

חיידקים מהונדסים מייצרים דלק ביולוגי מעשבים

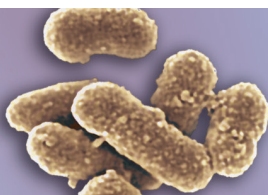


עובד על פי המאמר:

Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*.

מאת בוקינסקי וחוקרים נוספים מקבוצת המחקר של קיסלינג מהמכון לביו-אנרגיה ומאוניברסיטת ברקלי בקליפורניה.

G. Bokinsky, P. Peralta-Yahya, A. George, B.M. Holmes, E.J. Steen, J. Dietrich, T.S. Lee, D. Tullman-Ercek, C.A. Voigt, B.A. Simmons and J.D. Keasling. (2011). PNAS, 108, 19949–19954.



Gene Tamers – Studying Biotechnology Through Research

כיתוח ועיבוד:
גליה זר כבוד
כרופ' ענת ירדן

ייעוץ אקדמי:
דר' עינת שפרינצק

קראו והעירו:
רותי מנדלוביץ, דר' הדס גלברט, דר' יוסי מחלוף, דר' גילת בריל, רונית רוזנשין, דינה ברטוב

עריכה ועימוד:
אבי טל

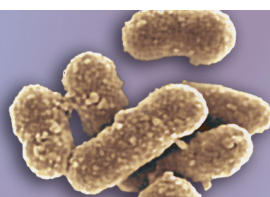
גרפיקה ממוחשבת:
זיו אריאלי

עריכה לשונית:
נדין קלברמן

גרסה אלקטרונית למאמר באתר המלווה לספר:
<http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/biotech/maamarim.html>

אין לשכפל, להעתיק, לצלם, להקליט, לתרגם, לאחסן במאגר מידע, לשדר או לקלוט בכל דרך או אמצעי אלקטרוני, אופטי או מכני או אחר כל חלק שהוא מהחומר שבספר זה. שימוש מסחרי מכל סוג שהוא בחומר הכלול בספר זה אסור בהחלט אלא ברשות מפורשת בכתב מהמוציא לאור.

©
כל הזכויות שמורות
משרד החינוך
2012



חיידקים מהונדסים מייצרים דלק ביולוגי מעשבים

תמצית

בשנים האחרונות מושקעים מאמצים ומשאבים רבים למציאת תחליף **לדלק מחצבי** שיהיה כדאי מבחינה כלכלית וידידותי לסביבה. דלק ביולוגי מתקדם, המופק מביומסה שמקורה **בתאית**¹ של יבולים שלא נועדו להזנת אדם ומפסולת חקלאית, הוא המקור הטוב ביותר לדלקי תחבורה נזליים מסקורות מתחדשים. אולם אחת הבעיות העיקריות בייצור דלק ביולוגי כזה היא עלות ייצורו הגבוהה, בשל הצורך בהוספה של אנזימים שמטרתם לפרק תאית לסוכרים הניתנים להתססה. מחקר זה מציג לראשונה פריצת דרך משמעותית בדרך לפיתוח דלק ביולוגי מתקדם בתור חלופה מתחדשת וידידותית לסביבה לבנזין, סולר ודלק סילוני. במחקר זה יוצרו חיידקי *אשריכיה קולי* מהונדסים שמסוגלים לעכל עשב מסוג דוחן, לפרקו לחד-סוכרים וליצור מהם חומרי מוצא לשלושה סוגי דלקים: בנזין, סולר ודלק סילוני, ללא צורך בהוספת אנזימים חיצוניים לתגובה. בכך יוזלו באופן משמעותי עלויות הייצור של דלק ביולוגי.

מבוא

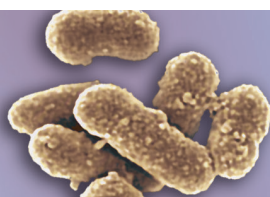
מאגרי הנפט ההולכים ומידלדלים וזיהום האוויר המתגבר מחייבים מציאת פתרון חלופי לדלק המחצבי. דלק ביולוגי (ביו-דלק) הוא דלק נזלי המיוצר מצמחים, בעלי היים או תוצריהם ובכך מהווה מקור של אנרגיה מתחדשת, בניגוד לדלק המחצבי, שהוא משאב מתכלה. שימוש בדלק מחצבי מוסיף פחמן למחזור הפחמן בטבע (פחמן שלא היה זמין במשך מיליוני שנים), גורם לעליית רמת הפחמן הדו-חמצני באטמוספירה ובכך מגביר את אפקט החממה. לעומת זאת, דלק ביולוגי הוא ידידותי לסביבה ואין הוא מוסיף פחמן למחזור, כיוון שהפחמן הדו-חמצני שנפלט במהלך שריפת הדלק הביולוגי, נקלט על ידי הגידולים שמהם מפיקים דלק ביולוגי בתהליך הפוטוסינתזה (1). הדלק הביולוגי מהווה כ-2.7% מצריכת הדלק לתחבורה בעולם כיום והשימוש בו נמצא בצמיחה. הדלקים הביולוגיים המיוצרים כיום, אשר מקורם מגידולי מאכל, נקראים דלקים ביולוגיים מדור ראשון והעיקריים שבהם הם אתנול וביודיזל. אתנול מופק מתהליכי תסיסה של סוכרים שמקורם בצמחי תירס וקנה סוכר ומיוצר בעיקר בארה"ב ובברזיל. האתנול יכול לשמש כתחליף לבנזין.

ביודיזל מופק משומנים ושמונים הנמצאים בצמחים, מיוצר בעיקר באירופה ויכול להחליף את הסולר (דיזל) (ראו טבלה 1).

ישנן מספר בעיות בהפקת ביו-דלק בדרכים הקיימות כיום: ראשית, גידול צמחים לצורכי דלקים ביולוגיים מתחרה בגידולי מזון שונים (בשטח ובמשאבים), ויש הטוענים שהוא גורם משמעותי במשבר המזון העולמי. שנית, לגידול צמחים לשם הפקת דלק ביולוגי עלול להיות מחיר סביבתי כבד. למשל, גידול דקלים באסיה לשם הפקת שמן דקלים גרם לנזק אקולוגי כפול, משום שבעת הרס היערות גם נפלט גז החממה, פחמן דו-חמצני, שהדקלים אגרו באופן טבעי וגם נזק כבד ביותר לעולם החי העשיר ולמגוון הביולוגי באזורים אלו. בנוסף על בעיות אלו, הביו-דלק המיוצר כיום אינו מותאם לרוב למנועים הקיימים ויש צורך להתאימם לשימוש בביו-דלק. כמו כן יש לערבב את הביו-דלק עם הדלק הרגיל (2).

