

Sintezna biologija za proizvodnjo biobutanola

Marina Klemenčič¹, Ilja Gasan Osojnik Črnivec^{2,3}, Albin Pintar², Marko Dolinar^{1#}

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za biokemijo, Večna pot 113, 1000 Ljubljana

² Kemijski inštitut, Laboratorij za okoljske vede in inženirstvo, Hajdrihova 19, 1001 Ljubljana

³ novi naslov: Kmetijski inštitut, Oddelek za živinorejo, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana

avtor, odgovoren za korespondenco: marko.dolinar@fkkt.uni-lj.si

Sintezna biologija

Sintezna biologija je znanstvena in inženirska panoga, ki temelji na razumevanju molekularnih procesov v celicah in ima za cilj pripravo celic, ki bi opravljale za človeka koristne naloge. Prav to, da z inženirskimi pristopi želimo spremeniti biokemijske procese v celicah, je posebnost sintezne biologije in jo do neke mere razlikuje od molekularne biotehnologije, čeprav je meja med obema precej zabrisana.

V zadnjih desetih letih je sintezna biologija doživela izjemno hiter razmah, kar je delno mogoče pripisati tudi tekmovanju študentskih ekip, ki nosi oznako iGEM (angl. International Genetically Engineered Machine). Študentje ameriške univerze MIT (Massachusetts Institute of Technology) so prvi poletni projekt s področja sintezne biologije izvedli leta 2003, tekmovanje pa se je začelo leta 2004, ko so na njem sodelovali študentje petih severnoameriških univerz. Naslednje leto sta bili med 13 ekipami že dve evropski, leta 2006 pa so prvič tekmovali tudi slovenski študentje, ki so v konkurenci 37 univerzitetnih ekip dosegli izjemen uspeh z osvojitvijo prvega mesta. Tudi v naslednjih letih so bili študentje iz Slovenije, ki so praviloma raziskovalno delo opravljali na Kemijskem inštitutu, zelo uspešni. Zanimanje za sintezno biologijo je raslo tudi na srednjih šolah in tako so leta 2011 zanje pripravili ločeno tekmovanje s samo petimi ekipami, nato pa je njihovo število do leta 2014 naraslo na 51. Leta 2015 so se organizatorji odločili, da tekmovanje dijaških ekip združijo s študentskim tekmovanjem, le da se bodo dijaki pomerili med sabo v posebni kategoriji. Skupaj se je na tekmovanje prijavilo 280 ekip, na srečanje, ki je potekalo v Bostonu, pa jih je prišlo 259, od tega je bila večina azijskih (95), sledile so severnoameriške (77) in evropske (67).

Tekmovanja iGEM ostajajo najpomembnejši študentski dogodek na področju sintezne biologije. Vsi konstrukti na ravni DNA, ki jih študentje pripravijo, obogatijo Register bioloških delov, zbirko DNA, ki je nato na voljo vsem naslednjim ekipam, pa tudi ostalim raziskovalcem, ki lahko te biološke dele uporabijo za nove, izpopolnjene biološke naprave in sisteme. Študentje svoje delo predstavijo na spletu v obliki wiki strani, s predavanjem in postrom, kar vse ocenjuje skupina recenzentov. Za to, da ekipa doseže eno od medalj, je treba izpolniti kar dolg seznam vnaprej določenih nalog, na tekmovanju pa predstavlja velik uspeh že nominacija med pet najboljših, od katerih potem ena ekipa postane zmagovalka v svoji kategoriji.

Prva slovenska dijaška ekipa na tekmovanju iGEM

Na tekmovanju iGEM 2015 smo se odločili sodelovati s srednješolsko raziskovalno skupino, saj se dijaki iz Slovenije tega najpomembnejšega mednarodnega tekmovanja iz sintezne biologije do tedaj še niso udeležili. K temu nas je spodbudilo tudi spoznanje, da slovenski dijaki na domačih in mednarodnih tekmovanjih s področja naravoslovja, kjer dosegajo odlične uspehe, pretežno nastopajo bodisi

