

Szymon Adam Porębski 

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Biofizyki Molekularnej

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, budynek D, pok. BFi-9

Uniwersytet Łódzki

e-mail: szymon.adam.benedykt.porebski@tutanota.com

MITOCHONDRIA I BILANS ENERGETYCZNY KOMÓRKI W BIOTECHNOLOGII

MITOCHONDRIA AND CELL ENERGY BALANCE IN THE BIOTECHNOLOGY

ABSTRACT

A mitochondria activity is a basic source of an energy for eukaryotic-like organisms. An energy generation (in the form of ATP) and their generation may significantly enhance an effectiveness of a biotechnological production. Changes in an intracellular ATP production may take place through regulation of all stages of pathways involved in ATP generation process. Researches are mostly concentrated on changes in: F-ATPase activity; proton gradient; amount of intracellular NADH; electron transport chain or accessibility to oxygen. Changes in ATP balance contribute to many benefits, such as: growth in amount of desired product; enhancement of cell viability; decrease of by-product generation and changes in rate of conversion and modification of a substrate. This paper describes review about these issues.

KEY WORDS: biotechnology, mitochondria, ATP, cell energy balance.

STRESZCZENIE

Praca mitochondriów stanowi podstawowe źródło energii dla organizmów eukariotycznych. Sama generacja energii (w postaci ATP) oraz jej modyfikowanie może znacząco przyczynić się do wzrostu efektywności produkcji biotechnologicznej. Zmiany w produkcji wewnątrzkomórkowego ATP odbywać się mogą poprzez regulację każdego etapu szlaków enzymatycznych. Badania z tym związane szczególnie koncentrują się na zmianach w: aktywności F-ATPazy; gradiencie protonowym; ilości wewnątrzkomórkowego NADH; łańcuchu transportu elektronów oraz dostępowi do tlenu. Zmiany w bilansie ATP przyczynić się mogą do licznych korzyści, takich jak: wzrost ilości pożądanego produktu, zwiększenie żywotności komórek, spadek generacji produktów ubocznych, czy zmiany w prędkości przetwarzania i modyfikowania substratu. Niniejsza praca prezentuje przegląd przez te zagadnienia.

SŁOWA KLUCZOWE: biotechnologia, mitochondria, ATP, bilans energetyczny komórki.

WSTĘP

Mitochondria (z greckiego *mitos* – nić, *chondros* – ziarno) są kluczowymi dla energetyki komórki organellami. Zostały one pierwszy raz zaobserwowane przez Köllikera w 1857 roku (preparat utrwalony) oraz przyżyciowo w 1900 roku przez Michaelisa. Charakterystycznym elementem tych organelli jest posiadanie własnych rybosomów, podobnych do tych prokariotycznych oraz osobnego materiału genetycznego (mtDNA) o wielkości 16569 bp u *Homo sapiens* (YOUNG I COPELAND, 2016). Koduje on rRNA dla własnych rybosomów, liczne tRNA oraz niektóre podjednostki F-ATPazy i stanowi obiekt szczególnego zainteresowania nauk biotechnologicznych. Dotyczy to szerokiego spektrum tych nauk, zarówno związanych z rolnictwem (WANG I IN., 2017) jak i medycyną (PICARD I IN., 2016).

BILANS ATP KOMÓRKI

Funkcjonalnie, mitochondria stanowią najbardziej aktywne organella komórki, które odpowiadają za jej homeostazę. Najważniejszym procesem jest wytwarzanie energii w postaci ATP, przeprowadzając w macierzy mitochondrialnej cykl kwasu cytrynowego (cykl Krebsa), a następnie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej - fosforylacji oksydacyjnej (WILSON, 2017). Biotechnologicznie jest to o tyle ważne, że ingerowanie w nie pozwala uzyskać odpowiednie substraty np. kwas cytrynowy, ale także na przeprowadzanie terapii chorób, gdzie występuje niewłaściwe funkcjonowanie enzymów mitochondrialnych (BOCZONADI I IN., 2018). Wpływanie na bilans ATP wewnątrz komórki ma istotny wpływ na żywotność drobnoustrojów przemysłowych, a tym samym wydajność i ekonomię procesu biotechnologicznego (JINGWEN I IN., 2008; GUTIERREZ I LEWIS, 2015). Modyfikowanie wypadkowej ilości ATP, może odbywać się na podstawie regulacji: ilości wewnątrzkomórkowego NADH; łańcucha transportu elektronów; aktywności F-ATPazy; dostępu tlenu, czy gradientu protonowego.

