



Studienämnden Kf / Kb

Föreläsningsanteckningar/sammanfattning av Metabolism med teknisk mikrobiologi.

Ursprungligen skrivna av Anna Johnning (Saria) några små ändringar är gjorda av Sofia Andersson (Bt3).



Studienämnden Kf / Kb

Mikroorganismer

Eukaryoter- har cellkärna och organeller

- Alger
- Svampar
- Protozoter (encelliga djur)

Prokaryoter- saknar cellkärna och organeller

- Archae (flesta anaeroba, extrema miljöer)
- Bacteria (flesta bakterier)

Figur 2.1

Med stort B menas bara Bacteria medan ”bakterier” avser hela den prokaryota gruppen. De flesta bakterier tillhör gruppen Bacteria. Archaeobakterier är ofta anaeroba och trivs i extrema miljöer vad gäller pH, salthalt m.m (Polymeraset som används i PCR kommer ifrån en archaeobakterie.)

Bakterier är mindre än eukaryoter och har därför större yta/volym. Detta gör att de har snabbare transportprocesser och tillväxt kan ske fortare.

Endosymbiosteorin

”Mitokondrier och kloroplaster kommer ursprungligen från bakterier”.

Ett bevis för detta är att ribosomer i dessa organeller är av 70S-typ som annars hittas i bakterier och inte 80S som vanligtvis finns i högre organismer.

Morfologi

Figur 4.11

- *Kocker (coccus)*
 - Runda, 1-2 μm i diameter
 - Solitära: enstaka
 - Diplokker: två och två
 - Streptokocker: kedjor
 - Staphylokker: klasar
- *Stavar*
 - 1 μm breda och 2-5 μm långa (t.ex. *E.coli*)
- *Spiriller*
 - Böjda, spiralvridna
- *Spirochaeter*
 - Vriden som en telefonsladd
- *Filamentösa hyfer*
 - Trådliknande (t.ex. *Actinomyceter*: ingår i antibiotika, ger jordlukt)

DNA i prokaryoter

Prokaryoter har inte sitt DNA uppdelat i olika kromosomer. Istället är större delen av genomet samlat i en enda sammanhållen, dubbelsträngad DNA-molekyl, den s.k. bakteriekromosomen. Dessutom har de små mängder, ofta ringformade, DNA-



Studienämnden Kf / Kb

fragment kallade plasmider. En E.coli har ca 4600 kb (=1000 baspar) + plasmider. Prokaryoter är haploida, de har bara en uppsättning av varje gen. För att få plats med kromosomen i cellen måste den packas ihop ordentligt. Detta åstadkoms genom supercoiling där DNA-molekylen är hårdare snodd än vanligt **Figur 7.10**.

Mobilitet (=rörelse)

Flageller är tunna utskott (\varnothing 20 nm) som kan rotera. Energin fås via protongradient (1000 protoner = 1 varv).

Olika flagelleringar:

- Monotrick (polär) –○
- Lofotrick (polär) =○=
- Peritrick (ej polär) ☼

Taxis: Rörelse mot attraktant eller från repellat, s.k. signalmolekyler.

Kemotaxis: Rörelsen från/mot en kemisk förening.

Fototaxis: Rörelse mot ljus; vanligare hos växter än hos bakterier (t.ex. solrosor).

Rörelsen är slumpvis:

Rörelse – Tumble (roterar) – Rörelse (ny riktning) – Tumble osv.

Fimbrae och Pili liknar flageller men är inte involverade i rörelse utan vidhäftning till ytor respektive cell-till-cellkontakt (överföring av plasmider).

Upplagsnäring

Prokaryoter lagrar näring i korn (granules) eller andra ”inclusions”.

Kol kan t.ex. lagras som polyhydroxybutyratpolymer (PHB) eller glykogen. PHB är en polymer av varierande längd som saknas i eukaryota celler. Glykogen är en polysackarid som är vanlig även hos eukaryoter

Många bakterier har även lager av polyfosfat. Dessa kan användas som fosfatkälla till syntes av nukleinsyror eller fosfolipider.

Vissa bakterier som kan oxidera reducerat svavel har upplag av elementärt svavel.

Endospor

Figur 4.60?

Vissa arter av bakterier kan bilda sporer t.ex. *Bacillus*. Sporer är mycket resistenta mot värme, uttorkning, strålning etc. *Bacillus stearothermophilus* (sporer) klarar temperaturer på upp till 120°C (sterilisering vid 121°C är vanlig).

Sporstrukturen skiljer sig från en vegetativ cell. De bildas då celltillväxten stannar av t.ex. vid brist på näringsämnen.

Sporbildning är en komplex process, som har studerats ingående för *Bacillus subtilis*. För denna bakterie tar sporbildningen ca 8 h och det är ca 200 gener som reglerar



Studienämnden Kf / Kb

processen. En spor kan sedan omvandlas tillbaka till en vegetativ cell när förhållandena i omgivningen är mer gynnsamma.

Hur länge en spor kan överleva vet man inte riktigt. Att de klarar 100-1000 år verkar troligt, kanske mer.



Studienämnden Kf / Kb

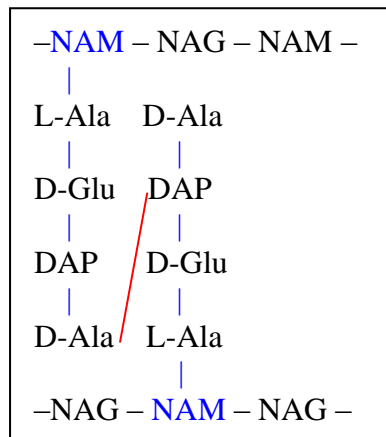
Prokaryot cellvägg

Figur 4.4 & 4.28

Två varianter finns: Gram positiv (G^+) och Gram negativ (G^-). De har olikheter i uppbyggnad av cellvägg och får därför olika färg vid s.k. gramfärgning; G^+ blir blåviolettera och G^- blir rosa. Archae har stor variation i uppbyggnaden av cellvägg men saknar peptidoglukan.

Peptidoglukan el. murcin

Har två ”ryggrader” av N-acetylglukosamin (NAG) och N-acetylmuraminsyra (NAM) i repeterande sekvenser. Till NAM är peptidkedjor bundna (blå bindningar nedan). Dessa är i sin tur sammanbundna (”cross linked”) via en peptidbindning (röd bindning) som förenar de två ”ryggraderna”. Denna bindning förhindras av penicillin som därmed förstör cellväggen och dödar bakterien. Enzymet lysosym gör likadant och bryter den essentiella bindningen. **Figur 4.30 & 4.31**



NAM och DAP är unika för bakterier. Aminosyrorerna D-Ala och D-Glu förekommer aldrig i proteiner.

G^- : Vanligtvis direkt bindning mellan D-Ala och DAP.

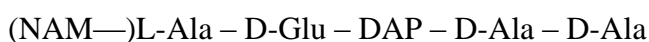
Ca 10% av cellväggen består av peptidoglukan + yttre membran eller s.k. LPS-lager (se nedan).

G^+ : DAP är ofta utbytt mot t.e.x L-Lys och en interpeptidbrygga mellan DAP och D-ala med varierande sammansättning är vanlig (*S. aureus* har 5st glycinerheter). Ca 90% av cellväggen består av peptidoglukan + teichominsyror (polymer: —ribitol —P—glycerol—P—).

Transpeptidering- ursprungligen pentapeptid

Reaktionen som sammanbinder de två peptidkedjorna i peptidoglukan.

Ursprungligen ser kedjan ut så här (jfr bilden ovan):



När D-Ala-terminalen spjälkas så frigörs energi som används av enzymet transpeptidas för att bilda crosslinking, dvs peptidbindningen mellan D-Ala och DAP.



Studienämnden Kf / Kb

- Penicillin inhiberar transpeptidas och vilket hindrar crosslinking som ger starkt försvagad cellvägg.
- Lysosym, däremot, bryter ner existerande cellväggar (bindningen mellan NAM – NAG)
- Autolysin ”öppnar upp” peptidoglukan så att nytt väggmaterial kan inkorporeras. Finns naturligt i bakterier.

Cellvägg G⁻ **Figur 4.35**

[Cellmembra – Periplasma – Yttermembran]

- *Cellmembranet*
Byggs upp av ett dubbellager av fosfolipider. Sterolerna är ersatta av hopanoider. Vissa bakterier i gruppen *Mycoplasma* saknar cellvägg och har istället steroler i sitt cellmembran för rigiditet. Därför fungerar inte penicillin emot en lunginflammation som beror på dessa bakterier.
Archaeobakterier har unika typer av membran som klara extrema miljöer.

Funktion hos cellmembranet

- Permeabilitetsbarriär (transportprocesser)
- Energiproduktion (e⁻-transport)
- *Periplasman*
Innehåller stor mängd proteiner:
 - *Hydrolytiska*: Påbörjar nedbrytning av näringsämnen.
 - *Bindande*: Inleder transport av substrat över membranet.
 - *Kemoreceptorer*: Är inblandade i kemotaxis (rörelse mot/emot substratsgradient, solljus etc).
- *Yttermembranet*
 - Lipopolysackarider (LPS) bygger upp yttermembranet.
Grundstruktur: [LipidA – Corepolysackarid – O-polysackarid]
Grundstrukturen är relativt uniform men vissa komponenter kan variera, framför allt O-polysackariden.
 - Toxiska egenskaper i yttermembranet är ofta kopplade till LipidA; endotoxin (del av bakterien, jfr exotoxin som bakterien släpper ut).
 - Poriner (specifika/ickespecifika) är membranprotein i yttermembranet. De är inblandade i transport av lågmolekylära föreningar över yttermembranet vilket gör membranet relativt permeabelt.
 - Lipoprotein: sitter på insidan av yttermembranet och förankrar det i peptidoglukanlagret.

Transport över membran (prokaryoter) **Figur 4.23**

- *Aqua porin*
Ökar hastigheten för H₂O-transport över membranet.



Studienämnden Kf / Kb

- *Aktiv transport*
Kan ske mot koncentrationsgradient.
Kräver energi (ljus, ATP-hydrolysis, jongradient [H^+])
- *Passiv diffusion*
”Vanlig” diffusion med koncentrationsgradienten. Låg hastighet
- *Faciliterad diffusion*
Med koncentrationsgradienten m.h.a. carrier-protein.
Hög hastighet, hög specificitet, ”mättnadskinetik” **Figur 4.22 4.24.**
 - *Uniport:* Ett ämne transporteras.
 - *Symport:* Två ämnen transporteras i samma riktning (t.ex. K^+ med H^+).
 - *Antiport:* Två ämnen transporteras i motsatt riktning (t.ex. H^+ mot Na^+).
- *Grupptranslokation*
Substansen som tas upp modifieras samtidigt som den transporteras. På så sätt byggs ingen koncentrationsgradient upp

Ex. fosfotransferas-systemet i *E.coli*.
Glukos fosforiseras till glukos-6-fosfat via enzym II_c . Energin fås genom att enzym I omvandlar fosfoenolpyruvat (PEP) till pyruvat. Enzym I, som nu är fosforylerat, skickar vidare sitt fosfor till HPr vilket leder till en kaskad av fosforyleringar och defosforyleringar. Enzym II_a , II_b och II_c är specifika för olika socker medan enzym I och HPr är ospecifika. **Figur 4.26**
- *ABC transport:*
ABC= ATP-binding cassette.

Substratet binds av
 1. Periplasmaprotein med hög specificitet.
 2. Transportprotein, som utnyttjar energi från hydrolysis av ATP för transport.Tre protein:
 - 1) Bindande
 - 2) Transport
 - 3) ATP-hydrolysis



Studienämnden Kf / Kb

Näringsförsörjning

Kemisk sammansättning av cell:

- Kol ca 50 % av torrsvikt
- Syre ca 20-40 % av torrsvikt
- Kväve ca 10-15 % av torrsvikt
- Väte ca 5-10 % av torrsvikt

Medium (substrat)

Makroämnen

Tabell 5.1

Ämneskälla	Vanliga former av näringsämnet i omgivningen.
(Energi)	
Kol	Kolhydrat, organiska syror, alkoholer, ofta även energikälla t.ex. glukos
Kväve	NH ₃ , NO ₃
Väte	Organisk förening
Syre	Organisk förening. O ₂ används inte i biosyntes utan mest som e ⁻ -acceptor.
Fosfor	KH ₂ PO ₄ . Ingår i nukleinsyror och fosfolipider.
Svavel	XSO ₄ . Ingår i aminosyror och vitaminer.
Kalium	KCl, KH ₂ PO ₄ . Ingår i enzymer
Magnesium	MgCl, MgSO ₄ . Finns i ribosomer och vissa enzym.
(Natrium)	NaCl, NaH ₂ PO ₄ . Behövs mest av marina mikroorganismer.
(Kalcium)	CaCl ₂ . Behövs av vissa för stabilisering av cellvägg och sporer.
(Järn)	FeCl ₃ , Fe-Citrat. Viktig för e ⁻ -transport. Vissa arter klarar sig dock utan.

Mikroämnen (spårämnen)

Tabell 5.2

- Metaller: krav varierar beroende på organism
- Industriell produktion: ofta tillräckliga mängder spårämnen som föroreningar i andra kemikalier (makroämnen) och/eller i vattnet.

Tillväxtfaktorer

Tabell 5.3

Tillväxtfaktorer är organiska föreningar t.ex. vitaminer, aminosyror, purin och pyrimidin som behövs i småmängder av vissa celler. Olika organismer kan ha mycket olika krav och vissa kan syntetisera i stort sett alla tillväxtfaktorer.

En autotrof mutant är en mutan som förlorat förmågan att syntetisera en viss aminosyra och/eller purin/pyrimidin, ex ”markörgener”.

Odlingsmedium

- *Definierade medier:* Alla ingående komponenter (näringsämnen) är kända till mängd. Man tillsätter exakta mängder av rena organiska och organiska ämnen till destillerat vatten. Kan vara svårt att beräkna t.ex. kol.
- *Komplexa medier:* Alla ingående komponenter är ej kända till innehåll eller mängd.

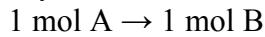


Studienämnden Kf / Kb

Innehåller exempelvis pepton (hydrolyserat protein) och jästextrakt (hydrolyserad jäst).

Termodynamik

Isotermt system:



, ΔU = Skillnaden i energi mellan A och B

Termodynamikens 1:a lag

Ändringen av inre energi (ΔU) i systemet är lika stor men motsatt förändringen av energin omgivningen.

$$\Delta U = q + w$$

, q = Värme. Negativ om systemet avger värme.

w = Arbete. Negativ om arbete utförs av systemet på omgivningen

ΔU är en tillståndsfunktion d.v.s. värdet är oberoende av vägen utan endast beroende av start- och sluttillståndet. q och w är inte tillståndsfunktioner.

Reaktioner i biologiska system sker vid konstant tryck och temperatur. Ej arbete förutom tryck-volym.

$$\Delta U = q - P\Delta V$$

Entalpi (H)

$\Delta H = \Delta U + P\Delta V$ men $\Delta U = q - P\Delta V \rightarrow \Delta H = q$, inget arbete utförs förutom tryck-volym. Konstant T och P.

Värme som produceras av en cellkultur motsvaras av entalpiförändringen i samtliga metaboliska reaktioner.

Vätskesystem har negligerbara volymsförändringar. Med konstant P och T fås,

$$\Delta H = \Delta U = q$$

Icke-isotermt med konstant P ger,

$$\Delta H = C_p \Delta T$$

Entropi (S) och Gibbs fria energi (G)

Gibbs fria energi definieras som,

$$G = H - TS \rightarrow \Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

För en spontan process krävs att den totala entropin ökar,

$$\Delta S_{\text{sys}} + \Delta S_{\text{omg}} > 0 \rightarrow \Delta G < 0$$

U, H, S och G är alla tillståndsfunktioner. S och G är aktivitetsberoende (~koncentrationsberoende) men U och H är i stort sett oberoende av aktiviteten.



Studienämnden Kf / Kb

$$\Delta_r G = \Delta_r G^\circ + RT \ln(c/c^\circ)$$

ΔG är den maximala mängd arbete som kan utföras reversibelt

$T\Delta S = q \rightarrow \Delta G = 0 \rightarrow$ reaktionshastigheten = 0

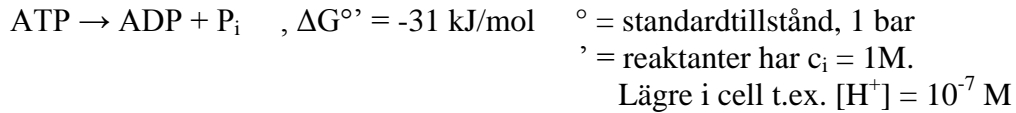


Studienämnden Kf / Kb

Katabolism

(Energiproduktion)

Adenintrifosfat (ATP) används som korttidslagring av energi. Hydrolys av ATP sker enligt,



ΔG beror av :

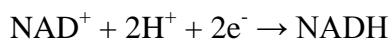
- Typ av reaktion
- Substrat- och produktkoncentrationer

ΔG i cellen för ATP-hydrolys är vanligen mer negativ än $\Delta G^{\circ'}$, mellan -40 och -50 kJ/mol. OBS! Det finns ingen koppling mellan reaktionshastighet och storlek på ΔG (, gäller dock för jämförelse mellan samma reaktion).

- *Fototrofer*
Använder ljus som energikälla (växter och vissa bakterier).
- *Kemotrofer*
Använder kemiska redoxreaktioner som energikälla (djur, de flesta bakterierna)
 - Extern elektronacceptor
 - O_2 = aerob respiration (djur, de flesta bakterier)
 - Ej O_2 t.ex. NO_3^- , Fe^{3+} = anaerob respiration (vissa bakterier)
 - Ej extern elektronacceptor
Fermentation (jäsnings). Ger t.ex. etanol, mjölksyra.

Elektronbärare

- $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$: ett Co-enzym som accepterar resp. donerar elektroner. Framför allt i katabolism.



- $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$: samma funktion som $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$. Bidrar med reducerande kraft i framför allt biosyntes.

Autotrofer hämtar kol från CO_2 .

Heterotrofer hämtar kol från organiska föreningar.

Centrala metabolismvägar

(sid. 29)

Glykolys, citronsyracykeln (TCA-cykeln), respirationskedjan m.m.

1. Glykolysen

Glukos oxideras \rightarrow 2 pyruvat bildas

$\rightarrow 2\text{e}^-$ frigörs $\rightarrow 2 \text{NAD}^+$ reduceras till 2NADH



Studienämnden Kf / Kb

→ 2 ATP bildas

a) Aerobt

2a. Pyruvat oxideras till Acetyl-CoA

→ 2 NAD^+ reduceras till 2 NADH .

3a. Acetyl-CoA går in i TCA-cykeln och oxideras till CO_2 .

→ 6 NAD^+ reduceras till 6 NADH .

→ 2 FAD^+ reduceras till 2 FADH_2 .

→ 2 ATP bildas.

4a. *Respirationskedjan*

NADH och FADH_2 återoxideras till NAD^+ resp. FAD^+ .

e^- "vandrar" i e^- -transportkedjan mot en successivt ökande redoxpotential.

→ Energi frigörs och som används till att pumpa protoner mot en koncentrationsgradient över membran.

→ Elektrokemisk kraft, både koncentration- samt laddningsgradient, byggs upp. Denna kraft utnyttjas av enzymer (ATPaser) som syntetiserar ATP när protonerna går tillbaka med sin konc.gradient genom enzymet.

→ e^- tas om hand via reduktion av O_2 till H_2O och på så sätt skapas redoxbalans.

b) Anaerobt

2b. Pyruvat reduceras

→ NADH återoxideras till NAD^+ → redoxbalans bibehålls.

→ 2 ATP

3b. Omvandlar pyruvat till fermentationsprodukt t.ex. etanol eller mjölksyra.

Effektivitet och yield

Fermentation ger få ATP per mängd substrat. Men om man tittar på bildad ATP per förbrukad energi (räkna med energin bevarad i form av produkt) är fermentation jämförbar med respiration i energisynpunkt.

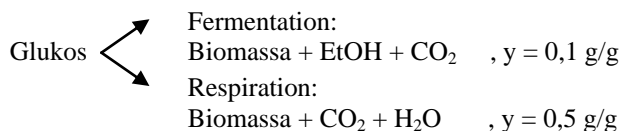
Yield är mängd biomassa producerad per konsumerad mängd substrat. [g_{prod}/g_{sub}] eller [g_{prod}/mol_{sub}].

ATP-yield är mängd producerad biomassa per antal mol konsumerad ATP

[g_{prod}/mol_{ATP}].

Den "dyraste" processen är proteinsyntes.

Fermentation (ex. bakjäst) har låg yield:





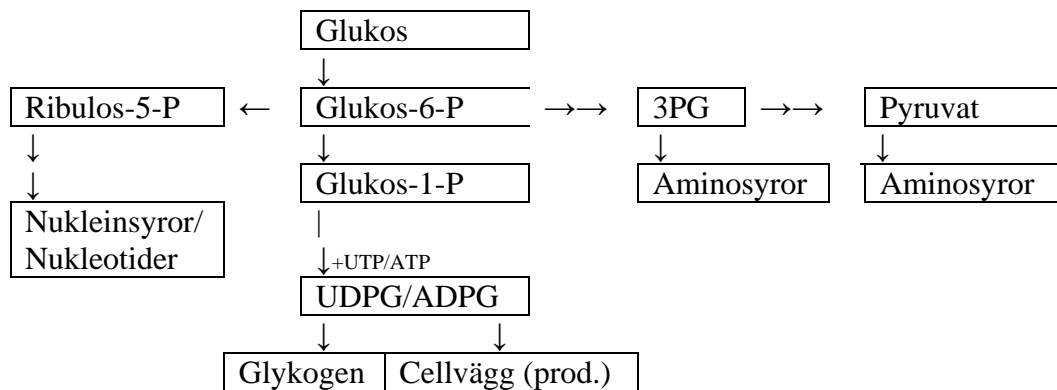
Studienämnden Kf / Kb

Anabolism

(Biosyntes)

- Autotrofer har förmågan att fixera CO₂ (växter).
- Heterotrofer kräver organiska kolföreningar (djur).

Glykolysen och TCA-cykeln är katabola vägar som producerar ATP med de har även en anabol funktion via produktion av precursorser för biosyntes. De är s.k. amfibola vägar, två funktioner men samma väg.