samostojno bodisi le v manjših skupinah. K sodelovanju smo povabili kandidate iz gimnazij, na katerih imajo dolgoletno tradicijo izvajanja raziskovalnega dela na področju naravoslovja in tehnike. Povabilu se je kljub počitniškemu obdobju odzvalo kar 28 kandidatov, s katerimi smo julija 2014 opravili intervjuje, dijaki pa so morali pripraviti tudi idejne predloge, kako bi se spopadli z danim raziskovalnim problemom. Zavedali smo se dejstva, da je uravnotežena sestava skupine in visoko izražena sposobnost ter pripravljenost članov za timsko delo ključnega pomena za njen uspeh na tekmovanju, zato so pri izboru osmih dijakov poleg mentorjev imele besedo tudi sodelavke iz pisarne za raziskovalno in projektno sodelovanje na Kemijskem inštitutu, sicer strokovnjakinje s sociološkega in družboslovnega področja. K izboru dijakov smo povabili tudi organizacijskega psihologa, ki je ugotavljal delovne stile kandidatov in njihovo primernost za skupinsko delo. V ekipo (slika 1) smo večinoma vključili dijake tretjih letnikov, tako da so bili med izvajanjem obsežnega raziskovalnega dela neobremenjeni z maturitetnimi obveznostmi. Raziskovalno skupino so tako sestavljali dijaki Aleš Zupančič in Domen Kulovec (Gimnazija Novo mesto), Nina Jerala (Škofijska klasična gimnazija Ljubljana), Zala Sekne (Gimnazija Kranj), Anže Vozelj (Gimnazija Trbovlje), Mariša Cvitanič (Gimnazija Bežigrad), Ana Milovanović (Prva gimnazija Celje) in Jernej Šavli (Gimnazija Jurija Vege Idrija).



Slika 1: Srednješolska raziskovalna skupina in njihovi mentorji (od leve proti desni): Domen Kulovec, Aleš Zupančič, dr. Ilja Gasan Osojnik Črnivec (mentor), prof. dr. Marko Dolinar (mentor), dr. Marina Klemenčič (mentorica), prof. dr. Albin Pintar (mentor), Jernej Šavli, Anže Vozelj, Mariša Cvitanič, Nina Jerala, Zala Sekne, Ana Milovanović.

Tema raziskovalnega projekta

Ker smo pri mentorskem delu sodelovali raziskovalci in pedagogi iz dveh raziskovalnih skupin, ki se ukvarjata tudi z alternativnimi gorivi (na inštitutu s pretvorbo komunalnih odpadkov v vodik, na fakulteti pa sodelujemo v evropskem projektu na temo biovodka iz sintezniobiološko spremenjenih cianobakterij), smo se odločili, da bo tematika dijaške ekipe prav s področja biogoriv. Ugotoviti je bilo treba, kje so realne potrebe po novih rešitvah in kje so možnosti, ki bi jih lahko ekipa zelo nadarjenih dijakov tudi v resnici izvedla v praksi. Ugotovili smo, da je eno od nerešenih vprašanj pri obstoječih postopkih anaerobne pretvorbe biomase v etanol ostanek kislin, ki so stranski produkti in predstavljajo

pri proizvodnji večjih količin biogoriv znaten neizrabljen vir. Če bi C-4 kisline uspeli pretvoriti v C-4 alkohole, bi s tem pridobili gorivo, ki je po svojih fizikalnokemijskih lastnostih še boljše od etanola in bi ga bilo brez težav mogoče mešati z bencinom, lahko bi ga uporabili kot samostojno gorivo, lahko pa tudi kot topilo. Takšne pretvorbe kislin v alkohole večina organizmov ne potrebuje, zato niso razvili encimov, ki bi katalizirali redukcijske reakcije tega tipa. Med znanimi organizmi, ki so sposobni tovrstnih pretvorb, so nekatere vrste anaerobnih bakterij klostridijev, na primer *Clostridium acetobutylicum*.

Naloga dijakov bi bila, da bi iz bakterij pridobili gene za encime, ki omogočajo pretvorbo butanojske kisline do butanola. Nato bi tem genom dodali zaporedja, ki bi omogočila intenzivno sintezo encimskih molekul. Konstrukte bi sestavili v bakterijah *Escherichia coli*, ki so za delo v laboratoriju najbolj varne in omogočajo rast tako v aerobnih kot v anaerobnih pogojih. Hkrati bi bilo treba ugotoviti, ali so substratne molekule toksične za bakterije in ali ni mogoče toksičen končni produkt. Razviti je bilo treba sistem za gojenje celic ter ugotoviti, kateri vir ogljika je potrebno dodajati, da celice čim bolj neovirano rastejo.