NADH powstaje w wyniku glikolizy, oksydacji kwasów tłuszczowych oraz działania cyklu kwasu cytrynowego. Istnieją metody modyfikowania jego ilości. Pierwszą z nich jest

wzmożona ekspresja lub delecja genów kluczowych dla ilości NADH w komórce np. *ldh* kodującego dehydrogenazę mleczanową (TURNER I IN., 2015). Badacze wprowadzili do *Saccharomyces cerevisiae* gen *ldhA* prowadząc do jego nadekspresji celem wydajniejszej produkcji kwasu mlekowego. W warunkach hodowli z limitowanym dostępem tlenu oraz ksylozą jako źródłem węgla i energii uzyskano wydajność na poziomie 0,69 gram kwasu mlekowego na 1 gram ksylozy. Drugą z metod jest wprowadzanie do podłoża hodowlanego substancji, będących specyficznymi substratami dla zależnych od NAD⁺ dehydrogenaz np. cytrynianu, czy szczawianu (KIM I SWARTZ, 2000). Przykładem takiej roli substratów może być efekt dodatku związków kwasu masłowego na wydajność produkcji butanolu w ko kulturze *Saccharomyces cerevisiae* i *Clostridium acetobutylicum*. Badacze podają jako jeden z potencjalnych mechanizmów zjawiska zwiększenie potencjału przetwarzania glukozy i nadprodukcji NADH (LUO I IN., 2015). Ostatnim ze sposobów, prowadzących do spadku ilości NADH w bilansie komórek, jest wprowadzenie lub nadekspresja genów kodujących oksydazy NADH. Prowadzą one do rozkładu cząsteczki NADH do NAD⁺ i wody, bez otrzymania ATP (VEMURII IN., 2006; SHI I IN., 2016). Przykładem tego mogą być eksperymenty polegające na wprowadzeniu oksydazy NADH kodowanej przez gen *noxE* z *Lactococcus lactis* (KIM I IN., 2015). Celem tego było zwiększenie wydajności produkcji 2,3-butandiolu. Rezultatem modyfikacji genetycznych był wzrost produkcji o 23,8% względem wyjściowego szczepu.

Modyfikacje łańcucha transportu elektronów zazwyczaj wpływają na zmniejszenie ilości ATP w komórce. Ich wprowadzanie zależy może np. od tego czy pożądane są produkty uboczne glikolitycznej generacji ATP. W przypadku, gdy chce się kontrolować ilość niepożądanego np. kwasu masłowego lub octowego, można zwiększyć wydajność łańcucha transportu elektronów poprzez regulację szlaków syntezy chinonów (WU I IN., 2015). Na samą dyfuzję chinonów w błonach subkomórkowych ma wpływ ich lepkość. Genetycznie jest to możliwe do regulowania poprzez modyfikowanie szlaków syntezy kwasów tłuszczowych, gdzie wzrost

ich nienasyceń zmniejsza jej lepkość (BUDIN I IN., 2018). W wydajności łańcucha transportu elektronów ważną rolę odgrywa dostępność ostatecznego akceptora elektronów w postaci tlenu. Można także wykorzystać w tym celu tlenki azotu i doprowadzić do nadekspresji kompleksów reduktaz tlenu azotu jako ostatecznych oksydaz całego łańcucha (JUNG I IN., 2017). Zmniejszenie transportu elektronów uzyskuje się poprzez wprowadzenie do pożywki specyficznych inhibitorów takich jak rotenon, czy antymycyna A (ABE I IN., 2008). Alternatywnie, celem rozprzęgnięcia transportu elektronów można zastosować modyfikacje genetyczne dające w rezultacie zmniejszoną ilość aktywnego kompleksu białkowego, czego przykładem jest zastosowanie operacji genetycznych przez zespół Liu, który doprowadził do deficytu w komórkach cytochromu *aa₃* oraz *b* (LIU I IN., 2006). Innym przykładem jest jednoczesna inaktywacja monooksygenazy chinolu, terminalnej oksygenazy cytochromu *bd* oraz oksygenazy cytochromu *bo* prowadząca do całkowitej blokady łańcucha transportu elektronów. Jednakże takie rozwiązanie prowadziło do spadku wzrostu komórek oraz znacznego zwiększenia poboru glukozy (MAN I IN., 2020). Ostatnim omawianym rozwiązaniem jest doprowadzenie do ekspresji genów, których białka odpowiedzialne są za szlak alternatywnej oksydacji np. gen *AOX1* pochodzący z *Histoplasma capsulatum*, którego produkt białkowy przeprowadza reakcję oksydacji z wytworzeniem cząsteczki wody, bez magazynowania energii w postaci ATP (JOHNSON I IN., 2006).

