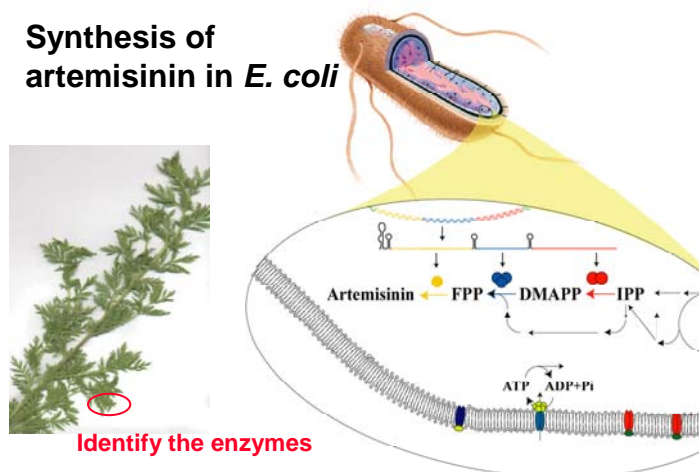
Εκτός από τα φυτά η βιοσύνθεση των τερπενίων μπορεί να πραγματοποιηθεί και στο βακτήριο *E. coli*. Το *E. coli* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του amorpha-4,11-diene. Το Amorphadiene είναι σεσκιτερπένιο, πρόδρομη ένωση για την παραγωγή artemisinin. Η artemisinin είναι ένα φυσικό προϊόν και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της ελονοσίας και απομονώθηκε πρώτα από την *Artemisia annu* (**Εικόνα 60, 61**). Η εμπορική παραγωγή του artemisinin στηρίζεται αυτή την περίοδο στην εξαγωγή και τον καθαρισμό της από το φυτικό ιστό και όπως αναμενόταν, οι παραγωγές είναι χαμηλές. Με τη βοήθεια του *E. coli* έγινε εφικτό η αύξηση της παραγωγής της. Υπάρχουν δύο βιοσυνθετικά μονοπάτια ισοπρενίων που συνθέτουν τα πρόδρομα, πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το ισομερές του πυροφωσφορικό διμεθυλααλύλιο (DMAPP) (**Εικόνα 61**) (Vincent et.al.,2003).



Εικόνα 60: Αριστερά :Αρτεμισία, Δεξιά Χημικός τύπος της artemisinin.

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν το μεβαλονικό μονοπάτι (MEV) για τη σύνθεση των ισοπρενίων για τη μετατροπή του Ακετυλο-CoA σε IPP το οποίο στην συνέχεια ισομερειώνεται σε DMAPP. Τα φυτά χρησιμοποιούν το μεβαλονικό και το μη- μεβαλονικό μονοπάτι (MEV) ή το deoxyxylulose 5-phosphate (DXP), για τη σύνθεση ισοπρενίων. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί με μερικές εξαιρέσεις, χρησιμοποιούν το μονοπάτι του DXP στα προϊόντα IPP και DMAPP χωριστά (**Εικόνα 63**). Τα IPP και DMAPP είναι πρόδρομες ενώσεις για την πρενυλίωση του

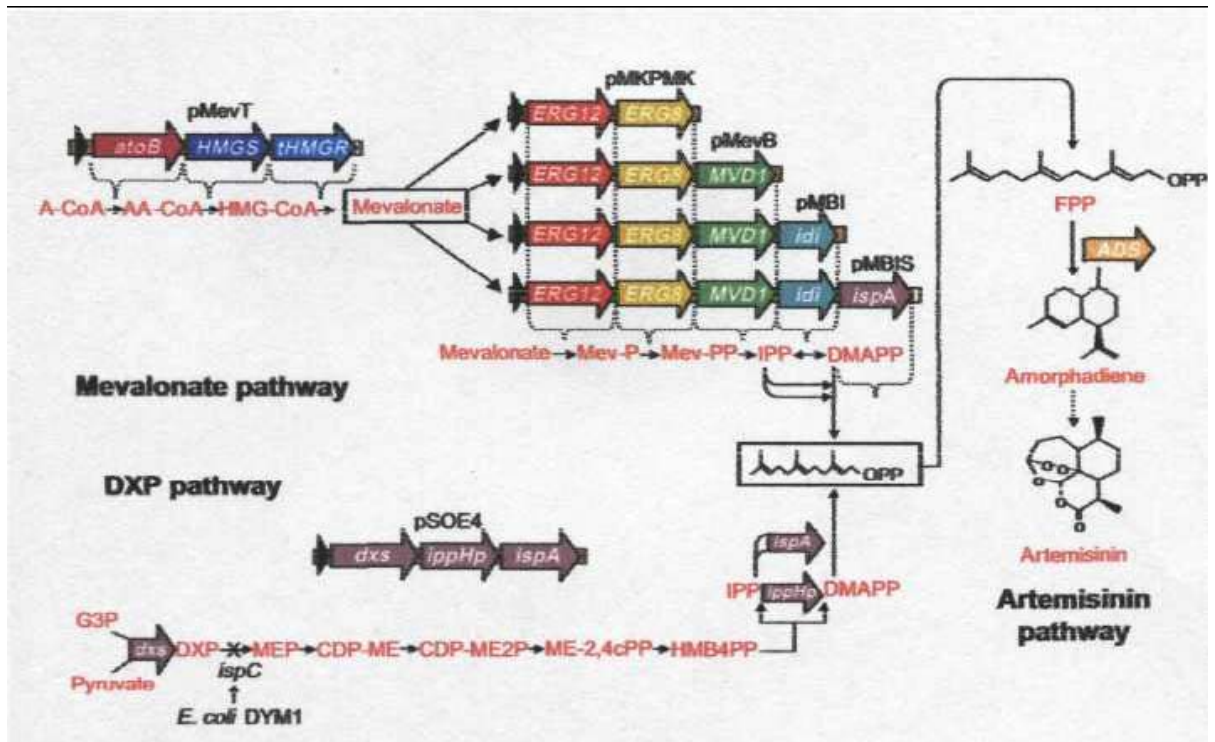
tRNAs και τη σύνθεση πυροφωσφορικού φαρνεζύλιου (FPP), που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση κινόνης και κυτταρικών τοιχωμάτων στο *E. coli* (Vincent et.al.,2003) .



Εικόνα 62: Η σύνθεση της artemisinin στο *E.coli*.

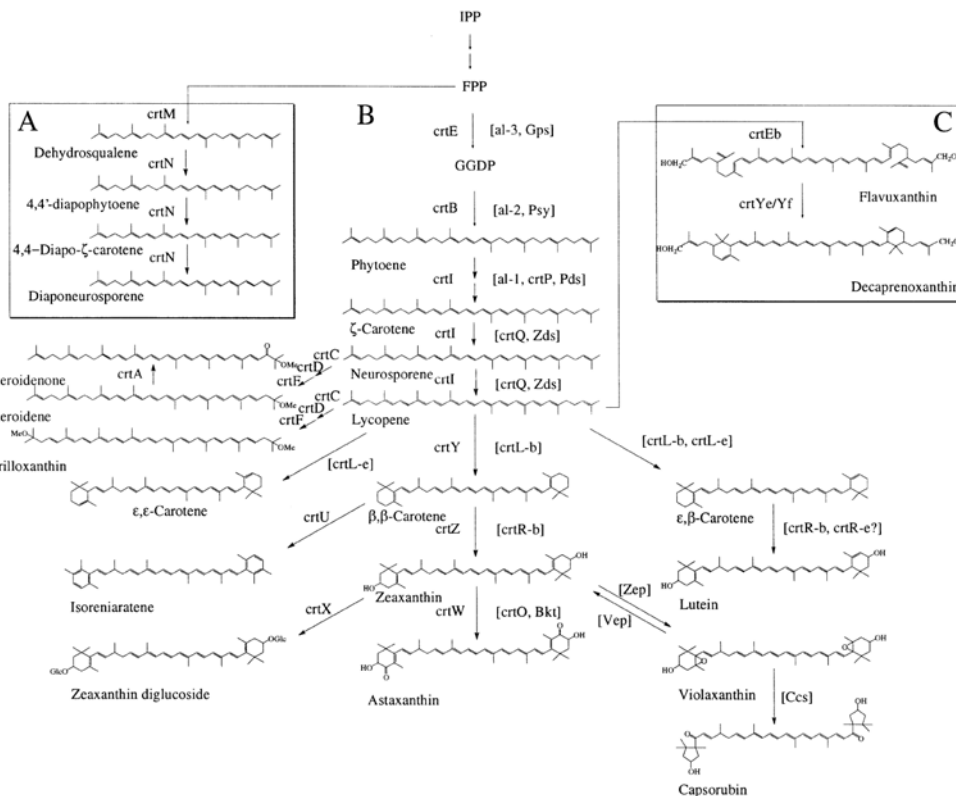
Η αύξηση των glyceraldehyde-3-phosphate, pyruvate, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS; που κωδικοποιείται από το γονίδιο *dxs*) και IPP (κωδικοποιείται από το *idi*), κατευθύνει την αυξανόμενη συγκέντρωση καροτενοειδών στο κύτταρο. Αν και σημειώθηκαν σημαντικές βελτιώσεις στην παραγωγή ισοπρενίων, αυτή η προσέγγιση έπασχε πιθανότατα από τους περιορισμούς των μηχανισμών ελέγχου του ξενιστή. Αυτό ξεπεράστηκε με την αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του υποστρώματος FPP που παρέχεται στο ένζυμο synthase amorghadiene. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα βιοσύνθεσης του ισοπρενίου με το μεταβολικό και το μη μεταβολικό μονοπάτι από το *S. cerevisiae* συνδυάστηκαν μέσα σε οπερόνια και εκφράστηκαν στο *E.coli* (Vincent et.al.,2003).

Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση αυτής της ετερόλογης έκφρασης στο *E.coli* οδήγησε σε αφθονία προδρόμων ισοπρενίων, τα κύτταρα είτε έπαψαν να αυξάνονται είτε αλλοιωνόντουσαν για να υπερνικήσουν την τοξικότητα. Το *E. coli* μπορεί να παράγει και να συνθέτει FPP με την βοήθεια των γονιδίων *ispA*, *crtE* και *al-3* (Πίνακας 13). Η *Erwinia uredevora* μετατρέπει το FPP σε GGPP με το *crtE*, ενώ το GGPP μπορεί να συντεθεί από το *Archaeoglobus fulgidus* με το γονίδιο *gps* (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002).



Εικόνα 62: Η παραγωγή amorphaadiene δια μέσου του DXS, βιοσυνθεσή του ισοπρενίου μέσω του μεβαλονικού μονοπατιού και απεικόνιση του συνθετικού οπερονίου.

Ομοίως, μπορεί να συντεθεί το ένζυμο dehydrosqualene synthase με το γονίδιο *crtM* από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002). Τα διάφορα κλωνοποιημένα γονίδια του φυτοενίου όταν εισαχθούν σε αυτό δύο, τρεις, τέσσερις ή πέντε διπλοί δεσμοί παράγουν τη ζ-καροτίνη στα φυτά, στα κυανοβακτήρια και στα άλγη. Με τον ίδιο τρόπο παράγεται και η νευροσπορένη από *Rhodobacter* και η λυκοπαΐνη που περιέχεται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στους μύκητες (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002). Πρόσφατα ένα νέο γονίδιο κωδικοποιεί τη παραγωγή της λυκοπαΐνης με τη βοήθεια του γονιδίου *crtEb* από το *Corynebacterium glutamicum*, το οποίο καταλύει τη συμπύκνωση ενός μορίου DMAPP που έχει σαν αποτέλεσμα η λυκοπαΐνη να παράγει τη φλαβοξανθίνη που περιέχει C₅₀ (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002) (Εικόνα 62).



Εικόνα 62: Η βιοσύνθεση των καροτενοειδών σε φυτά και μικροοργανισμούς. Βιοσυνθετικά μονοπάτια των καροτενοειδών C30, C40 και C50 σε φυτά και μικροοργανισμούς από τους οποίους τα ένζυμα έχουν κλωνοποιηθεί. Παρουσιάζονται τα τελικά προϊόντα των βιοσυνθετικών μονοπατιών. Τα ένζυμα από τα φυτά, τα άλγη και τα κυανοβακτήρια δίνονται σε παρένθεση.

Γ.1.4 ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

Τα καροτενοειδή είναι ενδοκυτταρικά συστατικά και δεν μπορούν να εκκριθούν στο μέσο μιας ζύμωσης. Υπάρχουν βασικές αρχές αυτής της φυσιολογικής κατάστασης. Η βασική παραγωγικότητα για τη βιολογική παραγωγή καροτενοειδούς είναι το κόστος παραγωγής βιομάζας, η συγκέντρωση του καροτενοειδούς μέσα στο κύτταρο και η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων που παράγουν τα καροτενοειδή. Περαιτέρω, απαιτείται ιδιαίτερη μεταχείριση εάν χρειάζεται καθαρισμό και οι δαπάνες της επεξεργασίας είναι υψηλές. Οι στρατηγικές για τη παραγωγή καροτενοειδών στα βιολογικά συστήματα πρέπει να λάβουν υπόψη τους βιοχημικούς και φυσιολογικούς περιορισμούς του συστήματος τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κάθε μεθόδου. Πολλές διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί για τη χρησιμοποίηση βιολογικής παραγωγής ως τρόπο παραγωγής ποικίλων προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων, τις θεραπευτικές πρωτεΐνες, τα αμινοξέα και

πολλές άλλες ενώσεις. Αυτές οι υπάρχουσες διαδικασίες χρησιμοποιούν τα κύτταρα των ξενιστών ως χημικό αντιδραστήρα.

Το υπό μελέτη προϊόν παράγεται συχνά στα συστήματα ζύμωσης, και στις περισσότερες περιπτώσεις εκκρίνεται στο μέσο παραγωγής. Η έκκριση στο μέσο είναι βασικός παράγοντας στην επιτυχία των διαδικασιών για τους ακόλουθους λόγους:

- Τα κύτταρα δεν συσσωρεύουν μεγάλα ποσά του προϊόντος. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του προϊόντος στο κύτταρο μπορούν να οδηγήσουν σε μια αρνητική ανατροφοδότηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του προϊόντος. Επιπλέον οι υψηλές συγκεντρώσεις του προϊόντος στο κύτταρο μπορούν να είναι τοξικές, με συνέπεια τη μείωση του μεταβολισμού ή τη βιωσιμότητα των κυττάρων.
- Εάν το προϊόν απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία και καθαρισμό, το κόστος του καθαρισμού είναι χαμηλότερο όταν το προϊόν συσσωρεύεται στο μέσο καλλιέργειας παρά μέσα στα κύτταρα.

Η παραγωγικότητα της σύνθεσης σε αυτές τις διαδικασίες εξαρτάται από τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων και το κόστος παραγωγής βιομάζας. Αυτό όμως, δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην παραγωγικότητα και στο κόστος διαδικασίας (Ausich R.L., 1997).

Γ.1.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ: Στη φύση υπάρχουν πάνω από 600 διαφορετικά είδη καροτενοειδών, με ευρύ φάσμα βιοσυνθετικής ικανότητας. Ο κλασσικός τρόπος σύνθεσης για τη παραγωγή των καροτενοειδών είναι η χημική σύνθεση. Επίσης χρησιμοποιείται και η σύγχρονη τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Επειδή τα χαρακτηριστικά της βιοσύνθεσης των καροτενοειδών είναι γνωστά, μπορούμε να βιοσυνθέσουμε ένα καροτενοειδές και να το χρησιμοποιήσουμε για τη δημιουργία των υπολοίπων. Με τη βιολογική παραγωγή, εμφανίζονται και παράγονται μόνο τα φυσικά στερεοϊσομερή. Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα της χημικής σύνθεσης για την παραγωγή καροτενοειδών. Οι χημικές μέθοδοι παράγουν καροτενοειδή

εξαιρετικής καθαρότητας και συνοχής και το κόστος παραγωγής είναι αρκετά χαμηλό. Επιπλέον παράγονται νέες ενώσεις από τα πρόδρομα βιοσυνθετικά μονοπάτια (Ausich R.L., 1997).

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ: Όπως με οποιαδήποτε τεχνολογία υπάρχουν επίσης και μειονεκτήματα για τη βιοσύνθεση των καροτενοειδών. Μίγματα καροτενοειδών παράγονται συχνά στα βιολογικά συστήματα και απαιτούν την περαιτέρω επεξεργασία και καθαρισμό. Σε πολλές περιπτώσεις που η τεχνολογία είναι νέα απαιτείται ιδιαίτερη έρευνα για τον καθαρισμό τους, και το γενικό κόστος παραγωγής είναι υψηλότερο από της χημικής σύνθεσης. Η σύνθεση ορισμένων καροτενοειδών είναι πολύ σύνθετη. Η γνώση και η τεχνολογία που αναπτύσσονται για τη σύνθεση ενός καροτενοειδούς ίσως ενισχύσει τη σύνθεση άλλων καροτενοειδών, αλλά συχνά η σύνθεση ενός νέου καροτενοειδούς απαιτεί ανάπτυξη μιας νέας χημικής διαδικασίας. Τέλος, η χημική σύνθεση παράγει μίγματα στερεοϊσομερών, μερικά από τα οποία ίσως να μην είναι ενεργά όπως συμβαίνει στα φυσικά ισομερή καροτενοειδή, ίσως να μην είναι επιθυμητό για ευρεία κατανάλωση, ή μπορεί να έχει ανεπιθύμητες παρενέργειες (Ausich R.L., 1997).