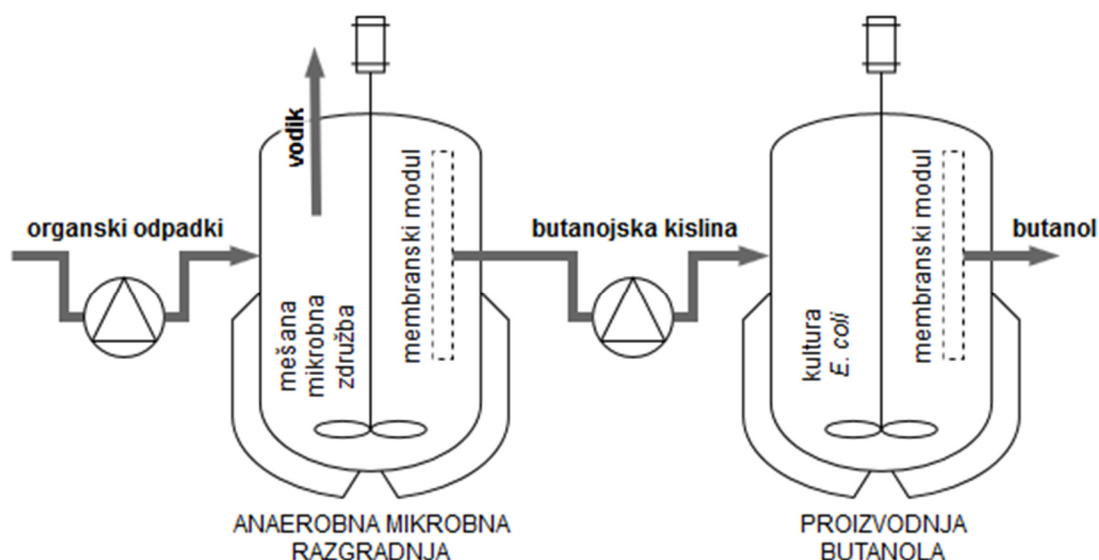
Konstrukte bi sestavili v bakterijah *Escherichia coli*, ki so za delo v laboratoriju najbolj varne in omogočajo rast tako v aerobnih kot v anaerobnih pogojih. Hkrati bi bilo treba ugotoviti, ali so substratne molekule toksične za bakterije in ali ni mogoče toksičen končni produkt. Razviti je bilo treba sistem za gojenje celic ter ugotoviti, kateri vir ogljika je potrebno dodajati, da celice čim bolj neovirano rastejo.

Ker je bilo vnaprej jasno, da je narava dela z DNA v sinteznobiološkem laboratoriju precej drugačna od dela v biotehnoškem laboratoriju, so se dijaki razdelili v dve skupini. Sinteznobiološka, ki so jo sestavljali štiri dijaki, je delo opravljala na Katedri za biokemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, enako velika biotehnoška skupina pa v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu. Najprej smo dijake uvedli v laboratorijsko varnost, posebnosti dela z gensko spremenjenimi organizmi in s pristopi, ki so značilni za sintezno biologijo, saj tega v srednji šoli ne obravnavajo. Nato so začeli z eksperimentalnim delom v skupini, za katero so se vnaprej odločili.

Pristopi k reševanju problema

Ideja, da bi butanojsko kislino lahko pretvarjali v ekonomsko zanimiv butanol, je prišla iz opažanj, da med anaerobnimi procesi pretvorbe odpadnih snovi do vodika nastaja znatna količina stranskih produktov, med njimi tudi veliko butanojske kisline, ki bi jo z uporabo ustreznih mikroorganizmov lahko pretvorili v butanol.

Celoten proces pretvorbe odpadne biomase do butanola smo zasnovali kot dvostopenjski proces (slika 2). Prva stopnja pretvorbe temelji na anaerobni razgradnji lahko razgradljivih organskih odpadkov z mešano anaerobno mikrobno združbo. Glavni produkti prve stopnje so: (i) vodik, ki ga lahko uporabimo kot energent ali sintezno surovino, (ii) in organske kisline, med katerimi prevladuje butanojska kislina. V drugi stopnji butanojsko kislino uvajamo v gojišče z modificirano bakterijo *E. coli*, ki proizvaja butanol. V zasnovi procesa smo na iztok obeh procesov vključili membranske module za ločevanje mikrobne biomase in kapljevine. Membranski moduli med prvo in drugo stopnjo preprečujejo okužbo kulture *E. coli* z mešano anaerobno mikrobno združbo, membranski moduli na izhodu druge stopnje pa preprečujejo nenadzorovan izpust modificiranih mikroorganizmov in tako zagotavljajo večjo varnost procesa.