Glukoneogenes är produktion av G6P/glukos från pyruvat, ”omvänd glykolys”. Används för syntes av nödvändiga precursorser vid tillväxt på ”icke-kolhydrater” (fett, aminosyror o.s.v.).



Studienämnden Kf / Kb

Mikrobiell tillväxt

Kapitel 6

Förökningssätt

Delning via "binary fission" (delning som ger två lika dotterceller) är vanligast hos bakterier. Detta gör dem ålderslösa.

Jäst (*Saccharomyces cerevisiae*) förökar sig via knoppning. Den snörper av en liten del av sig själv som bildar en ny cell. På så sätt kan man mäta en jästcells ålder (~30-40 generationer).

Hyfbildande bakterier och svampar är besvärliga att mäta tillväxt på.

Hastighet av cellökning

N = antalet celler.

μ = specifik tillväxthastighetskonstant [h^{-1}]

x = biomassakonc. [g/l]

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \qquad \frac{dx}{dt} = \mu x$$

G = generationstid. Den tid det tar att fördubbla antalet celler/ biomassakoncentrationen i en odling.

$$\ln(x) = \ln(x_0) + \mu t \rightarrow \ln(x/x_0) = \mu t$$

$$\text{Om } t = G \rightarrow x = 2x_0$$

$\mu = \ln(2) / G$, plottas $\ln(x)$ mot t är μ lutningen på linjen.



Studienämnden Kf / Kb

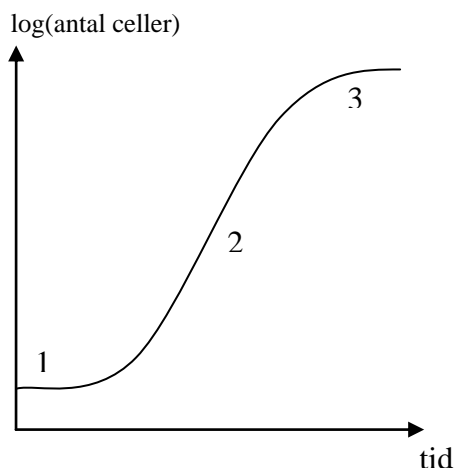
Odlingsmetoder

Fyra olika sätt:

- 1) Batchodling
- 2) Fed-batch odling
- 3) Kontinuerlig odling
- 4) (Immobiliserad kultur)

Batchodling

Ingen kontinuerlig tillförsel av näring förutom ev. luftning och syra-/bastillsats för att hålla ett konstant pH.



1. Lag-fas
2. Log-fas eller exponentiell fas
3. Stationär fas

1. Lag-fas

Ingen celldelning, adaptation till miljön, enzymsyntes, cellkomposition ändras etc.
Längd kan variera

2. Log-fas (exponentiell fas)

Cellantalet fördubblas med konstant hastighet. Cellkompositionen är någorlunda konstant.

n = antal generationer

$$\boxed{N_t = N_0 2^n} \quad \boxed{G = t / n} \quad \rightarrow \quad G = \frac{\log 2 \cdot \Delta t}{\log N_{t=1} - \log N_{t=0}}$$

Plottas $\log(N_t)$ mot tiden fås,

$$\boxed{G = \log(2) / \text{lutning}}$$

3. Stationär fas

Cellantalet ökar inte längre och cellkompositionen ändras med tiden.

Något näringsämnen är slut eller så har toxiska substanser (t.ex. EtOH) börjat bildas.



Studienämnden Kf / Kb

”Cryptic growth” innebär att viss del av populationen växer medan en annan del lyserar (dör). På så sätt hålls cellantalet konstant.

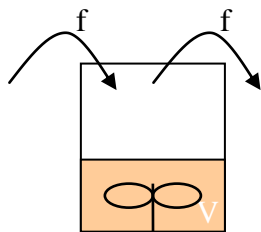
Fed-batchodling

Kontinuerlig tillförsel av näring men inget utflöde → kontinuerlig volymsökning. Näring, exempelvis glukos, tillförs i så pass låg hastighet att lågkoncentration erhålls och repression av enzymsyntes förhindras. Höga koncentrationer av vissa ämnen hämmar bildning av vissa produkter.

Kontinuerlig odling

Kontinuerlig tillförsel av substrat och kontinuerligt utflöde (med samma hastighet) av kultur → konstant volym.

Kemostat: Ett ämne i substratet är begränsande och kontrollerar tillväxten t.ex. kolkälla, kvävekälla, syrekälla (även P och S).



f = flödeshastighet [l/h]
 V = vätskevolym [l]

$MRT = V / f$, Mean Residence Time, medeltid en cell tillbringar i reaktorn [h]
 $(MRT)^{-1} = f / V = D$, delution rate [h^{-1}]

För att vara kvar i reaktorn krävs en viss cellökningshastighet.

$\frac{dx}{dt} = \mu x$, cellproduktion tillväxt $\frac{dx}{dt} = Dx$, utflöde av biomassa

Vid steady state gäller,

$$\boxed{\mu = D}$$

Självreglerande koncentration av begränsande ämne kontrollerar tillväxthastigheten enligt (jfr Michael Mentels),

$\boxed{\mu = \mu_{\max} s / (k_s + s)}$, μ_{\max} = maximal tillväxthastighet
 k_s = substratkoncentration som ger $\mu_{\max}/2$
 s = substratkoncentration

I en batchodling är $\mu = \mu_{\max}$ i logfasen eftersom alla näringsämnen finns i överflöd, $s \gg k_s$. Det finns dock fortfarande ett μ_{\max} som beror på hur mycket näringsämne som tillsats i början: ju mer näring desto fler celler.



Studienämnden Kf / Kb

I en kemostat inställs hela tiden en jämvikt enligt,
 μ ökar \rightarrow s minskar $\rightarrow \mu$ minskar \rightarrow s ökar $\rightarrow \mu$ ökar o.s.v.

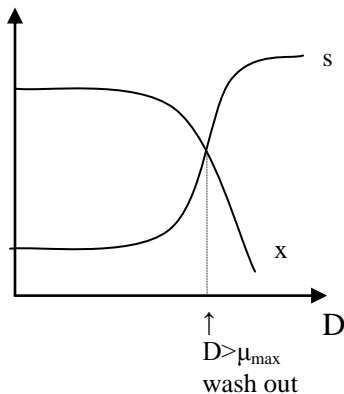
$$x = y (s_R - s)$$

, s = substrat kvar i reaktorn
($s_R - s$) = förbrukat substrat
y = yield
x = biomassakonc.

$$x = y [s_R - K_s D / (\mu_{\max} - D)]$$

Biomassakoncentrationen beror av

- Koncentration av begränsande ämne. Kan man påverka själv i odling.
- Yield
- Dilution rate (D) vid höga D. [h^{-1}]



Vid låga D tillförs substratet (t.ex. glukos) i så låg hastighet att överlevnadskraven (maintenance) inte uppfylls d.v.s. det finns inte tillräckligt substrat för att cellerna skall kunna bibehålla sin integritet och funktion. Steady state kan då inte uppnås och cellerna sköljs ut (wash out).

Immobiliserad kultur

Höga flöden möjliga. Biosyntes ej nödvändigt \rightarrow ökat utbyte av produkt. Enklare rening, celler behöver ej avskiljas.



Studienämnden Kf / Kb

Mätmetoder

Cellantal

- *Totalhalt*

Både levande och döda

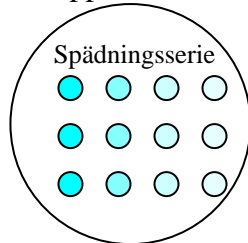
- Direkt i mikroskop m.h.a. räknecammare
Snabb, arbetskrävande, reproducerbarhet tvivelaktig, ej utspädda lösningar
- Partikelräknare
Ganska dålig metod. Cellerna klumpar ihop sig o.s.v.

- *Levandehalt*

CFU = colony forming unit

- Man kan sprida bakteriesuspension på eller i en näringslösning. 1 cell kommer ge upphov till 1 koloni.
30-300 kolonier per platta. <30 blir statistiskt osäkert, >300 är svårt att räkna.
Olika spädningsserier odlas på olika agarplattor för att få lagom många kolonier att räkna.
Långsam metod, tar minst ett dygn att odla cellerna.
Har man naturliga prover kan det vara svårt att hitta en näringslösning som passar alla vilket gör att man lätt underskattar antalet celler i provet.

- Dropptest



Kvalitativt beräkningsätt för att se hur olika bakterier klarar sig under olika förhållanden.

- Metylenblåfärgning

Kvalitativt mått på antalet levande celler.

De levande cellerna förblir ofärgade eftersom deras membran är intakta.

Cellmassa

- *Direkt torrviktsbestämning*

Centrifugering av bestämd volym i förvägda rör. Därefter 90-110°C i 24h.

- *Indirekt biomassabestämning*

Turbiditet (OD = optisk densitet) mäts i spektrofotometer m.h.a absorptionsmätning. Utspädda lösningar kvävs eftersom OD måste vara mindre än 0,4-0,5.

Värdet jämförs sedan mot en standardkurva (OD mot torrsvikt). Standardkurvan är unik för varje bakterie och odlingsförhållande. T.o.m. spektrofotometern kan spela roll.



Studienämnden Kf / Kb

$$G = \frac{\log 2 \cdot \Delta t}{\log x_{t=1} - \log x_{t=0}}$$

log x, kan ersättas med log OD

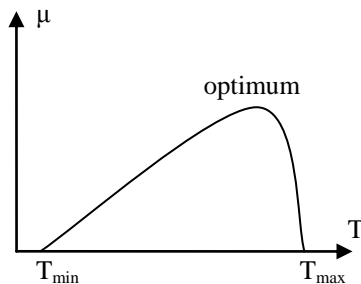


Studienämnden Kf / Kb

Omgivningsförhållanden

Temperatur

Tillväxt av celler har observerats i temperaturer mellan 0 – 113°C. Ett vanligt temperaturspann ($T_{\max} - T_{\min}$) är $\sim 30^\circ\text{V}$



Ökad temperatur gör att reaktioner sker snabbare

Över en viss temperatur slutar dock protein, nukleinsyror och membran att fungera och reaktioner avstannar.

Optimumtemperatur är relativt nära maximum
Minimumtemperatur begränsas av membranfunktionen.

Bl.a. sammansättningen av membranet avgör hur en organism tacklas med externa temperaturer. Är kolledjorna i fosfolipiderna långa och mättade (raka) blir de intermolekylära bildningarna starka och organismen klara höga temperaturer. Å andra sidan blir membranet stelt om temperaturen blir för låg. Det motsatta gäller för korta och omättade (böjda) kolledjor.

Temperaturklasser

Bakterier är de enda organismer som klara tillväxt över 60°C .

- fil: Kräver något.
- tolerant: Tål något, men kräver inte.

- *Psykrofil*
Låg temperaturoptimum, under 15°C .
Deras enzymer fungerar optimalt vid låga temperaturer men denaturerar vid relativt låga (men högre) temperaturer.
Membranen består till stor del av omättade fettsyror vilket gör att fluiditet bevaras vid låga temperaturer. I varmare miljöer faller membranet sönder.
- *Psykrotolerant*
Klara tillväxt vid 0°C men har temp.optimum vid $20\text{-}40^\circ\text{C}$.
- *Mesofil*
Medel temperaturoptimum, $\sim 10\text{-}45^\circ\text{C}$.
- *Termofil*
Högt temperaturoptimum, över 45°C .
Deras enzym fungerar bäst vid höga temperaturer och primärstrukturen (aminosyrasekvensen) har små skillnader jämfört med mesofila motsvarigheter.
Membranen har en hög andel mättade fettsyror vilket bevarar fluiditet vid höga temperaturer. I kallare miljöer blir membranet stelt.
Även ribosomer fungerar vid höga temperaturer.



Studienämnden Kf / Kb

Det finns stort biotekniskt intresse för enzym från termofilmer t.ex. Taq-polymeras i PCR.

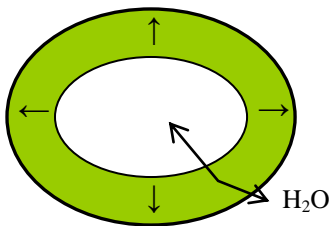
- *Hypertermofil*
Mycket högt temperaturoptimum, över 80°C.
Har speciella "lipid monolayer"-membran som saknar fettsyror.

pH

I de flesta fall ligger intracellulärt pH när 7, men i vissa undantag kan det ligga mellan 4,6-9,5. Generellt är svampar mer toleranta än bakterier mot lågt pH. Jäst (*Saccharomyces cerevisiae*) har ett pH-optimum vid 4,5-5,5 men klarar ner till pH 3 (långsam tillväxt). Även mjölksyrabakterier klarar relativt låga pH.

- *Acidofiler*
Växer vid lågt pH
- *Alkalofiler*
Växer vid högt pH (tvättmedel)

Osmostress/Osmotolerans



Turbotryck: Då plasmamembranet pressas mot cellväggen (grön). Det är nödvändigt för tillväxt (till viss grad) och fungerar som drivkraft för en expanderande cell.

Vid ett visst turbotryck erhålls balans i osmotisk potential mellan ut- och insidan → inget nettoflöde av vatten över membranet. (Högt osmotiskt tryck = låg osmotisk potential).

Följande gäller främst växter:

- *Halofil*
Organismer som *kräver* höga Na⁺-koncentrationer.
- *Halotolerant*
Organismer som *tål* men *kräver* inte höga Na⁺-koncentrationer.
- *Osmofil, osmotolerant:*
Kräver resp. *tål* höga sockerkoncentrationer.
- *Xerofil, xerotolerant*
Kräver resp. *tål* "torra" miljöer (brist på vatten).



Studienämnden Kf / Kb

För att handskas med den osmotiska trycket måste vattenkoncentrationen utjämnas på något sätt. Ackumulering av joner (K^+) är ovanlig. Syntes eller ackumulation från omgivningen av "compatible solute" d.v.s. substanser som är kompatibla med cellen funktioner, är det andra alternativet för att utjämna det osmotiska trycket.



Studienämnden Kf / Kb

Syre

- *Obligata aeroba*
Kräver O₂.
Aerob respiration
- *Fackultativ aerob*
Använder O₂ om det finns tillgängligt men kan även växa anaerobt.
Aerob respiration, anaerob respiration och fermentation.
- *Mikroaerofila*
Kräver O₂ men i lägre koncentration än i luft.
Aerob respiration.
- *Obligat anaeroba*
O₂ är toxiskt letalt (dödlig).
Anaerob respiration och fermentation.
- *Aerotolerant anaerob*
Använder ej O₂ med det är inte toxiskt.
Anaerob respiration och fermentation.

Aeroba processer

Syre har låg löslighet och låg diffusionshastighet vilket gör syresättning till en kostnadskrävande process.

Åtgärder inom industrin:

- Sparger
En anordning som fördelar luft i mindre bubblor → mer yta/volym → högre diffusionshastighet.
- Ökad hastighet på lufttillförsel. Relativt ineffektivt.
- Ökad omrörningshastighet ger samma resultat som med en sparger.
- Ökat tryck ger ökad löslighet.
- Bafflar.

Luftning i industriskala ofta dyrbart!!

Anaeroba processer

Det är ett problem att avlägsna allt syre

Åtgärder inom industrin:

- Kemikalier. T.ex. reduktionsmedel som reducerar O₂ till H₂O. Kan dock påverka på annat sätt.
- Kontinuerligt flöde av N₂.

Gifta former av syre:

- ”Singlet oxygen”
- Superoxidanjon, O₂⁻



Studienämnden Kf / Kb

- Väteperoxid, H_2O_2
- Hydroxylradikal, $\text{OH}\cdot$

Enzym för detoxifiering:

- Katalas: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- Peroxidas: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+$
- Superoxiddismutas (SOD): $2\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$



Studienämnden Kf / Kb

Tillväxtkontroll

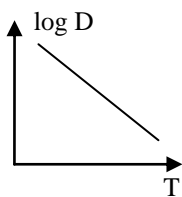
Kapitel 20

Sterilisering

Sterilt: Inga levande celler närvarande

Värme

Hög temperatur på kort tid.



Decimal reduction time (D): Den tid det tar att minska en population 10-faldigt vid en given temperatur.

Thermal death time: Den tid det tar att döda alla celler i en population. Beror på organism, omgivningsförhållanden (medium, pH m.m.) etc.

- *”Torrsterilisering”*
Kräver höga temperaturer och lång tid. Ugn, ~2h 170°C (~3h 160°C)
- *”Vätskesterilisering”*
Mer effektiv än torrsterilisering. Autoklav (tryckkokare) 15-20 121°C.
Vätskan kokar inte bort p.g.a. övertrycket (1,1 atmosfärsövertryck).
- *Pastörisering*
Värmebehandling men inte sterilisering. 15s 71°C.
T.ex. mjölk som inte tål sterilisering.

Strålning

Används exempelvis på medicinsk utrustning och föda (vitpeppar)
Mikroorganismer är dock relativt tåliga mot strålning.

Filtrering

Porstorlek 0,22 μm . Används på värmekänsliga vätskor och gaser som innehåller t.ex. vitaminer eller aminosyror.
Gaser luftas i fermentorer.



Studienämnden Kf / Kb

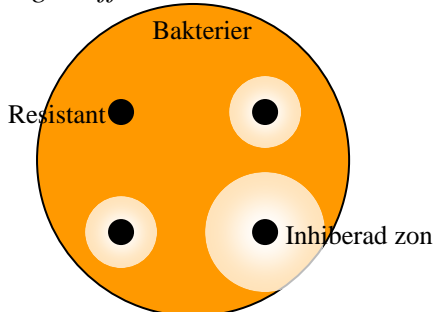
Kemisk tillväxtkontroll

MIC: Minimum inhibitory concentration, d.v.s. den lägsta koncentrationen som krävs för att ett ämne skall förhindra cellväxt. Beror på omgivningsfaktorer såsom medium, pH, ympstorlek m.m. För att olika ämnen skall kunna jämföras finns en standardiserad metod.

- *Bakteriostatiska*
Tillväxten avstannar men cellerna är fortfarande viabla. Bakteriostatiska medel påverkar ofta proteinsyntes i bakterierna genom att binda till ribosomerna. Bindningen är dock lös och om koncentrationen av medlet är för låg frigörs det ifrån ribosomerna och proteinsyntesen kan fortsätta. Därför kan man ”sköja rent” en odling från medlet och återfå tillväxt.
- *Bakteriocidala*
Orskar celldöd men inte lysering. Sitter fast bundet till substratet och kan därför inte tvättas bort.
- *Bakteriolytiska*
Dödar cellerna genom att förstöra cellväggen t.ex. Penicillin.

Metoder och substanser

- *Agardiffusionsmetod*



- *Dissenfektans*
Dödar eller inhiberar mikroorganismer. De är även skadliga för människor. En del är sterilanter d.v.s. de dödar allt.
- *Antipetitika*
Dödar eller inhiberar mikroorganismer utan att vara toxiska för människor.
- *Germicider*
Kemiska ämnen med antimikrobiell verkan. Används vid ”kall sterilisering” t.ex. av väggar och golv i sjukhus.

Livsmedelshantering

Risken för mikrobiell nedbrytning beror framför allt av vatteninnehåll. För att öka motståndskraften hos ett livsmedel kan man minska vattenhalten genom att tillsätta t.ex. salt eller socker.



Studienämnden Kf / Kb

Man får också längre hållbarhet om livsmedlet har ett lågt pH. Detta kan åstadkommas med mjölksyrabakterier (yoghurt, surkål), vinäger (inlagd gurka) m.m.



Studienämnden Kf / Kb

Läkemedel

Kemoterapeutikum är kemiska föreningar med antimikrobiell verkan som kan användas medicinskt.

Syntetiska substanser

- *Growth factor analogs*
Ämnen som liknar riktiga tillväxtfaktorer men som inte är funktionella. De blockerar därför för de riktiga tillväxtfaktorerna.

Ex. Sulfaanalog för PABA (para-aminobenzoic acid) som förhindrar bildning av folsyra. Påverkar bakterier selektivt eftersom de syntetiserar sin folsyra till skillnad från djur som tar upp det via föda.

Ex. Nukleinsyraanaloger används framför allt för att bekämpa virus- och svampinfektioner. **Figur 20.17**

- *Quinoloner*
Inhiberar bakteriellt DNA-gyras och därmed ej riktig supercoiling av DNA. På så sätt kan inte bakterien föröka sig.

Ex. Nalidixic acid används för att bota urinvägsinfektion.

Antibiotika (naturliga substanser)

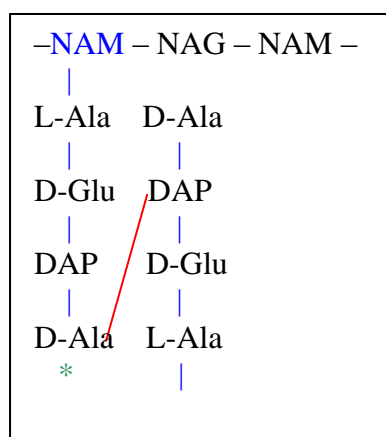
Ett ämne producerat av en mikroorganism som är toxiskt inhiberande för en annan mikroorganism.

Antibiotika slår mot cellväggen, protein-/nukleinsyrasyntes eller cellmembran (även vid svampinfektioner).

- *Semisyntetiska*
Kemiskt modifiering av naturligt producerad antibiotika för ökad effektivitet.
- *"Bredspektrum" antibiotika*
Verksam mot både G^+ - och G^- -bakterier.

β -laktamantibiotika (penicilliner, cephalosporiner)

Inhiberar nysyntes av cellvägg.





Studienämnden Kf / Kb

–NAG – NAM – NAG –

Vid * sitter ursprunglingen ytterligare ett D-Ala (sid 3). När detta spjälkas bort av transpeptidas bildas peptidbindningen (röd) till DAP. Penicillin binder till transpeptidas och förhindrar att denna peptidbindning ("cross linking"). Autolysin luckrar upp cellväggen och i närvaro av penicillin lyserar cellerna.

Eftersom β -laktamantibiotika riktar in sig på cellväggen har den hög specificitet då cellvägg är unikt för bakterier. Det är inte toxiskt för humanceller men allergier förekommer.

Cephalosporiner är en annan grupp av β -laktamantibiotika som har samma mekanism som penicilliner. De är verksamma mot ett vidare spektrum av bakterier och är generellt mer resistent mot enzymer som bryter ner β -laktamringar, β -laktamas.