Γ.1.6 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Τα περισσότερα γονίδια καροτενοειδών και ομάδες γονιδίων έχουν κλωνοποιηθεί και έχουν εκφραστεί σε γενετικά μη-καροτινογενείς ξενιστές. Υπάρχουν διάφορες εμπορικές διαδικασίες για τη Ν παραγωγή καροτενοειδών για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση. Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει ποικίλους οργανισμούς και συστήματα για να παράγουν τα διάφορα καροτενοειδή. Υπάρχουν διάφορες εμπορικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται αυτήν τη περίοδο για να παράγουν τα καροτενοειδή για ανθρώπινη καθώς επίσης και για ζωική κατανάλωση. Η παραγωγή β-καροτένιου από τα άλγη *Dunaliella sp.* είναι μια καλά αναπτυγμένη τεχνολογία. Τα μη κυψελοειδή άλγη στερούνται κυτταρικού τοιχώματος και παράγουν υψηλά επίπεδα β-καροτίνης όταν αναπτύσσονται υπό υψηλή συγκέντρωση άλατος. Η εκχύλιση από κύτταρα φυκιών έχει αναπτυγμένη απόδοση β-καροτένιου. Η έρευνα έχει συμβάλει για να αναπτυχθούν άλλα βιολογικά συστήματα όπως μύκητες, άλγη και άλλοι οργανισμοί για την παραγωγή β-καροτένιου.

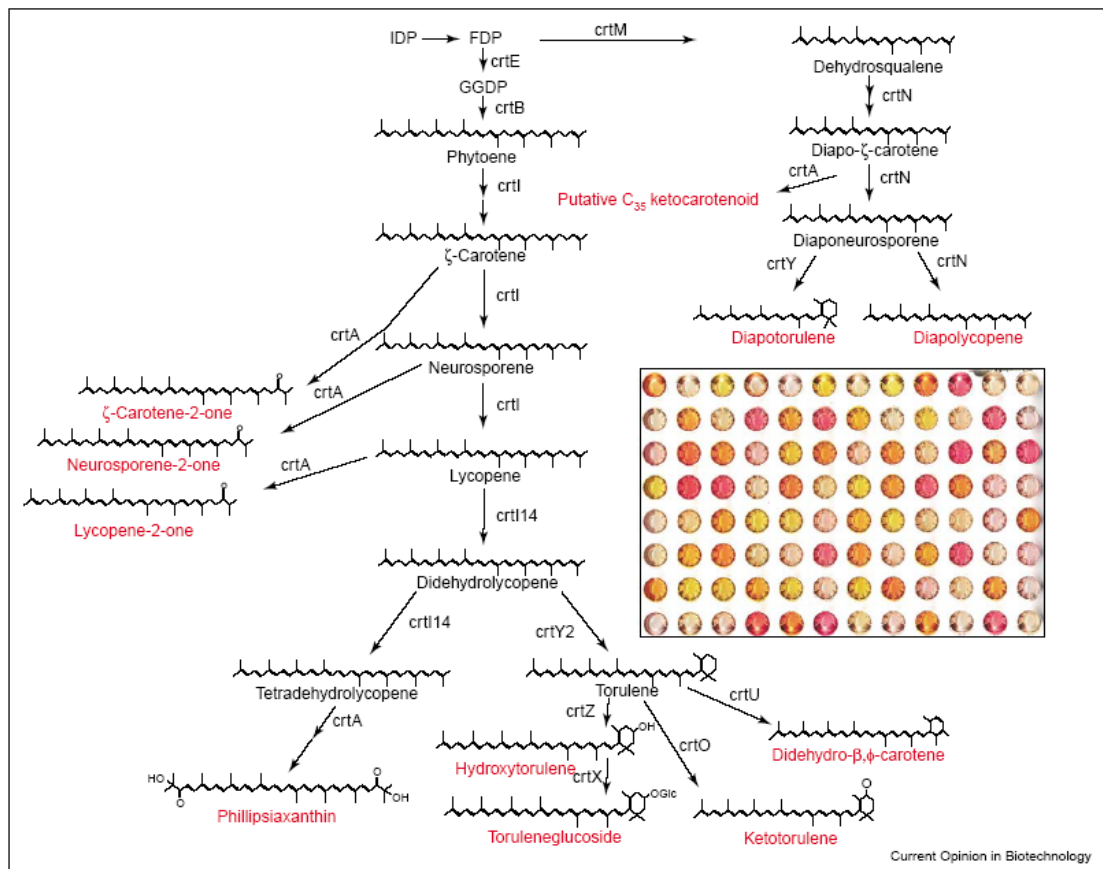
Τα κύτταρα του *E. coli*, μετά από μετασχηματισμό με ετερόλογα γονίδια, έχουν την ικανότητα παραγωγής καροτενοειδών, αλλά σε χαμηλό επίπεδο. Ενδεικτικά μπορούμε να συλλεχθεί περίπου 1 mg/g βάρος ξηρών κυττάρων (DCW), σε αντίθεση με τα καροτινογενή άλγη και άλλους οργανισμούς όπως *Dunalliella*, *Haematococcus*, *Flavobacterium* και *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) κ.α. που η παραγωγή των καροτενοειδών είναι σε υψηλότερα επίπεδα. Η υψηλή παραγωγή των καροτενοειδών στους «τροποποιημένους» μικροβιακούς ξενιστές απαιτεί (1) τη βελτιστοποίηση διαθέσιμης πηγής προδρόμων ενώσεων ισοπρενίου, (2) εξισορρόπηση της έκφρασης των καροτενογενών γονιδίων για το μετασχηματισμό των πρόδρομων ενώσεων κατά την παραγωγή επιθυμητών καροτενοειδών (3) να έχουν την ικανότητα αποθήκευσης των λιπόφιλων καροτενοειδών, π.χ. πρόσθετη αποθήκευση στις μεμβράνες του κυττάρου ή επιλογή κατάλληλου ξενιστή, ο οποίος να έχει την ικανότητα αποθήκευσης των υδρόφοβων ενώσεων (Ausich R.L., 1997).

Το *E. coli* και άλλα μη-καροτενογενή μικροβιακά κύτταρα έχουν περιορισμένη τροφοδοσία σε πρόδρομα ισοπρένια για τη σύνθεση των μεταβολιτών όπως τα δολιχολή και τις κινίνες που απαιτούνται στο κύτταρο σε μικρές ποσότητες. Για μεγαλύτερη παραγωγή καροτενοειδών από τα κύτταρα του *E. coli* πρέπει να αυξηθούν οι πηγές των προδρόμων ενώσεων. Οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην υπερέκφραση των διαφορετικών ενζύμων του μη μεβαλονικού μονοπατιού του ισοπρενίου στα καροτενοειδή που συνθέτουν τα κύτταρα του *E. coli* (Εικόνα 64). Η μεγαλύτερη παραγωγή καροτενοειδών επιτεύχθηκε όταν ανακαλύφθηκε το ένζυμο *idi* που συμβάλλει στον ισομερισμό του IPP σε DMAPP και βοηθά στη καλύτερη βιοσύνθεση του ισοπρενίου.

Ο Kajiwaraet και οι συνεργάτες του (1995) ανέφεραν ότι με τη βοήθεια του *idi* υπήρχε αυξημένη παραγωγή λυκοπαΐνης από 3.6 σε 4.5 mg/g DCW⁻¹, του β-καροτένιου από περίπου 1.3 σε 2.7 mg/g DCW⁻¹, τέλος ο συνδυασμός *idi* και *dxs* ή *dxr* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της παραγωγής της ζεαξανθίνης σε επίπεδο 1.6 mg/g DCW⁻¹ και 6 φορές υψηλότερη παραγωγή της ασταξανθίνης (Lee P.C. και C.Schmidt-Dannert, 2002).

Η εξισορρόπηση της έκφρασης των βιοσυνθετικών ενζύμων περιορίζει τη βιοσύνθεση του ισοπρενίου και των καροτενοειδών, ενώ ήταν αποτελεσματική στη παρεμπόδιση της αυξημένης ροής που προκαλείται από την υπερέκφραση των ενζύμων μέσω των μονοπατιών των καροτενοειδών. Η χρησιμοποίηση ενός χαμηλού

αριθμού αντιγράφων σε αντίθεση με ένα υψηλό αριθμό αντιγράφων ενός πλασμιδίου περιορίζει την έκφραση του ένζυμο DXS ενώ ενισχύει τη παραγωγή της λυκοπαΐνης από 2 σε 3 φορές. Αυτό αναδεικνύει την υπερέκφραση του DXS στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, όταν αυτό υπερβεί τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων γλυκολυτικού, πυροσταφυλικού και του G3P έχει ως αποτέλεσμα την εκπροσώπηση του μεταβολικού φορτίου για το κύτταρο.



Εικόνα 64: Η βιοσύνθεση των καροτενοειδών στο *E. coli*.