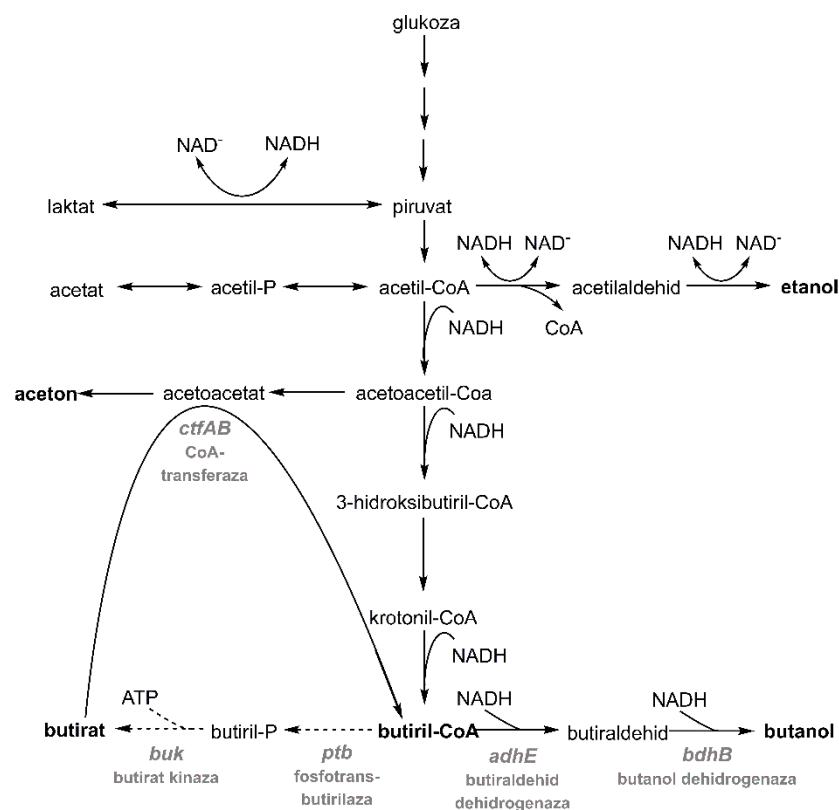


Slika 2: Shematska prikaz dvostopenjskega procesa pretvorbe organskih odpadkov v biobutanol.

V splošnem je sinteza butanola pri nekaterih anaerobnih bakterijah, kakršna je *Clostridium acetobutylicum*, del metabolne poti ABE, pri kateri se sladkorji preko piruvata pretvorijo v aceton, butanol in etanol, kot prikazuje slika 3. Delež posameznega produkta je odvisen od več dejavnikov, ki otežujejo nadzor nad količino nastalega butanola. Prav tako je uporaba bakterij vrste *Clostridium acetobutylicum* zaradi svoje kompleksne in počasne rasti problematična za uporabo v industrijske namene. Zaradi teh razlogov so se razvile ideje, da bi metabolne poti, ki omogočajo nastanek butanola, iz klostridija prenesli v biotehnoško bolj obvladljiv in dobro poznan bakterijski sev, kot so na primer sevi bakterije *Escherichia coli* (v našem delu smo uporabili nepatogeni sev DH5 α).

V študentskih sekcijah tekmovanja iGEM je bilo v preteklih letih že več skupin, ki so poskušale pripraviti genske konstrukte (Alberta 2007, Rutgers 2012), ki bi omogočali prenos zgoraj omenjene metabolne poti v *E. coli*, a so bile dokaj neuspešne, saj niso pripravili in v register bioloških delov posredovali nobenega funkcionalnega konstrukta. Vse skupine so se odločile za pripravo celotne sintezne poti butanola, torej od piruvata do butanola. Za razliko od teh skupin smo imeli na voljo razmeroma kvaliteten vir butanojske kisline (t.j. produkt terciarnih reakcij anaerobnega metabolizma organskih odpadkov). Zato so nas v predstavljeni reakcijski shemi zanimale končne stopnje, ki vodijo do butanola iz bolj oksidiranih spojin.