על פי מחקרים אחרונים, אחד הפתרונות האפשריים לבעיות השונות שגורם הייצור הנוכחי של דלק ביולוגי מדור ראשון הוא יצירת ביו-דלק מתקדם, הקרוי גם ביו-דלק מדור שני. זהו ביו-דלק המופק מחומרי גלם בני-קיימא כמו

1. **דלק מחצבי** (נקרא גם דלק מאובנים) – דלק הנוצר מהתאבנות של אורגניזמים בסביבה חסרת חמצן מתחת לפני האדמה במשך מאות מיליוני שנים. דלקים אלה הם פחם, נפט וגז טבעי. את הדלק המחצבי כורים או שואבים מהשכבות העליונות של כדור הארץ והוא מהווה משאב מתכלה.
2. **תאית** (צלולוז) – רב-סוכר המורכב משרשרות של גלוקוז. התאית הנה מרכיב מרכזי בדפנות התאים בצמחים ומהווה כשליש מהמסה של הצומח בכדור הארץ.



חומרי גלם	דלק מחצבי	ביו-דלק דור 1	ביו-דלק דור 2
חומרי גלם	נפט גולמי	שמן ירקות, קנה סוכר, תירס	פסולת צמחית זולה שאינה משמשת כמזון (פסולת חקלאית, פסולת יער, עשב וכו')
תוצרים עיקריים	בנזין, דיזל (סולר), דלק סילוני	ביודיזל, אתנול	בוטאנול, חומצות שומן, פינן
בעיות והסכנות	- הידלדלות מקורות הנפט (משאב מתכלה) - גורם לזיהום סביבתי - בעיות כלכליות ואקולוגיות	- תחרות לגידולי מזון (שטח ומשאבים) - לרוב אינו מותאם למנועי-רכב קיימים - יכול לגרום לפגיעה במערכות אקולוגיות ובמגוון הביולוגי	- עלות גבוהה - נוצרת כמות לא מספקת
יתרונות	- זמין וזול יחסית - תשתיות קיימות ומוכרות	- ידידותי לסביבה - זול	- אין תחרות לגידולי מזון (שטח ומשאבים) - ידידותי לסביבה
יכולים לשמש כתחליף ל-		ביודיזל ← סולר אתנול ← בנזין	בוטאנול ← בנזין חומצות שומן ← סולר פינן ← דלק סילוני

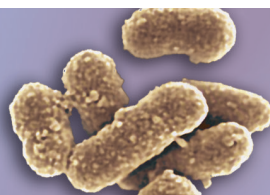
← מהווה חומר מוצא ל...

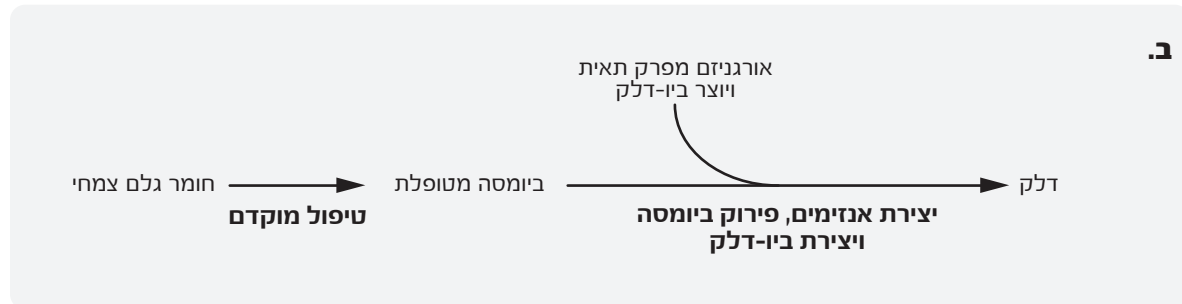
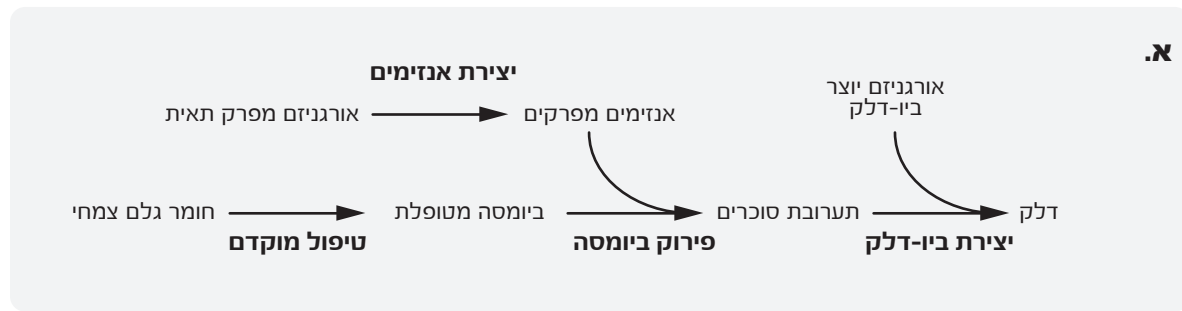
בהוספה של אנזימים שמטרתם לפרק תאית (צלולוז) לסוכרים הניתנים להתססה (איור 1א). דרך אפשרית לפתרון בעיה זו וליצירת דלק ביולוגי מתקדם וידידותי לסביבה היא יצירת חיידק מהונדס שיפריש את האנזימים לפירוק תאית ויכיל בנוסף אנזימים ליצירת דלק. כך ניתן יהיה לצמצם את עלויות ההפקה של הדלק על ידי מיזוג של שני שלבים נפרדים – הפירוק של תאית לסוכרים והתססת הסוכרים הללו לדלק – לשלב יחיד באורגניזם אחד (איור 1ב). בעיה נוספת בייצור ביו-דלק מתקדם היא שהתאית בדופן הצמחים מוטמעת בחוזקה בחומר עצי הקרוי ליגנין, מה שמקשה מאוד על מיצוי התאית מהביומסה הצמחית. נוזל יוני (מלח מותך) יכול להמיס את הליגנין ולסייע במיצוי התאית.