Zmniejszenie aktywności syntazy ATP (także nazywanej jako F-ATPaza) (JUNGE I NELSON, 2015) wymuszana komórkach przedefiniowanie metabolizmu w stronę glikolizy. W praktyce efekt ten uzyskuje się np. poprzez specyficzne drobnocząsteczkowe inhibitory, czy mutacje w materiale genetycznym komórki (NESCI I IN., 2020). Zwiększenie aktywności F-ATPazy nastąpić może poprzez doprowadzenie do nadekspresji F-ATPazy, zwiększając wypadkową ilość tego białka w organizmie. Przykładem jest nadekspresja mitochondrialnego genu *ATP6* pochodzącego z *Arabidopsis thaliana* i wprowadzonego do *Saccharomyces cerevisiae*, co zwiększyło prędkość regeneracji ATP w

komórkach modelu (ZHANG I IN., 2008). Sama generacja ATP w związku z ATPazami może być modyfikowana za pomocą zmian pH środowiska. Badania pokazały, że dodatek kwasu cytrynowego zwiększył pH cytozolu u *Candida glabrata* i spadek pH wakuolarnego. Sugeruje się, że te rezultaty wynikają ze zwiększonej produkcji ATP potrzebnej dla intensywniejszej pracy V-ATPazy transportującej jony wodorowe do wnętrza wakuoli, chroniąc elementy cytozolu przed obniżonym pH środowiska (HARA I KONDO, 2015). W odwrotnej sytuacji podwyższenie pH produkcji biotechnologicznej, zmniejsza generację ATP i indukcję szlaków glukoneogenezy (IVARSSON I IN., 2015).

Tlen, jako ostateczny akceptor elektronów w łańcuchu oddechowym limituje wydajność produkcji ATP w wyniku fosforylacji oksydacyjnej (SALIN I IN., 2015). Wyróżnia się trzy sposoby zwiększenia stężenia tlenu w bioreaktorze. Pierwszym jest zwiększenie dostaw tlenu przez bełkotkę, zwiększenia obrotów mieszania lub zastosowanie technologii będących wariacją obu metod (JU I IN., 2019). Kolejnym jest wprowadzenie do bioreaktora nietoksycznych rozpuszczalników (heksan, heptan, dodekan) o wyższym od wody współczynniku rozpuszczalności tlenu. Zwiększa to całkowitą zawartość tlenu w bioreaktorze i powierzchnię dyfuzji tlenu, przy zużywaniu go w podłożu hodowlanym przez drobnoustroje (RAMESH I IN., 2016). Ostatnią z metod jest wprowadzenie konstruktów genetycznych kodujących białko, które pozwoli na wyłapywanie tlenu z pożywki i uwalnianiu go w warunkach niedoboru (np. hemoglobiny z *Campylobacter jejuni*) (XU I IN., 2015). Wykorzystuje się do tego także inne analogi hemoglobiny np. gen *vgh* z *Vitrocilla stercoraria* (VÉLEZ-LEE I IN., 2016). W strategii tej ważną rolę odgrywa finalna lokalizacja hemoglobiny. Badania potwierdziły, że lepsze wyłapywanie tlenu przez rekombinowane białko zachodzi, gdy gromadzi się ono w przestrzeni peryplazmatycznej aniżeli wewnątrz komórki bakteryjnej (OUYANG I IN., 2018). Istnieją jednak przypadki kiedy zwiększanie ilości tlenu w pożywce nie prowadzi do maksymalizacji efektywności procesu biotechnologicznego. Przykładem tego jest generacja i akumulacja substancji lipidowych w komórkach

Lipomyces starkeyi. Prowadzone badania pokazały, że akumulacja substancji oleistych zachodziła przy doprowadzaniu do niewielkiego niedoboru w azot oraz tlen. Badacze przedstawili hipotezę, że efekt jest wywołany promowaniem procesów wymagających niewielkiej ilości ATP wobec tych wysoce energochłonnych. Powoduje to zmniejszenie energochłonnej generacji biomasy, replikacji DNA oraz produkcji NADH. Jednocześnie zwiększa proces odnawiania NAD⁺ z NADH na alternatywnych szlakach redukcyjnych prowadzących do akumulacji zredukowanych alkoholi, czy niepełnej oksydacji cząsteczki glukozy, zwiększając akumulację lipidów (CALVEY I IN., 2016).

Gradient protonowy jest siłą napędzającą zmiany konformacyjne ATPazy. Istnieje wiele związków np. ksyleny, bakteriocyny, czy 2,4-dinitrofenol, które zaburzają selektywną przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej, a tym samym gradientu (ZHOU I IN., 2008). Dodatkowo, przy hodowli komórek eukariotycznych, może dojść do ekspresji białek UCP (ang. uncoupling protein), będących kanałami jonowymi, a tym samym zaburzenia gradientu protonowego (SLUSE I IN., 2006). W rezultacie prowadzi to do zaburzenia gradientu syntezy ATP (REBUFFET I IN., 2017). Ważne jest, aby minimalizować w hodowli ryzyko zaburzenia gradientu protonowego przez czynniki zewnętrzne- i wewnątrzkomórkowe. Należy jednak podkreślić, że zaburzenie elementów związanych z gradientem protonowym poszczególnych organeli może w pewnych wypadkach wywoływać wzrost efektywności produkcji. Przykładem tego mogą być badania nad generacją *H2* przez *Chlamydomonas reinhardtii* w celu generacji biogazu w oparciu o procesy fotosyntezy. Badacze dokonali zatrzymania ekspresji białek regulujących gradient protonowy w chloroplastach: PGR5 (ang. Proton Gradient Regulation 5) oraz PGRL1 (ang. PGR-like 1). Rezultatem był wzrost generacji wodoru, co według zespołu badawczego było spowodowane brakiem kontroli nad respiracją w fotosystemach i przejściu komórek *Chlamydomonas reinhardtii* w kierunku metabolizmu anaerobowego (STEINBECK I IN., 2015). Dodatkowo takie białka jak PGR5 są sugerowane w naukach biotechnologicznych jako