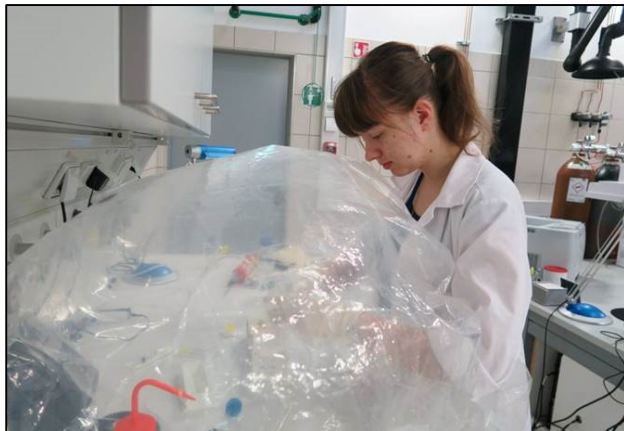
V biotehnoškem laboratoriju smo najprej želeli preveriti, do kakšne mere lahko s spreminjanjem obratovalnih pogojev anaerobne razgradnje sočasno: (i) povečamo koncentracijo butanojske kisline in (ii) povečamo selektivnost procesa za butanojsko kislino (minimiranje množin ostalih organskih kislin v brozgi, npr. etanojske in metanojske kisline). Predvidevali smo, da nam bo višja koncentracija vhodnega substrata omogočila višji donos končnega produkta, odsotnost drugih organskih kislin pa selektivno produkcijo butanola po metabolni poti ABE. S tako določenim razponom koncentracij vhodnega produkta smo nato predvideli optimizacijo medija. Ker je pretvorba butanojske kisline v butanol energetsko potraten proces, smo kot ko-substrat v gojišču predvideli še glicerol, ki ima v anaerobnih pogojih vlogo prenašalca elektronov. Glicerol smo izbrali, ker je cenovno razmeroma ugoden in dobro dostopen na tržišču kot stranski produkt proizvodnje biodizla. Ker smo želeli zagotoviti, da koncentracija končnega produkta ne omejuje ne donosa procesa ne pretvorbe substrata, smo v zadnji fazi preskusov v biotehnoškem laboratoriju želeli določiti možne inhibitorne učinke samega butanola na bakterijo *E. coli*.



Slika 3: Shema metabolne poti ABE bakterije *Clostridium acetobutylicum*. (povzeto po Lee in sod., Biotechnol. Bioeng. 2008;101: 209–228)

Sinteza butanola poteka preko butirilkoencima A (slika 3). Ta iz butirata lahko nastane ali preko fosforilirane oblike butirata (butiril-P), za kar sta potrebna encima butirat kinaza (Buk) in fosfotransbutirilaza (Ptb), ali pa enostopenjsko z encimom koencim A-transferazo (CtfAB). Glede na to, da je pot preko vmesnega intermediata butiril-P že dobro opisana, smo se odločili, da bomo za prvi del pretvorbe poskušali pripraviti encim CtfAB, ki ga sestavljata dve polipeptidni verigi. Iz butirilkoencima A sledi najprej redukcija do butiraldehida, ki pa se v naslednji stopnji reducira do alkohola, butanola. To, zadnjo, stopnjo reakcije lahko opravlja več različnih dehidrogenaz. Izbrali smo encim butanol dehidrogenazo (BdhB), ki poleg redukcije aldehida v alkohol katalizira tudi pretvorbo butirilkoencima A v butiraldehid.

Naš končni cilj je bil pripraviti posamezne zapise za encime v vektorju pSB1C3, ki omogoča izražanje genov v *E. coli*. Te zapise smo želeli vstaviti v vektor z močnim promotorjem in močnim vezavnim mestom za ribosom (RBS) pred zapisom za encim, ter terminatorjem za zapisom za encim. Najprej smo želeli pripraviti vektorje z zapisi za vsakega od encimov posebej. To bi nam omogočilo kontrolo nad ravni izražanja in boljše možnosti za morebitno kasnejšo optimizacijo. Na koncu bi posamezne konstrukte sestavili v en vektor, ki bi omogočal hkratno izražanje vseh treh genov (*ctfA*, *ctfB* in *bdhB*), sintetizirani encimi pa bi katalizirali pretvorbo butirata v butanol preko butirilkoencima A.



Slika 4: Dijaki pri delu v preprosti anaerobni komori (levo) in pri pripravi reakcijske mešanice za PCR (desno).

Doseženi eksperimentalni rezultati

Usmerjeno proizvodnjo butanojske kisline smo preučevali s pomočjo anaerobne mikrobne združbe, ki smo jo odvzeli iz bioreaktorjev za anaerobno stabilizacijo odvečnega aktivnega blata, ki obratujejo v sklopu komunalne čistilne naprave. Združbo smo stabilizirali (pri 4 °C do uporabe) in termostatirali (pri 37 °C, pribl. 2 dni), nato pa smo jo uporabili za inokulacijo 15-kanalnega računalniško nadzorovanega bioreaktorskega sistema ($T_i = 37\text{ °C}$, $pH_i = 5,5\text{--}7,0$, $v_m = 200\text{ rpm}$, $cs = 1\text{--}10\text{ g OS/L}$). Sistem (BioProcess Controll, model AMPTS II) je sklopljen s (i) plinskim kromatografom (Agilent Technologies, model 490 Micro GC) za samodejno sprotno identifikacijo nastalih plinastih komponent in (ii) plovno celico za sprotno evidentiranje nastale količine plina ter omogoča vzorčenje kapljevinate faze med obratovanjem šaržnih bioreaktorjev ($V_o = 350\text{ mL}$). Raztopljene spojine (mono in disaharidi kot modelni substrati, metanojska, etanojska, butanojska, butandiojska, cis-butendiojska, 2-hidroksipropanojska kislina in glicerol) smo analizirali s tekočinsko kromatografijo (naprava Agilent Technologies, model Infinity 1260). Butanol (butan-1-ol, butan-2-ol, izobutanol in terc-butanol) in aceton smo analizirali s plinskim kromatografom (Agilent Technologies, model 7890A).