תאית מיבולים שלא נועדו להזנת אדם ופסולת חקלאית. חומרי גלם כאלה יכולים להיות שאריות מגידולים, פסולת עירונית ותעשייתית, פסולת יער, צמחים שגדלים על אדמות לא חקלאיות ועוד (3). חלק מהיתרונות של שימוש בדלק ביולוגי מדור שני הם: התאמתו לשימוש במנועים קיימים, בניגוד לאתנול והעובדה שאינו מתחרה בגידולי המזון. בוטאנול, חומצות שומן ופינן³ (Pinene) - חומר מוצא לדלק סילוני) הם דוגמאות לביו-דלקים מתקדמים (טבלה 1).

על אף היתרונות הטמונים בייצור ביו-דלק מדור שני, אחת הבעיות העיקריות בייצור ביו-דלק מתקדם היא עלות ייצורו הגבוהה, המפחיתה את הכדאיות לייצורו על פני הדלק המחצבי. אחת הסיבות העיקריות לכך היא הצורך

3. פינן (Pinene) – חומר אורגני המופק מזיקוק שרף עצים והוא המרכיב העיקרי בטרפנטין. משמש בעיקר כממס. יכול לשמש כחומר מוצא ליצירת דלק סילוני. מיוצר באופן טבעי גם על ידי מספר חיידקים.





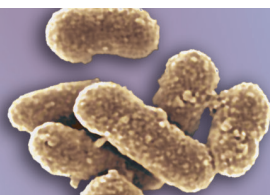
איור 1: תהליך יצירת ביו-דלק על ידי חיידק. א. שני תהליכים נפרדים ליצירת ביו-דלק: פירוק ביומסה על ידי אנזימים ויצירת ביו-דלק על ידי אורגניזם יוצר-דלק. **ב.** תהליך משולב שבו אורגניזם מהונדס מפרק את הביומסה ויוצר את הביו-דלק.

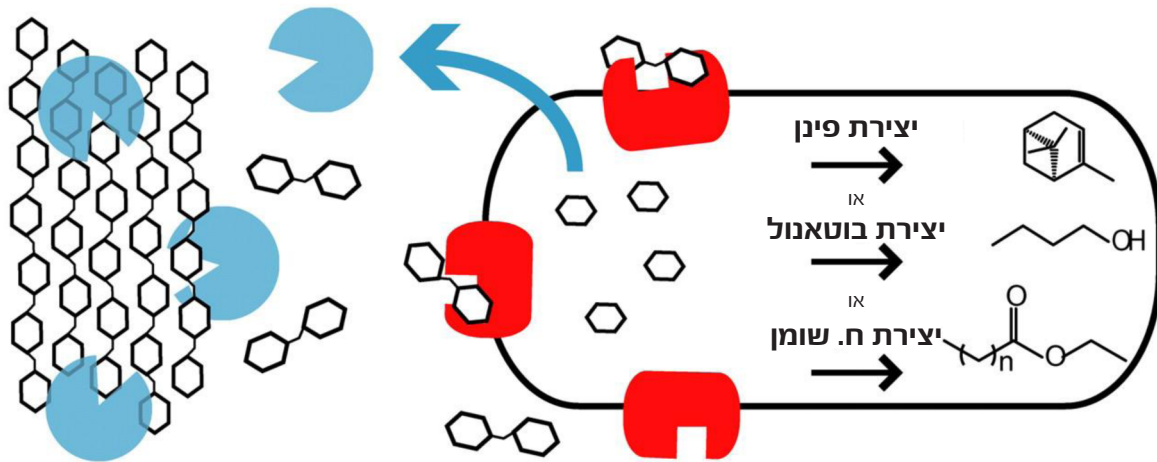
מהונדס שיכול ליצור ביו-דלק בעל אותן התכונות של דלק מחצבי כך שניתן להשתמש בו במונעים ובתשתיות הקיימות כיום ללא צורך בהתאמתו. בנוסף לכך כל הניסיונות שנעשו עד כה הניבו ביו-דלק בכמות קטנה יחסית ולא היו מותאמים למעבר לייצור בקנה מידה גדול. מטרת המחקר הזה היא יצירת חיידקי *א. קולי* מהונדסים שיהיו מסוגלים לעכל עשב מסוג דוחן, שטופל בנוזל יוני, ולפרקו לחד-סוכרים שמהם יופקו חומרי מוצא לכל שלושת סוגי הדלקים: בנזין, דיזל ודלק סילוני, ללא הוספת אנזימים חיצוניים כתוספים לתגובה. בעבודה זו פותחו שלושה זנים של חיידקי *א. קולי* מהונדסים המסוגלים לעכל תאית לחד-סוכרים באמצעות האנזימים צלולאז ובתא-גלוקוזידאז ולייצר מחד-סוכרים אלו בוטאנול (תחליף לבנזין), חומצות שומן (חומר מוצא לסולר) ופינן (חומר מוצא לדלק סילוני) (איור 2).

יצירת חיידק מהונדס כזה מתאפשרת עקב ההתקדמות הרבה בהבנת התהליכים המטבוליים והגנטיקה של החיידק *אשריכיה קולי (Escherichia coli)* או בקיצור *א. קולי*. חיידק זה הוא ככל הנראה האורגניזם שהונדס לייצר את מגוון החומרים הכימיים הגדול ביותר ובכלל זה: אינסולין, חיסונים, אלכוהול, מיסן ועוד. הקלות שבה ניתן לבצע שינויים גנטיים בחיידק *א. קולי* ולבטא בו **חלבונים הטרוולוגיים**⁴, גידולו הפשוט והמהיר, יכולות הייצור הנרחבות שלו והידע העצום שקיים אודותיו – כל אלו הופכים את השימוש בחיידק *א. קולי* לאטרקטיבי מאוד לייצור דלק ביולוגי (4).

מספר מיקרואורגניזמים הונדסו בעבר כך שיפרקו תאית וייצרו ממנה אתנול או סוגי ביו-דלק אחרים. למשל, שמר האפייה הונדס כדי ליצור אתנול מתאית, ללא הוספת אנזימים חיצוניים. אולם עד כה לא הצליחו ליצור אורגניזם

4. חלבון הטרוולוגי - חלבון זר, שאינו מיוצר באופן טבעי באורגניזם מסוים.