Η έκφραση των ενζύμων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως στρατηγική για να επιτευχθεί συσσώρευση των διαφορετικών αναλογιών των ενδιάμεσων προϊόντων μέσω της βιοσύνθεσης των καροτενοειδών. Η σημασία των ενδοκυτταρικών βιοσυνθετικών ενζυμικών δραστηριοτήτων για την ενδιάμεση συσσώρευση και το τελικό σχηματισμό προϊόντων παρατηρήθηκε από τις διαφορετικές συνθετικές διαδρομές κατά τη διάρκεια σχηματισμού ασταξανθίνης σε *in vitro* και *in vivo*

τεχνικές που οδηγεί στη συσσώρευση των διαφορετικών ενδιάμεσων προϊόντων (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002).

Γ.1.6.1 Η χρήση του ανασυνδυασμένου DNA για την παραγωγή καροτενοειδών

Η αύξηση της αποδοτικότητας της παραγωγής καροτενοειδών από τα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί σήμερα μόνο με δύο στρατηγικές: α) αύξηση της αποδοτικότητας της παραγωγής βιομάζας και β) αύξηση της αποδοτικότητας της σύνθεσης των καροτενοειδών. Βελτιώσεις μπορούν αναμφισβήτητα να γίνουν για να αυξήσουν την αποδοτικότητα της παραγωγής βιομάζας από επιλεγμένους ξενιστές. Η βελτίωση είναι πιθανό να είναι μόνο μικρή συγκριτικά και μη επαρκής για να μειώσει σημαντικά τις δαπάνες παραγωγής.

Η σύνθεση των καροτενοειδών ελέγχεται στα κύτταρα από το επίπεδο και τη δραστηριότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να αλλάξει το επίπεδο και τη δραστηριότητα των ενζύμων. Η εφαρμογή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει την παραγωγικότητα των καροτενοειδών και είναι το εργαλείο για να οδηγήσει πιθανότατα σε μια αυξημένη παραγωγή καροτενοειδών από τα βιολογικά συστήματα. Υπάρχουν δύο απαιτήσεις για τη χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA για την παραγωγή οποιασδήποτε ένωσης. Η πρώτη είναι η διαθεσιμότητα υποκινητών και των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα που μετέχουν στην παραγωγή μιας επιθυμητής ένωσης. Αυτό απαιτεί την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της ένωσης καθώς επίσης και των γονιδίων-υποκινητών. Η δεύτερη απαίτηση αφορά τη διαδικασία ένθεσης των γονιδίων γονίδια στον επιθυμητό ξενιστή για να εκφραστούν στις επόμενες γενιές. Ο μύκητας *Phycomyces blakesleeanus* κανονικά παράγει β-καροτένιο. Με τη βοήθεια της μικρό-έγχυσης οι ερευνητές κατάφεραν να εισάγουν ένα ξένο DNA στο γενετικό υλικό του *Phycomyces*. Σήμερα υπάρχουν πολλά συστήματα μετασχηματισμού σε πολλά βακτήρια και μύκητες, συμπεριλαμβανομένων της *Pichia*, του *Saccharomyces*, της *Erwinia uredonora*, του *E. coli* και του *Zymomonas mobilis*.

Όλα τα εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA είναι σε θέση να χρησιμοποιηθούν για να αυξήσουν τη παραγωγικότητα των καροτενοειδών. Αυτά τα εργαλεία περιλαμβάνουν τα συστήματα μετασχηματισμού για την ένθεση ξένου DNA σε ένα επιθυμητό ξενιστή, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα από το βιοσυνθετικό μονοπάτι ισοπρενίων και τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα για τη βιοσύνθεση ενός καροτενοειδούς.

Υπάρχουν διάφορα παραδείγματα της χρήσης του ανασυνδυασμένου DNA για αύξηση της παραγωγικότητας καροτενοειδών, όπως το βιοσυνθετικό μονοπάτι των καροτενοειδών που ανασυστάθηκε στο *S. cerevisiae*. Με τη βοήθεια της ζύμης έγινε δυνατό να αυξηθεί η σύνθεση του φυτοενίου που οδηγεί σε αυξανόμενα επίπεδα καροτενοειδών στα φυτά (βάση ξηρού βάρους) και το γονίδιο για τη σύνθεση φυτοενίου τις τομάτες προκαλώντας αυξημένη σύνθεση καροτενοειδών. Παραμένει το πρόβλημα εάν η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA θα επιτρέψει τελικά την ανάπτυξη ενός συστήματος για βιολογική παραγωγή των καροτενοειδών με καλύτερα αποτελέσματα από της χημικής σύνθεσης (Ausich R.L., 1997 και Lee. P.C. και C Schmidt-Dannert, 2002).

Γ.1.6.2 Επιλογή των ξενιστών

Η συνεισφορά των κυττάρων του *E. coli* στη βιοτεχνολογική παραγωγή καροτενοειδών είναι πρόσφατη. Τα επίπεδα παραγωγής δεν είναι ακόμα ανταγωνιστικά σε σύγκριση με τα επίπεδα των καροτενοειδών που παράγονται προς το παρόν από τη ζύμωση, τη σύνθεση ή την απομόνωση. Ένας από τους σημαντικότερους περιορισμούς στη παραγωγή καροτενοειδών στο *E. coli*, είναι η τροφοδοσία των προδρόμων ενώσεων ισοπρενίου και η ανεπαρκής ικανότητα αποθήκευσης για τις λιπόφιλες ενώσεις.

Διάφορα νέα είδη βακτηρίων έχουν ανακαλυφθεί πρόσφατα που παράγουν καροτενοειδή. Γίνεται προσπάθεια παραγωγής ασταξανθίνης, κανθαξανθίνης, β-καροτένιου και ζεαξανθίνης. Η παραγωγή ασταξανθίνης από τη *Phaffia sp.* έχει μελετηθεί εκτενώς. Η *Phaffia* είναι μια ζύμη που φυσικά παράγει ασταξανθίνη. Η παραγωγή ασταξανθίνης από τα κύτταρα της *Phaffia* είναι περίπου 300 ppm ανά ξηρή μάζα. Το επίπεδο της παραγωγής είναι πολύ χαμηλό για να αναπτυχθεί μια εμπορικά βιώσιμη σύνθεση. Σκοπός της έρευνας είναι η αυξημένη παραγωγή σύνθεσης της

ασταξανθίνης στη *Phaffia*. Η έρευνα απέδειξε ότι τα ψάρια ή τα όστρακα των ψαριών μπορούν ικανοποιητικά να χρησιμοποιήσουν τα διαρρυγμένα κύτταρα που περιέχουν την ασταξανθίνη. Επομένως, δεν υπάρχει καμία ανάγκη να καθαριστεί η ασταξανθίνη από τα άλλα συστατικά που υπάρχουν στα κύτταρα της ζύμης.

Η τεχνολογία έχει επίσης αναπτυχθεί για να εκμεταλλευθεί τη φυσιολογία των αλγών. Υπό κανονικές συνθήκες τα άλγη δεν μπορούν να παράγουν ασταξανθίνη. Όταν η καλλιέργεια υποβάλλεται σε κατάσταση πίεσης και λαμβάνουν τροφή από το θρεπτικό μέσο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή και τη συσσώρευση της ασταξανθίνης. Το άλγος *Haematococcus pluvialis* έχει μελετηθεί εκτενώς ως ξενιστής για τη παραγωγή ασταξανθίνης. Τα επίπεδα ασταξανθίνης μπορούν να ξεπεράσουν το 4% ανά ξηρή μάζα. Τα υψηλά επίπεδα σύνθεσης και συσσώρευσης αυτής εμφανίζονται μετά από αρκετές εβδομάδες από την ανάπτυξη της. Οι μέθοδοι για να μειώσουν το χρόνο παραγωγής ασταξανθίνης, αυτή την περίοδο βρίσκονται υπό έρευνά. Η *Phaffia* και τα κύτταρα του *Haematococcus pluvialis* έχει βρεθεί ότι είναι κατάλληλοι φορείς για τη παραγωγή ασταξανθίνης για υδατοκαλλιέργεια και δεν απαιτείται κανένας περαιτέρω καθαρισμός (Lee P.C. και C Schmidt-Dannert, 2002 και Ausich R.L., 1997).

Το φυτό *Adonis aestivalis* παράγει ασταξανθίνη στα πέταλα του. Οι ερευνητές έχουν αναπτύξει ποικιλίες του *Adonis* με αυξανόμενη ποσότητα ασταξανθίνης. Η κανθαξανθίνη είναι ένα ενδιάμεσο μόριο για τη σύνθεση της ασταξανθίνης. Η *Phaffia rhodozyma* κάτω από πιέσεις μπορεί να παράγει κανθαξανθίνη. Οι προσπάθειες ανάπτυξης για τη παραγωγή υψηλών επιπέδων καροτενοειδών εστιάζονται στον άγριο τύπο βακτηριακού κυττάρου. Ο *Corynebacterium sp.* βρέθηκε ότι παράγει κανθαξανθίνη. Προσπάθειες γίνονται επίσης για την αύξηση της βιοσυνθετικής ικανότητας καθώς επίσης και στα βελτιστοποιημένα συστήματα ζύμωσης, με σκοπό την αύξηση της παραγωγικότητας.