Vancomycin är inte ett β -laktamantibiotika men påverkar D-Ala – D-Ala-terminalen och förhindrar cross linking utan att påverka transpeptidas direkt. Medlet har ett smalare spektrum och verkar framför allt mot *Staphylococcus*, *Bacillus* och *Clostridium*. Eftersom det inte finns några (alt. ett fåtal) resistent bakterier används det ofta som sista utväg. Biverkningar är relativt vanliga.

Framställning av penicillin

Penicillium chrysogenum (svamp) ger en blandning av olika penicillin med begränsad antimikrobiell effekt. Ges svampen fenylättiksyra som precursor bildas istället Penicillin G (benzylpenicillin) som var det första antibiotikat att upptäckas.

Penicillin G är endast verksamt mot G^+ organismer, är känsliga mot β -laktamas samt känsliga mot lågt pH (magen) och måste därför injeceras. Penicillin G kan in sin tur, med hjälp av *E. Coli* och immobiliserat enzym, kemiskt omvandlas till 6-AminoPenicillanic acid (6-APA); ett "råpenicillin" utan antimikrobiell effekt. Till 6-APA kan sedan olika sidokedjor adderas kemiskt för att skapa olika semisyntetiska penicillin. Dessa kan t.ex. ha ett bredare spektrum och även inhibera G^- bakterier, klara av låga pH eller vara extra β -laktamasresistent.

Cephalosporin – samma mekanism som penicillin, (β -laktam), men kemisk uppbyggnad skiljer. Verksam vidare spektrum av bakterier och mer β -laktamas resistent.

Vancomycin (ej β -laktam antibiotika) interagerar med terminal D-ala---D-ala och transpeptidas kan ej verka och crosslinking förhindras.

Smalspektrum G^+

Staphylococcus

Bacillus

Clostridium

Inga eller fåtal resistent bakterier men biverkningar relativt vanliga.



Studienämnden Kf / Kb

Aminoglykosider, makrolider och tetracykliner

Dessa antibiotika har gemensamt att de förhindrar proteinsyntes genom att interferera med olika delar av prokaryota ribosomer (30S eller 50S).

Streptomycin är en aminoglykosidantibiotika som slår bl.a. mot *Streptomyces* och *Actinomyces* (jordluft) genom att påverka 30S-delen av ribosomen. Streptomycin var vanligare förr.

Erythromycin är en makrolidantibiotika som slår mot 50S-delen av ribosomen.

Tetracykliner är tillsammans med β -laktamantibiotika de viktigaste grupperna av antibiotika. De finns både som naturliga och semisyntetiska och påverkar 30S-delen av ribosomen.

Antibiotikaresistens

För att antiobiotikaproducerande mikroorganismer inte skall ta död på sig själva har de en resistensgen. Denna kan då och då överföras till andra organismer som då också blir resistenta mot antibiotikumet. Spridning av resistens avgörs av selektionstrycket

Resistansmekanismer:

- Cellen saknar struktur som antibiotikumet är verksamt mot.
Ex: *Mycoplasma* saknar cellvägg vilket gör att den är resistent mot penicillin.
- Cellen är impermeabel för antibiotikumet.
Ex: De flesta G bakterier är resistent mot penicillin G.
- Cellen förändrar eller bryter ned antibiotikumet.
Ex: Många Staphylokokker kan bryta ner β -laktam (m.h.a. β -laktamas).
- Förändring av struktur som antibiotikumet är verksamt mot.
- Bakterien kan utveckla alternativa metabola vägar som kringgår en blockering som antibiotikumet skapat.
- Transport av antibiotikumet ut ur cellen.

Antibiotikaresistensen kan koda för antingen på kromosomal nivå eller på plasmidnivå genom s.k. resistensplasmider (R-plasmid). Kromosomalt medierad resistens innebär oftast modifiering av "målet" för antibiotikat. Plasmidmedierad resistens slår oftast mot antibiotika via olika typer av modifiering, nedbrytning, förhindrat upptag eller utpumpning av substansen. En R-plasmid kan innehålla flera olika gener och därmed ge resistens mot flera olika antibiotika via olika mekanismer.

Virusinfektioner

Eftersom virus utnyttjar värdcellens egna "maskineri" för förökning är substanser som selektivt slår mot virus sällsynta. Virustoxiska ämnen är alltså oftast även toxiska mot värdcellen. **Tabell 20.5**



Studienämnden Kf / Kb

- *Nukleosidanaloger*
De vanligaste och mest framgångsrika antivirala medlen är nukleosidanaloger. T.ex. AZT som är en tyminanalog, är verksamt mot retrovirus (HIV) som behöver reverst transkriptas för att omvandla sitt RNA till DNA.
- *Rifamycin*
Ett antibiotikum som inhiberar RNApolymeras. Fungerar mot *Vaccinia* och andra poxvirus (koppvirus).
- *Interferon*
Interferoner är små proteiner som produceras av mammaliaceller vid virusinfektioner. En infekterad cell skickar ut interferoner till cellerna runt om kring som då syntetiserar antivirala proteiner.
Celler som är infekterade av lågvirulenta virus har en hög produktion av interferoner medan lite produceras mot högvirulenta virus. Viruset hinner uppenbarligen stänga av cellens proteinsyntes innan något interferon hunnit produceras.
Interferoner är värd- men inte virusspecifika. Ett specifikt interferon i en viss celltyp, inducerat av en viss virustyp är även verksamt mot andra typer av virus i samma celltyp, men inte mot samma typ av virus i en annan organism. Eftersom cellerna själva producerar interferon används det vanligtvis inte som läkemedel.

Svampinfektioner

Eftersom svampar, precis som vi, är eukaryoter och har ett strukturmåskinerat motsvarande högre organismer, är selektiva substanser sällsynta.

- *Polyener*
Polyener är ett antibiotikum producerat av *Streptomyces*. De binder till ergosterol i cellmembranet och stör på så sätt membranfunktioner vilket dödar cellen. Högre organismer saknar ergosterol och har istället kolesterol.
- *Azoler, allylaminer*
Inhiberar ergosterolbiosyntes.



Studienämnden Kf / Kb

Reglering av metaboliska flöden

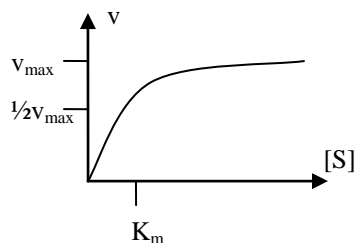
DNA → mRNA → protein → regleringsväg (metaboliter)

Reglering via mängd enzym

- Induktion-repression (ex. Lac-operon)
- mRNA's halveringstid och translationseffektivitet.
- proteinets halveringstid (aktiv nedbrytning av protein t.ex. katabolit inaktivering)
- etc.

Reglering via ändring av proteins aktivitet

- *Substrat- och produktkoncentration*



[S] påverkar v.

[S]_{in vivo} vanligen nära eller något under K_m -värdet.

Produkten kan fungera som kompetitiv inhibition

- *Allosterisk reglering*

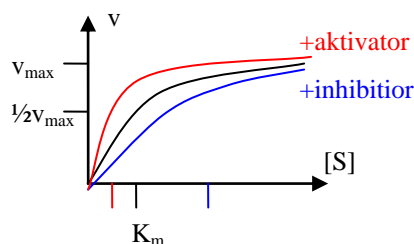
Allosteriska enzym är viktiga för reglering av hastigheter och/eller metabolitkoncentrationer.

- *Homoallosterisk reglering*

Ex. Hemoglobin som kan binda 4 O₂-molekyler. När den första O₂-molekylen bundit in ändras konformationen på hemoglobinet så att affiniteten för ytterligare O₂-molekyler ökar.

- *Heteroallosterisk reglering*

En effektormolekyl (ej substrat) binder in till ett eget bindingsite och påverkar aktiviteten positivt/negativt.



v_{max} påverkas inte men det gör K_m .

Vissa enzym påverkas av många olika effektorer.



Studienämnden Kf / Kb

Rate limiting enzyme

Bygger på tanken att ett hastighetsbegränsande enzym i reaktionsvägen bestämmer hastigheten på reaktionen (ex. fosfofruktokinas i glukolysen). Men eftersom alla reaktioner i metabolismen som är i steady state sker med samma hastighet är det svårt/omöjligt att avgöra vilken av enzymreaktionerna som är den begränsade. Genetisk modifiering som gett överuttryck av fosfofruktoginas har inte gett nämnvärt högre hastighet.

MCA (Metabolic control analysis)

Alla enzym i en reaktionsväg deltar i hastighetsregleringen men i olika grad. Grad av påverkan anges av den s.k. FCC (flux control coefficient). Värdet på FCC ligger mellan 0-1 för varje enzym och summan av FCC i en reaktionsväg är alltid 1. Ett rate limiting enzyme skulle ha $FCC = 1$, övriga 0.



Studienämnden Kf / Kb

Centrala metabolismvägar

Glykolysen, TCA-cykeln, respiration, petosfostatvägen

Metabolism $\begin{cases} \rightarrow & \text{Katabolism = Nedbrytning, energiproduktion} \\ \rightarrow & \text{Anabolism = Biosyntes, uppbyggnad, energikrävande} \end{cases}$

Aerob nedbrytning av organiskt material delas in i tre steg, **Figur 13.1**:

- 1) Oxidation av substrat, bildning av tvåkolfragment (acetylgrupp i Acetyl-CoA), reduktion av NAD^+ , ATP-bildning via substratnivåfosforylering.
- 2) Oxidation av tvåkolfragment i citronsyrcykeln (TCA-cykeln) till CO_2 , reduktion av NAD^+ och FAD , ATP-bildning via substratnivåfosforylering.
- 3) NADH och FADH_2 reoxideras via elektrontransportkedjan, ATP-bildning via oxidativ fosforylering, reduktion av elektronacceptor som "tar hand om" e^- t.ex. $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$.

- 1) Glykolysen : I cytoplasman
- 2) Pyruvatoxidation till acetyl-CoA: I mitokondriens matrix
- 3) Elektrontransportkedjan: I över mitokondriens innermembran (högre organismer).



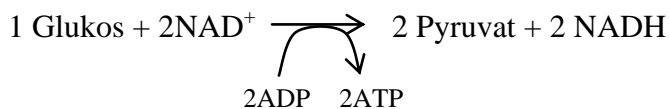
Studienämnden Kf / Kb

Glykolysen

Kap.13

Glykolysen sker i cytoplasman. De viktigaste reglerande enzymerna är hexokinas, fosfofruktokinas och pyruvatkinas. Hastigheten regleras även av intransporthastighet av glukos, mobilisering av reservnäring (t.ex. glykogen) m.m. Glykolysen kan delas in i 10 steg där de fem första är energiinvensterande och de fem sista är energigenererande.

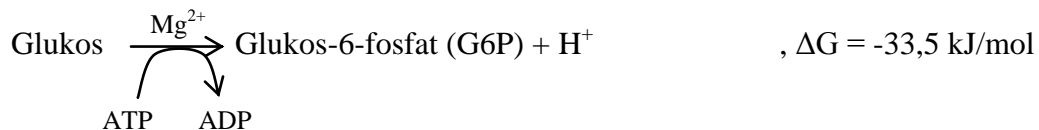
Sammanfattning av hela glykolysen:



Energiinvensterande steg

1) Hexokinas

Fosforylerar glukos via ATP-konsumtion. Irreversibel.
Hexokinas inhiberas av G6P och ev. ATP.



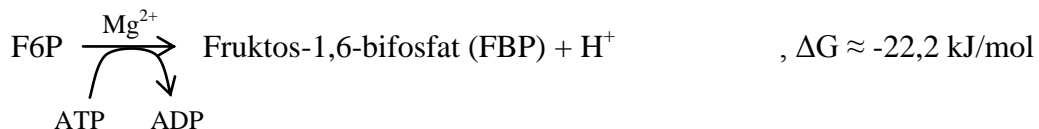
2) Fosfoglukoisomeras

Katalyserar isomerisering av G6P (bollar om 6-kolringen till en 5-kolring med flagga). Reversibel.



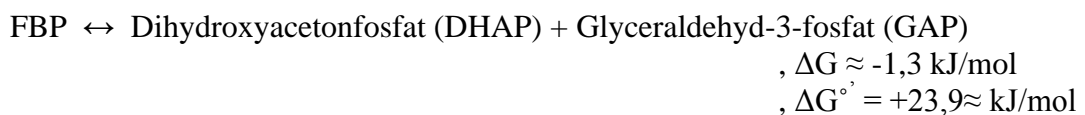
3) Fosfofruktokinas

Fosforylerar F6P via ATP-konsumtion.
Fosfofruktokinas är ett allosteriskt enzym som främst inhiberas av ATP men även av citrat. Aktiveras gör det av främst AMP men även ADP, ammonium (NH_4^+) och fruktos-2,6-bifosfat.



4) Fruktos-1,6-bifosfaldolas

Klyver F-1,6-P till två triosfosfater. Reversibel.





Studienämnden Kf / Kb

Koncentrationer av DHAP och framför allt GAP är mycket låga.

5) Triosfosfatisomeras

Genomför isomerisering av DHAP till GAP. Reversibel



ΔG är dock fel eftersom koncentrationen av GAP är oerhört låg vilket gör att det är svårt att bestämma den exakt.

Sammanfattning av steg 1-5, den energiinversterade fasen, i glykolysen:



Energigenererande steg

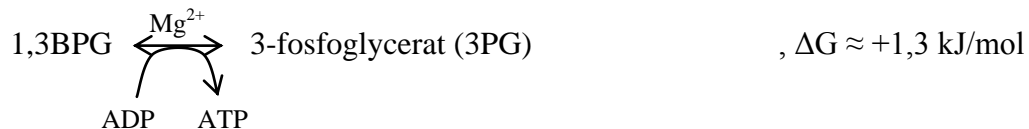
6) Glycerinaldehyd-3-fosfatdehydrogenas

Oxiderar karbonylgruppen och bildar på så sätt NADH samt högenergiföreningen 1,3-bifosfoglycerat (1,3BPG). Reversibel. Inhiberas av jodacetat.



7) Fosfoglyceratkinas

Katalyserar överföring av acylfosfat från 1,3BP till ADP vilket ger bildning av ATP via fosforylering på substratnivå. Irreversibel.



8) Fosfoglyceratmutas

Katalyserar isomerisering av 3PG till 2-fosfoglycerat (2PG). Reversibel.



9) Enolas

Omvandlar 2PG till högenergiföreningen fosfoenolpyruvat (PEP). Reversibel.

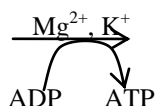


10) Pyruvatkinas

Överför fosforylgrupp till ADP vilket ger bildning av ATP via fosforylering på substratnivå. Irreversibel.

Pyruvatkinas inhiberas av ATP och acetyl-CoA. Det regleras också via en feed forward-aktivering av FEP för att undvika ackumulering av intermediärer.

Allosteriskt enzym. I levern är det inaktivt när det är fosforylerat och vice versa.





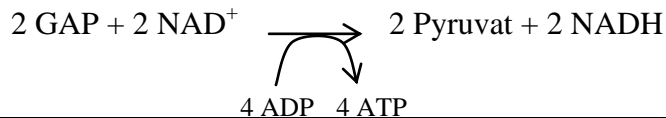
Studienämnden Kf / Kb

PEP

Pyruvat

, $\Delta G \approx -16,7 \text{ kJ/mol}$

Sammanfattning av steg 6-10, den energiinversterade fasen, i glykolysen:



PEP används också via glukoneogenes (omvänd glykolys) till bildning av G6P och produktion av glykogen.

Lever

Fosforylerad – defosforylerad form
Ej aktiv Aktiv

PEP vid gluconeogenes till glykogensyntes

Isoenzym

Många enzym i kroppen förekommer i flera olika former. Dessa andra varianter av enzymet kallas isoenzym (isozym). De katalyserar samma reaktion som ”originalenzymet” men har små skillnader i aminosyrasammansättningen. Det förekommer isoenzym i de flesta steg i glykolysen. Anledningen till att det finns olika uppsättningar av enzym är okänd. Olika kinetik, co-faktorer.

”Adenylat Energy change” (EC)

Man kan se cellen som ett batteri som är fullt laddat när allt adeninfosfat finns i form av ATP och fullt urladdat när allt är i AMP form. EC är proportionell mot antalet energirika bindningar i cellen. Välnärda aeroba celler har ett EC som ligger när 0.9

$$EC = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2} [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

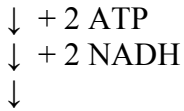


Studienämnden Kf / Kb

Fermentation

Kap.13

Glykos



Pyruvat

I glykolysen reduceras NAD^+ till NADH som sedan måste återoxideras. Gör inte det avstannar glykolysen p.g.a. brist på NAD^+ och redoxbalansen rubbas. Redoxbalans betyder att det inte finns någon nettoproduktion/-konsumtion av NADH .

Återoxideringen sker som följer,

Aerobt: Via mitokondriell elektrontransport (kap 15).

Anaerobt: Via fermentation.

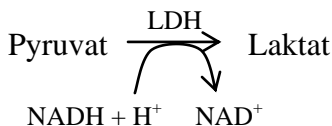
I fermentation används ingen extern elektronacceptor (aerobt = O_2) utan istället sker omlagringar i befintliga molekyler.

Fermentation innebär ofta snabba förlopp. Generationstiden för bagerijäst är ca 2h vid fermentaiton och ca 4h eller längre vid respiration.

Laktat, mjölksyräjäsning

Skär i skär i djurceller vid syrebrist samt i mjölksyrabakterier.

LDH = laktatdehydrogenas katalyserar vad?

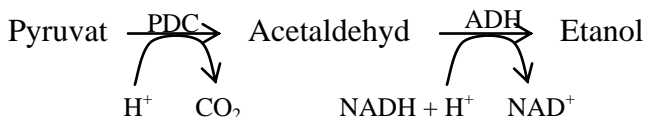


Etanolbildning

Skär t.ex. i *Saccharomyces cerevisiae* (bagerijäst) i två steg.

PDC = Pyruvatdekarboxylas

ADH = Alkoholdehydrogenas



Elektronbalansberäkning

Pyruvat är mer oxiderat än glukos. Laktat har samma reduktionsgrad som glukos medan etanol är än mer reducerat.

Degree of reduktion (γ): Antalet tillgängliga elektroner per antal mol C av ett ämne.

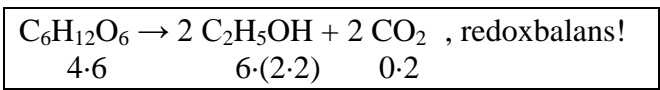
1 mol C = 12 g C

C = 4st H = 1st O = -2st



Studienämnden Kf / Kb

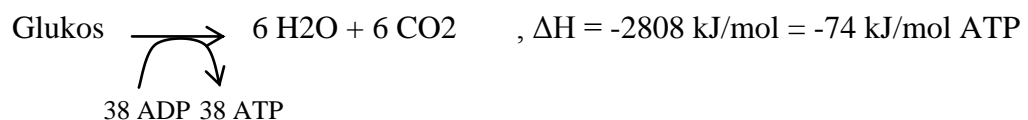
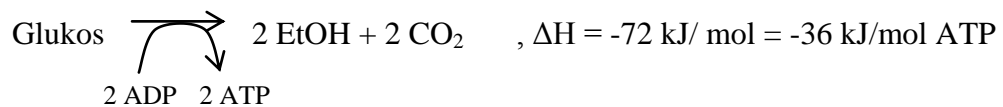
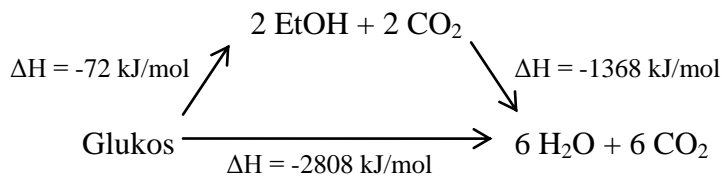
- Glukos $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_2O$, som har samma proportioner
 $\gamma = (1 \cdot 4 + 2 \cdot 1 + 1 \cdot (-2)) / 1 = 4$ (alt. $\gamma = (6 \cdot 4 + 12 \cdot 1 + 6 \cdot (-2)) / 6 = 4$)
- Etanol $C_2H_5OH \rightarrow CH_3O_{1/2}$
 $\gamma = (1 \cdot 4 + 3 \cdot 1 + 1/2 \cdot (-2)) / 1 = 6$
- Koldioxid CO_2
 $\gamma = (1 \cdot 4 + 2 \cdot (-2)) / 1 = 0$, maximalt oxiderad form av C.
- Metan CH_4
 $\gamma = (1 \cdot 4 + 4 \cdot 1) / 1 = 8$, maximalt reducerad form av C.



En del av glukosmolekylen reduceras till koldioxid och en annan oxideras till etanol.

Energiutbyte

Etanolbildning och mjölksyrejäsnig ger 2 ATP/Glukos. En stor del av den tillgängliga energin från substratet (glukos) finns bevarad i form av fermentationsprodukt. Detta gör att effektiviteten inte behöver vara lägre än för respiration även fast man jämförelsevis får ut mindre ATP.



Fermentation ofta snabba processer ex.vis jäst.
 Generationstid fermentation ~ 2 timmar
 Generationstid respiration 4 timmar eller längre

Pasteur effekt

Anaerob \rightarrow anaerob transition medför lägre glykolyshastighet på grund av fler ATP bildas per glukos förbrukad.



Studienämnden Kf / Kb

Med pasteur effekt endas synlig vid vissa förhållanden.



Studienämnden Kf / Kb

Alternativa socker

Kap. 13

Monosackarier

Gluktos, fruktos, maos kan utnyttjas och omvandlas till olika intermediärer i glykolysen.

Disackarier

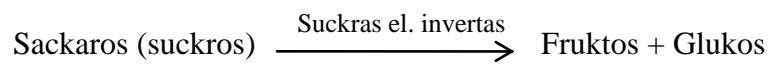
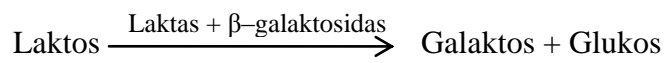
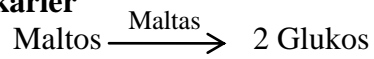


fig 13:12



Studienämnden Kf / Kb

Polysackarier

Polysackarier är ofta svårnedbrytna för de flesta organismer.

Växter har sin upplagsnäring i form av stärkelse medan djur och många mikroorganismer har det i form av glykogen.