איור 2. חיידק א. קולי מהונדס לייצור שלושה סוגי ביו-דלק בתהליך משולב. החיידק מכיל צלולאז (כחול) המופרש (חץ כחול) מהחיידק ומפרק את התאית לרב-סוכרים מסיסים, בתא-גלוקוזידאז (אדום) מפרק את הרב-סוכרים המסיסים לחד-סוכרים שחודרים לתא החיידק ומשמשים ליצירת פינן, בוטאנול או חומצות שומן על ידי אנזימים הטרוטופיים.

וכפי-פינן מופיע גן לעמידות לאנטיביוטיקה כלורמפניקול (Chloramphenicol) כגן בורר וכן אופרונים ליצירת בוטאנול, ח.שומן ופינן, בהתאמה, כולם תחת אזור הבקרה של אופרון הלקטוז (בקצרה lac), המופעל באמצעות המשרן IPTG. זוהי מולקולה דמויית לקטוז המשמשת כמשרן לפעולת אופרון הלקטוז. היא מסוגלת להיקשר אל הדכאן ולנטרל אותו, אך איננה מהווה מצע לאנזים β -galactosidase. הדבר מהווה יתרון בעריכת הניסוי, מכיוון IPTG איננו מפורק על ידי החיידק א. קולי, רמתו נשארת קבועה בתא וקצב ביטוי הגנים נותר קבוע.

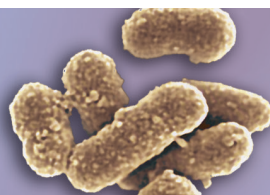
ב. החדרת הפלסמידים לחיידקים: הפלסמידים שנוצרו הוחדרו לחיידקי א. קולי בטרנספורמציה. החיידקים גודלו בנוכחות האנטיביוטיקה המתאימה על מנת לברור רק את החיידקים שאליהם חדר הפלסמיד.

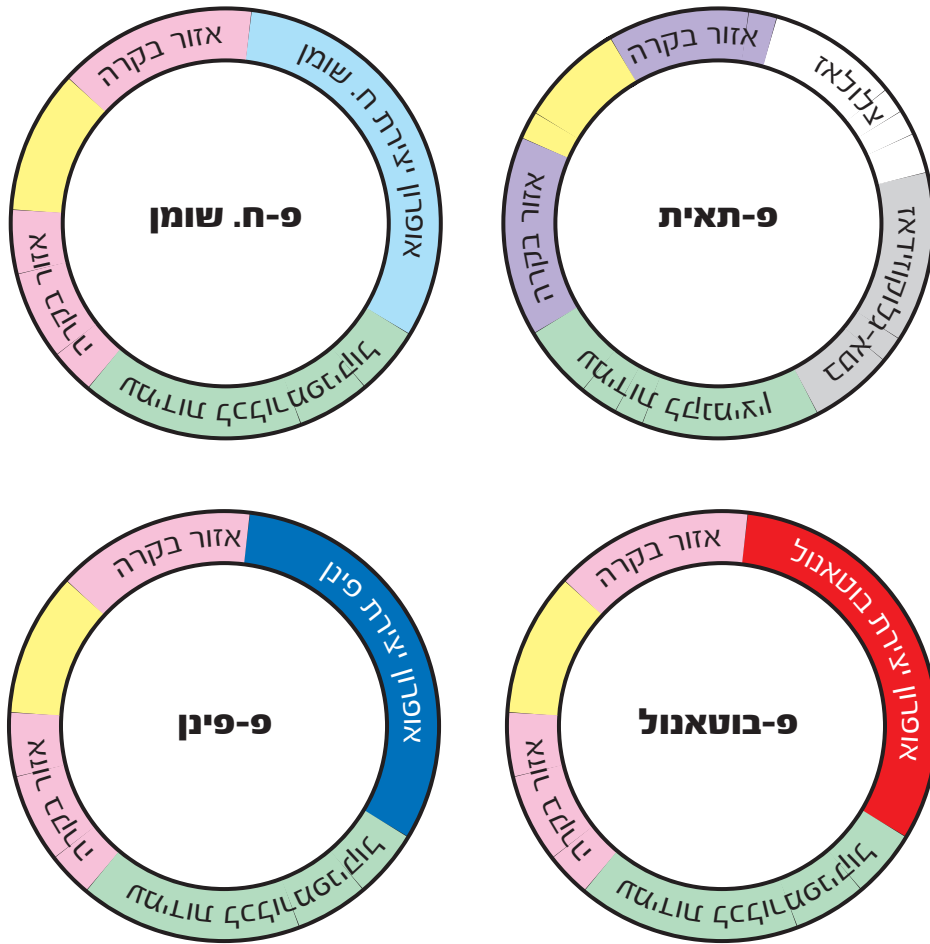
שיטות וחומרים

יצירת החיידקים המהונדסים - בניית הפלסמידים⁵ וטרנספורמציה

א. בניית הפלסמידים: הפלסמידים ששימשו ליצירת החיידקים המהונדסים הכילו אזורי בקרת תעתוק, אזורי מבניים של גנים המקודדים לאנזימים המעורבים בתהליכי העיכול של תאית ויצירת דלק, וכן גנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה ומשמשים כגנים בוררים. מבנה הפלסמידים השונים מופיע באיור 3. מקטעי ה-DNA נחתכו באמצעות אנזימי הגבלה מתוך הגנום של האורגניזמים המקוריים (טבלה 2), חוברו זה לזה על ידי האנזים ליגאז והוכנסו לפלסמיד נשא ליצירת 4 פלסמידים שונים. הפלסמיד פ-תאית מכיל גן לעמידות לאנטיביוטיקה **קנמיצין** (Kanamycin)⁶ המשמש כגן בורר ואת הגנים לצלולאז ולבתא-גלוקוזידאז, שניהם תחת אזור בקרה המופעל בתגובה לתנאי רעב. בנוסף חובר לגן צלולאז רצף הגורם להפרשת האנזים מהחיידק (איור 2). בפלסמידים פ-בוטאנול, פ-ח.שומן

5. פלסמיד - מקטע DNA מעגלי שאינו חלק מה-DNA הכרומוזומלי. מופיע לרוב בחיידקים. פלסמידים הם כלי חשוב בהנדסה גנטית.
6. קנמיצין (Kanamycin) - אנטיביוטיקה שנקשרת לריבוזום ומעכבת את פעילותו ובכך פוגעת בתהליך התרגום.
7. IPTG (Isopropyl- β -D-thio-galactoside) - אנלוג נפוץ המשמש כמשרן לפעולת אופרון הלקטוז.