Δύο νέα βακτήρια, το *Altermonas sp.* και το *Flexibacter sp.* και τα πράσινα άλγη *Neosporangium mexcentricum* ανακαλύφθηκε ότι παράγουν ζεαξανθίνη. Οι εντατικές προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν με τα άλγη συνδέθηκαν με τη βελτιστοποίηση του όρου ζύμωσης και οδήγησαν στη διαδικασία για τη παραγωγή ξανθοφύλλης 0,65% (ξηρά μαζική βάση). Το *Flavobacterium multivorum* είναι γνωστό από πολλά χρόνια για τη παραγωγή ζεαξανθίνης, όμως πρόσφατα συνδέθηκε με την υψηλή παραγωγή βιομάζας σε μια ημέρα με δύο περιόδους ζύμωσης. Σε

αντίθεση με το *E. coli*, οι ζύμες εκθέτουν έναν αποδοτικό μεταβολισμό των ισοπρενίων και είναι σε θέση να παράγουν μεγάλες ποσότητες τριτερπενοειδών και εργοστερόλης στις μεμβράνες τους. Επιπλέον εξετάζονται οι ζύμες οι οποίες είναι επιθυμητές για την παραγωγή καροτενοειδών με σκοπό την παραγωγή φαρμακευτικών, θρεπτικών ουσιών και τροφών (Ausich R.L., 1997).

Αν και η μεταβολική μηχανική των ανασυνδυασμένων ζυμών για τη παραγωγή καροτενοειδών δεν έχει εξερευνηθεί ακόμα ευρέως, τα λίγα δημοσιευμένα παραδείγματα που περιλαμβάνουν τις ζύμες ως ετερόλογους ξενιστές για τη παραγωγή καροτενοειδών είναι ελπιδοφόρες. Οι μη-καροτενογενείς ζύμες *S. cerevisiae* και *Candida utilis* μπορούν να παράγουν επιτυχώς λυκοπαΐνη, β-β καροτένιο και ασταξανθίνη στο μέσο του μονοπατιού της εργοστερόλης και των καροτενογενών γονιδίων που προέρχονται από το βακτήριο *Erwinia*. Ένας άλλος εξίσου σημαντικός ξενιστής για την παραγωγή των καροτενοειδών είναι τα φωτοσυνθετικά βακτήρια. Τα φωτοσυνθετικά βακτήρια συνθέτουν ήδη σημαντικά ποσά καροτενοειδών στις ενδοκυτταρικές τους μεμβράνες τους οπότε θα μπορούσε να παρέχει μια εναλλακτική λύση για την ετερόλογη παραγωγή των καροτενοειδών (Lee P.C. και C.Schmidt-Dannert, 2002).

Στην πραγματικότητα, μερικά από τα πιο πρώιμα παραδείγματα στα μονοπάτια των καροτενοειδών πραγματοποιήθηκαν με συνδυασμό των μονοπατιών από την *Erwinia herbicola* (*crtB*, *crtI*, *crtY* και *crtZ*) και το *Rhodobacter sphaeroides*, με συνέπεια την παραγωγή καροτενογενών γονιδίων από την *Erwinia* και την παραγωγή λυκοπαΐνης, β-καροτένιου και ζεαξανθίνης από *Rhodobacter*, το οποίο παράγει χαρακτηριστικά άκυκλες ξανθοφύλλες spheroidene και το spheroidenone από τη νευροσπορίνη (Lee P.C. και C. Schmidt-Dannert, 2002).

Η μεταβολική μηχανική της ποικιλομορφίας των καροτενοειδών και η ανασυνδυασμένη παραγωγή των καροτενοειδών στους μη-καροτενογενείς μικροοργανισμούς επιτρέπει τη μεταβολική μηχανική νέων μονοπατιών για τη παραγωγή διαφορετικών δομών. Τα πολυάριθμα παραδείγματα συνδυασμού γονιδίων κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών καταδεικνύουν ότι τα *crt* γονίδια από διαφορετικές πηγές μπορούν να συνδυαστούν και να δημιουργηθούν νέα βιοσυνθετικά μονοπάτια σε διάφορους ξενιστές (**Πίνακας 13**).

Σύμφωνα με τα παραπάνω έχουν πραγματοποιηθεί ιδιαίτερες έρευνες και προσπάθειες για την παραγωγή καροτενοειδών από τους διάφορους μικροοργανισμούς. Το κόστος παραγωγής των διαφόρων συστημάτων που έχουν αναπτυχθεί είναι υψηλό από αυτό της αντίστοιχης χημικής σύνθεσης. Μέχρι σήμερα η βιολογική παραγωγή των καροτενοειδών δεν μπορεί άμεσα να ανταγωνιστεί τη χημική σύνθεση στο κόστος παραγωγής.

Γ.1.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

Η μεγάλη ομάδα των διαθέσιμων βιοσυνθετικών γονιδίων των καροτενοειδών από διαφορετικούς οργανισμούς μπορούν να συνδυαστούν λειτουργικά στα ανασυνδυασμένα μονοπάτια, ανοίγοντας το δρόμο για πολυάριθμες δυνατότητες για τη σύνθεση διαφορετικών καροτενοειδών στους ανασυνδυασμένους μικροοργανισμούς. Στη πραγματικότητα, η ανασυνδυασμένη βιοσύνθεση των καροτενοειδών αντιπροσωπεύει προς το παρόν το καλύτερο παράδειγμα για τη συνδυαστική βιοσύνθεση, η οποία περιλαμβάνει το συνδυασμό ενζύμων στα νέα μονοπάτια. Η *in vitro* εξέλιξη των ενζύμων των καροτενοειδών θα διευρύνει την ποικιλομορφία των ετερόλογων παραχθέντων δομών καροτενοειδών ακόμα περαιτέρω και επιπλέον θα επιτρέψει τη σύνθεση των καροτενοειδών που δε βρίσκονται στη φύση.

Οι πρόσφατες ανακαλύψεις στη μεταβολική μηχανική της ροής των προδρόμων ισοπρενίων μέσω μονοπατιών των καροτενοειδών στο *E. coli* για την αυξανόμενη παραγωγή καροτενοειδών, έχουν αναφέρει διάφορες δυσχέρειες και περιορισμούς βημάτων στη μικροβιακή βιοσύνθεση καροτενοειδών. Παραγωγή καροτενοειδών σε έναν μη-καροτενογενή μικροοργανισμό όπως το *E. coli* έχει διαταράξει μέχρι τώρα άγνωστα μεταβολικά μονοπάτια που θα μπορούσαν να προσδιοριστούν με τη σκιαγράφηση της έκφρασης των γονιδίων και να γίνουν έπειτα οι στόχοι της μελλοντικής μεταβολικής μηχανικής. Μια συστηματική ανάλυση ροής της βιοσύνθεσης καροτενοειδών, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού των μεμονωμένων ενζυμικών δραστηριοτήτων και των λειτουργικών επιπέδων έκφρασης, δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα. Μόνο πολύ λίγα είναι γνωστά για τη λειτουργία των βιοσυνθετικών μονοπατιών των καροτενοειδών, την αλληλεπίδραση και τον

εντοπισμό των διαφορετικών ενζύμων είτε στους φυσικούς, είτε στους ανασυνδυασμένους ξενιστές και πώς οι φυσιολογικοί ή και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν επιπτώσεις στη βιοσύνθεση καροτενοειδών. Κατά συνέπεια, η κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών που κυβερνούν τη ροή μονοπατιών των καροτενοειδών είναι το κλειδί στην επιτυχή μελλοντική μεταβολική μηχανική της μικροβιακής παραγωγής καροτενοειδών. Η περιορισμένη ικανότητα αποθήκευσης καροτενοειδών στους τρέχοντες ξενιστές παραμένει ένα σημαντικό εμπόδιο για την επίτευξη των εμπορικά σχετικών επιπέδων παραγωγής καροτενοειδών. Οι ξενιστές εκτός από το *E. coli* π.χ., ζύμες, πρέπει επομένως να εξεταστούν για τη μελλοντική εφαρμοσμένη μηχανική της μικροβιακής παραγωγής καροτενοειδών.