Pri delu z bioreaktorji smo uporabljali rutinske postopke, ki zagotavljajo vzdrževanje anaerobnih pogojev (slika 4, levo). S spreminjanjem koncentracije modelnega substrata in pH vrednosti smo izmerili 0,5–3 g/L butanojske kisline v reaktorski vsebini in nizke koncentracije ostalih kislin (koncentracije očetne in mlečne kisline smo znatno zmanjšali s podaljšanjem obratovalnega časa na > 24 h).

Na podlagi najvišje dosežene koncentracije butanojske kisline smo nato opravili temeljit pregled možnih sestav gojišč in rastnih pogojev (koncentracija kisika in pH vrednost). V anaerobnih in aerobnih pogojih smo preučili rast *E. coli* na 72 različnih gojiščih (za množično gojenje smo uporabili plošče s 24, 96 in 384 vdolbinicami, za spremljanje rasti bakterij pa spektrofotometer BIO – TEK Power Wave XS). Vzporedno smo ves čas eksperimenta gojili izvirno kulturo na standardnem gojišču LB. Sestava gojišč je večinoma temeljila na modificiranem gojišču LB oziroma modificiranem gojišču ENZO; gojišča so tako vsebovala bodisi laktozo bodisi butanojsko kislino in glicerol (vir C) ter vsa še mesni pepton (vir N in esencialnih hranil), kalijev hidrogenfosfat (za uravnavanje pH vrednosti) in natrijev sulfat (za

zagotavljanje selektivnosti gojišča). Tako smo potrdili aplikativnost procesa, saj rezultati kažejo, da *E. coli* v ustreznem pH območju (7,0–8,0) uspeva pri dovolj visokih začetnih koncentracijah butanojske kisline. Optimalne rastne pogoje smo tako določili pri 1 g/L butanojske kisline, molskem razmerju butanojske kisline in glicerola 1:1 in pH vrednosti gojišča 8,0.

Inhibicijo z butanolom smo preučili z gojenjem *E. coli* v standardnem gojišču LB, ki smo mu dodali različne množine butan-1-ola, butanojske kisline in glicerola. Na enak način smo preverili učinke izobutanola in acetona, ki sta prav tako lahko pričakovana produkta preučevane modificiranega metabolizma. 50 % inhibicijo rasti smo izmerili pri 19,8 g/L acetona, 2,6 g/L butan-1-ola in 1,1 g/L izobutanola. Pri 100 % pretvorbi butanojske kisline v začetni koncentraciji 1 g/L lahko tako pričakujemo 14 % inhibicijo procesa. Glede na to, da je v proizvodnem procesu pretvorba navadno nekoliko nižja, lahko zaključimo, da v identificiranem obsegu procesnih pogojev sam produkt podobno vpliva na učinkovitost procesa kot pri komercialnih postopkih proizvodnje etanola.

V sinteznobiološkem delu naloge smo prvotno želeli genske zapise za iskane encime pridobiti kar iz anaerobne mikrobne brozge (iz procesa pridobivanja butanojske kisline) z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR; študentje pri pripravi reakcijskih mešanic na sliki 4 desno), saj je dobro znano, da je brozga vsebuje mešano združbo mikroorganizmov, ki omogočajo pretvorbo. Vendar pa so v brozgi številne različne bakterije, med katerimi večina nima genov za ključne encime za sintezo butanola. Iz literature je znan sev bakterije *Clostridium acetobutylicum* (sev ATCC 842), ki ima ustrezne gene, za ostale bakterije v anaerobnih brozgah pa podatki še niso na voljo. Poleg bakterij brozga vsebuje tudi mnogo drugih anorganskih in organskih nečistoč, ki so najverjetneje povzročile, da pomnoževanje odsekov DNA z metodo PCR ni bilo uspešno. Zato smo se odločili, da pri podjetju IDT iz Združenih držav Amerike naročimo že sintetizirane gene. Za lažje nadaljnje delo smo konstrukte zasnovali tako, da smo zapisom za encime dodali zaporedja nukleotidov, ki jih prepoznajo tisti restrikcijski encimi, ki jih praviloma uporabljamo v sintezni biologiji. Poleg tega smo na za zapis za encim pred kodonom STOP dodali še zapis za šest zaporednih histidinov (oznaka His), ki omogoča detekcijo izraženih genov s protitelesi proti oznaki His₆.