Glykogen kan brytas ner via:

- *Hydrolys* → Sockerenheter

Sockerenheterna lättare transporteras över membranerna men kräver ATP för vidare metabolism.

Hydrolys sker via α -amylas (saliv) som bryter $\alpha(1-4)$ -bindningen mellan sockerenheterna och bildar på så sätt maltos + glukos. α -amylas klarar inte av $\alpha(1-6)$ -bindningar, något som glukosidas gör. Glukosidas bryter ner stärkelse och glykogen till glukos.

- *Fosforylering* → Glykogen + Sockerenheter — P

Den fosforylerade sockerenheten kan metaboliseras direkt utan medverkan av ATP men den är svårare att transportera.

Mobilisering av glykogen (fosforylys)

Glykogenfosforylas: Bryter $\alpha(1-4)$ -bindningen och bildar fria glukos-1-fosfat-enheter. Var fjärde glukosenhet förgrenar sig sockerkedjan med en $\alpha(1-6)$ -bindning. Precis som α -amylas klarar inte glykogenfosforylas att ta sig förbi dessa $\alpha(1-6)$ -brytpunkter.

- Glukantranseras*:
- Bryter $\alpha(1-4)$ -bindning och flyttar tre ihopsittande glukosenheter (trisackarid) till en annan grenände vilket gör att glykogenfosforylas kan fortsätta sin aktivitet där.
 - Kan också bryta $\alpha(1-6)$ -bindningen i förgreningspunkterna så att glykogenfosforylas har tre nya och fräscha glukos att ta tag i.

Sammanfattningsvis bryter dessa två ner glykogen till främst glukos-1-fosfat men även glukos.

G1P kan via fosfoglykomutas omvandlas till G6P som antingen kan fortsätta till glykolysen (in vid steg 2) eller via fosfatas omvandlas till glukos som kan levereras till andra celler (ex. lever, tarm).

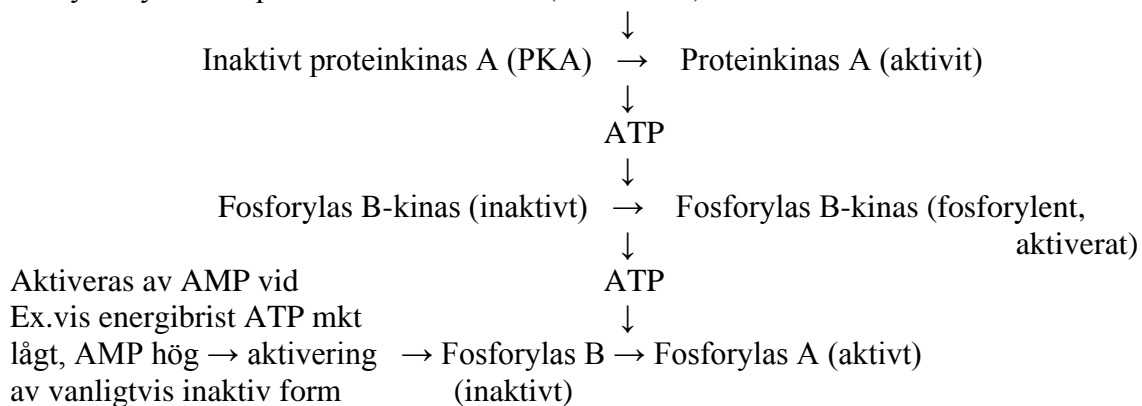


Studienämnden Kf / Kb

Reglering av glykogenmobilisering (glukogenfosforylas)

- 1) Epinefrin (adrenalin) binder till receptor i cellmembranet som aktiverar ett G-protein.
- 2) Detta stimulerar i sin tur adenylatcyklas som sätter igång bildning av cAMP, en reaktion som kräver 1 ATP/ bildad cAMP.
- 3) cAMP aktiverar proteinkinase A (PKA) som i sin tur fosforylerar, och därigenom aktiverar, fosforylas-B-kinas via ATP-konsumtion. Fosforylas-B-kinas består av flera subenheter varav en calmodulin (kalciumbindande protein) som påverkas av Ca^{2+} -halt.
- 4) Fosforylas-B-kinas är nu fosforylerat och redo att arbeta. 2 ATP går åt när den fosforylerar och aktiverar fosforylas B till fosforylas A (B = inaktiv, A = aktiv + fosforylerad). Fosforylas B aktiveras allosteriskt av AMP vid energibrist eller svält.

Epinefrin (adrenalin) binder receptor på cellytan → aktivering av G-protein → stimulerar adenylat cyklas → produktion av c-AMP (krävs ATP)



Fosforylas B-kinas innehåller flera subenheter bland annat calmodulin (Ca modulating), dvs. aktiveras av kalcium. Esterasen bryter ner c-AMP.

Fig 13:18



Studienämnden Kf / Kb

Bildning av acetyl-CoA

Kap. 14

Enzymnomenklatur

Nedstående är inte 100% rätt, det finns undantag.

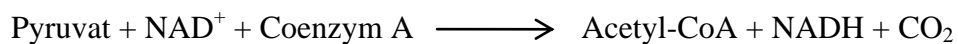
<i>Dehydrogenaser:</i>	Avlägsnar H^+ från e^- -donator, oxiderar, fungerar som e^- -donator för NAD^+ och FAD^+ .
<i>Oxidaser:</i>	Ett enzym som katalyserar en oxidation av ett substrat med O_2 som e^- -acceptor.
<i>Oxygenaser:</i>	O_2 förenas med substrat som oxideras.
<i>Kinaser, fosfataser:</i>	Katalyserar fosforylering resp. defosforylering.
<i>Karboxylaser, dekarboxylaser:</i>	Inkorporering resp. avlägsning av CO_2 .

Pyruvatoxidation

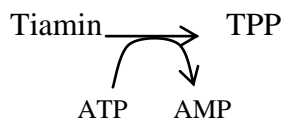
Pyruvat oxideras till acetyl-CoA i mitokondriens matrix.
Omvandlingen av pyruvat till acetyl-CoA är en oxidativ dekarboxylering som katalyseras av ett pyruvatdehydrogenas-komplex. Dekarboxyleringen är irreversibel.

Komplexet består av tre enzym: Pyruvatdehydrogenas (E_1)
Dihydrolipoamidtransacetylas (E_2)
Dehydralipoamiddehydrogenas (E_3)

Tills in hjälp har enzymkomplexet fem coenzym:
Triaminpyrofosfat (TPP) (bundet till E_1)
Liponsyra (bundet till E_2)
FAD (bundet till E_3)
NAD
Coenzym A (CoA—SH)



Coenzymet triaminpyrofosfat bildas via "dubbelfosforylering" av tiamin (vitamin B_1).

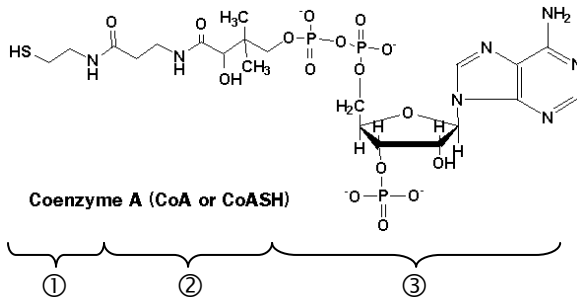


FAD (flavin-adeninedinukleotid) och FMN (flavinmononukleotid) har samma funktion som $NAD^+/NADP^+$ men kan genomföra 2 1-elektronöverföringar \rightarrow $FADH_2/FMNH_2$.



Studienämnden Kf / Kb

Coenzym A består av ① β -Mercaptoetylamin, ② pantotensyra (vitamin) och ③ ATP.



- 1) Pyruvats anjon (efter att ha släppt en vätejon ifrån karboxylgruppen) är en ketosyra. TPP dekarboxylerar ketosyran och bildar en aktiverad aldehyd (ej oxiderad).
Figur 14.6
- 2) Den aktiva aldehyden överförs från TPP till liponsyra samtidigt som den oxideras (medan liponsyrans disulfid reduceras). På så sätt skapas en acyl-grupp.
- 3) Acylgruppen överförs av pyruvatdehydrogenas-komplexet till Coenzym A vilket ger Acetyl-CoA.

Reglering av pyruvatdehydrogenas

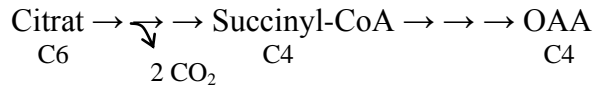
- *Allosterisk kontroll*
Inhibitorer: Acetyl-CoA
NADH
ATP
Aktivatorer: CoA—SH
NAD⁺
AMP
- *Kovalent modifiering*
Fosforylerad form av pyruvatdehydrogenas är inaktiv. Fosforyleringen och defosforyleringen sköts av pyruvatdehydrogenas-kinas resp. pyruvatdehydrogenas - fosfatas. Pyruvatdehydrogenas-fosfatas aktiveras av Ca²⁺ och Mg²⁺. ATP binder mer Mg²⁺ än AMP vilket gör att höga ATP-nivåer ger låga Mg²⁺-nivåer som i sin tur sänker fosfatasaktiviteten. På så sätt ger höga ATP-nivåer lägre aktivitet på pyruvatdehydrogenas.



Studienämnden Kf / Kb

Citronsyrcykeln

TCA-cykeln inleds med att en C₂-förening (från acetyl-CoA) adderas till oxalättiksyra (OAA) vilket bildar citrat (salt av citronsyra).



Den viktigaste regleringen sker via NAD⁺/NADH-kvoten. Hög NADH-halt ger låg aktivitet i TCA-cykeln.

Fig 14:3



Studienämnden Kf / Kb

Fas 1: Introduktion och förlust av två kolatomer

1) Citratsyntas

Katalyserar inkorporering av C₂.

Allosterisk reglering: inhiberas av NADH, NADPH och succinyl-CoA.



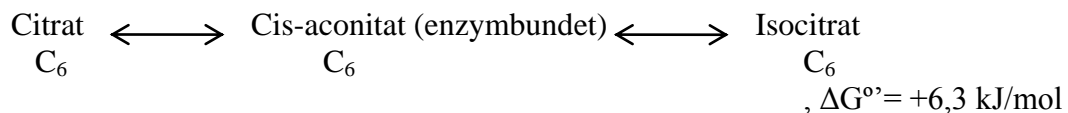
ΔG° är stort och negativt, men vid cellulära koncentrationer ligger ΔG nära 0.

OAA-koncentrationen är mycket låg.

2) Aconitas

Katalyserar isomerisering av citrat.

Flouroacetat som finns i vissa pesticider (bekämpningsmedel) inhiberar aconitas och gör att organismen inte kan föröka sig.



Nästföljande reaktion har lågt ΔG vilket gör att isocitrat-koncentrationen hålls låg och ovanstående reaktion drivs åt höger, trots positivt ΔG° -värde.

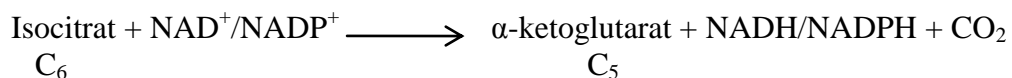
3) Isocitratdehydrogenas

Katalyserar oxidativ karboxylering.

Allosterisk reglering: Inhiberas av NADH och aktiveras av ADP.

Kovalent modifiering: Fosforylerad form kan inte binda till isocitrat och är därför inaktivt.

En NAD⁺-specifik form av isocitratdehydrogenas finns i mitokondrierna och är troligtvis den mest aktiva i TCA-cykeln. Det finns också en NADP⁺-specifik form som hittas både i cytoplasman och i mitokondrierna.

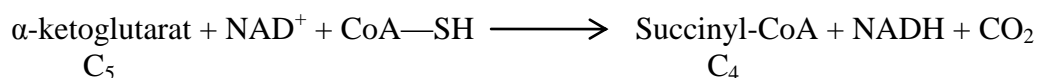


4) α -ketoglutaratdehydrogenas-komplex

Katalyserar oxidativ karboxylering.

Enzymet är ett komplex liknande pyruvatdehydrogenas. Det består av 3 enzym och samma 5 coenzym som pyruvatdehydrogenas.

Allosterisk reglering: inhiberas av NADH och succinyl-CoA.



STEG 3 OCH 4 ÄR NYCKELREAKTIONER! Produktion av NADH samt α -ketoglutarat som är en nyckelsubstans vid aminosyrabiosyntes. Komplex reglering.

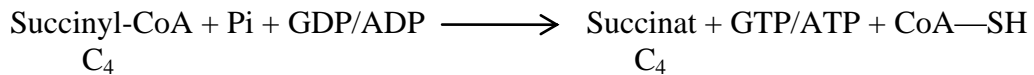


Studienämnden Kf / Kb

Fas 2: Regeneration av oxalättiksyra

5) Succinyl-CoA-syntetas

Katalyserar produktion av ATP/GTP via fosforylering på substratnivå.



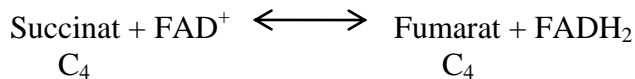
6) Succinatdehydrogenas

Katalyserar produktion av FADH_2 .

Identisk med Komplex II i elektrontransportkedjan.

FAD är starkare oxidant än NAD^+ (redoxpotential närmare O_2) vilket behövs eftersom en C—C-bindning är svårare att oxidera än en C—O-bindning.

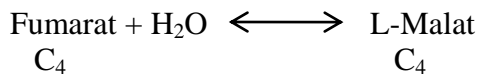
FAD är kovalent bundet till enzymet som i sin tur binder till mitokondriens innermembran. FADH_2 reoxideras senare via interaktion i e^- -transportkedjan.



7) Fumaras

Hydrerar C=C-bindningen

Enzymet kan inte verka på cis-isomeren av fumarat (maleat) i framåtreaktionen. Inte heller kan den verka på D-malat i bakåtreaktionen.



8) Malatdehydrogenas

Producerar NADH.



Trots det positiva ΔG° drivs reaktionen till höger eftersom citratsyntasreaktionen (steg 1) har ett så stort negativt ΔG° och på så sätt håller OAA-koncentrationen låg. Därför blir ΔG negativ.



Studienämnden Kf / Kb

Anapleurotiska vägar

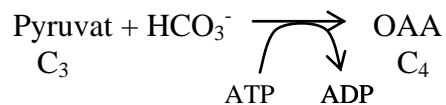
Citronsyrcykeln intermediärer används också som precursorer i biosyntes. Därför behövs "påfyllnadsreaktioner", s.k. anapleurotiska vägar, för att inte TCA-cykeln skall avstanna p.g.a. brist på OAA.

1) Pyruvatkarboxylas

Katalyserar ATP-beroende karboxylering av pyruvat.

Allosterisk reglering: aktiveras av acetyl-CoA genom en feed forward-mekanism.

När CO₂ löser sig i blodet bildas kolsyra vars anjon är HCO₃⁻



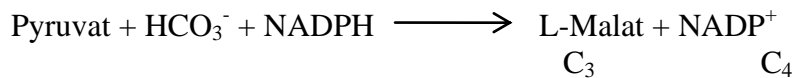
2) Fosfoenolpyruvatkarboxylas

Finns i växter och bakterier.



3) "Malic enzym"

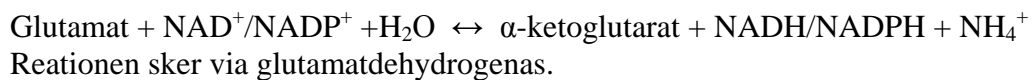
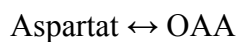
Mer exakt namn: "malatdehydrogenas(dekarboxylerar:NADP⁺)".



4) Transamineringar

En aminogrupp överförs från aminosyra till ketosyra.

Ex:

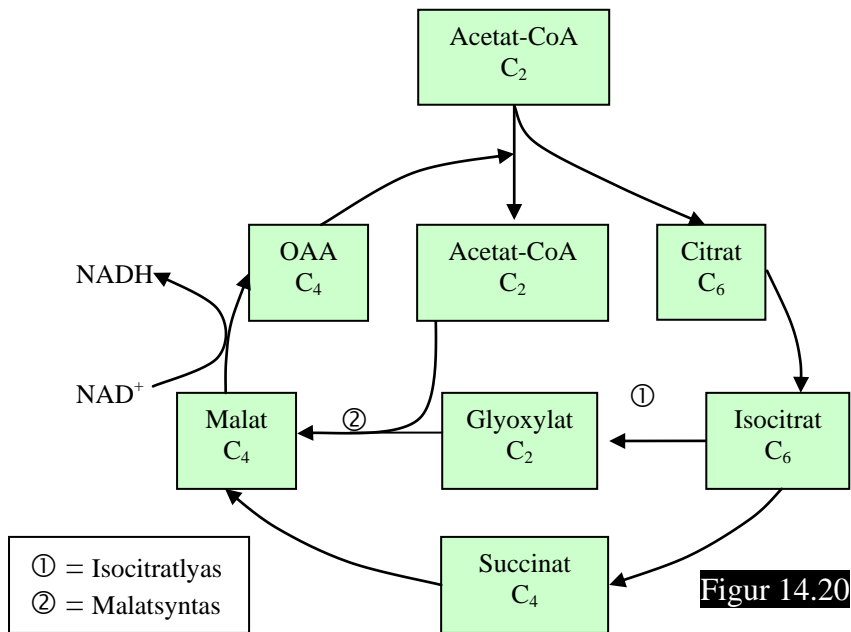


Glyoxylatcykeln

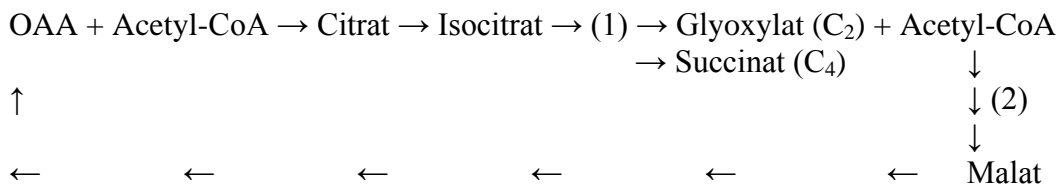
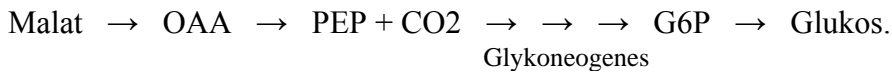
Glyoxylatcykeln är som en anabol (vävnadsuppbyggande) variant på TCA-cykeln som omvandlar fet till kolhydrater. Många av enzymen är gemensamma med TCA-cykeln men de CO₂-producerande stegen hoppas över (bypassing). Den förekommer endast i växter och i vissa mikroorganismer, s.k. Glyoxysomer. Cykeln tillåter många mikroorganismer att leva på C₂-substrat t.ex. acetat som enda kolkälla. Detsamma gäller vissa svampar, protozoter (encelliga djur) och alger. Ett varv i cykeln innebär sammanslagning av två acetyl-CoA till en succinat.



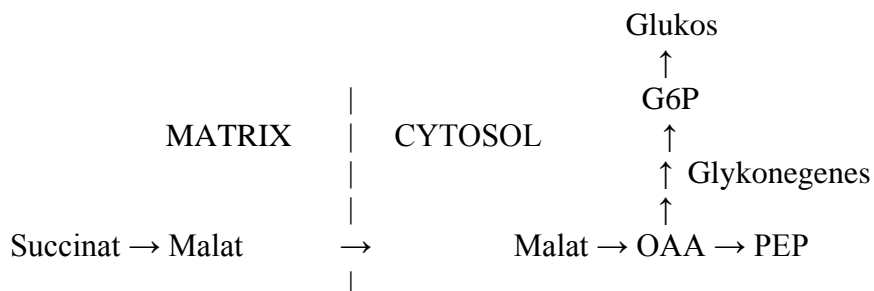
Studienämnden Kf / Kb



Succinatet transporteras till mitokondrierna där det i matrixen omvandlas till malat som antingen kan tuffa vidare i citronsyracykeln eller transporteras ut i cytoplasman. Väl där ute kan följande reaktion ske:



- (1) Isocitratlyas
 - (2) Malatsyntes $\Sigma 2 \text{ Acetyl-CoA} \rightarrow 1 \text{ Succinat}$
- Succinat exporteras till mitokondrier





Studienämnden Kf / Kb

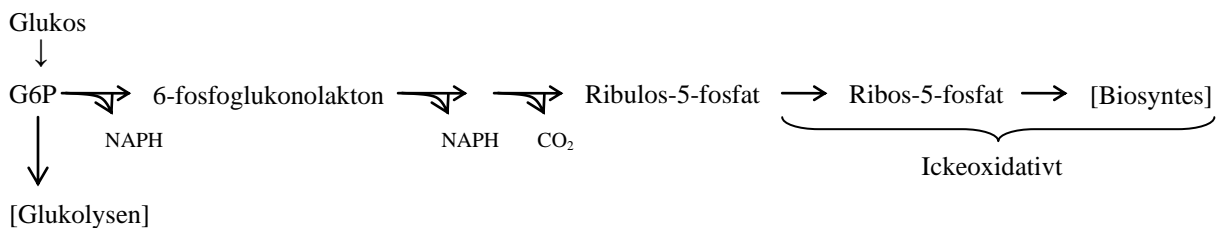
Pentosfosfatvägen

Reaktionerna sker i cytoplasman och har två primära funktioner:

- 1) Produktion av NADPH (blå reducerande kraft vid biosyntes).
- 2) Produktion av ribos-5-fosfat som är en precursor i syntesen av nukleotider och nukleinsyror.

Oxidativa fasen

Oxidativa fasen av pentosfosfatvägen producerar 2 NADPH och 1 CO₂.



Figur 14.25 a)

Ickeoxidativa fasen

Ickeoxidativa fasen av pentosfosfatvägen används t.ex. vid stort behov av NADPH men inte nukleinsyror.

(Vägen kommer inte på tentan men nettoreaktionen är viktig.)

Fruktos-6-fosfat = F6P

Glyceraldehyd-3-fosfat = GAP



Figur 14.25 b)

Sammanfattning

- Nukleotidbiosyntes kräver ribos-5-fosfat-produktion.
- NADPH-produktion ger även F6P och GAP. F6P kan omvandlas till G6P via glukoneogenes och ännu pentosfosfatvägen ånyo.
- För att försörja cellen med energi produceras GAP och F6P som båda kan omvandlas till pyruvat och därefter ännu TCA-cykeln.