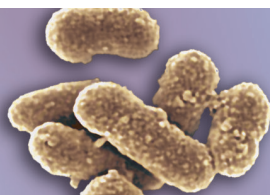


איור 3: איור סכמתי של הפלסמידים ששימשו ליצירת חיידקי ה-א. קולי המהונדסים. צהוב - הפלסמיד המקורי, סגול - אזור בקרה המופעל בתגובה לרעב, ורוד - אזור בקרה lac, ירוק - גן בורר, עמידות לאנטיביוטיקה, לבן - אזור מבני של הגן צלולאז, אפור - אזור מבני של הגן בתא-גלוקוזידאז, תכלת - אזור מבני של אופרון יצירת ח.שומן, אדום - אזור מבני של אופרון יצירת בוטאנול, כחול - אזור מבני של אופרון יצירת פינן.

טבלה 2: הגנים ששימשו לבניית הפלסמידים והמקור שלהם

שם הפלסמיד	גנים	אורגניזם מקור
פ-תאית (pCellulose)	צלולאז	בצילוס
	בטא-גלוקוזידאז	חיידק קרקע מפרק תאית
פ-ח. שומן (pFatty-acid)	6 גנים מאופרון יצירת חומצות שומן	זימומונאס
פ-בוטאנול (pButanol)	7 גנים מאופרון יצירת בוטאנול	קלוסטרדיום אצטיל-בוטיליקום*
פ-פינן (pPinene)	8 גנים מאופרון יצירת פינן	שמר האפייה

8. *Clostridium acetylbutylicum* - חיידק הקרוי גם "חיידק ויצמן", ע"ש חיים ויצמן, שהשתמש בו במלחמת העולם הראשונה לייצר אצטון - חומר חיוני לייצור חומר נפץ.



תוצאות

יצירת חיידקי א. קולי מהונדסים מעכלי עשב

החיידק א. קולי תאית, המכיל את הפלסמיד פ-תאית הנושא את הגנים צלולאז, בתא-גלוקוזידאז וכן לעמידות לאנטיביוטיקה קנמיצין, גודל בנוכחות תאית או דוחן מטופל בנוזל יוני כמקורות פחמן. כבקרה שימש זן הבר של חיידק א. קולי שגודל בנוכחות דוחן מטופל. ניתן לראות כי החיידק א. קולי תאית מסוגל לגדול על תאית כמקור פחמן יחיד (גרף 1). כמו כן עולה מהתוצאות שהחיידק גדל בנוכחות הדוחן המטופל, בקצב גידול דומה לקצב הגידול בנוכחות התאית. חיידק זן הבר הראה גידול מינימאלי כשגודל בנוכחות הדוחן המטופל.

החיידקים המהונדסים מסוגלים לייצר שלושה סוגי ביו-דלק מעשב

על מנת לבדוק את האפשרות ליצירת ביו-דלק מתקדם מצמחים ללא הוספת אנזימים חיצוניים, הונדסו שלושה זנים של חיידקי א. קולי, כך שיוכלו לייצר שלושה סוגים של ביו-דלק ישירות מדוחן מטופל בנוזל יוני: א. קולי סולה, א. קולי בנוזל יוני-א. קולי סילון. שלושת זני החיידקים הונדסו באמצעות החדרת אחד מהפלסמידים פ-ח.שומן, פ-בוטאנוול או פ-פינן לתוך חיידקי א. קולי תאית (המכילים את הפלסמיד פ-תאית). לאחר מכן נבדקה יצירת הביו-דלק המתקדם על ידי כל אחד מזני החיידקים המהונדסים, בהשוואה לחיידק זן הבר בנוכחות דוחן מטופל כמקור פחמן.

חיידקי א. קולי סולה, שגודלו במצע המכיל דוחן מטופל בנוזל יוני, הצליחו לייצר חומצות שומן (גרף 2א). לעומתם, חיידקים מזן הבר שגודלו על דוחן מטופל והחיידקים א. קולי סולה שגודלו ללא מקור פחמן ייצרו כמות זניחה של ח. שומן. תוצאות אלו מראות כי החיידקים א. קולי סולה מסוגלים ליצור ח. שומן כשהם גדלים במצע עם דוחן מטופל כמקור פחמן.

בוטאנוול עשוי לשמש כתחליף לבנזין משום שהוא מתאים למנועי הבעירה הפנימית הקיימים. החיידק א. קולי בנוזל נושא שני פלסמידים – אחד מכיל גנים לפירוק תאית

זני החיידקים

- בניסוי השתתפו חמישה זנים שונים של חיידקי א. קולי:
1. א. קולי זן הבר.
 2. א. קולי תאית – חיידק מפרק תאית (מכיל את הפלסמיד פ-תאית).
 3. א. קולי סולה – חיידק מפרק תאית ויוצר חומצות שומן (מכיל את הפלסמידים פ-תאית ופ-ח. שומן).
 4. א. קולי בנוזל – חיידק מפרק תאית ויוצר בוטאנוול (מכיל את הפלסמידים פ-תאית ופ-בוטאנוול).
 5. א. קולי סילון – חיידק מפרק תאית ויוצר פינן (מכיל את הפלסמידים פ-תאית ופ-פינן).

גידול החיידקים

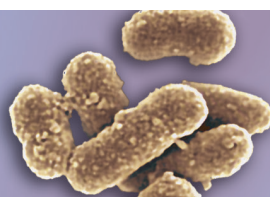
החיידקים גודלו במצע גידול עני נוזלי שהוספו לו מקורות פחמן שונים (גלוקוז, תאית או דוחן מטופל). אל מצע הגידול הוסף IPTG, המשורה את ביטוי האופרונים ליצירת בוטאנוול, ח. שומן ופינן. כמו כן, הוספו למצע הגידול האנטיביוטיקות המתאימות (כלורמפניקול ו/או קנמיצין) על מנת לברור את החיידקים המכילים את הפלסמידים שחדרו לתאי החיידקים. החיידקים גודלו למשך לילה בטמ' של 37 מעלות צלזיוס. לצורך יצירת עקומות הגידול, נמהלו החיידקים למהול 1:10⁶, נזרעו על מצע גידול מוצק, והמושבות שנוצרו נספרו.