Najprej smo zapise prenesli v sinteznobiološki vektor pSB1C3, to je tisti vektor, v katerem smo morali poslati vse genske konstrukte za letošnje tekmovanje v Register bioloških delov, ki hrani vse konstrukte z dosedanjih tekmovanj v nekakšni zbirki genov. Za izražanje genov pa je bilo pred kodirajoča zaporedja potrebno dodati še promotorsko regijo in vezavno mesto za ribosom, ki omogočata prepisovanje in prevajanje zapisa v proteine. V ta namen smo iz kompleta konstruktov, ki ga za vsakoletno tekmovanje razpošlje organizator izbrali konstrukt, ki vsebuje močan promotor in močno zaporedje za vezavo ribosoma (RBS). Z vstavitvijo te regulatorne regije pred zapis za vsak posamezen encim smo torej ustvarili tri konstrukte, ki omogočajo močno izražanje vsakega od treh genov. Standardi sintezne biologije narekujejo tudi prisotnost terminatorske regije za kodirajočim zaporedjem za protein. Zato smo zapise za encime z dodano regulatorno regijo prenesli v vektorje z dvojnimi terminatorskimi regijami (tak vektor je bil prav tako prisoten v kompletu konstruktov, ki ga je dobila vsaka od sodelujočih ekip). Vseh devet sestavljenih konstruktov smo v fizični obliki poslali organizatorjem, podatki o njihovih zaporedjih in lastnostih pa so dostopne na spletni strani http://parts.igem.org/Main_Page, pri čemer imajo naši poslani konstrukti zaporedne številke od BBa_K1669001 do BBa_K1669009.

Pred sestavljanjem celotnega konstrukta smo se odločili preveriti izražanje vsake posamezne polipeptidne verige. Glede na to, da so bili konstrukti ustvarjeni na tak način, da omogočajo konstitutivno izražanje v sevu *E. coli* DH5 α , smo celice gojili različno dolgo (3 h, 12 h, preko noči), nato pa celice razbili z ultrazvokom in ločili topno od netopne frakcije. Vsebnost proteinov v obeh frakcijah smo določevali z elektroforezno ločitvijo proteinov na poliakrilamidnem gelu v prisotnosti denaturanta

natrijevega dodecilsulfata. Ugotovili smo, da je v primerjavi s celicami, ki vsebujejo plazmid samo z regulatorno regijo (promotor in RBS), v primeru popolno sestavljenega konstrukta na gelu prisotna še dodatna lisa, ki je v vseh treh primerih ustrezala pričakovani velikosti posamezne polipeptidne verige. Da se res izraža želeni gen, smo dodatno dokazali še tako, da smo proteine iz gela prenesli na nitrocelulozno membrano in izvedli detekcijo s protitelesi, ki so specifična za oznako His, ki so jo na C-koncu proteina imeli vsi trije posamezni proteini.

Žal nam čas ni dopuščal, da bi sestavili konstrukt s tremi geni na istem vektorju, kar bi omogočalo dejansko pretvorbo butanojske kisline v butanol. Vseeno pa smo prva skupina, ki je v bazo bioloških delov deponirala kar devet konstruktov, za katere verjamemo, da bodo olajšali nadaljnje delo skupinam, ki bodo v naslednjih letih poskusile pripraviti celice za biološko sintezo butanola.

Udeležba na srečanju tekmovalnih ekip

Dijaki so se na tekmovanje iGEM pod vodstvom mentorjev skupno pripravljali več kot leto dni, večino svojega raziskovalnega dela pa so opravili med lanskimi poletnimi počitnicami. V konkurenci 36 srednješolskih ekip se je slovenska raziskovalna skupina (na sliki 5 udeleženci srečanja tekmovalnih ekip v Bostonu, ZDA, ki je potekalo od 24. do 28. septembra 2015) s svojim projektom z naslovom »From waste to fuel: Reprogrammed *E. coli* for sustainable production of biobutanol from butanoic acid« uvrstila med 5 najboljših, za opravljene vnaprej postavljene naloge pa je prejela zlato medaljo. Dodatno je bila skupina nominirana med najboljše srednješolske ekipe na več področjih, in sicer za najboljše predavanje, najboljšo spletno stran (http://2015.igem.org/Team:Slovenia_HS) in za najboljše delovanje v javnosti. Recenzente so prepričali z obsežnostjo projekta in visoko kakovostjo opravljenega raziskovalnega dela, ki je po njihovih besedah na več področjih krepko presegala nivo srednješolcev.