Studienämnden Kf / Kb

Elektrontransportkedjan och oxidativ fosforylering

Kap. 15

Reaktionerna sker i/över mitokondriens innermembran som består av ~70% proteiner och 30% lipider. Hos bakterier, som inte har mitokondrier, sker den i/över cellmembranet. (Endosymbiosteorin)

Fig 15:2 b

Elektronbärarna är organiserade så att redoxpotentialen succesivt ökar.



På så sätt frigörs energi när elektronerna vandrar i elektrontransportkedjan. Energin används för att pumpa protoner mot koncentration- och laddningsgradienten över innermembranet. Genom att göra det byggs en elektrokemisk kraft upp (laddning- och konc.skillnad). (pmf = proton motive force, protongradient)

När protonerna sedan vandrar med gradienten genom enzymet ATPas frigörs energi som används för syntes av ATP.

Elektrokemi

Reduktionspotential: Mått på ett ämnes tendens att oxideras/reduceras. Låg reduktionspotential innebär att ämnet lätt oxideras (ex. NAD^+/NADH). Hög reduktionspotential innebär att ämnet lätt reduceras (ex. $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$).

$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E_0'$, n = antalet elektroner
F = Faradays konstant
 $\Delta E_0'$ = skillnaden i redoxpotential emellan e^- -donatorn och e^- -acceptorn.

$$E = E_0' + (2.303RT / nF) \cdot \log([e^- \text{-acc}] / [e^- \text{-don}])$$

$$\Delta E_0'(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -0.32 \text{ V}$$

$$\Delta E_0'(\text{FAD}^+/\text{FADH}_2) = -0.22 \text{ V}$$

Bakterier stor variation både vad gäller e^- donator och e^- acceptor.

e^- donator kan vara H_2 , H_2S , S, NO_2^- , Fe^{2+}

”Kemolitotrofer” – energi via oxidation av organiska ämnen

e^- acceptor O_2 , men även NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^- förekommer

e^- acceptor måste ha högre reduktionspotential än e^- donator

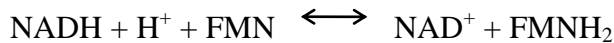
Komponenter i elektrontransportkedjan

1. Komplex I: NADH-dehydrogenas

FMN binder till komplexet och katalyserar återoxideringen av NADH till NAD^+ .



Studienämnden Kf / Kb



Komplexet innehåller även ett antal Fe^{2+}S -protein (järn-svavel). Dessa tar emot de två elektroner som FMN tagit emot och skicar de vidare till CoQH_2 .

2. Komplex II: Succinatdehydrogenas

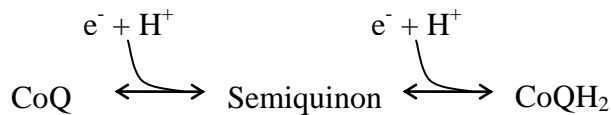
Enzymet oxiderar succinat till fumarat och använder sig av ett FAD-coenzym till elektronöverföringen. Komplexet är bundet till innermembranet och kan därifrån, ifrån FADH_2 och via Fe^{2+}S , föra vidare elektronerna till CoQH_2 .

Succinat \rightarrow Fumarat.

3. Coenzym Q (Ubiquinon)

CoQ är mycket lipofil och kan därför röra sig förhållande fritt i membranet ("mobil lipofil").

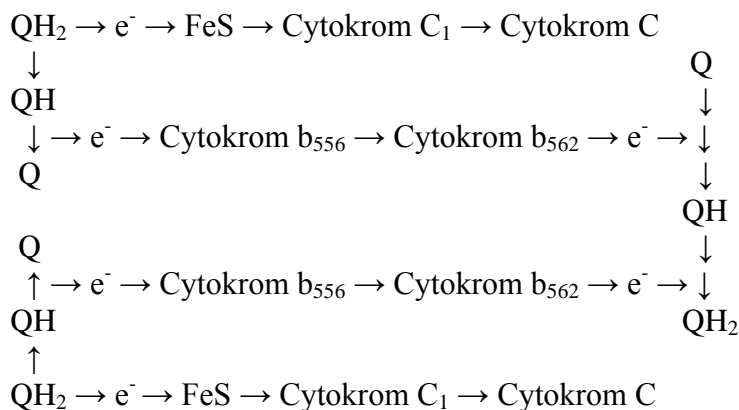
Genomgår oxidation/reduktion med en e^- i taget.



Reduceras både av NADH-dehydrogenas och succinatdehydrogenas.

4. Komplex III: CoQoxidoreduktas

Komplexet oxiderar CoQH_2 , en e^- i taget, i den s.k. Q-cykeln.



$\Sigma 2 \text{CoQH}_2$ oxideras och en CoQ reduceras



Studienämnden Kf / Kb

2 e⁻ frigörs och reducerar Cytokrom C

5. Cytokrom c

Litet komplex som är relativt mobilt.

6. Komplex IV: Cytokromoxidas

Byggs upp av cytokrom a och cytokrom a₃. I eukaryoter kan komplex bestå av upp till 13 polypeptidkedjor. Det är här reduktionen av O₂ till H₂O sker.

7. Komplex V: ATPas

F₀F₁-komplex eller F₀F₁-ATPas.

Komplexet består av en F₀-del som går igenom mitokondriens innermembran och en F₁-del som befinner sig i matrixen. Det är igenom F₀-delen som protonerna transporteras så att F₁-delen kan använda den energi som frigörs till att syntetisera ATP av ADP + P_i.

Oligomycin kan bilda till ett protein i F₀ och därigenom blockera protonflödet genom komplexet.

Inhibitorer

- Rotenon, amytal: Blockerar komplex I. Rotenon förlamar eller dödar fisk och används bl.a för att utrota exotisk fisk från ställen där de inte hör hemma. Jäst är dock okänslig.
- Antimycin A: Blockerar komplex III.
- Cyanid, CO, Azid: Blockerar komplex IV. Toxiskt dödligt för människor. Vissa växter och bakterier kan fungera ändå.

Redoxskyttlar

NADHdehydrogenas (komplex I) är lokaliserat i innermembranet mot matrixsidan i mitokondrien. NADH kan inte passera mitokondriemembran vilket gör att NADH som producerats i cytoplasman, t.ex. via glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenas, måste transporteras in i matrix för att oxideras i e⁻-transportkedjan. Detta löses med s.k. skyttlar.

Fig 15:11

- a) Glycerol-2-fosfatskytteln. b) Malat-/Aspartatskytteln.



Studienämnden Kf / Kb

Oxidativ fosforylering

P/O-kvot = ATP bildad per $2e^-$ el. ATP bildad per $\frac{1}{2}O_2$.

P/O (NADH) = 3

P/O ($FADH_2$) = 2

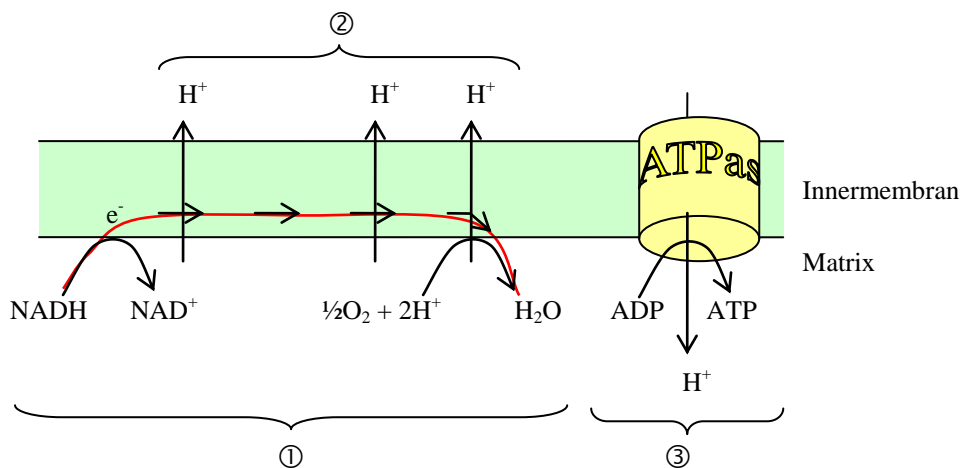
Glykolys	→ 2 ATP	→ 2	}	$\Sigma P/O = 38$ ATP/glukos (eg. 36?)
	2 NADH	→ $2 \cdot 3 = 6$		
Pyruvatox.	→ 2 NADH	→ $2 \cdot 3 = 6$		
TCA-cykeln	→ 6 NADH	→ $6 \cdot 3 = 18$		
	2 $FADH_2$	→ $2 \cdot 2 = 4$		
	2 ATP	→ 2		

Experimentella resultat är nära eller aningen lägre än dessa värden. För NADH är P/O-kvoten troligen närmare 2-2,5.

Jäst borde teoretiskt ha P/O = 2 för NADH eftersom komplex I saknar protonpumpande aktivitet. Experimentellt erhålls värden på 1-1,5.

”Coupling sites”: 3 steg i e^- -transportkedjan som vart och ett är tillräckligt exoterma för att 1 ATP skall kunna syntetiseras. Komplex I, III, IV.

Bioenergetik



1. Redoxpotentialen (och konc.) avgör hur mycket energi som frigörs när NADH oxideras och O_2 reduceras.
 $\Delta G^{\circ} = -220$ kJ/mol
2. Den energi som krävs för att pumpa över ytterligare protoner över membranet resp. den energi som frigörs när H^+ går med protongradienten genom ATPas, avgörs av pHgradienten samt membranpotentialen.
 $\Delta G^{\circ} \approx -21$ kJ/mol



Studienämnden Kf / Kb

3. Den energi som krävs för att syntetisera 1 ATP beror av koncentrationen av ATP, ADP, P_i, H⁺ etc.
 $\Delta G^{\circ} = -31 \text{ kJ/mol}$

”Leak” och ”slip” sänker effektivitet.

Leak: Protoner läcker genom membranet utan att passera ATPas. Membranet är bara *nästan* impermeabelt för protoner.

Slip: Färre protoner pumpas i komplexet; de slirar.

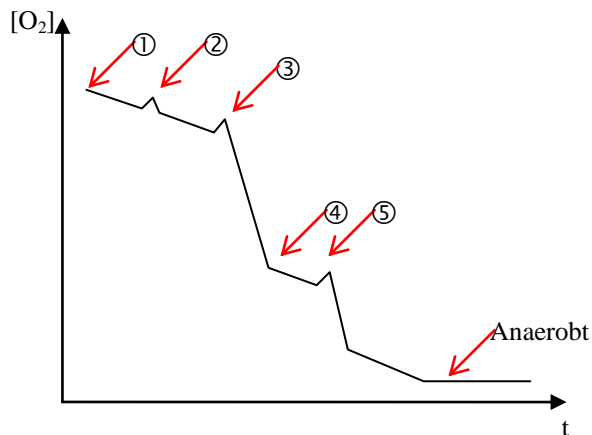
Frikopplare (uncoupler)

Frikopplare tar sig in genom membranen och transporterar de överpumpade protonerna tillbaka till matrix. På så sätt förstörs protongradienten och ATP kan inte syntetiseras; elektrontransporten är frikopplad. Tillsatts av frikopplare ger maximal respirationshastighet.

Ex: 2,4DNP (dinitrofenol)

Reglering av respiratorisk hastighet

- *Substratbegränsning*
ADP, P_i, O₂, NADH, FADH₂.
- *”Respiratory control”*
Elektrontransport sker endast vid ATP-syntes.
ADP stimulerar respiration medan ATP inhiberar.



- ① Tillsats av mitokondrier.
- ② Tillsats av oxiderbart substrat (NADH)
- ③ Tillsats av ADP.
- ④ Tillsats av oligomycil
- ⑤ Tillsats av frikopplare (2,4DNP)

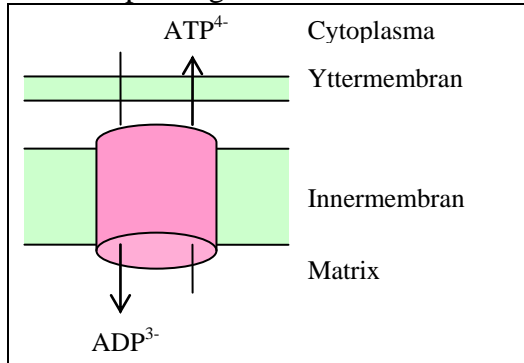
Syrekonsumtionen före jämfört med efter tillsatsen av ADP är ett kvalitetsmått på mitokondrierna. Är det stor skillnad i respirationshastighet är mitokondrierna bra. Oligomycil blockerar protontransporten ut till matrix genom ATPas. En hög membranpotential byggs då upp som leder till att elektrontransporten avstannar. DNP fungerar som frikopplare som förstör protongradienten. Därför kan respirationen fortsätta, trots närvaro av oligomycil, i maximal respirationshastighet.



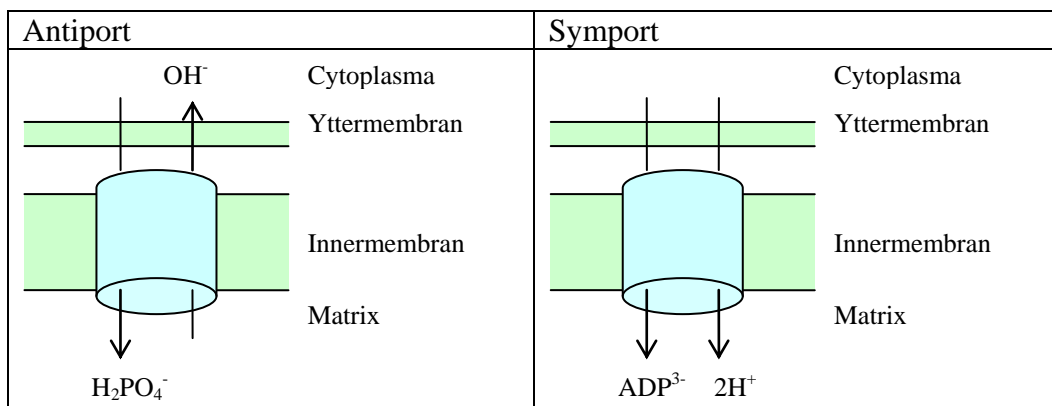
Studienämnden Kf / Kb

Mitokondriella transportsystem

- *Adeninnukleotidtranslokas*
Drivs av protongradient.



- *Fosfattranslokas*
Kan antingen fungera som antiport eller symport beroende på protongradient (pH).



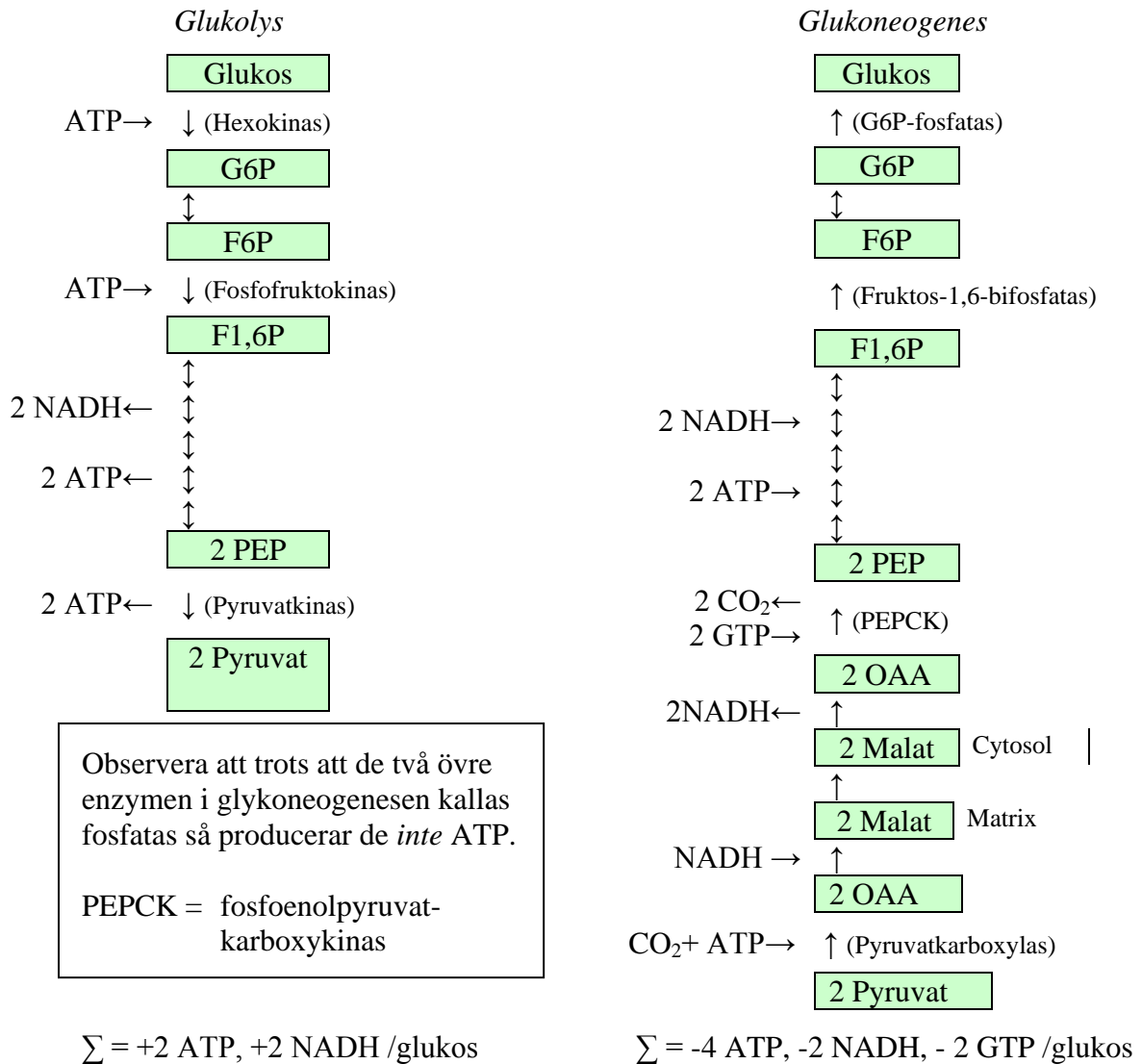


Studienämnden Kf / Kb

Biosyntes

Glukoneogenes

Glukoneogenes fungerar ungefär som glykolysen fast baklänges. Det sker främst i levern som utnyttjar precursorer från proteiner och fetter.



Reglering av glukoneogenes

Glukolys och glukoneogenes ha reciprok (motsatt) reglering. I stort sett kan man säga att det som aktiverar glukoneogenes inhiberar glukolys (se nedan).

Insulin och glukagon är två hormoner vars koncentrationer reglerar mot varandra (hög insulin → låg glukagon).

Fruktos-2,6-bifosfat inhiberar glukoneogenes och aktiverar fosfofruktokinas (steg 3 glukolys) men *in vivo* betydelse oklar. Mutanter som överproducerar eller inte syntetiserar fruktos-2,6-bifosfat alls uppträder i naturen.

Fig 16:6

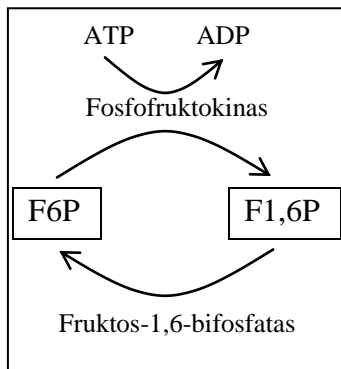


Studienämnden Kf / Kb

Futila cykler

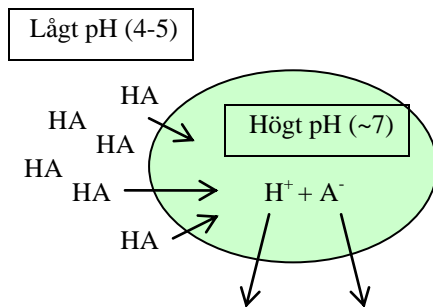
Futil = onödig

Ex. Fruktos-1,6-bifosfat bryts aktivt ner via s.k. katabolit inaktivering om glukos funns tillgängligt i cellen.



Det enda som händer är att ATP förbrukas.

Ex. Frikoppling via svaga syror (HA).

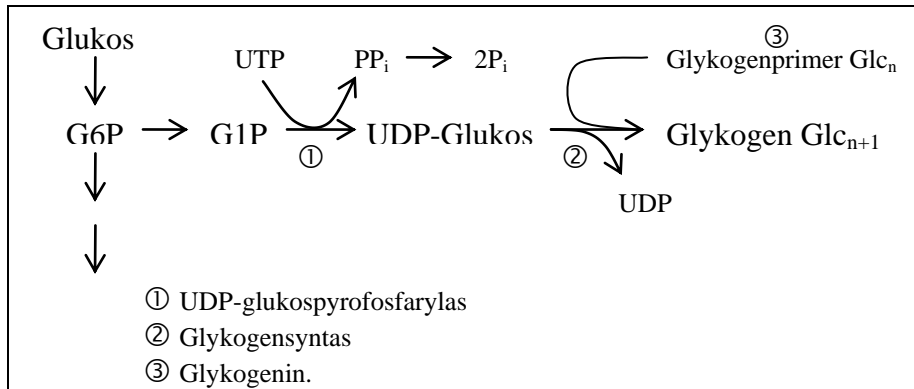


För att bibehålla det höga pH måste syran pumpas ut. Detta kostar ATP.

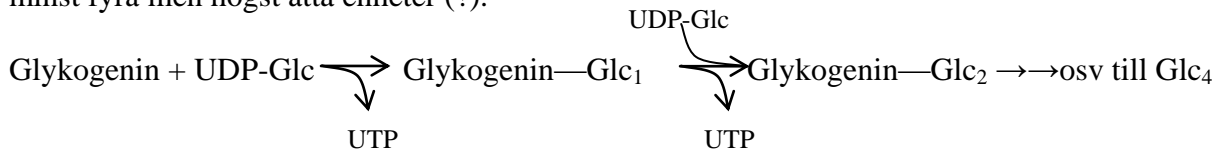


Studienämnden Kf / Kb

Glykogenbiosyntes



Glykogenprimern är en kort kedja av glukosenheter producerad av glykogenin och består av minst fyra men högst åtta enheter (?).



Glykogenmolekylen är förgrenad (för att öka lösligheten) med $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -bindningar i knutpunkterna. Dessa förgreningar skapas av ett "branching enzyme" t.ex. "amylo-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglykosylas".