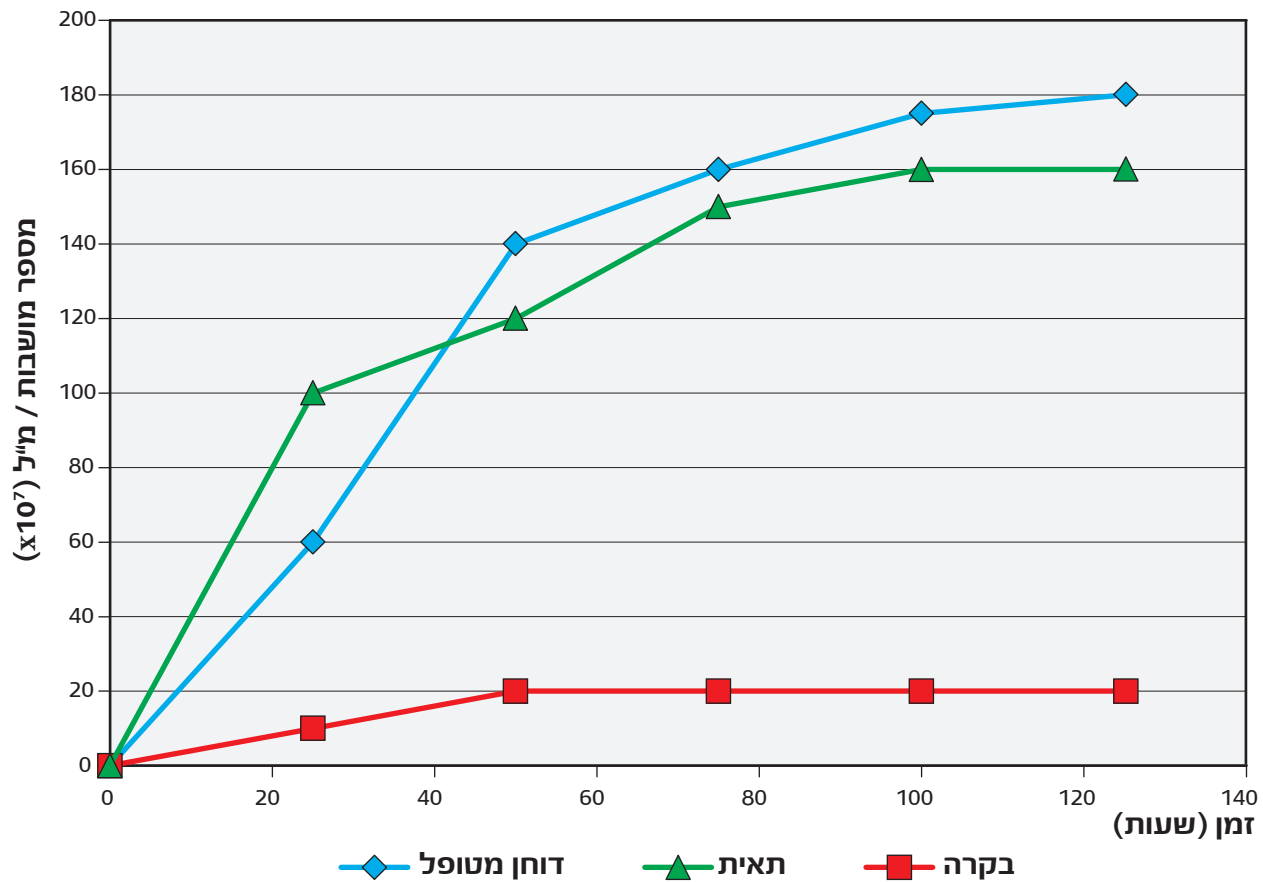
טיפול באמצעות נוזל יוני

התאית בדופן הצמחים מוטמעת בחוזקה בחומר עצי הקרוי ליגנין. משום כך קשה למצות את התאית מהביומסה הצמחית. טיפול מוקדם עם נוזל יוני (מלח מותר) גורם להמסת הליגנין ומאפשר מיצוי של התאית ביתר קלות. בניסוי, הושרה הדוחן עם הנוזל היוני למשך כ-3 שעות, סונן ונשטף היטב ולאחר מכן הוסף למצע הגידול.

בדיקת יצירת בוטאנוול, פינן וחומצות שומן

בוטאנוול, חומצות השומן או פינן מוצו מתרביות הגידול, וכמותם נמדדה באמצעות כרומטוגרפיה גזית. שיטה זו משמשת להפרדה וזיהוי של חומרים כימיים על פי גודלם, המשפיע על נקודת הרתיחה שלהם.

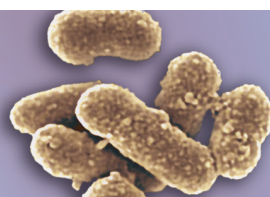




גרף 1: קצב גידול חיידקי א. קולי תאית הגדל על מצע המכיל תאית או דוחן מטופל כמקור פחמן.

גם את האנזימים ממסלול יצירת פינן, שהוא חומר מוצא ליצירת דלק סילוני. חיידקי א. קולי סילון שגדלו בנוכחות דוחן מטופל כמקור פחמן יחיד הצליחו לייצר פינן (גרף 2). לא נוצר פינן כלל מתרבית של חיידקי א. קולי סילון שגדלו ללא נוכחות מקור פחמן או מתרבית של חיידקים מזן הבר שגודלו בנוכחות הדוחן המטופל.

