

09-11-2012

Thomas Meijer
s1727222
Gorechtkade 7
9713BB Groningen

s1727222@student.rug.nl

Witte biotechnologie:
ontwikkeling en strategieën

Begeleider;
Dr. J Lolkema

1. Introductie

Alle levens vormen blijven zich ontwikkelen, van eencelligen tot complexe organismen. Zij kunnen gifstoffen ontwikkelen waarop gereageerd wordt door nieuwe of verhoogde resistenties. Complexe metabole systemen worden opgezet waardoor groei, celdeling en reparatie van eventuele schade versneld wordt. Door evolutie van een kleine vier miljard jaar zijn er indrukwekkende en gecompliceerde organismen ontstaan. Nu in de laatste decennia deze mechanismen beter begrepen worden, worden micro-organismen ook steeds vaker gebruikt in de industrie. Het gebruik van bacteriën, gisten of andere organismen wordt biotechnologie genoemd. In veel verschillende branches kunnen micro-organismen gebruikt worden, met ieder hun eigen doel. Hierdoor zijn categorieën ontstaan. Ondanks dat verschillende instellingen de biotechnologie categorieën vaak verschillend indelen, kan men in het meest uitgebreide geval biotechnologie in tien verschillende categorieën onderbrengen (tabel 1).

Deze categorieën variëren sterk, zo houdt de gouden biotechnologie zich puur bezig met in silico berekeningen en gele biotechnologie houdt zich daar en tegen louter met voeding bezig (da Silva E.J., 2004). Vragen waar onderzoekers zich in deze onderdelen van biotechnologie mee bezig houden zijn, bijvoorbeeld wat is de beste manier om de verkregen informatie overzichtelijk te tonen, of hoe kan een product langer houdbaar gemaakt worden zonder smaakverlies.

Rood	Gezondheid, Medical, Diagnostiek
Geel	Voedsel, Voeding Wetenschap
Blauw	Aquacultuur, Kust en Marine Biotech
Groen	Agricultuur, Milieu Biotech – Biobrandstoffen, Biomeststoffen, Biosanering, Geomicrobiologie
Bruin	Dorre zone en woestijn Biotechnologie
Donker	Bio-terrorisme, Bio-oorlogsvoering, Bio-misdaden, Anti-gewassen oorlogsvoering
Paars	Patenten, Publicaties, Uitvindingen, IPRs
Wit	Gen-gebaseerde bio-industrie
Goud	Bioinformatica, Nanobiotechnologie
Grijs	Klassieke Fermentatie en Bioproces Technologie

Tabel 1 - overgenomen van Da Silva E.J., 2004, vertaald vanuit het Engels.

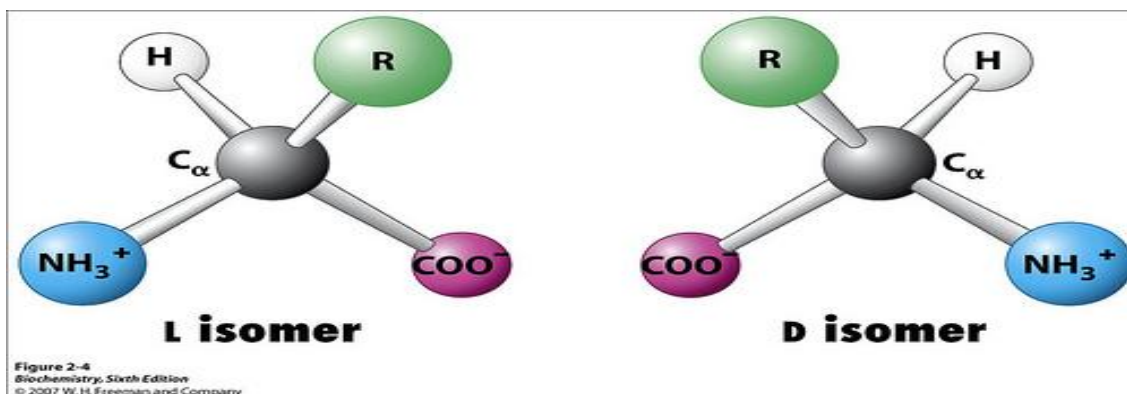
Een mooi voorbeeld van rode biotech waarin witte biotechnologie een grote rol heeft gespeeld is de ontwikkeling op het gebied van insuline productie (rood, productie van medicijnen en wit het gebruik van micro-organismen). Sinds het gebruik van dierlijk insuline uit 1920 heeft dit product veel veranderingen door gemaakt (Betz J.L. 1995). In het begin werd insuline gewonnen uit de pancreas van dieren, maar tegenwoordig wordt insuline door een micro-organisme geproduceerd. Dit is bereikt door vele genetische aanpassingen in het micro-organisme. Hierdoor kan er nu insuline geproduceerd worden dat een beter medische effect heeft voor patiënten dan de insuline die gewonnen werd uit de dierlijke pancreas en hoeven er geen dieren meer geslacht te worden.

Dit verslag gaat over de witte biotechnologie. Deze tak houdt zich bezig met het gebruik van bacteriën en gisten in bio-industriële processen. Onderzoek in deze categorie houdt zich met name bezig met de vraag; hoe kan een micro-organisme zo gemodificeerd

worden dat het gebruikt kan worden in een productie proces. Eerst wordt er kort ingegaan op de geschiedenis en vervolgens op de ontwikkelingen in dit gebied. Daarna wordt er aan de hand van de productie van lysine een voorbeeld gegeven hoe, in dit geval, *Corynebacterium glutamicum* gemodificeerd kan worden voor industriële doeleinden. Vervolgens wordt er kort over de toekomstige ontwikkelingen ingegaan.