Fig 16:10

En regulatorisk enzymkaskad kan påverka glykogensyntes/mobilisering via ett cAMP-beroende proteinkinase

- Glykogensyntas I: Defosforylerad, aktiv. Inte beroende av G6P.
- Glykogensyntas D: Fosforylerad, inaktiv. Aktiveras allosteriskt av G6P.

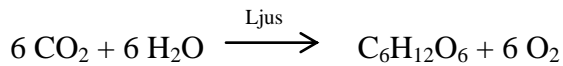


Studienämnden Kf / Kb

Fotosyntes

Kap. 17

Fotosyntes sker i gröna växter, alger och blågröna bakterier (cyanobakterier). Processen brukar oftast ses som O₂-producerande ("oxygenic photosynthesis") men det finns även icke O₂-producerande fotosyntes ("anoxygenic photosynthesis") i vissa bakterier som inte använder vatten som reduktionsmedel. De använder sig istället av t.ex. H₂S, svavel, väte eller organiskt substrat som e⁻-donator.



Ovanstående kan delas in i två reaktioner:

1. Ljusreaktion som kräver ljusenergi.
 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + \text{ATP} + \text{NADPH}$
2. Mörkerreaktion som kräver NADPH.
 $\text{CO}_2 \rightarrow \rightarrow \rightarrow \text{Kolhydrat}$

Kloroplaster

I växter sker reaktionerna i kloroplaster.

Morfologi: Dubbelmembran ytterst
Stroma, som mitokondriens matrix
Tylakoider, staplade som mynt, i stroman. En mynthög = en granum
Lumen, insidan av tylakoiden (myntet)

Fig 17:4 c

Fotosyntes sker i kloroplaster (delvis autonoma, DNA, ribosomer etc. liknande mitokondrier, ursprung cyanobakterier enligt endosymbiosteorin).

Fotosyntetiska pigment Fig 17:9 a

Pigmenten har till uppgift att absorbera ljusenergi vid olika våglängder. Energin överförs sedan via resonansöverföring till ett reaktionscentrum (se bredvid). Pigmenten är proteinkomplex som består av flera olika typer av klorofyll samt karotenoider och fykobiliner. Komplexet har flera antennpigment (hjälpigment) som kan samla upp ljusenergi från ett brett spektrum vid låg intensitet. Det finns även skyddspigment (karotenoider) som skyddar reaktionscentrumet ifrån fotooxidation.

Ljusreaktionerna

Fig 17:12

Q = QH₂ , PC = plastocyanin , Fd = Ferredoxin , (FNR = ferredoxin-reduktas)

En protongradient byggs upp över tylakoidmembranen då protoner ifrån stroman pumpas in i lumen. Därefter går protonerna genom ett ATPas (CF₀CF₁-komplex) som utnyttjar den fria energin till ATP-syntes.

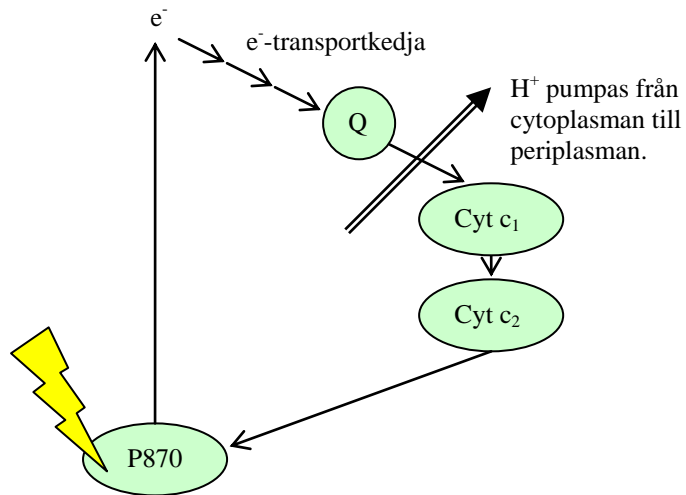


Studienämnden Kf / Kb

Icke-cyklisk fotofosfyllering: Ger ATP-syntes, O₂-produktion, NADPH-produktion.
Cyklisk fotofosfyllering: Bygger upp protongradient och syntetiserar ATP men producerar inget O₂ eller NADPH.

Bakteriell fotosyntes

Ex. Rhodobakter.



Därefter utnyttjar ATPaser protongradienten till ATP-syntes.

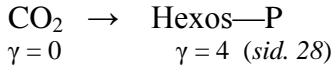
Som synes finns ingen NADPH-syntes i denna form av fotosyntes. Bakterierna kan istället producera NADPH från olika substrat via ATP-konsumtion.



Studienämnden Kf / Kb

Mörkerreaktionen, Calvin-cyklen

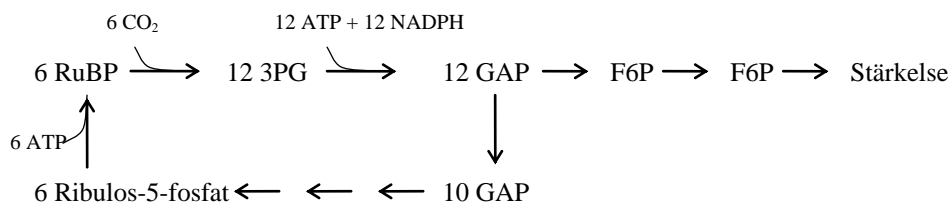
Reaktionerna kräver mycket energi (ATP) samt reducerande kraft (NADPH).



Rubulos-1,5-bifosfatkarboxylas, "rubisco", är jordens vanligaste enzym. Den katalyserar följande reaktion.



Calvin-cykeln:



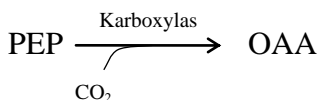
$$\Sigma = +1 \text{ F6P}, -12 \text{ NADPH}, -18 \text{ ATP}$$

Fotorespiration och C₄-cykeln

Fotorespiration: Rubisco kan även fungera som oxygenas (istället för karboxylas) och producera CO₂ via konsumtion av O₂. Detta sker vid låga CO₂-koncentrationer och höga O₂-koncentrationer.

Fig 17:24

C₄-växter, t.ex. majs och sockerrör, har förutom Calvincykeln alternativa reaktionsvägar för att fixera CO₂. Reaktionerna kräver 2 extra ATP per CO₂ jämfört med Calvincykeln.



Kvävemetabolism

Kväve kan vanligen inte lagras på samma sätt som t.ex. energi (fett, kolhydrat).

Bakterier och jäst kan ofta syntetisera alla nödvändiga aminosyror. Djurceller kan bara syntetisera en del och resten, de s.k. essentiella aminosyror, måste tas upp genom födan.

Prototrof: Auxotrof som fått tillbaka förmågan att syntetisera aminosyror.

Auxotrof: Mutant som förlorat förmåga att syntetisera en/flera aminosyra/or. Mutationen kan användas som selektionsmarkör. (Organism med näringskrav orsakat av en mutation)

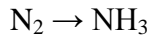
N₂-fixering



Studienämnden Kf / Kb

Endast vissa bakterier klara av att fixera kväve från kvävgas, nämligen cyanobakterier, *Klebsiella*, *Aeotobakter* och *Rhizobium* (symbios med artväxter).

Reaktionen kräver reducerande kraft (NADPH) och energi (ATP). Den katalyseras av nitrogenas, ett proteinkomplex som är syrekänsligt. För att inte skadas av syret använder sig cellen av en av flera skyddsmekanismer t.ex. speciella celltyper (cyano. har låg permeabilitet för O₂), hög respirationshastighet (konsumerar syret snabbt så det inte hinner göra någon skada) o.s.v.



Nitrogenas

Extremt syrekänsligt. Skyddsmekanismer för att skydda mot syre exponering, ex. snabbrespiration, speciella celltyper med extra tjock cellvägg.

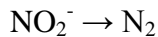
Kväveomsättning

Figur 19.29 BBM

Kemotrofer (vissa bakterier) oxiderar ammoniak till nitrat med O₂ som e⁻-acceptor. Denna reaktion kallas nitrifikation:



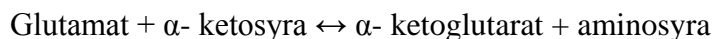
Vissa bakterier utnyttjar slutprodukten som e⁻-acceptor vid anaerob respiration, en process kallad denitrifikation eller dissimilatorisk nitratreduktion.



Assimilatorisk nitratreduktion innebär inkorporering av NO₃⁻ i protein (efter reduktion till NH₄⁺) och kan utföras av många växter och bakterier.

Transamineringar

Transaminering är en reaktion som överför en aminogrupp, framför allt från glutamat, till andra kolskelett för att bilda andra aminosyror. Dessa reaktioner katalyseras av transaminaser (amintransferaser) och kan gå åt båda håll, d.v.s. både syntetisera och degradera aminosyror.





Studienämnden Kf / Kb

NH₃-assimilering

Fig 20:7

1. a) *Glutamatdehydrogenas (GDH)*

Reaktionen har relativt högt K_m vilket betyder att det krävs höga koncentrationer av NH₃.

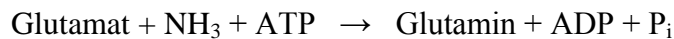


b) *Glutamatsyntas (GOGAT)*

Ett enzym relaterat med ovanstående men vars primära funktion är glutamatsyntes.



2. *Glutaminsyntetas (GS)*



GOGAT/GS-systemet har lågt K_m vilket gör att det används vid låga NH₃-koncentrationer.

Reglering av glutaminsyntetas

1. *Allosterisk reglering via kumulativ feedback-inhibering*

8 st inhibitorer: Trypofan
Histidin
Glukosamin-6-fosfat
Karbamylfosfat
CTP
AMP
Alanin
Glycin

Var och en av inhibitorerna ger liten verkan medan alla åtta samtidigt kan näst intill fullständigt inhibera enzymet.

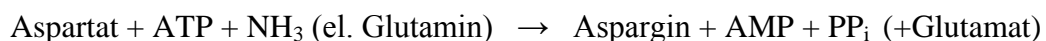
2. *Kovalent modifiering via adenylering*

Enzymet har 12 adenyleringssites. Om alla är adenylerade är enzymet 100% inaktivt men är bara vissa adenylerade är enzymet partiellt inhiberat.

3. Även kvoten α -ketoglutarat / glutamin är en reglerande faktor.

Asparaginsyntes

Asparaginsyntetas är enzymet som omvandlar aspartat till asparagin.



Karbamylfosfatsyntes



Studienämnden Kf / Kb

(Genererar intermediärer till arginin- och pyrimidinsyntes via antingen ammoniak eller glutamin.)



Nedbrytning av proteiner

”Protein turnover”: Proteiner syntetiseras och degraderas hela tiden i cellen. Om koncentrationen av ett protein är konstant betyder det att det syntetiseras i samma hastighet som det degraderas.

Proteiners degradering sker i princip logaritmiskt och det går därför att bestämma en ”halveringstid” för varje protein.

Tab 20:2

Aminosyror deamineras till $\left\{ \begin{array}{l} \text{Glutamat} \rightarrow \alpha\text{-ketoglutarat} + \text{NH}_3 \\ \text{Kolskelett} \rightarrow [\text{TCA-cykeln}] \end{array} \right.$

NH_3 utsöndras som urea eller urinsyra.



”Aminosyrafamiljer”

Aminosyra	Precursor	Metabolisk väg
Glutamat Prolin Glutamin Arginin	α -Ketoglutarat	TCA-cykeln
Aspartat Asparagin Lysin Metionin Treonin Isoleusin	OAA	
Serin Glycin Cystein	3-fosfoglycerat	Glykolysen
Alanin Valin	Pyruvat	



Studienämnden Kf / Kb

Leusin		
Fenylalanin Tyrosin Tryptofan	PEP + Erytros-4-fosfat	
Histidin	Ribos-5-fosfat	Pentosfosfatvägen



Studienämnden Kf / Kb

Fysiologiska grupper

Uppdelning via,

- *Energimetabolism*
 1. *Fototrofer*- Ljus som energikälla.
 - a) Fotolitotrofer (oorganiska e^- -donator)
 - b) Fotoorganitrofer (organisk e^- -donator)
 2. *Kemotrofer*- Redoxreaktioner som energikälla.
 - a) Kemilitotrofer (oorganiska e^- -donator)
 - b) Kemoorganotrofer (organiska e^- -donator)
- *Kolkälla*
 1. Autotrofer- CO_2 som kolkälla.
 2. Heterotrofer- Organisk förening som kolkälla.

Kemolitotrofer

Kemolitotrofer får sin energi ifrån oxidation av oorganiska ämnen såsom NH_3 , NO_2^- , H_2S , S , Fe^{2+} , H_2 , CO . De har, på samma sätt som kemoorganotrofer, elektrontransportkedja och producerar ATP via protongradient (el. Na^+ -grad.). Den mängd energi som frigörs beror på skillnad i redoxpotential mellan e^- -donator och e^- -acceptor.

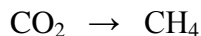
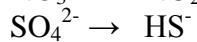
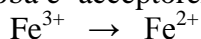
$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E_0'$$

Tabell 17.1

De flesta är också autotrofer. CO_2 är den maximalt oxiderade formen av C vilket gör att det krävs en stor mängd energi (ATP) och reducerande kraft (NAD(P)H) för att kunna reducera och inkorporera CO_2 som cellmaterial.

De flesta är också aeroba (O_2 som e^- -acceptor) men anaerob respiration förekommer.

Anaeroba e^- -acceptorer:



Organiska föreningar ex. Fumarat \rightarrow Succinat

Den reducerade slutprodukten vid anaerob respiration blir substrat för kemolitotrof e^- -transport.

Omvänd e^- -transport: Endast H_2 har tillräckligt negativ redoxpotential för direkt reducera NAD^+ till NADH. De bakterier som inte kan oxidera H_2 måste använda omvänd e^- -transport ("reverse electron transport"). Elektroner tvingas



Studienämnden Kf / Kb

då uppåt mot mer negativ redoxpotential för att skapa ett starkt reduktionsmedel. Denna process kostar energi.

För redoxpotentialer, se **Tabell A1.2**

Grupper av kemolitotrofer

- Nitrifikationsbakterier: NH_3 , NO_2^- som substrat.
- Svavelbakterier: H_2S , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^-
- Järnbakterier: Fe^{2+}
- Vätgasbakterier (knallgasbakterier): H_2
- Karboxydetrofa bakterier: CO_2 (en typ av vätgasbakterie)

Övriga grupper som *kan* oxidera H_2 som energikälla och växa kemolitotroft:

- Metanogena bakterier
- Homoacetogena bakterier
- Sulfatreducerande bakterier
- Denitrifikationsbakterier

Nitrifikationsbakterier

Figur 17.32 17.33

ATP-bildning sker via protongradient och ATPas. Elektron donatorer med hög redoxpotential (speciellt med $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ som substrat) gör att det utvinns en begränsad mängd energi per substratenhet. Dessutom är NAD(P)H-produktionen via omvänd elektrontransport energikrävande vilket ger processen låg yield.

Nitroso... = oxiderar NH_3

Nitro... = oxiderar NO_2^-

NH_3 -oxidation sker via ammonium-monooxygenas (AMO) och hydroxylamin-oxidoreduktas (HAO).

NO_2^- -oxidation sker via nitritoxidas.

AMO kräver två elektroner som levereras via HAO och CoQ.

Svavelbakterier

Figur 17.27

T.ex. *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, *Beggiatoa*, *Sulfolobus*.

De vanligaste energikällorna är H_2S , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ som stegvis oxideras till SO_4^{2-} .

Vissa H_2S -oxiderande bakterier kan lagra svavelkorn intracellulärt som energireserv.

Detta svavel kan sedan nyttjas när H_2S -koncentrationen är låg.



ATP-syntes sker via e^- -transportkedja och protongradient. Vissa svavelbakterier kan även syntetisera ATP via substratnivåfosforylering.

Anaerob respiration med NO_3^- som e^- -acceptor förekommer.

Flera svavelbakterier kan också oxidera Fe^{2+} t.ex. *Thiobacillus ferrooxidans*.



Studienämnden Kf / Kb

Järnbakterier

Fe^{2+} oxiderar spontant i närvaro av O_2 och vid neutralt pH, till Fe^{3+} vilket bildar olösligt $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Fe^{2+} är dock stabil i anaeroba miljöer med lågt pH, det är därför järnbakterier är acidofiler (växer bara vid låga pH). Neutrala järnoxiderare (*Galionella*, *Lepthrix*) finns i interfas mellan anaeroba och aeroba miljöer.

$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ har mycket hög redoxpotential (+0,77 vid pH 2, jfr $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = +0,82$) vilket ger mycket lågt energiutbyte.

Acidofila järnoxiderare utnyttjar den naturliga protongradienten till ATP-syntes. $\text{pH}(\text{periplasma}) = 1-2$, $\text{pH}(\text{cytoplasma}) = 5.5-6$

Oxidationen av Fe^{2+} är en protonkonsumerande process som fungerar så att det intracellulära pH hålls nära 6 samtidigt som protongradienten upprätthålls.

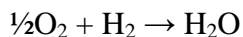
Figur 17.30

Reaktionen har lågt yield (liten energivinst) och det är en lång väg för omvänd e^- -transport och syntes av NAD(P)H . På så sätt förbrukas mycket stora mängder substrat.

Vätgasbakterier (knallgasbakterier)

T.ex. *Alcanegenes*, *Pseuclomanas*, *Paracoccus*.

Följande reaktion katalyseras av hydrogenas:



De är fackultativa kemolitotrofer och fackultativa autotrofer. Organiskt substrat repressar enzym involverade i CO_2 -fixering samt hydrogenas.

De flesta är obligat aeroba (microaeroba eftersom hydrogenas är syrekänsligt, ~10% O_2 är optimalt). Anaerob respiration med NO_3^- som e^- -acceptor förekommer.

H^+/H_2 har låg redoxpotential och kan därför direkt reducera NAD(P)^+ till NAD(P)H .

Ex. *Alcaligenes eutrophus* har två olika hydrogenas:

- Cytoplasmiskt (lösligt)
Tar upp H_2 och reducerar $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$.
- Membranbundet
 $\text{H}_2 \rightarrow \text{Quinon} \rightarrow \dots \rightarrow \text{Cytokrom} \rightarrow \text{O}_2$

Många saknar lösligt hydrogenas och kräver då omvänd e^- -transport för NADH -syntes (från quinon).

Karboxidotrofa bakterier

Kan också använda H_2 vilket gör gruppen till en typ av vätgasbakterier.

De får primärt sin energi via oxidation av CO till CO_2 som katalyseras av kolmonoxid-dehydrogenas.

Aerob respiration som regel med anaerob med NO_3^- förekommer.



Studienämnden Kf / Kb

Fackultativa kemolitotrofer?

Metanogena bakterier

Kan få sin energi från oxidation av H_2 med CO_2 som e^- -acceptor och kolkälla. På så sätt reduceras den maximalt oxiderade formen av kol (CO_2) till den mest reducerade (CH_4).



Organiska substrat kan också användas t.ex. format, metanol, acetat.

De är strikta anaerober.

Elektrontransport och protongradient ger ATP-produktion, men de har ingen konventionell e^- -transportkedja med quinon och cytokromer. Istället har de flera unika coenzym och andra komponenter. **Figur 17.44**

De har två typer av jonpumpar:

- Protonpump som ger drivkraft vid ATP-syntes.
- Na-pump som ger drivkraft vid olika steg i CO_2 -reduktionen.

Rötning/Biogasproduktion: Sker i samverkan med många andra bakterier.

Nedbrytning av organiskt material t.ex. cellulosa.

Homoacetogena bakterier

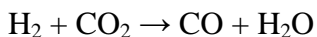
En spretig grupp med bl.a. *Clostridium*, *Acetobacterium*.



De kan också använda organiska substrat men CO_2 -reduktion är viktigast. Även reduktion av $S_2O_3^{2-}$ och NO_2^- är relativt vanlig.

De är strikta anaerober.

Energiproduktion och CO_2 -fixering sker via acetyl-CoA-vägen (Ljungdahl-Woodvägen). Ett viktigt enzym längs vägen är kolmonoxiddehydrogenas som katalyserar följande reaktion:



Figur 17.41

Denitrifikation

Ett stort antal bakterier kan genomföra dessa reaktioner, både kemolitotrofer och kemoorganotrofer.



De flesta är fackultativa aerober (O_2 -respiration i närvaro av syre, annars anaerob).

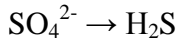
Den vanligaste anaeroba respirationen är NO_3^- -respiration som ger lägre utbyte än O_2 -respiration.



Studienämnden Kf / Kb

Sulfatreducerande bakterier

De flesta är kemoorganotrofer men vissa kan leva kemolitotroft med H_2 som e^- -donator. Vissa är autotrofer, d.v.s med CO_2 som kolkälla.



Sulfat som e^- -acceptor ger längre energiutbyte än NO_3^- och O_2 . Vissa kan använda NO_3^- som e^- -acceptor istället.

De är strikta anaerober och har endast ananerob respiration.

Använder Acetyl-CoA vägen för CO_2 -fixering.

Hypertermofila archaebakterier

De kan vara både kemoorganotrofer eller kemolitotrofer. De flesta kräver svavel i någon form till sin energimetabolism.

Kemolitotrof metabolism sker via H_2 -oxidation med O_2 , SO_4^- , S^0 eller NO_3^- som e^- -acceptor eller via Fe^{2+} -oxidation med O_2 eller NO_3^- som e^- -acceptor.

Ex. *Acidianus*

- Aerob miljö $\rightarrow S^0$ som e^- -donator.
 S^0 oxideras till H_2SO_4
- Anaerob miljö $\rightarrow S^0$ som e^- -acceptor.
 H_2 oxideras samtidigt som S^0 reduceras till H_2S .



Studienämnden Kf / Kb

Kemoorganotrofer

Får sin energi från oxidation av organiska föreningar. Djur, svampar och de flesta bakterierna hör till denna grupp.