והשני מכיל 7 גנים ממסלול יצירת בוטאנול. חיידקים אלה ייצרו בוטאנול כשגודלו על מצע גידול המכיל דוחן מטופל כמקור פחמן יחיד (גרף 2). החיידקים א. קולי בנזין ייצרו פי 9 פחות בוטאנול כשגודלו ללא מקור פחמן. חיידקים מזן הבר שגודלו בנוכחות דוחן מטופל, ייצרו פי 3.5 פחות בוטאנול מחיידקי א. קולי בנזין. חיידקי א. קולי סילון מכיל בנוסף לאנזימים לפירוק תאית

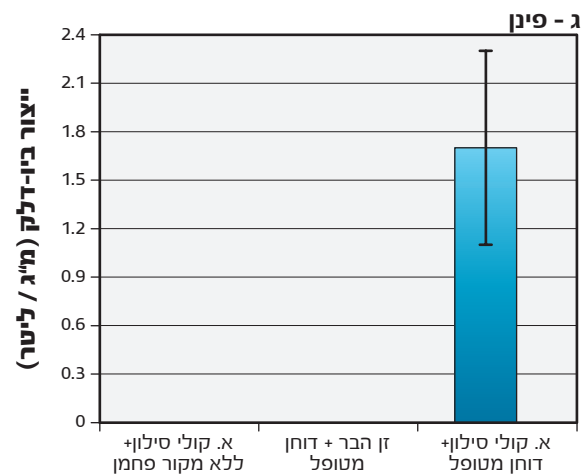
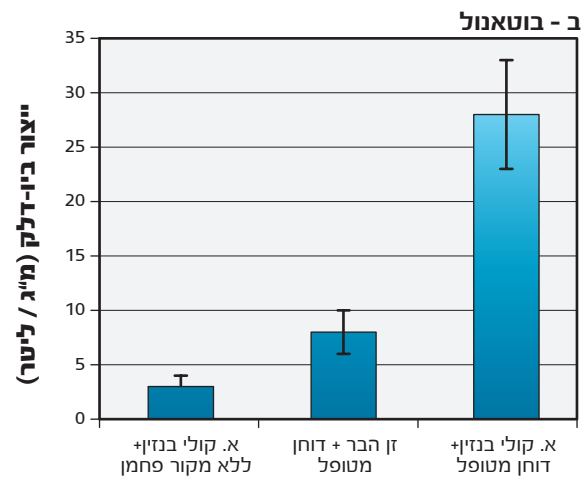
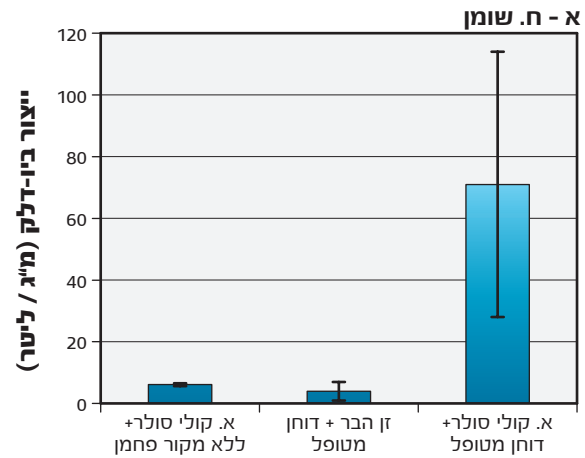


דיון ומסקנות

מחקר זה מדווח לראשונה על יצירת חיידקי א. קולי מהונדסים המסוגלים לייצר שלושה סוגי דלק מתקדמים ישירות מביומסה צמחית, ללא הוספת אנזימים מפרקי תאית ממקור חיצוני. בשנים האחרונות מושקעים מאמצים ומשאבים רבים למציאת תחליף לדלק מחצבי שיהיה כדאי כלכלית וידידותי לסביבה. חוקרים רבים סבורים כי ביו-דלקים מתקדמים, המופקים מתוך ביומסה שמקורה בתאית של יבולים שלא נועדו להזנת אדם ופסולת חקלאית, מייצגים את המקור הטוב ביותר לדלקי תחבורה נזליים מתחדשים (2). בעבר נעשו ניסיונות ליצור מיקרואורגניזמים מהונדסים שייצרו ביו-דלק מתקדם מתאית, אולם עד כה לא הצליחו לייצר ביו-דלק בכמות גבוהה מספיק, ועלות הייצור הייתה גבוהה מדי.

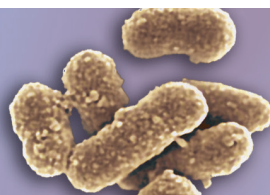
תוצאות המחקר מראות כי זני החיידקים המהונדסים מסוגלים לגדול בנוכחות דוחן מטופל בנוזל יוני כמקור פחמן, לפרק את התאית שבו לסוכר וליצור שלושה חומרים - ח. שומן, בוטאנול ופינן - המהווים חומרי מוצא לשלושה סוגים של דלק ביולוגי: סולר, בנזין ודלק סילוני, בהתאמה. התהליך המשולב ליצירת ביו-דלק המתואר כאן, שבו חיידק מהונדס מכיל גם את האנזימים לפירוק התאית וגם את אלו שיוצרים דלק, יכול להוזיל באופן משמעותי את עלויות הייצור הגבוהות שנובעות בעיקר מהצורך להוסיף אנזימים מפרקים ממקור חיצוני.

למרות השיפור המשמעותי בייצור ביו-דלק מתקדם מחיידק מהונדס שהושג במחקר זה, המערכת עדיין איננה מתאימה לייצור בקנה מידה תעשייתי. על מנת שזני החיידקים שהונדסו במחקר זה יהיו מתאימים לייצור דלק ביולוגי מתקדם בקנה מידה תעשייתי ויוכלו להוות תחליף לדלק המחצבי, יש לשפר באופן ניכר גם את יכולת יצירת הביו-דלק שלהם וגם את יכולת פירוק הביומסה. למשל, באופן אידאלי חיידק יכול לייצר כ-0.26 גר' חומצות שומן לליטר - כמות גבוהה בהרבה מהכמות שנוצרה על ידי החיידק המהונדס בעבודה זו (כ-0.07 גר' לליטר). כמו כן החיידקים המהונדסים הצליחו לפרק רק כ-10% מהתאית בדוחן המטופל לגלוקוז. ייתכן כי ניתן להגביר את יעילות פירוק הביומסה על ידי הכנסת אנזימים נוספים



זן החיידק ומצע הגידול

גרף 2: יצירת שלושה סוגי ביו-דלק על ידי חיידקי א. קולי מהונדסים. חיידקי א. קולי סולר ייצרו ח. שומן (א), חיידקי א. קולי בנזין ייצרו בוטאנול (ב) וחיידקי א. קולי סילון ייצרו פינן (ג). בגרף מוצגות סטיות תקן של 3 חזרות ביולוגיות.