2. Witte biotechnologie

Om optimaal gebruik te maken van micro-organismen moeten er vaak aanpassingen gemaakt worden. Deze aanpassingen zijn bedoeld om het productie proces te bevorderen. Voorbeelden van doelen van aanpassingen zijn, verhoogde synthese van het gewenste product, verhoogde stress tolerantie, optimale groei en verlaagde behoefte aan nutriënten. Door deze aanpassingen moet het productie proces bevorderd worden zodat het rendabel wordt om het micro-organisme te gebruiken in plaats van organisch chemische productie. Naast het feit dat dit financieel gunstiger kan zijn voor het bedrijf, kan doormiddel van biotechnologische processen ook een groene productie lijn opgezet worden. Door over te gaan op een groenere manier van produceren komt een bedrijf ook gunstiger te staan in de publieke opinie. Ook dit kan leiden tot meer verkoop van de producten. Naast het vervangen van bestaande productie methoden kunnen ook geheel nieuwe producten gerealiseerd worden die voorheen niet mogelijk waren. Hierbij kan gedacht worden aan biologisch afbreekbaar plastic. Deze kunnen worden gemaakt op basis van zetmeel en afgebroken worden in CO₂, H₂O en biomassa. Een ander voorbeeld is dat er een heel specifiek product gemaakt wordt. Een voorbeeld hiervan zijn aminozuren. Deze moleculen kunnen in twee isomeren, gemaakt worden. De D variant en de L variant (figuur 1). Bij chemische processen is het erg moeilijk om maar één variant hiervan te ontwikkelen en is er vaak een zuiveringsstap nodig om beide producten te scheiden. Wanneer er micro-organismen gebruikt worden is dit niet het geval. Micro-organismen gebruiken enzymen die een specifieke active plaats hebben waar de reactie plaats vindt. Door deze ruimte is er maar plek voor één van deze varianten en zal de andere variant niet gesynthetiseerd worden (Tryfona and Bustard, 2004). Dit is een van de redenen dat tegenwoordig bijna alle aminozuren door witte biotechnologische processen geproduceerd worden (Bolten CJ, 2010)



Figuur 1- Biochemistry, sixth edition (c) 2007 W.H. Freeman and Company.

3. *Geschiedenis*

Voordat de huidige technieken op het gebied van genetisch modificatie en de vele facetten van -omics ontwikkeld waren, werden er op een simpelere manier mutaties aangebracht bij bacteriën en gisten. Deze ‘random mutagenesis’ en selectie techniek, werd uitgevoerd met ultra violet licht. Door cellen bloot te stellen aan het UV licht ontstaan er breuken in het DNA die vervolgens gerepareerd worden door reparatie eiwitten. Fouten die worden gemaakt door deze enzymen zorgen er voor dat er mutaties ontstaan in het DNA (Witkin, 1969; Kondo, 1969). Hierdoor worden veel cellen met allemaal verschillende mutaties verkregen. Door de cellen te uitstreken op een agar plaat is het mogelijk om de kolonies te selecteren en vervolgens te testen op functie. Hierdoor kunnen cellen die beter functioneerden op de geteste omstandigheden geselecteerd worden en uiteindelijk gebruikt worden voor industriële toepassing. Als de vereiste criteria nog niet behaald werden door het micro-organisme dan konden ze worden blootgesteld aan een tweede ronde random mutaties. In principe kan dit proces oneindig herhaald worden totdat er een micro-organisme verkregen is met de gewenste eigenschappen. Ondanks dat er goed functionerende micro-organismen gevonden zijn op deze wijze, zijn er ook nadelen. Zo wordt er niet gericht gezocht naar een optimale benadering van het probleem. In veel gevallen hadden de cellen die wel genoeg product synthetiseerden andere nadelen. Ze waren minder stress bestendig, hadden veel nutriënten nodig om in leven te blijven of waren niet of nauwelijks in staat te delen. Dit kwam voornamelijk doordat er vaak op meerdere plekken een mutatie optrad. Als er een mutatie verkregen werd die een positief uitwerking had, was er altijd een kans dat een tweede mutatie een negatieve uitwerking had (Becker, J. And Witmann, C. 2011).

4. *Moderne biotechnologie*

Door de grote ontwikkeling op het gebied van genetisch modificeren kunnen nu gerichte mutaties worden aangebracht. Hiermee word het nadelige effect van eventuele “bij mutaties” geëlimineerd. Echter is hier veel kennis voor nodig om te achterhalen welke mutaties gedaan moeten worden voor een positieve uitwerking op de cel. Kortom voor een gerichte aanpak van modificatie van micro-organismen is meer kennis nodig dan de modificatie techniek alleen. Daarnaast zijn onderzoekers tegenwoordig ook in staat nieuwe genen te introduceren en bestaanden te verwijderen. Hierdoor kunnen geheel nieuwe netwerken gebouwd worden in micro-organismen.

Voor een succesvolle aanpak moet bekend zijn hoe het genoom er uit ziet (genomics), welke enzymen door dit genoom geproduceerd worden en hoe de transcriptie veranderd onder verschillende omstandigheden (proteomics), hoe eiwitten en enzymen substraten omzetten en in welke relatieve hoeveelheden metabolieten voor komen (metabolomics). Door deze ontwikkelingen komt er steeds meer informatie die allemaal gebruikt kan worden Om deze informatie goed weer te geven en overzichtelijk te maken is er goede software nodig die deze informatie kan verwerken en tonen (Gouden biotechnologie). Hiermee kunnen onderzoekers sneller en efficiënter werken (bioinformatics). Met deze combinatie van technieken kan een goede gerichte aanpak opgezet worden.