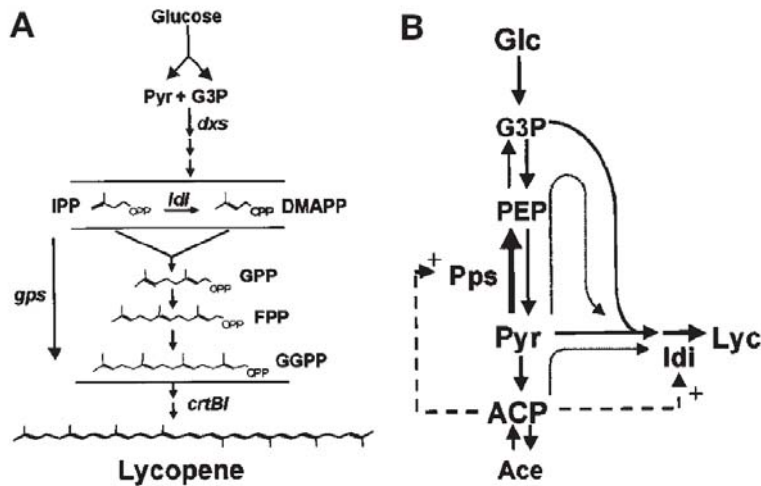
Εναλλακτικά, η μεταβολική μηχανική των καροτενοειδών που διαχωρίζει τα συστήματα στο *E. coli* πρέπει να ωθήσει τη παραγωγή καροτενοειδών σε πιο οικονομικές παραγωγές. Οι στρατηγικές που πρέπει να αναπτυχθούν για συγκεκριμένα καροτενοειδή από τους ξενιστές, συνδέονται με την παραγωγή βιομάζας με χαμηλό κόστος, λόγω της ικανότητας των ξενιστών να υποστηρίξουν υψηλής σύνθεσης καροτενοειδή. Τέλος θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και η ανάγκη καθαρισμού των καροτενοειδών από τους διάφορους ξενιστές.

Γ.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΛΥΚΟΠΑΪΝΗΣ

Η λυκοπαΐνη επιλέχτηκε ως πρότυπη ένωση λόγω των ευεργετικών αποτελεσμάτων που παρέχει στην ανθρώπινη υγεία. Η λυκοπαΐνη έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες με πιθανά οφέλη στη πρόληψη διαφόρων τύπων καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων. Κατά συνέπεια, η *in vivo* σύνθεση λυκοπαΐνης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων.

Συγκεκριμένα, στρατολόγησαν και μετέβαλλαν ένα από τα σφαιρικά ρυθμιστικά συστήματα, το Ntr, μέσα στο *E.coli*, για να ελέγξει την παραγόμενη λυκοπαΐνη μέσω του βιοσυνθετικού της μονοπατιού. Η τεχνητά παραγόμενη, υποκινημούμενη από τη γλυκολυτική ροή μέσω ενός ενδοκυτταρικού μεταβολίτη (ακέτυλο φωσφορικό άλας), ελέγχει την έκφραση δύο βασικών ενζύμων κλειδιών για τη σύνθεση της λυκοπαΐνης. Αυτός ο ενδοκυτταρικός έλεγχος ενίσχυσε σημαντικά τη παραγωγή της λυκοπαΐνης ενώ έγινε η αιτία για την ελάττωση της μεταβολικής δυσαναλογίας (**Εικόνα 65**). Η στρατηγική αυτή μπορεί να επεκταθεί και σε άλλους

τομείς όπου η έκφραση γονιδίων πρέπει να ελεγχθεί πολύ από την ενδοκυτταρική φυσιολογία, όπως η θεραπεία γονιδίων (W. R. και Liao J. C., 2000).



Εικόνα 65: Α) Ανασύσταση μονοπατιού λυκοπαΐνης με τη βοήθεια *dxs*, *idl*, *gps*, *crtBI*, Pyr, pyruvate, G3P, glyceraldehyde 3-phosphate, IPP, isopentenyl diphosphate, DMAPP, dimethylallyl, diphosphate, GPP, geranyl diphosphate, FPP, farnesyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate. (B) Στρατηγική για την εκτροπή του μεταβολικού μονοπατιού της λυκοπαΐνης με τον έλεγχο IDI και της PPS *glnAp2*.

Γ.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

Γ.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρεσβερατρόλη είναι ένας μεταβολίτης που παράγεται από τα αμπέλια (*Vitis vinifera*) κατά τη διάρκεια μυκητιακής μόλυνσης, πληγής, η ακτινοβολίας UV. Η ρεσβερατρόλη συντίθεται ιδιαίτερα στην επιδερμίδα των σταφυλιών ενώ ίχνη είναι παρόντα στη σάρκα. Το κόκκινο κρασί περιέχει υψηλή συγκέντρωση ρεσβερατρόλης σε σχέση με το άσπρο κρασί, λόγω της επαφής της επιδερμίδας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Εκτός από αντιμυκητιακή δράση, οι έρευνες απέδειξαν ότι παρέχει αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξόγones ιδιότητες με αποτέλεσμα μείωση του κινδύνου στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων και του καρκίνου προκαλώντας την παραγωγή συγκεκριμένων ενζύμων που μεταβολίζουν τις καρκινογόνες ουσίες (Linus, 2005). Ο στόχος της μεταβολικής μηχανικής είναι η δυνατότητα παραγωγής ρεσβερατρόλης μέσα σε ζύμες. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η θρεπτική αξία στα κόκκινα και λευκά κρασιά.

Γ.3.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

Η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι κατέχει ένα ιδιαίτερο ρόλο λόγω των φυσικοχημικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που παρέχει στα φυτά και στην ανθρώπινη υγεία. Δομικοί και βιοχημικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ανθεκτικότητα των φυτών στα παθογόνα. Ο ενεργός αμυντικός μηχανισμός των φυτών σε απάντηση στη μόλυνση παράγει τους δευτερογενείς μεταβολίτες γνωστοί ως φυτοαλαξίνες. Η ρεσβερατρόλη αποτελείται από στιλβένια. Τα στιλβένια συντίθενται από φυτοαλεξίνες που τους προσδίνουν αντιμυκητιακές ιδιότητες. Το κόκκινο κρασί ζυμώνεται με την επιδερμίδα των σταφυλιών. Με την αύξηση της θερμοκρασίας και την περιεκτικότητα σε αλκοόλη, οι φαινολικές ενώσεις και συμπεριλαμβανομένου και της ρεσβερατρόλης εξάγονται από το κρασί. Η ζύμωση του άσπρου κρασιού πραγματοποιείται χωρίς τη επιδερμίδα των σταφυλιών και επομένως περιέχει λιγότερες ενώσεις που περιέχουν ρεσβερατρόλη της οποίας η σύνθεση πραγματοποιείται στην επιδερμίδα των σταφυλιών. Λόγω αυτής της διαφοράς η κατανάλωση του κόκκινου κρασιού έχει συνδεθεί με το 'γαλλικό παράδοξο'. Αυτή η διατροφική 'ανωμαλία' προτείνει ότι αν και οι Γάλλοι καταναλώνουν τροφές υψηλές σε λιπαρά και σε συνδυασμό με τη χαμηλή άσκηση, είχε μια εντυπωσιακά μικρή επίπτωση στις στεφανιαίες καρδιακές παθήσεις.

Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη είναι σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη της αρτηριοσκλήρωσης. Η ρεσβερατρόλη έχει αντιοξειδωτική δράση και αναστέλλει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Η δομική ομοιότητα της ρεσβερατρόλης με το συνθετικό οιστρογόνο diethylstilbesterol, αποδεικνύει ότι ενεργεί ως φυτοοιστρογόνο. Λαμβάνοντας υπόψη τα οφέλη των οιστρογόνων για τη προστασία των καρδιαγγειακών παθήσεων, τα συμπεράσματα είναι εξαιρετικά ελκυστικά για την παραγωγή και κατανάλωση κρασιού. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα της ρεσβερατρόλης εμποδίζει τις βιοχημικές αλλαγές που περιλαμβάνουν τη δημιουργία όγκων ή τη δυνατότητα απόπτωσης (κυτταρικός θάνατος) (Becker J. V. W., 2003 και Linus, 2005).

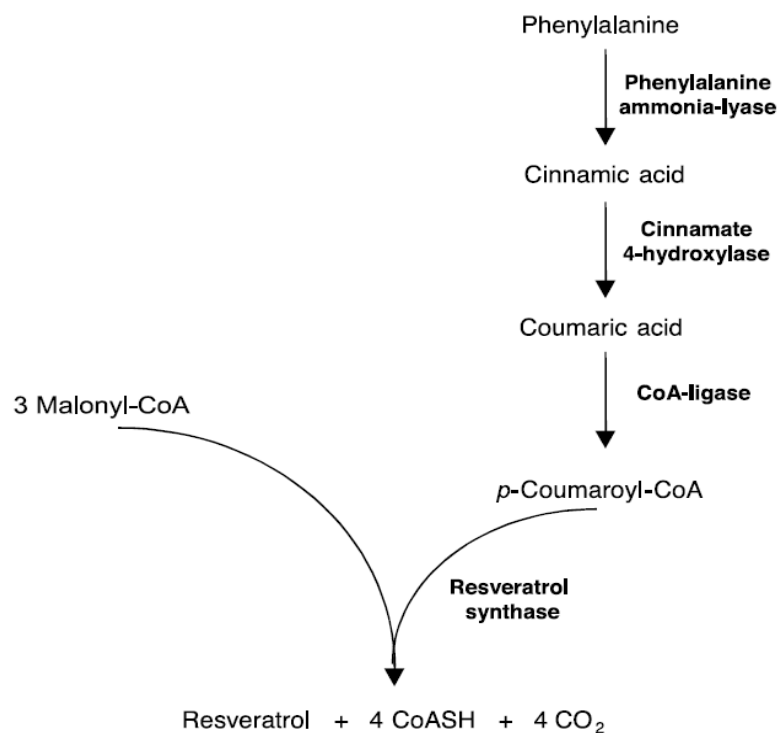
Γ.3.3 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

Το φαινυλοπροπανοειδές μονοπάτι ανασυστάθηκε στο *S. cerevisiae* για την παραγωγή p-coumaroyl-CoA, ένα από τα υποστρώματα για τη σύνθεση της ρεσβερατρόλης. Το άλλο υπόστρωμα για τη σύνθεση της ρεσβερατρόλης είναι το malonyl-CoA που βρίσκεται ήδη μέσα στη ζύμη και περιλαμβάνει τη βιοσύνθεση του λιπαρού οξέος. Η παραγωγή του p-coumaroyl-CoA και της ρεσβερατρόλης μπορεί να επιτευχθεί με έκφραση του συνενζύμου A λιγάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο (4CL216) και το γονίδιο της ρεσβερατρόλης (vst1) δημιουργώντας στο εργαστήριο ένα γονίδιο-υβρίδιο με τη βοήθεια του *S. cerevisiae*.