markery roślin odpornych na różnorodne stresy abiotyczne (SHAHID I IN., 2016).

KORZYŚCI Z REGULACJI BILANSU ATP

Możliwość regulowania poziomu ATP skutkuje wieloma biotechnologicznymi korzyściami. Umożliwia zwiększenie ilości otrzymywanego w bioprocesie produktu. Wzorcowym przykładem jest bioprodukcja glutationu (GSH). Synteza i sekrecja tego związku jest bezpośrednio związana z bilansem wewnątrzkomórkowym ATP (LIAO I IN., 2008), ale suplementacja adenozynotrójfosoforanu do podłoża hodowlanego jest bardzo kosztowna. Rozwiązaniem tego może być immobilizacja w żelu karagenowym zmodyfikowanej genetycznie *Escherichia coli* (zawierającej geny *gshI/gshII*) odpowiedzialnej w układzie produkcyjnym za syntezę glutationu oraz immobilizowanej kinazy octanowej (EC 2.7.2.1) z *Saccharomyces cerevisiae* – enzymu systemu regeneracji ATP (MUROOKAI IM-ANAKA, 2020). Do syntezy glutationu stosować można same odpowiednio zmodyfikowane genetycznie szczepy *Escherichia coli*. Przykładem tego jest wprowadzenie do *Escherichia coli* genu *gshF* ze *Streptococcus thermophilus*. Koduje on syntetazę glutationu, która wpływa korzystnie na bilans ATP ze względu na przeprowadzanie przez nią dwóch etapów syntezy GSH, które są zazwyczaj wykonywane przez dwa odrębne enzymy: ligazę L-cysteiny (EC 6.3.2.2) i syntetazę L-glutationu (EC 6.3.2.3) (WANG I IN., 2016). Kolejną korzyścią jest bezpośrednio zwiększenie produktywności wynikającej ze zwiększenia obiegu węgla w kluczowych szlakach enzymatycznych (glikolizy, cyklu kwasu cytrynowego). Potwierdzać to mogą badania porównujące szczepy *Saccharomyces cerevisiae* produkujące S-adenozyl-L-metioninę (SAM) z różną wydajnością. Badacze za pomocą znakowania węglem ¹³C odkryli, że te o wydajniejszej generacji SAM produkują więcej ATP, głównie dzięki łańcuchowi oddechowemu (HAYAKAWA I IN., 2015).

Modyfikacja bilansu wewnątrzkomórkowego ATP skutkuje zmianami ilości powstających produktów ubocznych metabolizmu np. kwasu octowego, mlekowego, czy glicerolu (ASLAN I IN., 2017). Związki te akumulując się w podłożu

hodowlanym wpływają negatywnie na wydajność produkcji oraz koszty bioprodukcji (QUATRAVAUX I IN., 2006). Przykładem zwiększenia generacji ATP celem redukcji ilości produktów ubocznych jest np. synteza penicylin przez *Penicillium chrysogenum*. Wyższe zapotrzebowanie na ATP tego organizmu powstaje w trakcie fazy logarytmicznego wzrostu (WANG I IN., 2019). Dodatkowo, synteza oraz wydzielanie penicylin w trakcie fazy stacjonarnej jest niezwykle energochłonna (73 mole ATP na rzecz 1 mola penicyliny-G) (VAN GULIK I IN., 2001). W trakcie trwania tego procesu niezwykle ważne jest, aby monitorować ilość wewnątrzkomórkowego ATP, gdyż doprowadzić to może do zwiększenia ilości produktów ubocznych, pod postacią kwasów organicznych i zaburzenia całości biosyntezy (VAN GULIK I IN., 2000). Modyfikacje genetyczne zmniejszające ilość produktów ubocznych często wywołują efekt plejotropowy, gdzie większość zmian ma korzystny wpływ na wydajność produkcji. Przykładem tego jest praca na temat syntezy pinocembryny w komórkach *Escherichia coli*. Badacze dokonali zaburzenia ekspresji energochłonnych genów syntezy proliny oraz SAM metodą CRISPRi (ang. CRISPR interference). Przyczyniło się do zwiększenia wydajności syntezy flawonoidu (TAO I IN., 2018). Innym przykładem, także z udziałem *Escherichia coli*, jest zmniejszanie generacji glikogenu w komórkach przez dezaktywację genów rozgałęziających glikogen, co przyczyniło się do zwiększenia zdolności produkcyjnej szczepu (ZHANG I IN., 2016). Oba przypadki wyłączenia genów syntezy niepożądanych produktów opierają się na podobnym mechanizmie zwiększającym wydajność całej bioprodukcji. Brak aktywnych enzymów syntezy produktów ubocznych wywołuje przekierowanie przepływu węgla w komórce na tory generacji pożądanego produktu. Dodatkowo nie jest wydatkowane ATP na syntezę niechcianych produktów, przez co zwiększa się jego wypadkowa ilość i jest ona wykorzystywana przez komórkę na utrzymanie aktywnych szlaków syntezy – w tym przypadku dających pożądanego bioproduktu.