Genomics - De basis van ieder organisme is het genoom. In het genoom is vastgesteld welke eiwitten gemaakt kunnen worden. Met betrekking tot micro-organismen die gebruikt kunnen worden voor witte biotechnologie is het daarom belangrijk te weten hoe

het genoom er uit ziet. Aan de hand hier van kunnen vragen beantwoord worden zoals, is het micro-organisme in staat een bepaald eiwit te synthetiseren of welk type promotor zit er voor een (groep) gen(nen). Met de informatie over een promotor kan nagegaan worden of het gen of de genen achter de promotor veel of juist weinig afgeschreven worden. Organisme waar het gehele genoom van bekend is en waar veel experimenten mee gedaan zijn, zijn model organismen. Voor de witte biotechnologie zijn de bacterie *Escherichia coli* en *Corynebacterium glutamicum* de belangrijkste (Fields, S. 2005). Het voordeel van het gebruik van deze organismen is dat onderzoek naar het genoom al gedaan is en dat de informatie hierover bekend is. Dit bespaart de onderzoekers tijd en geld. Het nadeel is dat men werkt met een systeem met dezelfde potentie waar al langer mee gewerkt wordt of anders gezegd als andere organismen gebruikt zouden worden dan zal de potentiële productie afwijken en wellicht beter zijn dan het model organisme.

Door de ontwikkelingen op het gebied van genomics wordt het steeds goed koper om gehele genomen te sequensen. In een pers bericht van januari 2012 werd al gezegd dat het mogelijk is om het menselijk genoom binnen een dag voor minder dan 1000 dollar te sequensen (Press). Door deze ontwikkelingen zullen meer genomen onderzocht worden en nieuwe genen of varianten van genen ontdekt worden. Als nieuwe genen gevonden worden kunnen dezen in metabole netwerken geïntegreerd worden.

Transcriptomics - Transcriptomics is de studie naar eiwit expressie en quantificeert alle afgeschreven genen. Ook kan men veranderingen in de afschrijving van deze genen onder verschillende omstandigheden meten. Zo kan de gen expressie bij het gebruik van medium A vergeleken worden met de gen expressie bij het gebruik van medium B. (Cappola, T.P., Margulies 2011). Een goed begrip van deze reacties zal kunnen leiden tot vergrote mogelijkheden voor de productie met behulp van bacteriën. Of er transcriptie van een gen plaats vindt heeft te maken met de omstandigheden van een cel. Een cel heeft niet op ieder moment de zelfde eiwitten in de zelfde verhoudingen. Als men weet welke stoffen invloed hebben op de transcriptie en translatie van de genen dan kan men deze informatie gebruiken voor het stimuleren van de transcriptie van de gewenste eiwitten en het verminderen van transcriptie van eiwitten die niet gewenst zijn.

Metabolomics - Hoe en in welke mate producten gemaakt worden is uitermate belangrijk. Pas wanneer bekend is in welke mate een micro-organisme zijn metabole intermediären maakt kunnen gerichte aanpassingen gemaakt worden in dit netwerk. Eén strategie om een overzicht te krijgen van het metabole netwerk is met een zo geheten "Metabolic Flux Analysis" (MFA) (Wiechert, W. 2001). Met deze analyse kan een gedetailleerde quantificatie van alle metabole routes gemaakt worden (figuur 2). Wanneer bekend is in welke hoeveelheden metabolieten gesynthetiseerd worden kunnen er aanpassingen gemaakt worden. Bijvoorbeeld als stof A opgenomen wordt en deze via twee routes omgezet wordt in het gewenste product A dan kan gekeken worden welke route het best is. Aan de hand hiervan kunnen er op gen niveau aanpassing gedaan worden om de gewenste route te stimuleren en de niet gewenste route te beperken.

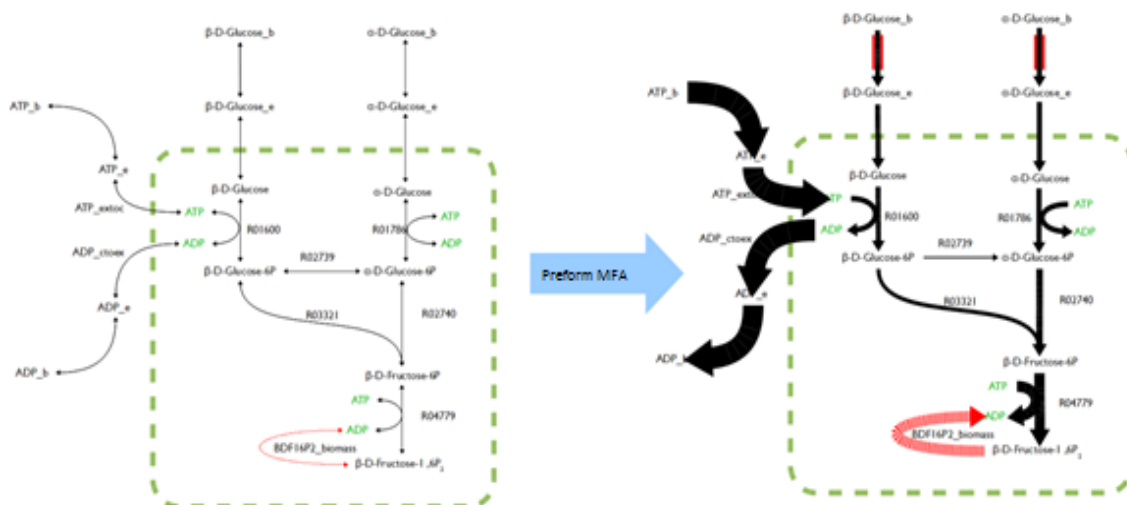
De MFA kan op verschillende wijzen uitgevoerd worden. Eén van deze strategieën is het gebruik van ^{13}C -gelabelde substraten, zoals $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Door aan het medium van een batch culture gelabeld glucose toe te voegen en de ^{13}C atomen te laten verspreiden

over het netwerk kan dat vervolgens geanalyseerd worden met behulp van NMR (“nuclear magnetic resonance”) of MS (“massaspectrometrie”) technieken (Wiechert, W. 2001). De informatie die hier bij verkregen wordt is doorgaans erg groot en ingewikkelde software is nodig om deze informatie om te zetten in bruikbare grafieken en figuren.