Αυτή η ζύμη έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει το π κουμαρικό οξύ, μια ουσία που υπάρχει ήδη στο μούστο των σταφυλιών. Η ένωση αυτή προστέθηκε στο συνθετικό μέσο και χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη εργαστηριακών καλλιιεργειών. Τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τα γονίδια 4CL216 και vst1 εξετάστηκαν για την παραγωγή της ρεσβερατρόλης. Η επεξεργασία του οργανικού μέρους με L-glucosidase για την αφαίρεση της γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη με τη ρεσβερατρόλη έχει σαν αποτέλεσμα η μετασχηματισμένη ζύμη να παράγει ρεσβερατρόλη, L-glucoside και piceid.

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι για την παραγωγή ρεσβερατρόλη παρουσιάζεται στην **εικόνα 66**. Περισσότερη ρεσβερατρόλη θα μπορούσε να ληφθεί εάν οι βέλτιστες διαδικασίες εκχύλισης είχαν διευκρινιστεί (Becker J. V. W., 2003).

Επιπλέον, ο χρόνος εκχύλισης από τα κύτταρα, καθώς επίσης και η σταθερότητα της ρεσβερατρόλης στο ξενιστή δεν είναι ακόμη γνωστή. Μια άλλη σημαντική πτυχή που είναι ακόμα υπό έρευνα είναι η διαθεσιμότητα των απαραίτητων προδρόμων ενώσεων σε επαρκή επίπεδα στο μέσο για την παραγωγή ρεσβερατρόλης. Αν και οι πρόδρομες ενώσεις εμφανίζονται στη ζύμη, χρησιμοποιούνται επίσης και στα βιοσυνθετικά μονοπάτια του λιπαρού οξέος προκαλώντας ανταγωνισμό με τις πρόδρομες ενώσεις.



Εικόνα 66: Η βιοσύνθεση της ρεσβερατρόλης από τη φαινυλαλανίνη (Schroer και Schroder, 1990).

Αρχικά πειράματα απέδειξαν ότι οι καλλιέργειες που παρέχουν όλες τις πρόδρομες ενώσεις δεν παράγουν σημαντικά ποσά ρεσβερατρόλης. Η προσθήκη του π-κουμαρικού οξέος στην πρόδρομη ένωση του συνθετικό μέσου (ζύμης) οδήγησε στη παραγωγή της ρεσβερατρόλης. Αυτή η ένωση είναι παρούσα στο μούστο του κρασιού πριν από τη ζύμωση, με συνέπεια καμία προσθήκη δεν θα ήταν απαραίτητη για να παράγει τη ρεσβερατρόλη μέσω της ζύμωσης.

Τελικά οι ερευνητές κατάφεραν με απόλυτη επιτυχία να εκφράσουν το γονίδιο της λιγάσης του συνένζυμο A (4CL216) και το γονίδιο σύνθεσης της ρεσβερατρόλης (*vst1*) μέσα στον *S. cerevisiae* με σκοπό τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής ρεσβερατρόλης στη ζύμη.

Εντούτοις η περαιτέρω έρευνα είναι ουσιαστική για να βελτιστοποιήσει τα επίπεδα παραγωγής ρεσβερατρόλης και για να εξασφαλίσει μια ζύμη που θα συνδυάζει την ασφάλεια και τη ποιότητα του κρασιού. Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κανένα εμπορικό κρασί δεν παράγεται σήμερα από γενετικά τροποποιημένη ζύμη (Becker J. V. W., 2003).

Κατά συνέπεια διάφορα εμπόδια σχετικά με την επιστημονική τεχνική, την οικονομία, το μάρκετινγκ, την ασφάλεια, τα νομικά και ηθικά ζητήματα παραμένουν

να υπερνικηθούν στο βραχυπρόθεσμο ή μακροπρόθεσμο μέλλον, πριν μια γενετικά τροποποιημένη ζύμη χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του κρασιού σε παραγωγική κλίμακα. Αυτά τα ζητήματα και προκλήσεις έχουν αναθεωρηθεί πρόσφατα εκτενώς για να επισημάνουν ότι, παρά τις αντιθέσεις που υπάρχουν για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς και προϊόντα, πάντα θα υπάρχει κίνδυνος για τους παραγωγούς κρασιού και για τον καταναλωτή εάν αγνοηθεί η βιοτεχνολογία από τη διεθνή βιομηχανία κρασιού (Becker J. V. W., 2003).

Η σωστή δημιουργία της ρεσβερατρόλης που παράγεται στη ζύμη συμμορφώνεται πλήρως με τους κανονισμούς και τη νομοθεσία της βιοασφάλειας γιατί τα οφέλη μέτριας κατανάλωσης κρασιού μπορεί να προστατεύσει από τους διάφορους τύπους καρκίνου και να προφυλάξει από τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Linus, 2005).

Γ.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ενώσεις παραγόμενες από τη φαινυλαλανίνη και μοιράζονται ένα κοινό μεταβολικό μονοπάτι με τις λιγνίνες και τα λιγνάνια. Το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών είναι η μετατροπή του προδρόμου 4-coumaroyl-CoA σε χαλκόνη από το ένζυμο συνθάσης της χαλκόνης. Το ένζυμο συνθάσης της χαλκόνης καταλύει μια σειρά ενζυμικών βημάτων για να παράγει ποικιλία μορίων που ενεργούν ως χρωστικές ουσίες, αμυντικές χημικές ουσίες (φυτοαλεξίνες) και ρυθμιστικά μόρια.

Τα φλαβονοειδή είναι ένας ελκυστικός στόχος από τη δεκαετία του '90 λόγω των διαφορετικών τροποποιήσεων που μπορούν να επιφέρουν στο χρώμα των λουλουδιών. Ένα πρόσφατο παράδειγμα είναι η συσσώρευση του dihydroflavonol 4-reductase και της ανθοκυανιδίνης στο forsythia από διαδοχικό μετασχηματισμό. Αυξάνοντας τα επίπεδα φλαβονοειδών μέσα στα φυτά μπορούν να παρέχουν σημαντικά οφέλη στην υγεία γιατί αναπτύσσουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Αυτό αποδείχθηκε στην περίπτωση της τομάτας με την έκφραση του γονιδίου της πετούνιας για το chalcone isomerase, που οδηγεί στην αύξηση κατά 80-φορές των φλαβονοειδών στην επιδερμίδα τη τομάτας και 20-φορές σε επίπεδο τοματοπολτού (Capell T. και Christou P., 2004).

Γ.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Όπως καταδεικνύεται από τα παραδείγματα που παρέχονται παραπάνω, η μεταβολική μηχανική και οι ανασυνδυασμένοι μεταβολίτες που παράγουν στους οργανισμούς είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη βελτίωση της παραγωγής, που κατευθύνουν τη σύνθεση των επιθυμητών προϊόντων και παραγωγή νέων ενώσεων.

Ποικίλες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για να παράγουν νέες ενώσεις στα μικροβιακά κύτταρα. Μια τεράστια πηγή πληροφοριών από τη γονιδιωματική ερευνά βοηθάει στην αποκάλυψη νέων βιοσυνθετικών μονοπατιών και γονιδίων. Αν και οι περισσότερες νέες δομές ανήκουν στα αντιβιοτικά πολυκετίδια και καροτενοειδή, οι δευτερογενείς μεταβολίτες (π.χ. τερπενοειδή και αλκαλοειδή) αρχίζουν να αναδύονται. Η συλλογή των διαθέσιμων ενζύμων διευκολύνει την αναζήτηση κατάλληλων ενζύμων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη κατασκευή νέων μεταβολικών μονοπατιών. Η μεταβολική μηχανική έχει σαν στόχο τη βελτίωση και δημιουργία νέων μονοπατιών. Πολλές νέες ενώσεις μπορούν να δημιουργηθούν από τη κατασκευή γενομικής βιβλιοθήκης.