Kolejnym atutem modyfikacji stężenia ATP w komórce jest zmiana szybkości przetwarzania substratu przez drobnoustroj. Bilans ATP

dla przetwarzania substratów ma udział przy takich procesach transportu przez błonowy oraz fosforylacji substratu (HEARN I IN., 2008). Dodatek ATP do medium w hodowli linii komórkowej HaCaT prowadził do wzrostu produkcji interleukiny-6. Badania stwierdziły, że ma to bezpośredni związek z fosforylacją receptora EGF (ang. Epidermal Growth Factor) oraz komponentów szlaku regulowanego przez kinazę p38 (SUMI I IN., 2016). Efekt bilansu ATP, szczególnie widać przy zastosowaniu hemicelulozy jako jednego z substratów. Większość produkcyjnych szczepów nie jest w stanie przetworzyć ksylozy oraz arabinozy, głównych pentoz surowców celulozowych, a jednocześnie najważniejszych źródeł energii oraz węgla organicznego (KUYPER I IN., 2005). Rozwiązaniem tego jest modyfikacja genetyczna szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, o zwiększonej wydajności produkcji ATP, poprzez doprowadzenie do ekspresji nieaktywnych genów dla utylizacji arabinozy oraz genów nieoksydatywnego szlaku fosforanów pentoz, przez co szczepy te mogą wykorzystać arabinozę jako źródła węgla i energii (WISSELINK I IN., 2007). Analogiczną sytuację prezentuje wykorzystanie substratów ligninocelulozowych, co jest szczególnie ważne przy optymalizacji np. procesu biotechnologicznej produkcji biopaliw (JIN I IN., 2015).

Ostatnią korzyścią wynikającą z regulacji poziomu ATP w komórkach jest zwiększona odporność drobnoustrojów na stres środowiskowy. ATP odgrywa rolę ochronną przed stresem (zmiany pH, temperatury, ciśnienia osmotycznego oraz występowanie RFT) poprzez transport aktywny oraz regulację szlaków sygnałowych (ZHOU I IN., 2008). Pierwsza z metod, transport aktywny, pozwala na kontrolowanie składu środowiska wewnątrzkomórkowego poprzez przemieszczanie do oraz poza komórkę. Zmiany ilości białek transportujących oraz samego ATP silnie wpływają na odporność szczepów na warunki środowiska. Przykładem jest odporność szczepów *Saccharomyces cerevisiae* na wysokie stężenia etanolu proporcjonalne do poziomu wewnątrzkomórkowego ATP (CHAROENBHAKDI I IN., 2016). Druga z metod opiera się o udział ATP w szlakach przekazywania sygnału. Przykładem jest tu wykorzystanie ATP jako źródła energii przez elementy

szlaku HOG odpowiedzialnego za ochronę przed stresem osmotycznym (KLIPPI IN., 2005). Na podobnej zasadzie działa wiele szlaków odporności na stres środowiskowy, gdzie stresowe warunki środowiskowe prowadzą do zwiększonego zapotrzebowania na ATP i odwrotnie, zwiększona suplementacja ATP, łagodzi konsekwencje stresu środowiskowego (SANCHEZ I IN., 2008). Ostatnia z metod polega na zwiększanie całościowego ATP w komórce, mogącego być wykorzystane na łagodzenie stresu środowiskowego, poprzez eliminację całych operonów kodujących geny nieprzydatne z perspektywy środowiska bioreaktora. Pierwszym przykładem tego, jest eliminacja 412 genów z genomu *Corynebacterium glutamicum* co zwiększyło jego odporność warunki stresowe, w tym ograniczenie w dostępie tlenu (BAUMGART I IN., 2018). Drugim przykładem tej strategii jest eliminacja genów kodujących więc *Pseudomonas putida*. Wypadkowo zwiększyło odporność szczepu na stres oksydacyjny oraz promieniowanie UV, a także jego ogólną żywotność (LIEDER I IN., 2015).