Bioinformatics - Door de toename van technieken komt er steeds meer informatie beschikbaar. Om deze data allemaal te analyseren is er software ontwikkeld die deze informatie zo beschrijft dat het alle informatie gemakkelijk weer geeft zodat het bruikbaar is bij onderzoek. Naast databanken van genomen, eiwitten en andere moleculen kunnen er tegenwoordig, zoals boven beschreven, ook berekeningen gemaakt worden met betrekking tot de metabole netwerken (Melzer G. 2009). Hierdoor zijn de optimale routes voor de productie van een bepaalde stof te berekenen. Dit is van onschatbare waarde voor het gericht engineeren van een organisme. Hiermee kan bepaald worden welke fluxen in een netwerk versterkt en welke verzwakt moeten worden voor een optimale productie van een stof. Daarnaast kan met informatie over eiwitten voorspellingen gedaan worden wat het gevolg op het metabole netwerk is wanneer er een gen verwijderd wordt.

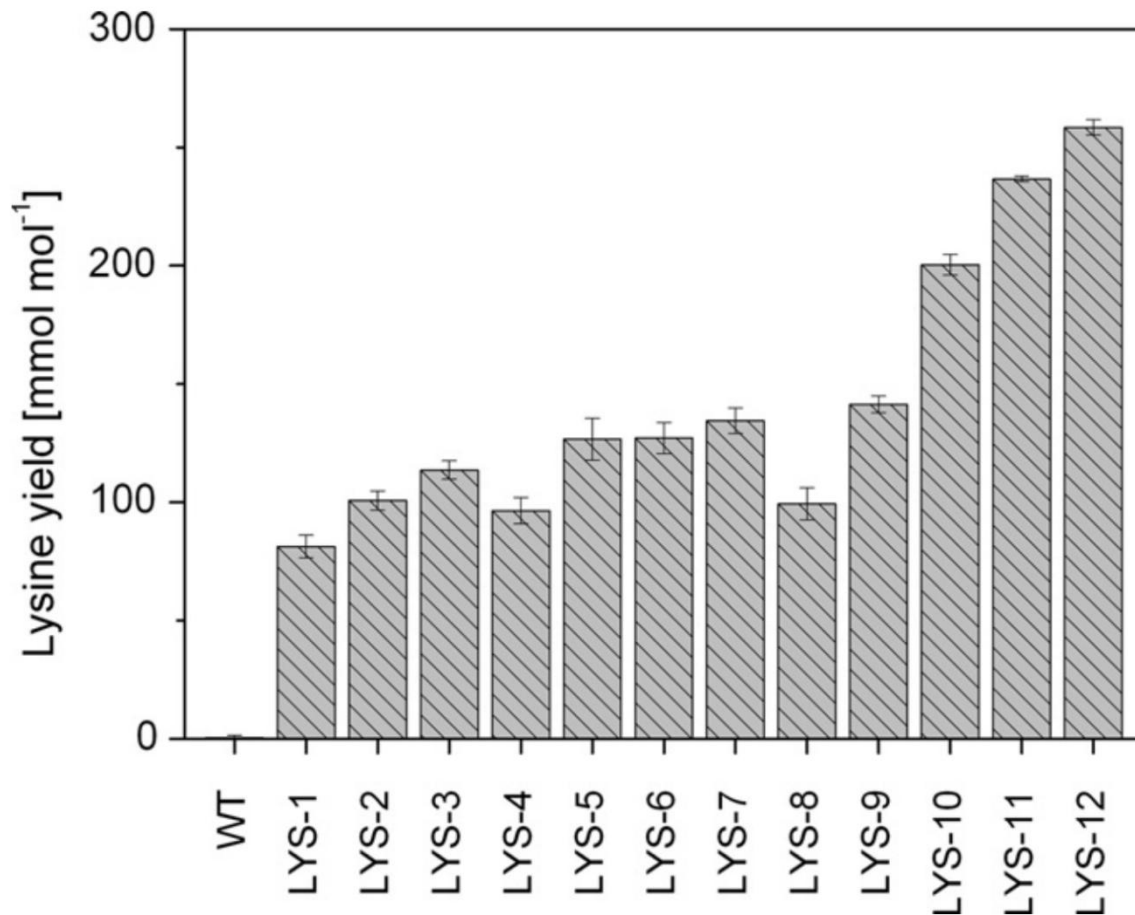
5. De ontwikkeling van een biotechnologisch proces: lysine productie door *C. glutamicum*

De bacterie *C. glutamicum* wordt al sinds de jaren vijftig gebruikt. In 1957 werd door Kinoshita en collega's ontdekt dat deze bacterie glutamine uitscheidt. Sindsdien zijn er vele aanpassingen aangebracht via random mutatie om van dit micro-organisme een organisme te maken welke hoog concentraties aminozuren uitscheidt. Voorheen werden micro-organismen louter gemodificeerd met behulp van random mutaties. Tegenwoordig wordt er een gerichte aanpak gebruikt voor modificatie. Zo heeft Becker J. samen met collega's met behulp van een gerichte aanpak een verhoogde productie van L-lysine weten te realiseren in *C. glutamicum*.