ATP-produktion sker via:

- *Aerob respiration*
O₂ som e⁻-acceptor.
- *Anaerob respiration*
NO₃⁻, NO₂⁻ eller SO₄²⁻ som e⁻-acceptor.
- *Fermentation (jäsnings)*
Ingen extern e⁻-acceptor. Istället behålls redoxbalansen genom att ingen nettoproduktion eller konsumtion av NAD(P)H sker vid bildningen av fermentationsprodukt t.ex. etanol eller laktat.
Vissa substrat går inte att fermentera då metabolismvägar som genererar energi och upprätthåller redoxbalansen saknas i frånvaro av extern e⁻-acceptor.
Vanliga fermentationer: **Figur 17.50** **Tabell 17.7** **17.8**
Slutprodukt vid fermentation är ofta ett substrat för annan organism.

Synthrophy (mutual feeding)

Synthrophy går ut på att två organismer tillsammans degraderar ett ämne för energiproduktion, något som de inte hade klarat på egen hand.

Ex:

Organism 1 (etanolvermentation):



Organism 2 (metanogenes):



Summa (synthrophy):



Båda reaktionerna går åt höger trots att första reaktionen har $\Delta G^{\circ} > 0$. Genom synthrophy är etanolvermentation möjlig.

Substrat

- *Fett*
Fett är reducerat vilket betyder att det är energirikt, C₁₆ → 129 ATP.
Lipas är ett enzym som behövs för att bryta ner fett till fettsyror (+glycerol).
Via β -oxidation katalyserat av Coenzym A ”klippas” C₂-fragment av och bildar Acetyl-CoA. Dessa kan sedan gå in i TCA-cykeln eller glyoxylatcykeln.
- *Övriga*



Studienämnden Kf / Kb

Organiska syror och alkoholer. C₂- eller C₃-föreningar kräver dock glyoxylatcykel för påfyllning av TCA-cykeln, intermediärer och kolhydratproduktion.

Autotrofer

Metabolism

Calvin-cykeln:	Svavel-, järn-, nitrifikation-, vätgasbakterier,
Acetyl-CoA:	Metanogener, homoacetylogener, sulfatreducerare.
Kolcykeln:	Figur 19.22
Kvävecykeln:	Figur 19.29
Svavelcykeln:	Figur 19.30

Fototrofer

Fotolitotrofer

- *Syrgasproducerande fotosyntes*
H₂O som e⁻-donator.
Sker i gröna växter, alger och blågröna bakterier.
- *Ickesyrgasproducerande (anoxygenic) fotosyntes*
T.ex. H₂S, S⁰ eller H₂ som e⁻-donator.
Sker i vissa bakterier under strikt anaeroba förhållanden eftersom processen kräver föreningar som oxideras i närvaro av O₂.

Fotoorganotrofer

Använder en organisk förening, t.ex. succinat, malat eller butyrat, som e⁻-donator. Det gör processen till en icke syreproducerande fotosyntes. Även denna sker under strikt anaeroba förhållanden.



Studienämnden Kf / Kb

Procaryotgrupper

Kap. 12-13

Metylotrofer

Metylotrofer kan växa på endast C₁-föreningar men även organiska syror, socker, etanol etc. Metylotrofer som kan växa på metan (CH₄) kallas metanotrofer (som vanligtvis inte klarar längre kolkedjor).

Metanotrofer

Metanotrofer är en undergrupp till metylotrofer och namnges därför *Metylo...*

Obligat aeroba.

Metanomonoxygenas (MMO) katalyserar följande reaktion:



Den reducerande kraften (d.v.s elektronerna) kommer från cytokrom c.

CH₄ produceras anaerobt men metanotrofer är strikt aeroba. De förekommer strikt i interfasa mellan aeroba och anaeroba miljöer.

Många har nitrogenas och därmed förmåga att fixera N₂.

Single cell protein ?

Typ I: *Ribulosmonofosfatvägen* för assimilering av C₁ (ej fullständig TCA-cykel).

Figur 17.60

Formaldehyd inkorporeras i cellmaterial, en process som kräver ATP.

Typ II: *Serinvägen* (fullständig TCA-cykel). Figur 17.59

Formaldehyd + CO₂ → cellmaterial

Processen kräver ATP och reducerande kraft i form av NAD(P)H.

Typ II har lägre yield än typ I.

Svavel- och sulfatreducerare

Kan växa kemolitotroft med H₂ som e⁻-donator men vanligen är de kemoorganotrofer.

Strikta anaerober

- Grupp 1
Utnyttjar laktat, pyruvat eller etanol till e⁻-donator.
SO₄²⁻ reduceras till H₂S.
ex. *Desulfovibrio*
- Grupp 2
Utnyttjar acetat till e⁻-donator.
SO₄²⁻ reduceras till H₂S.
ex. *Desulfobacter*
- Dissimilatoriska svavelreducerare
S⁰ reduceras till H₂S. (Ingen SO₄²⁻-reduktion)



Studienämnden Kf / Kb

- ex. *Desulforomonas*
- Archaeobakterier
 - Många andra fakultativt anaeroba bakterier kan reducera S^0 till H_2S .
Ex. *Proteus*, *Campylobakter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*.

Spirilla

Spiralformade bakterier.

De är G^- , rörliga och vissa av dem är patogena t.ex. *Campylobakter* (i kyckling), *Helicobakter* och *Pylorii* (magsår).

Ex. *Bdellovibrio*: En ”rovbakterie” som angriper andra bakterier, penetrerar deras cellvägg och förökar sig i deras periplasma. Den kan därför inte angripa G^+ eftersom de saknar periplasma.

Spirochaeta

Flera av dem är patogener t.ex. *Treponema pallidum* (syfilis), *Borrelia* (många patogena, *Borrelia recurrentis* är fästingburen).

Pseudomonader

Bl.a. *Pseudomonas*, *Zymomonas*.

De är aeroba, G^- stavar som får sin energi kemoorganotroft.

Näringskraven är modesta; de kan utnyttja stor mängd olika organiska föreningar, även sällsynt förekommande.

Många är multiresistenta vilket gör att deras infektioner är svårbehandlade.

Ex. *Pseudomonas aeruginosa*: Ger urinvägsinfektion men även angripa brännsakador och AIDS-patienter.

Zymomonas kan fermentera socker till etanol. De har en snabb glukosförbrukning och etanolproduktion samt hög yield av etanol. Glykolysen är ersatt av Entner-Doudoroffvägen som ger 1 ATP/glukos (jfr glykolys: 2 ATP/glukos). **Figur 12.17**
Etanoltoleransen är relativt bra men sämre än jäst.

Ättiksyrabakterier

Ofullständig oxidation av alkohol.

- *Acetobacter*
Fullständig TCA-cykel. ”Överoxiderare”.



- *Glucanobacter*
Ej fullständig TCA-cykel. ”Underoxiderare”.



Vinägerproduktion: En obligat aerob process.



Studienämnden Kf / Kb

Hög [ättiksyra] + [etanol] → celldöd vid anaeroba förhållanden.

Zymomonas

Fermentation ---- socker → Etanol
Ej glykolys, utan Enter Doudroff vägen, se fig 12.17
Använder 1 ATP per glukos
Har högt utbyte av etanol, snabb glukos förbrukning.
Ej lika etanol, inhiberar tolerant som jäst.

Enterobakterier

Fackultativa aerober.

Escherichia: Finns i tarmen hos varmblodiga djur (människor).
Små näringskrav.
Vissa är patogena (diarré, urinvägsinfektion).

Shigella: Nära släkt med *Escherichia* (>70% homologi på DNA-nivå, rekombinerar med varandra).
Ofta patogena (dysenteri, en tarminfektion)

Salmonella: Ofta patogena (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*)

Yersinia: *Yersinia pestis* orsakar böldpest (digerdöd).

Kan delas in i två grupper:

- *Blandad syrajäsning*
Bildar främst ättiksyra, mjölksyra och succinat men även etanol, CO₂ och H₂.
- *Butandioljäsning*
Bildar främst butandiol, etanol, CO₂ och H₂ men även ättiksyra, mjölksyra och succinat i små mängder.

Mjölksyrabakterier

G⁺, aerotoleranta anaerober d.v.s. de lever anaerozt men skadas inte av O₂.
De har ingen e⁻-transport utan endast fosforylering på substratnivå.
Näringskraven är komplexa vilket ger dem begränsad biosyntetisk förmåga.
Figur 12.53

Kan delas in i två grupper:

- *Homofermentativa*
Glukos → 2 Laktat + 2 ATP

Nyttjas av *Lactobacillus* (de flesta), *Streptococcus*, *Lactococcus* (mejeriindustri), *Enterococcus* (fekal, tarm) och *Pediococcus*.
- *Heterofermentativa*



Studienämnden Kf / Kb

Används mycket inom livsmedelsindustrin (yoghurt etc).

Glukos → Laktat + Etanol + CO₂ + ATP

Nyttjas av *Lactobacillus* (ett fåtal) och *Leuconostoc*. De är tåliga mot lågt pH.

Bacillus

Vanliga i jord.

Används till antibiotikaproduktion t.ex. bacitracin och polymyxin.

Bacillus thuringiensis producerar insekticider.

Propionsyrabakterier

Bor i Schweizerost t.ex. Emmenthaler. Propionat ger smak och CO₂ skapar hålen i osten .

Laktos $\xrightarrow[\text{Streptokocker}]{\text{Lactobacillus}}$ Laktat $\xrightarrow{\text{Propionsyrabak.}}$ Propionat + CO₂

Acimyceter

Streptomyces: Viktiga producenter av antibiotika och ger t.ex. streptomycin, tetracyklin och nystatin. Totalt kan de producera ca 500 olika antibiotika där ca 60 används medicinskt.

Mycobakterier

Mycobacterium tuberculosis (tuberkulos)

Mycobacterium leprae (spetälska)



Studienämnden Kf / Kb

Archae

Kap. 13

Halobakterier

Är kemoorganotrofer och obligata aerobes.

Extrema halofiler: Kräver oftast 2-4 M (minst 1.5M) NaCl för optimal tillväxt. Klarar av att växa i mättade saltlösningar ~5.5 M NaCl.

Ex. *Halobacterium* (extrem halofiler)

Eftersom dess cellvägg stabiliseras av Na^+ kan inte Na^+ i omgivningen ersättas av en liknande jon t.ex. K^+ . För att behålla en positiv vattenbalans (lagom osmotiskt tryck) pumpar nämligen cellen in K^+ så att $[\text{K}^+]$ är mycket högre inuti cellen än $[\text{Na}^+]$ utanför. Ersätts Na^+ i omgivningen av K^+ kommer K^+ att pumpas in och cellväggen kolapsar.

Under vissa förhållanden kan *Halobacterium salinarum* syntetisera ett protein kallat bacteriorhodopsin och inkorporera detta i sitt membran. Proteinet är en ljusdriven protonpump som absorberar ljus med våglängd på 570 nm (gult). Detta gör att cellerna ändrar färg från orange-rött till röd-lila i takt med att proteinet syntetiseras. Cellmembranen består av 25% lipider och 75% protein

Protongradienten utnyttjas till:

- ATP syntes
- Na^+/H^+ -antiport (när Na^+ pumpas ut så pumpas H^+ in)
- H^+/K^+ -symport (båda pumpas in samtidigt)
- Na^+ /aminosyra-symport

a) och d) växelverkar för att man inte skall få in för mycket Na^+ .

Hypertermofila

Har ett temperaturoptima över 80°C men kan växa vid över 100°C.

De är både kemoorganotrofer och kemilitotrofer. De kan använda metabolism av svavel och hittas därför ofta i varmakällor eller i områden med vulkanisk aktivitet, t.ex. Island.

Svavel (SO_4^{2-} el. S^0) nyttjas som e^- -acceptor vid anaerob respiration. Reduceras till H_2S .

Svavel nyttjas som e^- -donator vid kemolitotrof metabolism. **Tabell 13.8 13.9**

Ex. *Pylobus farnarii*

Håller rekodet som mest termofila bakterie. Den kan växa vid upp till 113°C men inte under 90°C. Under 1h kan den överleva 121°C (autoklivering).



Studienämnden Kf / Kb

Eukaryota mikroorganismer

Eukaryota mikroorganismer har till skillnad mot bakterier:

- Cellkärna
- Mitokondrier
- Golgi, ER, etc

Figur 14.1

Förut delades alla organismer in i fem ”riken”:

- Djur
- Växter
- Svampar
- Protists (eukaryoter som inte passar i någon av de ovanstående)
- Prokaryoter.

Idag delar man istället in dem i tre ”domäner”:

- Eukaryoter
- Archae
- Bacteria

För att undersöka evolutionära släktskap o.d.l används idag sekvensiering av 18S- och 16S-delen av ribosomer. Eftersom tekniken förbättras hela tiden och verktygen att analysera sekvensieringen med blir bättre och bättre, så ändras släkträden hela tiden.

Ex. på primitiva eukaryoter: *Giardia*, *Trichomonas* och *Encephalotozoon*.

De saknar mitokondrier men har troligtvis någon gång haft det och sedan ”förlorat” dem under evolutionen gång.

Microsporidia saknar alla organeller.

Ex. *Encephalotozoon*: Har väldigt litet genom på 2.9 MB, vilket är ca 1.5 MB mindre än *E.coli* trots att den är eukaryot.



Studienämnden Kf / Kb

Protozoer (encelliga djur)

Uppfylls följande kriterier är organismen en protozoa:

- Saknar klorofyll.
- Mobila, gäller dock inte alla.
- Saknar cellvägg.
- Bildar inte fruktkroppar.

De flesta av dem har sitt näringsupptag genom fagocytos.

Uppdelning

Protozoer delas in i grupper beroende på deras rörelsesätt.

- *Sarcodinia*
”Amöboid” rörelse. Cytoplasman ger upphov till rörelse. En viss del av cytoplasman börjar röra sig vilket skapar en utbuktning på cellen som får resten av cytoplasman att följa efter.

Ex. *Amoeba*

Är antingen nakna eller skalförsedda (ex. foraminifera)

Foraminigera är marina och har ett skal av CaCO_3 . Dovers klippor består av avdöda foraminifera.

- *Mastigophora*
Rör sig m.h.a. flageller (ett eller flera långa utskott).

Ex. *Trypanosoma*

Är ofta patogena, t.ex. *Trypanosoma brucei* som orsakar afrikanska sömnsjukan.

Den förökar sig i tarmen hos Tse-Tse-flugan, invaderar sedan dess spottkörtlar och andra mundelar och kan därefter spridas till människa via insektsstick.

- *Ciliophora*
Rör sig med hjälp av cilier (små korta utskott som täcker ”hela” cellytan).

Ex. *Paramecium*

Vanligen ej patogena men vissa kan orsaka dysenteri.

- *Apicomplex* (sporozoer)
Är inte rörliga och uppfyller egentligen inte alla kriterier för protozoer, men är ändå med i denna grupp.
De är obligata parasiter.

Ex. *Plasmodium* som orsakar malaria.

- *Eugena* (Ögondjur)



Studienämnden Kf / Kb

Det är tveksamt om de tillhör protozoerina. Eftersom de har kloroplaster och syntes borde de klassas om alger. De kan dock stöta ut sina kloroplaster och leva kemoorganotroft och heterotroft.

Svampar

- Har cellvägg.
- Är sporbildande.
- Är inte mobila

Gruppen delas in i mögelsvampar, jästsvampar och makroskopiska svampar.

Cellväggen påminner i uppbyggnaden om den runt växtceller men består av andra typer av komponenter. Vanligen ingår inte cellulosa utan svampar har istället chitin (polymer av N-acetylglukosamin).

De sprids via sporer och kan därför lätt kontaminera livsmedel m.m.

Svampar är relativt resistent mot extrema förhållande t.ex.

- Låga pH.
- Höga temperaturer (upp till 62°C)
- Högt salthalt (klarar brist på vatten)
- Torka (klarar brist på vatten)

Mögel

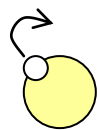
Är filamentär. Ett filament kallas hyf; dessa buntar ihop sig till större ”trådar” s.k. mycel.

Ex. *Rhizopus* (brödmögel), *Penicillium* och *Aspergillus* (båda används som produktionsorganismer i biotekniska processer).

Jäst

Encelliga svampar.

Förökar sig via knoppning



Kan även föröka sig via fission, ”fission yeast” ex. *Shizosacharomyces*. Cellen fördubblar sitt DNA och delas sedan i två identiska dotterceller.

Ex. *Saccharomyces cerevisiae* (bagerijäst)

Kan vara haploida (genom x1), diploida (genom x2) eller polyploida (genom xN).

Två haploida celler kan förenas och bilda en diploid cell, en process kallad ”mating”.

Jästen kan vara av två olika ”mating types”: a eller α . Det är alltid två olika typer av jäst (a och α) som genomför ”mating”, aldrig mellan a och a eller mellan α och α .

En diploid cell kan sporelera och bilda 4 sporer (via meios).

Industriell används oftast polyploida stammar eftersom de klarar tuffare förhållanden. Dock används haploida stammar oftast som labstammar då genetisk manupulering av dessa är betydligt enklare.



Studienämnden Kf / Kb

De flesta typer av jäst är ofarliga men vissa patogener förekommer t.ex. *Candida albicans* (underlivsinfektioner) och *Candida sp.* (torsk)

Basidomyceter, Makroskopiska svampar (hattsvampar)

Bildar stora fruktkroppar (t.ex. champinjoner). Har mycel under jorden.

Slamsvampar ("Slime molds")

Likar både svampar och protozoer:

- Har en livscykel med sporbildning (som svampar)
- Är rörliga (som protozoer)

De livnär sig på bakterier genom fagozytos.

Ex. *Physarum*.

Alger

En divers grupp av organismer

- Innehåller klorofyll
- Genererar O₂ via fotosyntes.

De flesta alger är mikroskopiska men även makroskopiska förekommer (tång).

Alger är oftast encelliga men aggregat av celler förekommer.

Oftast är alger gröna men även bruna och gröna finas. Färgen beror på vilket fotosynterande pigment algen har.

- Dinoflageller
Ex. *Noctiluca milaris*
Rörelse inducerar luciferas som får cellen att lysa (mareld).
- Toxiska dinoflageller
Ex. *Gonaolax*
Kan bilda neurotoxin.
- *Eugena*
Se protozoer (sid. 74)



Studienämnden Kf / Kb

Industriell mikrobiologi

Bioteknik: Kommersiellt utnyttjande av cellkulturer för produktion av enzymer, mikroorganismer m.m.

Downstream processing: Aktiviteter som sker efter fermentation t.ex. behandlingar av avfallsströmning

Biotekniska processer

Val av organism bestämmer substrat och odling (fermentation) d.v.s. odlingsbetingelser och odlingstyp.

Stamförbättring kan ske via genteknik eller slumpvis mutation/selektion (sistnämnda är viktigast).

OBS! Inom industriell mikrobiologi används termen fermentation till alla storskaliga produktioner oavsett om det sker via fermentation (i dess biokemiska mening) eller inte. De flesta industriella processer är aeroba.

Vanliga organismer

- *Jäst* (bagerijäst)
GRAS (generally regarded as safe)
Lätt odlad, generationstid på 2h.
Hela genomet är sekvensierat.
- *Mögelsvampar*
Hög produktivitet och exkretionsförmåga.
- *Streptomyces*
Producerar ett brett spektra antibiotika.
- *E.coli bacillus*
Välkänd.

Uppskalning

Måttet med uppskalning är att få så lika förhållanden som möjligt.

Labskala: 1-10 liter

Pilot plant: 100-10 000 liter

Fullskaligt : >100 000 liter

Kontroll och styrning av fermentationsprocesser

Mätmetoder:

- *Kemiska eller fysikaliska egenskaper*
 - Temperatur
 - Omrörning
 - pH



Studienämnden Kf / Kb

- Luftningshastighet
- Löst syre
- *Biologiska egenskaper*
Information angående biomassans aktivitet.
 - Mängd biomassa.
 - Gasanalys, [CO₂] och [O₂] i luft från fermentationen.
 - Mängd syra/bas.
 - Värmeproduktion, via kalorimeter eller genom beräkningar från kylning/värmning
 - Substrat-/produktanalyser.

Utbyte (yield)

Yield är oerhört viktigt för hur ekonomisk processen blir.
För att öka utbytet finns olika strategier:

- *Slumpvis mutationselektion*
Med eller utan mutagen behandling.
Kan man få fram ett bra selektionsförfarande har man tur. För att lyckas finns dock hjälpmedel t.ex. analoger.
Analoger är metaboliter som ”känns igen” som riktiga (original) av cellen men som inte kan användas för vidare processering (jfr Sulfa sid. 19).
 - Nukleotidanaloger som (dideoxindukleotid) byggs in i DNA som hindrar fortsatt förlängning (”elongation”) av DNA-strängen.
 - Aminosyraanaloger förhindrar att korrekta aminosyror bildas via repression och/eller feedback-reglering. På så sätt kan inte cellen växa eftersom den saknar riktiga aminosyror. Mutanter med defekt reglering kan fortsätta växa.

Evolutionary genetics: Om man odlar många generationer t.ex. i en kemostat eller i upprepade batchodlingar, och succesivt ökar selektionstrycket kan man få fram mer tåliga stammar t.ex. frystolerant jäst.

- *Riktad mutagenes*
Moderna molekylärbiologiska metoder.
Man kan använda genamplifiering eller plocka bort gener, gendeletioner. Man kan också framställa gener med defekt reglering, t.ex. minska känslighet mot feedback-reglering.

Metoderna kräver kunskap om vilka steg som är viktiga för utbyte/produktionshastighet av produkten. ”Rate limiting steps” och MCA-analys kan visa vilka enzym man bör ändra (*sid. 27*).

I aminosyrabiosyntes är det ett relativt begränsat antal reaktioner som alla är välkända. Detta innebär att riktad mutagenes kan utföras framgångsrikt.



Studienämnden Kf / Kb

Men sekundära metaboliter har ofta komplicerade syntesvägar med många steg som i viss utsträckning är okända. I sådana fall är slumpvis mutationsselektion ett bättre alternativ.

Biotransformation (Bioconversion)

Förändring av molekyl i ett eller ett fåtal steg med hjälp av mikroorganismer eller enzym.

Fördelar av bioconversion jämfört med kemisk syntes:

- *Hög specificitet*
Ett enzym katalyserar vanligen endast en reaktion.
- *Stereospecifikt*
Man får t.ex. endast L-form av aminosyror ej D-form.
- *”Milda reaktionsförhållanden”*
(temp, pH)
- *Vatten som lösningsmedel*
Ger låg risk för nedbrytning av känsliga substrat/produkter.

Ex. Produktion av diverse steroid hormoner **Figur 30.14**
Blandning av kemisk syntes och biotransformation.

Ex. Penicillinproduktion.