PODSUMOWANIE

Mitochondria z uwagi na rolę w energetyce komórki stanowią interesujący obiekt badań z perspektywy biotechnologii. Wynika to z kluczowej roli w produkcji ATP i nadrzędnej funkcji tej cząsteczki w niezliczonej ilości procesów komórkowych. Modyfikowanie bilansu ATP w komórkach przyczynić się może do licznych korzyści w ekonomice bioprodukcji, ale jak pokazały powyższe przykłady odbywać się to może różnymi strategiami. Ważne jest rozpatrzenie, czy bardziej opłacalna okaże się suplementacja substratami lub inhibitorami, czy lepsze będzie rozpoczęcie produkcji w oparciu o zmodyfikowany genetycznie szczep. W doborze metody ważne jest także rozpatrzenie punktu w szlakach syntezy ATP, który chcemy docelowo modyfikować. Tutaj kluczową rolę odgrywa nie tylko same szlaki syntezy ATP, ale pośrednie i bezpośrednie powiązanie ich ze szlakami odpowiedzialnymi za syntezę pożądanego produktu. Ostatecznie jak pokazały przykłady, racjonalna modyfikacja bilansu ATP w komórce zwiększa wydajność, a tym samym opłacalność biotechnologicznej produkcji.

LITERATURA

- ABE M., KUBO A., YAMAMOTO S., HATOH Y., MURAI M., HATTORI Y., MAKABE H., NISHIOKA T., MIYOSHI H. 2008. Dynamic function of the spacer region of acetogenins in the inhibition of bovine mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochemistry*. 47, 6260–6266.
- ASLAN S., NOOR E., BAR-EVEN A. 2017. Holistic bioengineering: rewiring central metabolism for enhanced bioproduction. *The Biochemical journal*. 474(23), 3935–3950.
- BAUMGART M., UNTHAN S., KLOß R., RADEKA., POLENT., TENHAEF N., MÜLLER M. F., KÜBERL A., SIEBERT D., BRÜHL N., MARIN K., HANS S., KRÄMER R., BOTT M., KALINOWSKI J., WIECHERT W., SEIBOLD G., FRUNZKE J., RÜCKERT C., WENDISCH V. F., NOACK S. 2018. *Corynebacterium glutamicum* Chassis C1*: Building and Testing a Novel Platform Host for Synthetic Biology and Industrial Biotechnology. *ACS synthetic biology*. 7(1), 132–144.
- BOCZONADI V., RICCI G., HORVATH R. 2018. Mitochondrial DNA transcription and translation: clinical syndromes. *Essays Biochemistry*. 62(3), 321–340.
- BUDIN I., DE ROND T., CHEN Y., CHAN L., PETZOLD C. J., KEASLING J. D. 2018. Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition. *Science (New York, N.Y.)*. 362(6419), 1186–1189.
- CALVEY C. H., SU Y. K., WILLIS L. B., MCGEE M., JEFFRIES, T. W. 2016. Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource technology*. 200, 780–788.
- CHAROENBHAKDI S., DOKPIKUL T., BURPHAN T., TECHO T., AUESUKAREE C. 2016. Vacuolar H⁺-ATPase Protects *Saccharomyces cerevisiae* Cells against Ethanol-Induced Oxidative and Cell Wall Stresses. *Applied Environmen-*

tal Microbiology. 82(10), 3121-3130.

GUTIERREZ J. M., LEWIS N. E. 2015. Optimizing eukaryotic cell hosts for protein production through systems biotechnology and genome-scale modeling. *Biotechnology journal*. 10(7), 939–949.

HARA K. Y., KONDO, A. 2015. ATP regulation in bioproduction. *Microbial cell factories*. 14, 198.

HAYAKAWA K., KAJIHATA S., MATSUDA F., SHIMIZU H. 2015. (13)C-metabolic flux analysis in S-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 120, 532–538.

HEARN E. M., PATEL D. R., VAN DEN BERG B. 2008. Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, 8601–8606.

IVARSSON M., NOH H., MORBIDELLI M., SOOS M. 2015. Insights into pH-induced metabolic switch by flux balance analysis. *Biotechnology Progress*. 31, 347–357.

JIN M., SLININGER P. J., DIEN B. S., WAGHMODE S., MOSER B. R., ORJUOLA A., SOUSA L., BALAN V. 2015. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in biotechnology*. 33(1), 43–54.

JINGWEN Z., LIMING L., ZHONGPING S., GUOCHENG D., JIAN C. 2008. ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives. *Biotechnology Advances*. 27, 94-101.

JOHNSON K. M., CLEARY J., FIERKE C. A., OPIPARIA W., GLICK G. D. 2006. Mechanistic basis for therapeutic targeting of the mitochondrial F1F0-ATPase. *American Chemical Society Chemical Biology*. 1, 304–308.