Figuur 2 – MFA van het metabole netwerk van de zes eerste reacties van de glycolyse. De voorspelde flux door iedere reactie is proportioneel aan de dikte van de lijn die de reactie weergeeft.

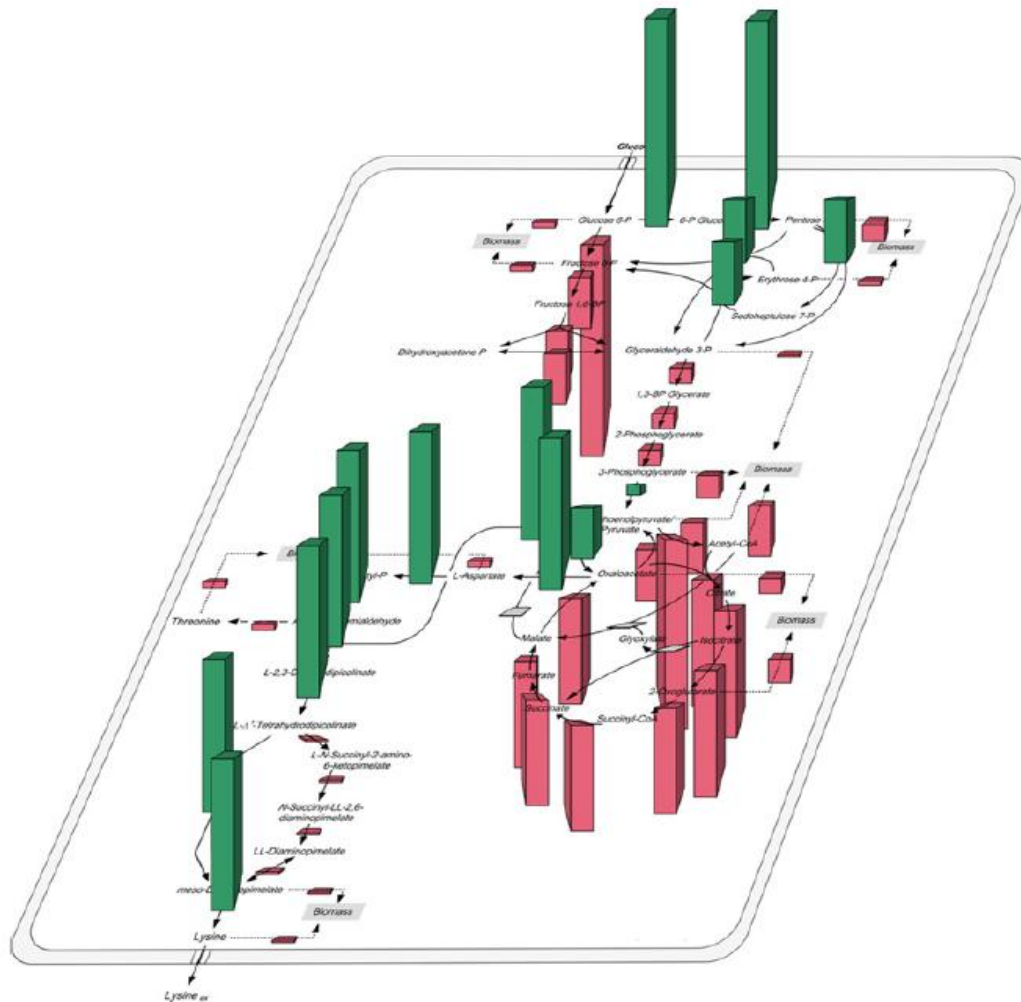
Hierbij zijn vijf stappen gedaan om tot een verhoogde productie te komen. Ieder stap heeft zijn eigen doel en werd bereikt door aanpassingen in te doen in het metabole netwerk. Deze aanpassingen zijn hier aangegeven met de lys1 tot en met lys12 en zijn onderverdeeld in vijf stappen die hierna besproken zullen worden. Onder staat de totale productie van lysine weergegeven die door de micro-organismen na iedere stap van mutatie werd geproduceerd (figuur 3)



Figuur 3 –Dit figuur toont aan hoeveel lysine er geproduceerd word na iedere mutatie. Becker, J. et al. 2011.

Stap 1.

De eerste stap in het gericht modificeren van een organisme tot een producerende cel is het begrijpen van de metabole route. Dit deed men door gebruik te maken van de hierboven genoemde ¹³C glucose MFA. Hiermee werd gemeten in welke verhoudingen glucose werd omgezet in verschillende metabolieten. Dit werd gedaan met wild type *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032). Hierdoor wisten de onderzoekers welke metabolieten in welke verhoudingen in het wild type gesynthetiseerd werden. Vervolgens werd in silico berekend wat de meeste optimale flux is voor de grootste opbrengst van lysine.



Figuur 4 – Het metabole netwerk van *Corynebacterium glutamicum* in silico berekend door elementaire flux mode analyse (Melzer et. al 2009) In groen wordt weer gegeven welke fluxen versterkt moeten worden en in rood de fluxen die verminderd moeten worden

Nu men op de hoogte was in welke mate de glucose werd omgezet in de verschillende substraten en de relatieve verhoudingen daarvan, kon deze vergelijken worden met de theoretische maximale efficiënte route. Het in silico optimale route werd berekend door het “*elementary flux mode analysis*” (Melzer, G. 2009). Dit geeft de theoretische route weer waarmee de hoogste bereikbare concentratie van lysine geproduceerd wordt (figuur 4).

Stap 2.

Nu men wist hoe het route er uit moest zien werden de eerste stappen van modificatie uitgevoerd. Deze zijn gericht op het sturen van de metabole flux richting de productie van lysine.