Τα περισσότερα από τα παραδείγματα που περιγράφονται παραπάνω αναφέρονται ιδιαίτερα στο *E.coli* λόγω της διαθεσιμότητας κατάλληλων γενετικά εργαλείων που παρέχουν. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εντούτοις παρέχεται στα αρχικά στάδια της μεταβολικής μηχανικής από τη δευτερογενή παραγωγή μεταβολίτη. Η μεταβολική μηχανική θα συνεχίσει να τροποποιεί πολλαπλά γονίδια και ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις για να επιτύχει σημαντικές μετατοπίσεις στη φυσιολογία και παραγωγή νέων μορίων. Η γνώση και η εκμετάλλευση της έκφρασης των γονιδίων και της ρύθμισής των ενζύμων μπορεί να αποδειχθεί η πιο χρήσιμη μεταβολική και συνδυαστική προσέγγιση της μεταβολικής μηχανικής. Σε συνδυασμό με πρόσθετες τεχνικές για τη μεταβολική τροποποίηση μονοπατιών, όπως η κατευθυνόμενη εξέλιξη, οι στόχοι βελτίωσης για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολίτων και η παραγωγή νέων προϊόντων μπορεί να επιτευχθεί σχετικά γρήγορα.

Συνεχείς προσπάθειες εφευρίσκουν νέες μεθόδους για τη “**πράσινη οικονομία**”. Ο όρος πράσινη οικονομία περιλαμβάνει όλες τις προσπάθειες που γίνονται για την καλύτερη προστασία του περιβάλλοντος αξιοποιώντας τις φυσικές πηγές. Για παράδειγμα, σαν πηγή ενέργειας χρησιμοποιείται το υδρογόνο, με το οποίο μπορούν να αναπτύχθούν φιλικές προς το περιβάλλον βιοχημικές διαδικασίες με

στόχο να υποβαθμίσουμε τα επιβλαβή απόβλητα. Σαν λύση για τα παραπάνω είναι η χρησιμοποίηση των βακτηρίων ως χημικοί βιοαντιδραστήρες. Τα βακτήρια που επιλέχτηκαν, για τους λόγους ότι υπάρχουν στο περιβάλλον, αναπαράγονται εύκολα, είναι σχετικά μικρά και απλά και είναι ανανεώσιμη πηγή. Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή φυσικών προϊόντων (βιταμίνες, αμινοξέα, χρωστικές ουσίες κ.α.), για τη παραγωγή καυσίμων (υδρογόνο, μεθάνιο, αιθανόλη), για τη δημιουργία πλαστικών και το σημαντικότερο απ'όλα την παραγωγή φαρμάκων. Η ανάπτυξη φαρμάκων από τα βακτήρια εισάγει μια νέα εποχή. Μαθηματικά πρότυπα και αναλύσεις ευαισθησίας από τα μεταβολικά συστήματα και τη σύνδεσή τους στη φυσιολογία θα καθοδηγήσει το προσδιορισμό φαρμάκων, με σκοπό τη θεραπεία και τη μείωση των παρενεργειών.

Εκτός από την οικονομία η μεταβολική μηχανική καινοτομεί και στην ιατρική. Βοηθάει στη γρήγορη κατανόηση του φαινοτύπου μέσω των γονιδίων, μπορούν να κατασκευαστούν γενομικές βιβλιοθήκες και να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του κυττάρου με το περιβάλλον. Το γονιδίωμα, το μεταγραφώσωμα και το πρωτέωμα είναι τα σημαντικότερα και ισχυρότερα στοιχεία και εργαλεία της βιοπληροφορικής. Οι απαντήσεις για τη σύνδεση των γονιδίων με το φαινότυπο λαμβάνονται μέσα από τη βιοπληροφορική. Η βιοπληροφορική συνδυάζει τη τεχνολογία με την επιστήμη. Επιπλέον υπάρχουν μελέτες σε ερευνητικό επίπεδο ακόμα για τη πρόληψη και θεραπεία διαφόρων τύπου καρκίνου.

Με τη βοήθεια της βιομηχανίας και της μεταβολικής μηχανικής μπορούν να αναπτυχθούν νέοι οργανισμοί οι οποίοι θα περιέχουν υψηλά επίπεδα φυτοχημικών για καλύτερη ποιότητα ζωής και προστασία του περιβάλλοντος. Σαν τελική σκέψη που μπορούμε να κάνουμε είναι να χρησιμοποιήσουμε τη δύναμη της φύσης για να ωφεληθεί η ανθρωπότητα και να διατηρηθεί το περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Καράταλης Σ., 1994. **Φυσιολογία φυτών**. Κεφάλαιο 10, σελ:365-414.
- Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ., 2003. **Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον**. Κεφάλαιο 10, σελ:333-354.
- Ausich R. L., 1997. **Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology**. Pure & Applied Chemistry 69, 10:2169-2173.
- Bailey, J. E., 1991. **Toward a science of metabolic engineering**. Science, 252: 1668-1675.
- Becker J. V.W, Armstrong G. O., Merwe M. J., Lambrechts M. G., Vivier M. A., Pretorius I.S., 2003. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol**. FEMS Yeast Research, 4 :79-85.
- Boer A. L. and Schmidt-Danner C., 2003. **Recent efforts in engineering microbial cells to produce new chemical compounds**. Current Opinion in Chemical Biology, 7:273–278.
- Bone R.A. et al., 2003. **Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans**. Journal of Nutrition, 133: 992-998.
- Britton G.,1998. **Carotenoids: biosynthesis and metabolism**. Birkhäuser Basel, 13–47.
- Business Communications Company RGA-110, 2000.**The Global market for carotenoids**. Business Communications Company, Norwalk, Conn.
- Capell T. and Christou P., 2004. **Progress in plant metabolic engineering** Current Opinion in Biotechnology, 15:148–154.
- Dekker M., 2004. **Phytochemicals in health and disease**. Free Radical Biology & Medicine 37, 12:2082.
- Farmer W. R. and Liao J. C., 2000. **Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control**. Nature Biotechnology, 18: 533-537.
- Gale C.R. et al.,2003. **Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration**. Invest Ophthalmol Vis, Sci 44: 2461-2465.
- Grusak M. A., 2002. **Phytochemicals in plants: genomics-assisted plant improvement for nutritional and health benefits**. Current Opinion in Biotechnology, 13:508–511.

- Hankinson S.E., Stampfer M.J., Seddon J.M., et al.,1992. **Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study.** 335–339.
- Hopwood, D. A., Malpartida, F., Kieser H. M., Ikeda H., Duncan J., Fuji I., Rudd B. A., Floss H. G. and Omura S.,1985. **Production of hybrid antibiotics by genetic engineering.** *Nature*, 314:642-644.
- Kristal A.R., Cohen J.H., 2000. **Invited commentary: tomatoes, lycopene, and prostate cancer. How strong is the evidence?** *Am J Epidemiol*; 151:124-127
- Lee P.C. and Schmidt-Dannert C., 2002. **Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms** *Apply Microbiological Biotechnology*, 60:1–11
- Lee-Sang Yup.,1999. **Metabolic Engineering .** *Biotechnology & Bioengineering*, 53:132-137.
- Lessard P.,1996. **Metabolic engineering, the concept coalesces.** *Nature Biotechnology*, 14: 1654-1655.
- Mozaffarieh M. et al., 2003. **The role of carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: a review based on controversial evidence.** *Nutritional Journal*, 2:20.
- Norrish A.E., Jackson R.T., Sharpe S.J., Skeaff C.M.,2000. **Prostate cancer and dietary carotenoids.** *Am J Epidemiol*, 151:119–123
- Oleszek W., 2002. **Dietary phytochemicals and human health.** *Phytochemistry Reviews*, 1: 163–166.
- Roodenburg A.J., Leenen R., Hof K.H., et al.,2000. **Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans.** *Am J Clinical Nutritional*, 71:1187–1193.
- Seddon J.M., Ajani U.A., Sperduto R.D., et al.,1994. **Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration.** *JAMA*, 272:1413–1420.
- Stephanopoulos G., 1999. **Metabolic fluxes and metabolic engineering.** *Metabolic Engineering* , 1 1-11.
- Stephanopoulos G. and Vallino J.J., 1991. **Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction.** *Science*, 252:1675-1681.
- Strohl W. R., 2001. **Biochemical Engineering of Natural Product Biosynthesis Pathways.** *Metabolic Engineering*, 3:4-14
- Martin V. J.J., Pitera D. J., Withers S.T., Newman J. D. and Keasling J. D., 2003. **Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids.** *Nature Biotechnology* 21, 7:796-802

Vershinin A., 1999. **Biological functions of carotenoids—diversity and evolution.**
Biofactors, 10:99–104

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals>.

<http://www.benbest.com/nucraceutical/phytochemicals>.