JU J. H., OH B. R., KO D. J., HEO S. Y., LEE J. J., KIM Y. M., YANG K. S., SEO J. W., HONG

W. K., KIM C. H. 2019. Boosting productivity of heterotrophic microalgae by efficient control of the oxygen transfer coefficient using a microbubble sparger. *Algal Research*. 41, 101474.

JUNG H. M., KIM Y. H., OH M. K., 2017. Formate and nitrate utilization in *Enterobacter aerogenes* for semi-anaerobic production of isobutanol. *Biotechnology Journal*. 12(11), 1700121.

JUNGE W., NELSON N. 2015. ATP synthase. *Annual Review of Biochemistry*. 84, 631–657.

KIM D. M., SWARTZ J. R. 2000. Oxalate improves protein synthesis by enhancing ATP supply in a cell-free system derived from *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 22, 1537–1542.

KIM J. W., SEO S. O., ZHANG G. C., JIN Y. S., SEO J. H. 2015. Expression of *Lactococcus lactis* NADH oxidase increases 2,3-butanediol production in Pdc-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*. 191, 512–519.

KLIPP E., NORDLANDER B., KRUGER R., GENNEMARK P., HOHMANN S. 2005. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nature Biotechnology*. 23, 975–982.

KUYPER M., TOIRKENS M. J., DIDERICH J. A., WINKLER A. A., VAN DIJKEN J. P., PRONK J. T. 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*. 5, 925–934.

LIAO X., DENG T., ZHU Y., DU G., CHEN J. 2008. Enhancement of glutathione production by altering adenosine metabolism of *Escherichia coli* in a coupled ATP regeneration system with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 104, 345–352.

LIEDER S., NIKEL P. I., DE LORENZO V., TAKORS R. 2015. Genome reduction boosts heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *Microbial cell factories*. 14, 23.

- LIU L. M., LI Y., LI H. Z., CHEN J. 2006. Significant increase of glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by inhibition of oxidative phosphorylation. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*. 6, 1117–1129.
- LUO H., GE L., ZHANG J., ZHAO Y., DING J., LI Z., HE Z., CHEN R., SHI Z. 2015. Enhancing Butanol Production under the Stress Environments of Co-Culturing *Clostridium acetobutylicum/Saccharomyces cerevisiae* Integrated with Exogenous Butyrate Addition. *PloS one*. 10(10), e0141160.
- MAN Z., GUO J., ZHANG Y., CAI Z. 2020. Regulation of intracellular ATP supply and its application in industrial biotechnology. *Critical reviews in biotechnology*. 1–12.
- MUROOKA Y., IMANAKA, T. 2020. Recombinant microbes for industrial and agricultural applications. CRC Press. Floryda.
- NESCI S., PAGLIARANI A., ALGIERI C., TROMBETTI F. 2020. Mitochondrial F-type ATP synthase: multiple enzyme functions revealed by the membrane-embedded FO structure. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 55(4), 309–321.
- OUYANG P., WANG H., HAJNAL I., WU Q., GUO Y., CHEN, G. Q. 2018. Increasing oxygen availability for improving poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas*. *Metabolic engineering*. 45, 20–31.
- PICARD M., WALLACE D. C., BURELLE Y. 2016. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*. 30, 105–116.
- QUATRAVAUX S., REMIZE F., BRYCKAERT E., COLAVIZZA D., GUZZO J. 2006. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *Journal of Applied Microbiology*. 101, 903–912.
- REBUFFET E., FRICK A., JÄRVÅ, M., TÖRN-ROTH-HORSEFIELD S. 2017. Cell-free production and characterisation of human uncoupling protein 1-3. *Biochemistry and biophysics reports*. 10, 276–281.
- SALIN K., AUER S. K., REY B., SELMAN C., METCALFE N. B. 2015. Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. *Proceedings. Biological sciences*. 282(1812), 20151028.
- SANCHEZ C., NEVES A. R., CAVALHEIRO J., DOS SANTOS M. M., GARCIA-QUINTANS N., LOPEZ P., SANTOS H. 2008. Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 1136–1144.
- SHAHID M.N., JAMAL A., AFTAB B., MOHAMED B.B., WATTOO J.I., KIANI M.S., RASHID B., HUSNAIN T. 2016. Identification, characterization, and expression profiling of salt-stress tolerant proton gradient regulator 5 (PGR5) in *Gossypium arboreum*. *Turkish Journal of Biology*. 40, 889–898.
- SHI X. C., ZOU Y. N., CHEN Y., ZHENG C., LI B. B., XU J. H., SHEN X. N., YING H. J. 2016. A water-forming NADH oxidase regulates metabolism in anaerobic fermentation. *Biotechnology for biofuels*. 9, 103.
- SLUSE F. E., JARMUSZKIEWICZ W., NAVET R., DOUETTE P., MATHY G., SLUSE-GOFFART CM. 2006. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochimica et BiophysicaActa*. 1757, 480–485.
- STEINBECK J., NIKOLOVA D., WEINGARTEN R., JOHNSON X., RICHAUD P., PELTIER G., HERMANN M., MAGNESCHI L., HIPPLER M. 2015. Deletion of Proton Gradient Regulation 5 (PGR5) and PGR5-Like 1 (PGRL1) proteins promote sustainable light-driven hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* due to increased PSII activity under sulfur deprivation. *Frontiers in plant science*. 6, 892.