(Lys1) De eerste mutatie die gemaakt werd, was een nucleotide wisseling C932T in het *LysC* gen. Dit gen codeert voor aspartokinase. Dit eiwit speelt een belangrijke rol in de metabole route van lysine en threonine door feedback inhibitie. Zie *LysC* in figuur 5.

Hierdoor werd de route niet meer geremd wat een grotere flux als gevolg heeft. Deze aanpak was al eerder gedaan door Cremer et al., 1991 en had ook een positief effect. Na deze mutatie werd er ongeveer 80 mmol lysine per mol glucose geproduceerd (figuur 3).

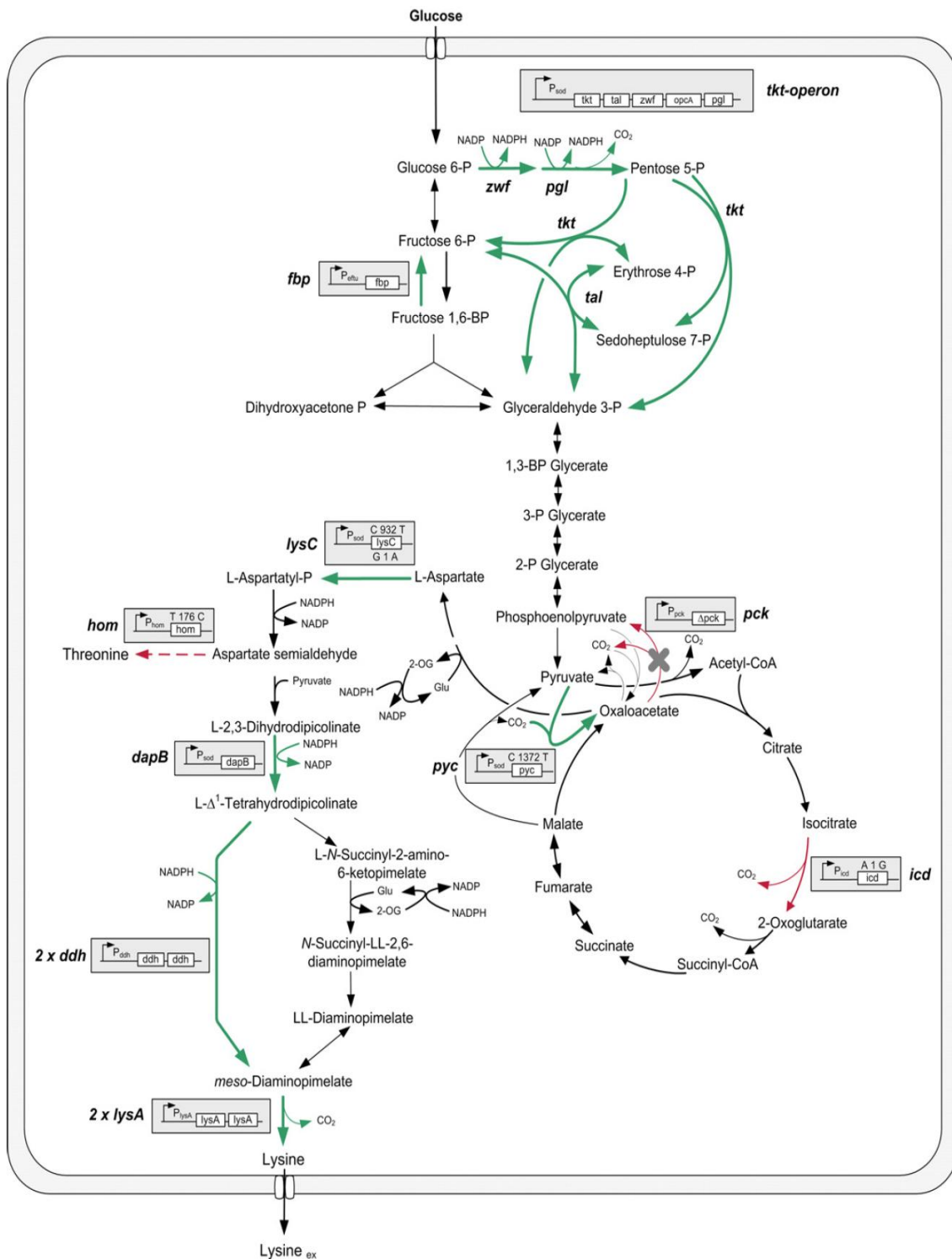
Een andere aanpak die ook erg effectief bleek te zijn (Kelle et. al., 2005) is het verwijderen van de threonine route. De flux over het lysine pad wordt hierdoor verhoogd maar het nadeel daarvan is dat de micro-organismen niet konden groeien zonder de toevoeging van threonine, isoleucine en methionine. (Wittmann and Heinzle, 2002). Kortom met de aanpassing waar Becker J. voor koos verkrijgt men een micro-organisme welke gemakkelijker te gebruiken is in een biotechnologisch proces, omdat het minder zorg nodig heeft. Vervolgens (Lys2) werd er een tweede kopie van het gen *ddh* toegevoegd. Dit gen is betrokken bij de dehydrogenase route voor de productie van lysine. Deze route had de voorkeur boven de andere routes na silico berekeningen. Door de toevoeging van het gen, dat codeert voor diaminopimelate dehydrogenase, werd de productie met 25% gestimuleerd (figuur 3). Daaropvolgend (Lys3) werd er gekeken naar een belangrijke precursor voor lysine, namelijk oxaloacetate. Dit molecuul kan worden omgezet door PEP carboxykinase in fosfoenolpyruvate. Om dit tegen te gaan is als derde stap het gen *pck* verwijderd. Door deze mutatie werd de lysine productie met 33% verhoogd.