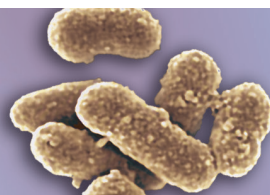
לסיכום, מחקר זה מציג לראשונה פריצת דרך משמעותית בדרך לפיתוח ביו-דלקים מתקדמים שיוכלו להחליף בנזין, סולר ודלק סילוני בתור חלופות מתחדשות, נקיות וידידותיות לסביבה. שיפור תהליכי פירוק הביומסה ויצירת שלושה סוגי ביו-דלק בתהליך משולב יכולים להוות נתיב חסכוני ואקולוגי לייצור ביו-דלקים מתקדמים.

ביבליוגרפיה

1. Naik, S.N. et al. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 578–597.
2. Demirbas, A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, 86, 108–117.
3. Tilman, D. et al. (2009). Beneficial Biofuels - The Food, Energy, and Environment Trilemma. *Science*, 375, 270-271.
4. Keasling, J.D. (2010). Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 330, 1355-1358.

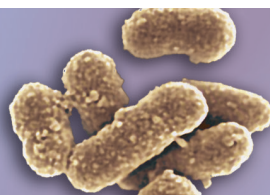
או מציאת אנזימים מפרקי תאית אחרים בעלי פעילות גבוהה יותר. בנוסף לכך ייתכן כי הרצף הגורם להפרשת הצלולאז מהחיידק פוגע בקרום התא של החיידק ובכך פוגע גם בגידול החיידק וכן בייצור הביו-דלק. יציבות גנטית של החיידק המהונדס חשובה בתהליך ייצור תעשייתי. אי לכך יש צורך להנדס חיידקי א. קולי כך שהגנים שיוכנסו אליהם יעברו אינטגרציה לגנום של החיידקים ולא יישארו על גבי פלסמידים, כמו במחקר הנוכחי. במקביל לשיפור יכולותיו של החיידק בפירוק התאית, בהפרשה וביצירת הביו-דלק, ניתן לשפר גם את התנאים המיטביים ואת הרכב הנוזל היוני לשם מיצוי מיטבי של תאית מביומסה צמחית.

בנוסף לשיפור יכולות המערכת ניתן יהיה בהמשך לנקוט בגישת התהליך המשולב ליצירת ביו-דלק מתקדם גם במיקרואורגניזמים אחרים, שייתכן שהם מתאימים יותר לגידול ולייצור תעשייתי. כמו כן נמצא כי סולר, בנזין ודלק סילוני בריכוזים גבוהים הם רעילים לחיידקים ועלולים להרוג אותם. במחקרים אחרים יוצרו זני חיידקים עמידים יותר לדלקים, וייתכן שבהמשך ניתן יהיה ליישם בחיידקים אלו את המערכת המשולבת שפותחה במחקר זה. בנוסף, יש צורך לבדוק שימוש בחומרי גלם אחרים שהיו זולים ואקולוגיים יותר מהדוחן ששימש במחקר זה ליצירת הביו-דלק.





1. דלק ביולוגי הוא דוגמה לאנרגיה מתחדשת וידידותית לסביבה ומהווה אחת מהחלופות האפשריות לדלק מחצבי.
2. דלק ביולוגי מתקדם, הקרוי גם דלק ביולוגי מדור שני, מופק מחומרי גלם בני-קיימא כמו תאית מיבולים שלא נועדו להזנת אדם ומפסולת חקלאית ובכך מהווה פתרון לבעיית התחרות עם גידולי המזון ולפגיעה הסביבתית.
3. ניתן להשתמש בגנים מאורגניזמים מסוימים על מנת להקנות תכונות שלא היו קיימות קודם לכן באורגניזמים אחרים או לשפר תכונות קיימות.
4. שילוב של אנזימים המעורבים בתהליכים שונים ונפרדים באורגניזם יחיד באמצעות הנדסה גנטית יכול להוזיל ולייעל את התהליך הכללי.
5. בתהליך יצירת חיידקים מהונדסים מוחדרים לחיידקים מקטעי DNA הכוללים אזורים מבניים ואזורי בקרה. המקור של מקטעי ה-DNA יכול להיות מאורגניזמים שונים. שימוש באזורי בקרה שונים מאפשר שליטה על התנאים שבהם יבוטאו הגנים ועל עוצמת ביטויים.
6. במעבר משלב המחקר לשלב היישום בקנה מידה תעשייתי יש לבדוק את ביצועי התוצר הביוטכנולוגי בתנאים שמדמים את המציאות ולשפר ככל הניתן את תפוקת המערכת.





1. ציירו את מחזור הפחמן בטבע בעת שימוש בדלק מחצבי לעומת שימוש בביו-דלק.
2. הביאו דוגמאות נוספות לאנרגיה מתחדשת. בחרו דוגמה אחת והשוו אותה לדלק ביולוגי על פי שלושה קריטריונים לבחירתכם. לדוגמה: תוצרים עיקריים, יתרונות וחסרונות, תפוקה, היקף שימוש וכו'.
3. מה ההבדל בין דלק ביולוגי מדור ראשון לדלק ביולוגי מדור שני? מדוע עלות הייצור של דלק ביולוגי מתקדם היא גבוהה ומה הפתרון המוצע לכך, עפ"י המחקר הנוכחי?
4. מהם מרכיבי הפלסטידים ששימשו ליצירת החיידקים המהונדסים ומה תפקידו של כל מרכיב?
5. מדוע השתמשו בגנים המקנים עמידות לשתי אנטיביוטיקות שונות: קנמיצין וכלורמפניקול?
6. מהו נוזל יוני ומדוע השתמשו בו במחקר זה?
7. מדוע חובר לגן צלולאז רצף הגורם להפרשת האנזים מהחיידק?
8. מדוע השתמשו באזורי בקרה שונים? מה היתרון של כל אזור בקרה?
9. ערכו טבלה המשווה בין הניסוי הראשון לשני עפ"י הקריטריונים הבאים: שאלת המחקר בניסוי, המשתנים, בקורות.
10. איזו בקרה הייתם מוסיפים לניסוי הראשון?
11. מה מוסיף הניסוי השני על הניסוי הראשון?
12. מה יכול להשפיע על כמות הדלק הביולוגי שנוצר באמצעות חיידק מהונדס?
13. קיבלתם את המאמר לביקורת. בחנו את המאמר בראייה ביקורתית וציינו נקודת חולשה אחת (לפחות) במאמר וכיצד הייתם משפרים נקודה זו?
14. כיצד הייתם ממשיכים את המחקר?
15. חשבו על תהליך שניתן היה לייעל על ידי יצירת אורגניזם מהונדס משולב.