- SUMI D., ASAO M., OKADA H., YOGI K., MIYATAKA H., HIMENO S. 2016. Synergistic augmentation of ATP-induced interleukin-6 production by arsenite in HaCaT cells. *Archives of toxicology*. 90(6), 1307–1313.
- TAO S., QIAN Y., WANG X., CAO W., MA W., CHEN K., OUYANG P. 2018. Regulation of ATP levels in *Escherichia coli* using CRISPR interference for enhanced pinocembrin production. *Microbial cell factories*. 17(1), 147.
- TURNER T. L., ZHANG G. C., KIM S. R., SUBRAMANIAM V., STEFFEN D., SKORY C. D., JANG J. Y., YU B. J., JIN, Y. S. 2015. Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion. *Applied microbiology and biotechnology*. 99(19), 8023–8033.
- RAMESH H., MAYR T., HOBISCH M., BORISOV S., KLIMANT I., KRÜHNE U., WOODLEY J. M. 2016. Measurement of oxygen transfer from air into organic solvents. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 91(3), 832–836.
- VANGULIK W. M., ANTONIEWICZ M. R., DELAATW., VINKE J. L., HEIJNEN J. J. 2001. Energetics of growth and penicillin production in a high-producing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 72, 185–193.
- VAN GULIK W. M., DE LAATW., VINKE J. L., HEIJNEN J. J. 2000. Application of metabolic flux analysis for the identification of metabolic bottlenecks in the biosynthesis of penicillin-G. *Biotechnology and Bioengineering*. 68, 602–618.
- VÉLEZ-LEE A. E., CORDOVA-LOZANO F., BANDALA E. R., SANCHEZ-SALAS J. L. 2016. Cloning and expression of vgb gene in *Bacillus cereus*, improve phenol and p-nitrophenol biodegradation. *Physics and Chemistry of the Earth. Parts A/B/C*. 91, 38-45.
- VEMURI G. N., EITEMAN M. A., ALTMAN E. 2006. Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted ArcA regulatory protein. *Biotechnology and Bioengineering*. 94, 538–542.
- WANG D., WANG C., WU H., LI Z., YE Q. 2016. Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 43(1), 45–53.
- WANG L., FENG C., ZHENG X., GUO Y., ZHOU F., SHAN D., LIU X., KONG J. 2017. Plant mitochondria synthesize melatonin and enhance the tolerance of plants to drought stress. *Journal of pineal research*. 63(3), 12429.
- WANG G., WANG X., WANG T., VAN GULIK W., NOORMAN H. J., ZHUANG Y., CHU, J., ZHANG S. 2019. Comparative Fluxome and Metabolome Analysis of Formate as an Auxiliary Substrate for Penicillin Production in Glucose-Limited Cultivation of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology journal*. 14(10), e1900009.
- WILSON D. F. 2017. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *The Journal of physiology*. 595(23), 7023–7038.
- WISSELINK H. W., TOIRKENS M. J., BERRIEL M. D. F., WINKLER A. A., VAN DIJKEN J. P., PRONK J. T., VAN MARIS A. J. 2007. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 4881–4891.
- WU H., TULI L., BENNETT G. N., SAN K. Y. 2015. Metabolic transistor strategy for controlling electron transfer chain activity in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 28, 159–168.
- XU L., XIONG W., YANG J. K., LI J., TAO X. W. 2015. Recombinant *Escherichia coli* strains with inducible *Campylobacter jejuni* single domain hemoglobinCHb expression exhibited improved

cell growth in bioreactor culture. PloS one. 10(3), e0116503.

YOUNG M. J., COPELAND W. C. 2016. Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. Current opinion in genetics & development. 38, 52–62.

ZHANG J. G., WANG X. D., ZHANG J. N., WEI D. Z. 2008. Oxygen vectors used for S-adenosyl-methionine production in recombinant *Pichia pastoris* with sorbitol as supplemental carbon source. Journal of Bioscience and Bioengineering. 105, 335–340.

ZHANG J., QUAN C., WANG C., WU H., LI Z., YE Q. 2016. Systematic manipulation of glutathione metabolism in *Escherichia coli* for improved glutathione production. Microbial cell factories. 15, 38.

ZHANG X. X., LIU S. K., TAKANO T. 2008. Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (AtMtATP6) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. Biotechnology Letters. 30, 1289–1294.

§ Praca wpłynęła do redakcji: 17.08.2020.