Deze eerste drie stappen waren allemaal gericht op het basale metabolisme voor het overproduceren van lysine. Door er voor te zorgen dat de feedback op de productie wordt verminderd (Lys1), de omzetting van precursors in de richting van lysine te versterken (Lys2) en door er voor te zorgen dat deze precursors minder voor andere metabole processen worden gebruikt, wordt de productie van lysine versterkt (Lys3). De genetische aanpassing die zijn gedaan, zijn; modificatie van een eiwit (Lys1), duplicatie van een gen (Lys2) en deletie van een gen (Lys3).

Stap 3.

In het volgende stadium werden er aanpassingen gedaan om de anaplerotic reacties te bevorderen. Deze reacties dienen er voor om de tussenproducten van het metabole netwerk aan te vullen. Het doel was de aanmaak van de tussen producten van de lysine route te bevorderen.

(Lys4) Voor het gen *dapB* werd een sterkere promotor geplaatst zodat de omzetting van dihydrodipicolinate naar tetrahydrodipicolinate versterkt wordt. Aansluitend werd (Lys5) het *lysA* gen gedupliceerd met als gevolg dat het tussenproduct *meso*-Diaminopimelate meer gebruikt wordt voor de productie van lysine in plaats van de opbouw van de cel. Vervolgens (Lys6) werd homoserine dehydrogenase gemuteerd. Deze dehydrogenase speelt een belangrijke rol in de richting van de threonine synthese. Door de mutatie werkte het eiwit minder en werd de synthese van threonine minder efficiënt. Hierdoor kan het tussenproduct *aspartate semialdehyde* meer gebruikt worden voor de productie van lysine. Ondanks de mutatie is de cel nog steeds in staat het aminozuur threonine te maken, zodat er geen threonine aan het medium toegevoegd hoeft te worden. In de eerste stap (Lys1) is het feedback-resistente aspartokinase geïntroduceerd. In de volgende stap (Lys7) word de activiteit van dit eiwit verhoogd. Dit werd bereikt door de promotor van het gen te vervangen door een sterkere promotor.



Figuur 5 – Het metabole netwerk van de productie van l-Lysine in *Corynebacterium glutamicum*. Met groen is aangegeven welke routes versterkt zijn en met rood is aangegeven welke routes verzwakt zijn. Becker, J. et al. 2011.

Samenvattend, in stap 3 is de bio-synthetische route in de richting van lysine is versterkt door een sterkere promotor wat een verhoogd enzym activiteit geeft voor omzettingen in de richting van lysine (Lys4). Het gen *lysA* is verdubbeld waardoor er tweemaal zoveel enzym activiteit gemeten werd (Lys5). De enzym activiteit van een eiwit dat een precursor voor lysine omzet in threonine werd verminderd (Lys6). De enzym activiteit van *lysC* werd verhoogd door verhoogde afschrijving van het gen door een versterkte promotor (Lys7).

Stap 4.

Na tal van mutaties werd het verkregen micro-organisme weer vergeleken met het wild type en het theoretische model voor optimale lysine biosynthese. Deze vergelijking werd weer gedaan door de ^{13}C flux methode. Hieruit bleek dat aan het centraal metabolisme weinig was veranderd door de toegepaste mutaties. De onderzoekers concludeerden hieruit dat de verhoging van lysine productie voornamelijk ten koste ging van de groei. Hierom werd besloten om de concentratie anabole moleculen die nodig zijn voor de groei en productie van lysine te verhogen. Dit werd bereikt door de omzetting van pyruvaat in oxaloacetate te stimuleren. Oxaloacetate is de precursor voor lysine en een belangrijke stof in de citroen zuur cyclus.

Om dit te bewerkstelligen werden er in twee stappen twee aanpassing gemaakt aan het *pyc* gen. Het pyruvaat carboxylase eiwit wat door dit gen wordt gecodeerd katalyseert de omzetting van pyruvaat naar oxaloacetate. De eerste aanpassing (Lys8) was P458S in het eiwit en de tweede (Lys9) was het introduceren van een sterkere promotor voor het gen. De mutatie zorgt er voor dat het enzym veranderd in een enzym met superieure kinetische eigenschappen (Ohnishi et al., 2002). Echter leidde dit niet tot een verhoging in lysine productie (figuur 3). Dit kwam doordat de verhoogde voorraad van oxaloacetaat niet richting de lysine route ging, maar in de richting van de glycolyse. Hierdoor ontstond een nieuw doel voor de onderzoekers. Het verlagen van glycolyse zodat er meer oxaloacetaat stroomt in de richting van het lysine route. Dit werd bereikt door de productie van het isocitrate dehydrogenase te verlagen. (Lys10) Het start codon ATG werd vervangen door GTG waardoor het gen minder vaak afgeschreven word (Becker et al., 2010). Hierdoor werd de flux in de glycolyse geremd en werd daardoor minder oxaloacetaat gebruikt (zie *icd* in figuur 5).

Na deze laatste drie stappen, Lys8, 9 en 10, werd de aanmaak van de precursor oxaloacetaat in de cel gemeten. Deze stof werd door de mutaties meer aangemaakt. In deze stappen is er (Lys8) een nucleotide wisseling uitgevoerd met als uiteindelijk gevolg een enzym met verhoogde activiteit. (Lys9) Een promotor is verwisseld door een sterkere promotor met als gevolg meer enzym wat leidt tot verhoogd enzym activiteit. En (Lys10) een verwisseling van het start codon waardoor het gen minder vaak werd afgeschreven waardoor er minder van dat enzym geproduceerd werd.

Stap 5.