Penicillin G som kan omvandlas till 6-APA (råpenicillin) som används för produktion av semisyntetiska penicillin. (sid. 23)



Studienämnden Kf / Kb

Produkter

Primära metaboliter: Produceras vid tillväxt av organism.
Ex. ”katabola slutprodukter” som etanol, glycerol.
Ofta essentiella metaboliter som är en del av det cellulära maskineriet
t.ex. aminosyror, vitaminer m.m.

Sekundära metaboliter: Produceras sent i logfasen (stationära fasen) så produktionen är därför inte kopplad till tillväxt.
Ex. olika typer av antibiotika.
Bildningen är starkt beroende av omgivningsfaktorer såsom mediasammansättning. Repression av syntes är därför vanligt.
Utgångsämnen är primära metaboliter som sedan omvandlas via komplexa syntesvägar. **Figur 30.3**

Produkter från fermentation

- Antibiotika
 - *Penicillin*
Se tidigare föreläsning (*sid. 19*)
 - *Tetracyclin*
Syntes av klortetracylatin involverar 72 intermediärer och mer än 300 gener.
Reaktionsvägen är inte fullständigt känd.
Streptomyces används för produktion.

Hög tetracyclinproduktion ger hög aktivitet på pentosfosfatvägen och låg glykolytisk effekt. Därför tillsätts en glykolytisk inhibitor (benzylthiocyanat, OS 3 mg/l) som ger 50% högre tetracyclinutbyte.
Fosfat ger minskad pentosfosfatväg.
Glukos ger ökad glykolytisk aktivitet
Syntesen repressas alltså framför allt av fosfat men även glukos. Därför använder man medier med låg fosfatkoncentration och med sackaros istället för glukos.
Man har uppnått tetracyclinnivåer på upp till ~15g/l vid produktion i omrörda tankreaktorer på 150 000 liter.
- Vitaminer
Stor produkt som används i livsmedel och farmaceutika (läkemedel).
De flesta vitaminer produceras via kemisk syntes men vitamin B₁₂ samt riboflavin produceras via fermentation.
 - *Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin)*
Kan endast syntetiseras av mikroorganismer.
Brist på B₁₂ leder till blodbrist (*anemi*) och många andra symptom.
Vi upptar B₁₂ via födan (inte av de mikroorganismer i tarmen som producerar B₁₂, mycket B₁₂ i fekalier).
Växter vare sig använder eller syntetiserar B₁₂ (problem för veganer).



Studienämnden Kf / Kb

De organismer som används för att producera är bla *Propionibacterium* och *Pseudomonas*.

Halter upp till 60 mg/l.

- *Riboflavin (vitamin B₂)*

FAD och FMN, som används i e⁻-transportkedjan, är derivat av riboflavin. Det produceras av många mikroorganismer: bakterier, jäst och svampar (*Ashbya gossypii* producerar upp till 7 g/l naturligt).

- **Aminosyror**

Produktion globalt motsvarande 50 mdr SEK/år.

Används i livsmedel (smakförstärkare), medicin, utgångsmaterial i kemisk industri. Eftersom växtproteiner ofta innehåller lägre halter av essentiella aminosyror som lysin, metionin, treonin och tryptofan har man ofta tillsatt dessa i bröd, soya och animalfoder.

Brevibacterium och *corynebacterium* är vanliga produktionsorganismer.

Konkurrans mellan kemisk syntes (ger D- och L-form) och fermentation (ger L-form).

- *L-Glutamat*

370 000 ton/år.

Används som smakförstärkare (aromat).

Framställs via fermentation.

- *L-Lysin*

70 000 ton/år.

Används som livsmedelstillsats

Framställs via fermentation.

- *D,L-Metionin*

70 000 ton/år

Används som livsmedelstillsats

Framställs med kemisk syntes eftersom fermentation har låg yield.

- *Aspartan (Diet sötare),*

7 000 ton/år

Används som sötningsmedel.

Framställs av L-fenylalanin + L-aspartat.

Produktion av glutamat

Produceras av *Corynebacterium glutamicum*. De isolerades 1957 och ger hög produktion och exkretion av glutamat, >30 g/l naturligt.

Brevibacteria microbacterium och *Ahtrobacter* uppvisa liknande produktivitet.

Deras gemensamma egenskaper är:

- De kräver biotin (ett coenzym vid fettsyrsyntes).
- α -Ketoglutarat-dehydrogenas aktivitet är låg eller saknas.
- Hög aktivitet av glutamat-dehydrogenas (TCA-cykeln)
- Låg aktivitet på (vissa) isocitratlyas.



Studienämnden Kf / Kb

Hög permeabilitet är viktig för hög produktkoncentration. Detta kan åstadkommas via:

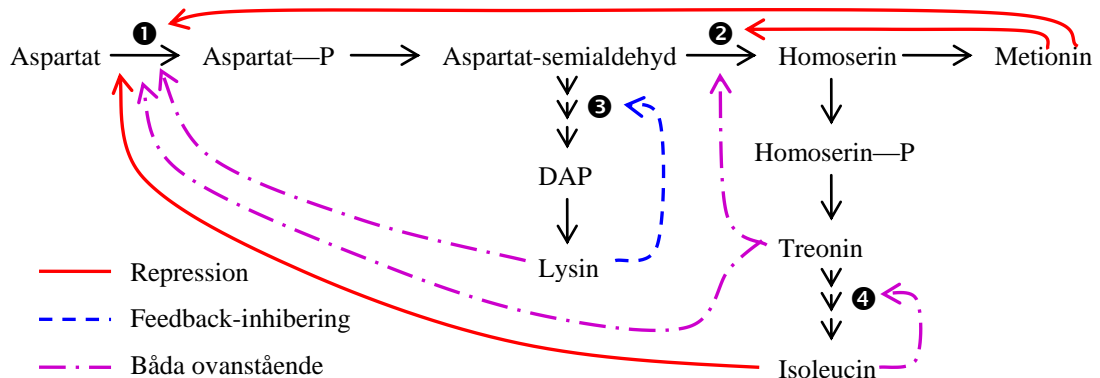
- Biotinbrist.
- Oleatbrist (oleat-auxotrofer är då ett måste).
- Tillsatts av mättade fettsyror.
- Penicillin

Syrenivå är viktig. Vid syrebrist bildas istället lactat och succinat medan för mycket syre leder till ackumulering av α -ketoglutarat som får tillväxten att avstanna.

Under optimala förhållanden kan man få 60% av kolkällan att konverteras till L-Glutamat.

Produktion av lysin

I *E.coli*:



Regleringsmekanismer:

- ❶ Aspartokinas, har 3 isoenzym.
 - Repressas av metionin.
 - Repressas och feedback-inhiberas av lysin.
 - Repressas och feedback-inhiberas av treonin.
 - Repressas av isoleucin.
- ❷ Homoserin-dehydrogenas, har 2 isoenzym.
 - Repressas av metionin.
 - Repressas och feedback-inhiberas av treonin.
- ❸ "Enzym 3"
 - Feedback-inhiberat av lysin.
- ❹ "Enzym 4"
 - Repressas och feedback-inhiberas av isoleucin.

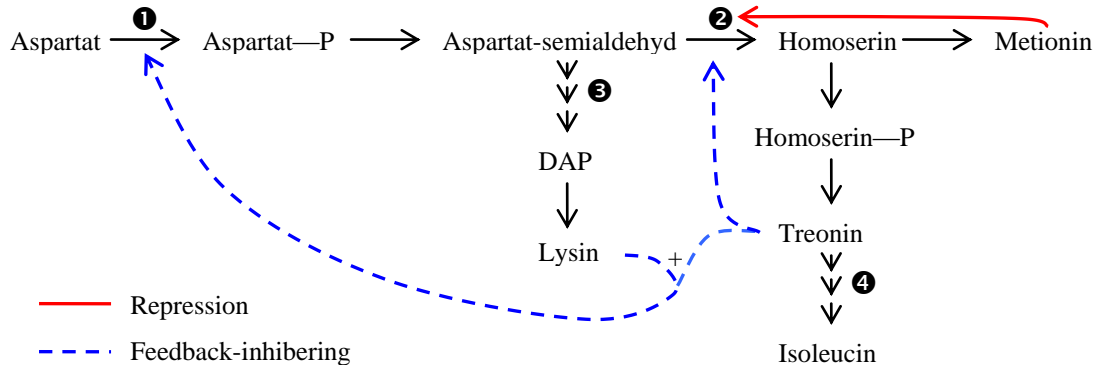


Studienämnden Kf / Kb



Studienämnden Kf / Kb

Ex. Lysinproduktion i *Corynebacterium* eller *Brevibacterium*.



Regleringsmekanismer:

- ❶ Asparokinas
Feedback-inhiberas av treonin + lysin (båda tillsammans, inte var och en).
- ❷ Homoserin-dehydrogenas
Repressas av metionin.
Feedback-inhiberas av treonin.

Överproduktion av lysin

Alternativ:

- *Deletion av genen för homoserin dehydrogenas*
På så sätt ger hög halt av lysin inte feed-back inhibering av aspartokinas eftersom treoninkoncentrationen är så låg. Kräver tillsats av homoserin eller treonin och metionin. Minimala mängder tillsats så att regleringseffekter undviks.
- *Mutering av genen för aspartokinas → AEC-resistent.*
(AEC = S-aminoetylcystein, en lysinanalog)
Aspartokinas är modifierat så att varken ACE eller lysin inte kan binda till det. Lysin förlorar då förmågan att feedback-reglera enzymet. Aspartat-semialdehyd kommer framförallt bilda lysin eftersom homoserin-dehydrogenas är feedback inhiberat av treonin samt repressat av metionin.
Produktkoncentrationen på över 60 g/l kan erhållas med dessa mutanter.

Överproduktion av treonin

I *E.coli*.

Alternativ:

- Muterat homoserin dehydrogenas som inte inhiberas av treonin
→ 1.9 g/l treonin
- Deletion av enzym som omvandlar treonin till isoleucin. Kräver (minimal) tillsats av isoleucin.
→ 4.7 g/l



Studienämnden Kf / Kb

- Deletion av enzym som omvandlar homoserin till metionin. Kräver (minimal) tillsats av metionin.
→ 6,0 g/l treonin

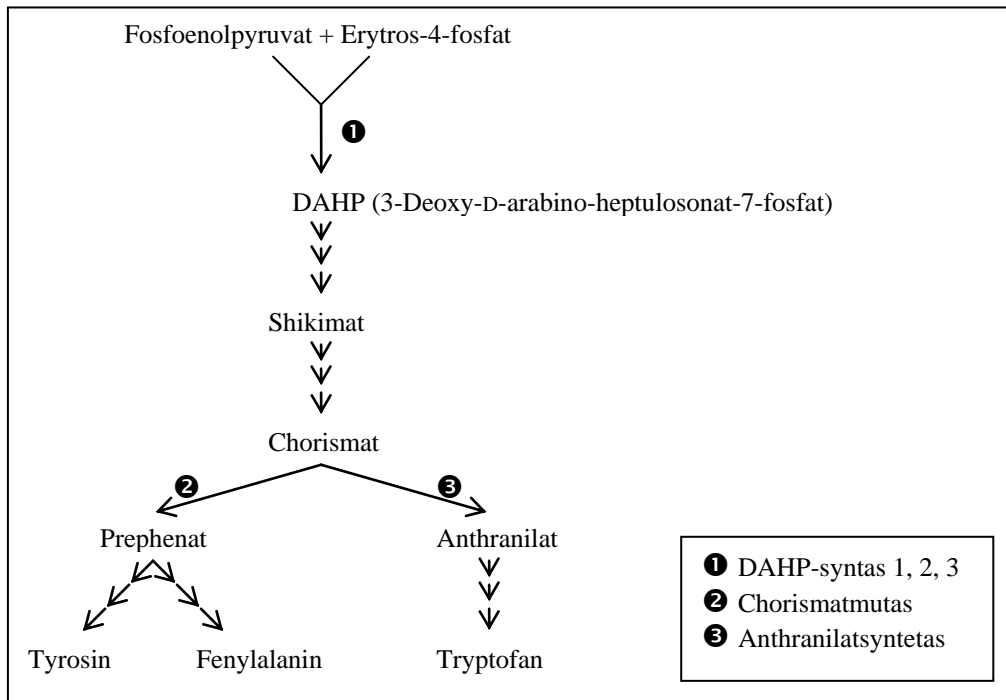


Studienämnden Kf / Kb

Produktion av aromatiska aminosyror (fenylalanin, tryptofan, tyrosin)

Fosfoenolpyruvat kommer från glukolysen medan erytros-4-fosfat kommer från pentosfosfatvägen.

”The Shikimat pathway”:



Regleringsmekanismer

1 DAHPsyntas (har tre isoenzym)

Vart och ett av dessa är feed-back inhiberade av en slutprodukt dvs antingen tyrosin, fenylalanin eller tryptofan. Om alla tre aminosyrorna är närvarande i höga koncentrationer finns ingen DAHP-syntas aktivitet alls.

2 Chorismatmutas

Feedback inhiberas av tyrosin.

Repressas och feedback inhiberas av fenylalanin.

Aktiveras av tryptofan.

3 Anthranilatsyntetas

Repressat och feedback inhiberat och av tryptofan.

● Prephenat (intermediär)

Feed-back inhiberas av fenylalanin →→ fenylalanin?

Aktiveras av tyrosin. →→ fenylalanin?



Studienämnden Kf / Kb

Överproduktion av fenylalanin

Δ Tyr samt Δ Trp (dvs mutanter där gener för produktionen av tyrosin resp. tryptofan saknas) samt multicopy plasmid med isoenzym för tyrosininhiberat DAHPsyntas (kunde även ha varit tryptofan inhiberat) och chorismatmutas, okänsligt för både repression och feedback inhibering av fenylalanin

Enzymer

Industriella enzymer:

- *Proteaser*
 - Alkaliska proteaser från alkalofila bakterier (framförallt *Bacillus*) används i detergent (ex tvättmedel)
 - De är stabila vid höga temperaturer, vid pH 9-11 och i närvaro av komplexbindare och perborater (BrO_4^- -salter).
 - Produktionsskala 40 – 100 m³
 - Fed-batch process med låg koncentration av NH_4 och aminosyror som repressar bildningen av proteas.
 - Allergier är vanliga vid proteasdamm. För att undvika detta kapslas enzymet in.

- *Amylaser*
 - *Amylas*
 - Bryter ner stärkelse till dextriner, glukos och maltos genom att bryta α -(1-4)-bindningen. Kan inte bryta α -(1-6)-bindningar men inhiberas inte heller av dem.
 - Är ett endoenzym (verkar mitt i molekylen, inte i ändarna).
 - Hittas i *Bacillus*, *Aspergillus*.

 - *Glukoamylas*
 - Bryter α -(1-4)-bindningen. Kan inte bryta α -(1-6)-bindningen utan inhiberas av dem.
 - Är inte ett endoenzym (verkar i polysackaridens ändrar).
 - Hittas i *Aspergillus*.

 - *Pullulanas*
 - α -(1-6)-bindningen.
 - Hittas i *Bacillus* och *Klebsiella*.

 - *Amyloglukosidas*
 - Bryter både α -(1-4)-bindningar och α -(1-6)-bindningar.
 - Är inte ett endoenzym.
 - Hittas i *Aspergillus niger*.

Stärkelse är en vanlig råvara i fermentationsprocesser (vete, korn, potatis). T.ex. jäst kan inte bryta ner stärkelse eller korta polysackarider. Disackarider är ok (men sker mycket långsamt), trisackarider är precis på gränsen (kan gå i viss mån, men då väldigt väldigt långsamt) och längre kedjor går inte alls.



Studienämnden Kf / Kb

- *Glukosisomeras*
Omvandlar glukos till fruktos som är sötare än både glukos och sackaros.
- *Rennin*
Vid ostproduktion, koagulering av mjölkprotein.
- *Pektinas*
Klarningsmedel i juice.

Sötningemedel

Invertas katalyserar följande reaktion:
Sackaros → Glukos + Fruktos

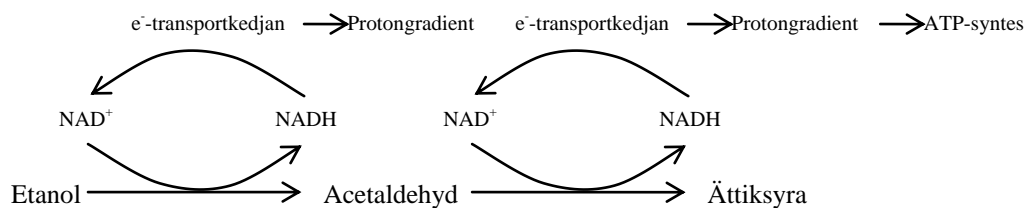
Glukosisomeras katalyserar följande reaktion:
Glukos → Fruktos + Glukos (oreagerat)

Fruktos är dubbelt så sött som sackaros (strösocker) medan glukos är 70-75% sötare. Imobilisering av glukosisomeras eller hela celler t.ex. "Novo process". *Bacillus coagularis* cross linked med glutanaldehyd ger 0,3-1 mm kulor. Processen är kontinuerlig och ser i två parallella linjer med tre 2,2 m³-koloner vadera. Ger 100 ton fryktos/dygn.

Organiska syror

- *Vinäger (ättiksyra)*
Ättiksyra kan lätt framställas kemiskt men vinäger framställs via fermentation. Detta eftersom vinäger inte bara innehåller ättiksyra utan även andra ämnen som är viktiga för smak och lukt. Vin som substrat kräver inga ytterligare tillsatser.

Två bakterier används: *Acetobacter* och *Glukonobacter*.
Processen är inte en fermentation utan en ofullständig oxidation.



Obligat aerob process. Celldöd inträffar om luftning avbryts vid höga etanol- och ättiksyrekoncentrationer.

Det finns tre olika framställningsmetoder:

- *Open-vat eller Orleansmetoden*
Öppna, grunda vinfat med (slemmig) bakteriefilm på ytan.
Långsam, ineffektiv process eftersom det enda stället där bakterierna är i kontakt med båda substraten, vin och syre, är precis i ytan.



Studienämnden Kf / Kb

- "Trickle generator"
Bakterier på ytan av bokflis som är suspenderad i substratet (vin). Vinet sprayas från toppen och omvandlas när det rinner ner genom träflisen. Därefter recirkuleras det. Luftning sker från botten.
Efter ~3 dygn har 90% av etanolen omvandlats.
- *Submerged, bubble method*
Vanlig omrörd tankreaktor (STR).
Effektivitet 90-98%
- *Citronsyra*
De mesta produceras via fermentation.

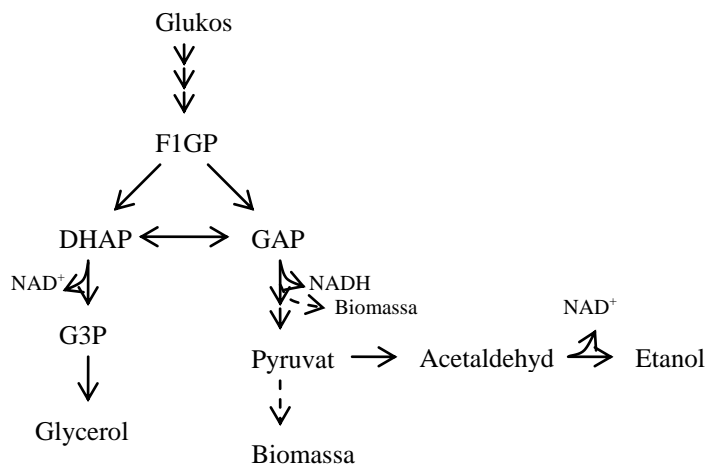
Används inom:

- Livsmedelsindustrin: Smakförstärkare i godis, juice, glass, marmelader m.m.
- Läkemedelsindustrin: Fe-citrat, citronsyra är konserveringsmedel i blodbanker.
- Kemiindustrin: Antifoamedel, mjukgörare.

Aspergillus niger utsöndrar citrat som "scavenger" (citrat "fångar upp järn") när den lider av järnbrist.

Alkoholer och bagerijäst

- *Glycerol*
Produktion skedde främst via fermentation under världskrigen. Idag sker det via kemisk syntes med osmotolerant jäst som bra producenter.



Tillsats av bisulfit som bidrar komplex med acetaldehyd gör att etanolproduktionen blockeras.

NADH som producerats i glykolysen kan oxideras via reduktion av DHAP (vänstra delen av reaktionerna ovan).

- *Etanol*
Bagerijäst som produktionsorganism vid fermentativa processer.

Fördelar:

- GRAS-status (generally regarded as safe)



Studienämnden Kf / Kb

- Hela genomet är sekvenserat
- Det finns många genetiska metoder för manipulering etc. (hänger ihop med ovanstående).
- Lättodlad. Man har stor industriell erfarenhet.
- Det är en tuff och robust organism som klara industriella förhållanden.

Ex. *S.cerevisae*

Används för produktion av etanol och biomassa.

- *Etanolproduktion*
Anaerob produktion som kräver Tween 80- och ergosteroltillsats.
Man vill undvika bildning av biomassa och glycerol (se reaktioner ovan).
Syntes av biomassa genererar ett överskott på NADH (beror på användning av glykolytiska intermediärer samt att biosyntetiska vägar för aminosyrabildning resulterar i NADH-bildning). Enda sättet för jäst att konsumera NADH anaerobt är via glycerolbildning. Därför har man microaeroba förhållanden så att överskottet av NADH respireras utan att etanol produceras.
- *Bagerijästproduktion*
Produktionen sker via respiratorisk metabolism för att få ett högt utbyte (respiration ~0.5 g/g , fermentation ~0.1 g/g).
Aerob fed-batchodling.
Som substrat används melass (Jästbolaget i Rotebro).
Hur hög produktionshastigheten är beror av reaktorns syreöverföringskapacitet.
1 liter skalas succesivt upp till 80 000 liter stora tankar

Önskan:

- Högt trehalosinnehåll. Viktigt för god lagringsbeständighet.
- Högt proteininnehåll. Viktigt för hög (fermentativ) aktivitet
- Hög fermentativ aktivitet för hög CO₂-produktion.

Trehalos ackumuleras vanligtvis när tillväxen avstannar eller vid låga tillväxthastigheter. Även kvävebrist samt kolöverskott ger högt trehalosinnehåll.

Proteinhalten ökar med ökad tillväxthastighet men minskar vid kvävebrist.

Jämn kvalitet på jästen är bättre än hög fast ojämn kvalitet.