Sodniki so tudi pohvalili požrtvovalnost dijakov, da so kljub številnim šolskim obveznostim uspeli redno prihajati na fakulteto in inštitut, kjer so izvajali raziskovalno delo. Srednješolska raziskovalna skupina je bila deležna tudi pohval za obsežno delo na področju promocije sintezne biologije in njihovega projekta na številnih prireditvah in na šolah. Neopažena ni ostala tudi unikatnost sestave ekipe, saj je bila slovenska srednješolska skupina edina izmed vseh ekip na lanskem tekmovanju iGEM, ki je bila sestavljena iz dijakov s številnih srednjih šol. Na ta način so dijaki dokazali, da lahko uspešno povezovanje in sodelovanje vodi do odličnih rezultatov. O uspehu slovenske srednješolske ekipe na tekmovanju iGEM so mediji (radio, televizija in časopisi) obsežno poročali; dijaki in njihovi mentorji so med drugim nastopili tudi v več oddajah. Javni predstavitvi njihovega raziskovalnega projekta in dosežka na tekmovanju iGEM sta bili organizirani oktobra in novembra 2014 na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani ter na Kemijskem inštitutu.



Slika 5: Fotografija slovenske srednješolske ekipe z lanskega tekmovanja iGEM v Bostonu v ZDA.

Synthetic Biology for Biobutanol Production

Abstract

In 2015, the first-ever Slovenian high school team competed at the iGEM (international Genetically Engineered Machine) competition in synthetic biology. The team was carefully selected from a list of candidates proposed by their high school teachers of chemistry and biology. Composed of eight students from 7 high schools from across the country, the team split into two groups, working in two institutions but with regular common meetings. The group of four students who worked at the National Institute of Chemistry focused on biotechnological production and the second group was preparing genetic constructs at the University of Ljubljana Faculty of Chemistry and Chemical Technology. The central problem that students tackled was the conversion of C-4 acids that are side-products of anaerobic waste degradation, into the corresponding alcohol.

In the biotechnological part of the project students tested butanoic acid production in an anaerobic fermentation broth using a 15-channel computer-controlled bioreactor system, configured to allow online analysis of gaseous products (by GC) and frequent analysis of dissolved compounds (by HPLC). Next, at optimal butanoic acid production conditions ($c = 1 \text{ g/L}$ butanoic acid) growth of *E. coli* was examined in terms of medium composition, temperature and pH in order to obtain optimal operational parameters for biotechnological transformation of butanoic acid to butanol. Overall, *E. coli* growth was analysed in 72 different growth media in microtiter plates. Students followed inhibition of *E. coli* growth by butanol, acetone and isobutanol in the presence of butanoic acid and glycerol.

The synthetic biology group started with PCR amplification of three genes (*ctfA* and *ctfB* encoding two polypeptide chains of Co-A transferase, and *bdhB* encoding butyraldehyde dehydrogenase for a two-stage conversion of butyryl CoA to butanol) from an anaerobic microbial community. Amplification failed, probably due to contaminants in the broth and a low number of bacteria harbouring these genes. Consequently, synthetic genes were designed with appended sequences for easier cloning, for a hexahistidine tag for detection of recombinant proteins using specific antibodies. Synthetic genes were inserted into pSB1C3 vectors and for each of them a strong promoter- ribosome binding site region was inserted in front of the enzyme coding region. Such combined constructs were further transferred into vectors with double terminators of transcription. In total, 9 different DNA constructs were prepared and deposited in the Registry of biological parts. All final expression constructs efficiently directed production of recombinant enzymes in *E. coli* DH5 α under aerobic conditions.

The giant jamboree of competing teams took place in Boston, USA, from September 24 to 28 with more than 260 teams from around the globe. In the high school track the Slovenian team presented the project entitled "From waste to fuel: Reprogrammed *E. coli* for sustainable production of biobutanol from butanoic acid". The project received high recognition, as it was awarded a gold medal for completed tasks and was nominated among five best teams in categories Best Integrated Human Practices, Best Wiki, Best Presentation and Best High School Project.