Na verdere analyse van het geëngineerde *Corynebacterium glutamicum* viel op dat door de verhoogde productie van lysine de micro-organisme een verhoogde behoefde hadden aan NADPH. De onderzoekers besloten om de 'Pentose Phosphate Pathway' (PPP) flux

te verhogen om aan deze nieuwe energie behoefte te voldoen. (Lys11) De promotor van FBPAse werd vervangen door een *eftu* promotor. Het gevolg was een 15-voudige toename van de activiteit van dit enzym. (Lys12) Een laatste mutatie werd gedaan om de flux door het PPP systeem te verhogen. Dit werd gedaan door de promotor voor het transketolase (tkt) te vervangen (Yokota and Lindley 2005).

Door deze laatste twee stappen is de NADPH productie van de cel verhoogd waardoor er meer energie voor de cel was voor de productie van lysine. In beide gevallen (Lys11) & (Lys12) werd dit gedaan door het vervangen van de promotor door een sterkere promotor. Echter bij (Lys11) gebeurde dit voor één gen en bij (Lys12) werd dit gedaan voor een operon en werden vijf genen versterkt afgeschreven.

Resultaat

Door al deze aanpassingen is er een micro-organisme gevormd dat in staat is +/- 260 mmol lysine te produceren per mol glucose. Hiermee is bewezen dat met gerichte modificatie goed functionerende micro-organismen ontwikkeld kunnen worden die gebruikt kunnen worden in de industrie. Dit voorbeeld is het eerste verslag van een industriële competitieve lysine producerende cel (Becker J. et al. 2011). Door de technieken verder te ontwikkelen zullen onderzoekers in de toekomst in staat zijn voor veel meer producten micro-organismen met gerichte aanpak te modificeren om zo de productie van vele stoffen te verhogen.

6. Toekomst

Alle facetten van -omics zullen zich verder ontwikkelen. Met meer informatie zal het gemakkelijker worden om uitspraken te doen over hoe een organisme zich gedraagt onder bepaalde omstandigheden en wat de effecten van mutaties zijn. Hierdoor zullen in de toekomst steeds meer verschillende soorten organismen gebruikt kunnen worden en niet alleen maar het model organisme. Het voordeel hiervan is dat de potentie van producten die gesynthetiseerd kunnen worden met behulp van witte biotechnologie verbreed wordt. Over één aspect van het genetisch modificeren is weinig te vinden. Dat is de verbeteringen die gemaakt kunnen worden in de secretie systemen van micro-organismen. De reden hiervoor is tweeledig. Membraan eiwitten zijn moeilijk te bestuderen. Door hun hydrofobe karakter hebben ze de neiging te aggregeren en de 3D structuur is daardoor moeilijk te verkrijgen. Enkele patenten omtrent dit onderwerp kunnen gevonden worden in databanken, maar wetenschappelijke artikelen hiervan zijn moeilijk te vinden. Waarschijnlijk houden bedrijven dergelijke informatie voor zich zelf. Dit om de concurrentie voor te blijven. Voor bedrijven die bezig zijn met witte biotechnologie is op dit gebied nog veel winst te behalen. Want als een secretie systeem gunstiger werkt wordt de opbrengst verhoogd. Bedrijven en universiteiten zouden er goed aan doen om zich hiermee bezig te houden.

Referenties.

Betz J.L. Fast-Acting Human Insulin Analogs: A Promising Innovation in Diabetes Care. *The Diabetes Educator* 1995 21: 195

Becker, J., Wittman, C.: Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production – the heartbeat of industrial strain development, *Curr Opin Biotechnol* (2012), doi:10.1016/j.copbio.2011.12.025

Becker J., Zelder O., Hafner S., Schroder H., Wittmann C. (2011). From zero to hero-design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-lysine production. *Metab. Eng.* 13, 159–168. doi: 10.1016/j.ymben.2011.01.003.

Bolten CJ, Schröder H, Dickschat J, Wittemann C: Towards methionine overproduction in *Corynebacterium glutamicum* methanethiol and dimethylsulfide as reduced sulfur sources. *J Microbiol Biotechnol* 2010, 20:1196-1203

Cappola, T.P., Margulies, K.B.: Functional genomics applied to cardiovascular medicine *Circulation*, 124 (2011), pp. 87–94

Fields, S. and Johnston, M.: Whither Model Organism Research? 2005 *science* vol 307 1885-1886

Kondo, S.: Mutagenicity versus radiosensitivity in *Escherichia coli*. *Proc. XIIth Intern. Congr. Genetics*. Vol. II, pp. 126-127 (1969)

Leigh, A.N. and Norman, A.G.: Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words *Electrophoresis* 1998, 19, 1853-1861

Ng, P.C. and Kirkness, E.F.: Whole Genome Sequencing. *Genetic Variation, Methods in Molecular Biology*, 2010, Volume 628, 215-226, DOI: 10.1007/978-1-60327-367-1_12

Melzer, G., Esfandabadi, M.E., Franco-Lara, E., Wittmann, C., 2009. Flux design: in silico design of cell factories based on correlation of pathway fluxes to desired properties. *BMC Syst. Biol.* 3, 120.

Tryfona, T. and Bustard, M.T.: Mechanistic understanding of the fermentative l-glutamic acid overproduction by *Corynebacterium glutamicum* through combined metabolic flux profiling and transmembrane transport characteristics. *J Chem Technol Biotechnol* 79:1321–1330 (online: 2004) DOI: 10.1002/jctb.1133

Wiechert, W.: 13C Metabolic Flux Analysis (2001) *Metabolic Engineering* 3, 195-206

Witkin, E.M.: Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bact. Rev.* 40, 869-907 (1976)

- (Press) [^ http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/about-us/news-gallery/press-releases/2012/life-technologies-introduces-the-bechtol-io-protocol.html](http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/about-us/news-gallery/press-releases/2012/life-technologies-introduces-the-bechtol-io-protocol.html)