

Kap. 30 – INDUSTRIELL MIKROBIOLOGI

Mikroorganismer kan brukes kommersielt til å produsere/omdanne et bredt utvalg av stoffer i stor skala:

- alkoholholdige varer (øl, vin mm.)
- organiske kjemikalier (f.eks. butanol)
- farmasøytiske preparater (f.eks. antibiotika)
- tilsetningsstoffer til mat (f.eks. aminosyrer)

Vha. utviklingen i moderne bioteknologi anvendes nå gen-modifiserte organismer (GMO) til å produsere store kvanter av ≠ forbindelser som ikke dannes naturlig av mikroorganismer

Biokatalyse – angir de reaksjoner som utføres av mikroorganismer i industriell mikrobiologi

Industrielle mikroorganismer & produkter

Hovedandelen av de organismene som brukes kommersielt i biokatalytiske prosesser er gjærsopper og forskjellige stammer av *Streptomyces*

Industrielle arter er spesialiserte organismer som kan ”manipuleres” til å produsere en eller flere produkter i store mengder i storskala kulturer ⇒ disse er ofte genetisk endret via transformasjon eller rekombinasjon og er veldig forskjellige fra WT stammer i naturen

Når nye stammer oppdages ⇒ deponering i store internasjonale samlinger for fremtidig anvendelse i undervisning, forskning mm.:

- **ATCC** – American Type Culture Collection
- **DSMZ** – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Attraktive egenskaper hos en industriell mikroorganisme

- Den må kunne produsere et stoff av kommersiell interesse og vokse under stor-skala betingelser
- Den må preferensielt kunne danne sporer eller reproduserende celler som lett kan inokuleres i store fermentorer
- Den må kunne vokse raskt og produsere størst mulig mengder av det ønskede produkt i billigst mulig medium
- Den må ikke være patogen eller danne toksiske forbindelser
- Den må kunne være lett å genmodifisere og forbli genetisk stabil

Viktige industrielle produkter/prosesser:

- dannelse av celler (f.eks. gjærceller)
- biokonvertering av kjemikalier mm.
- tilsetningsstoffer i mat, EtOH, antibiotika mm.

Vekst & produktdannelse under biokatalyse

- I industrielle sammenhenger er det viktige å vite NÅR en viktig metabolitt dannes – skiller mellom 2 typer mikrobielle metabolitter:
 - primær metabolitter dannes under vekstfasen – f.eks. EtOH
 - dannelsen av denne avhenger av energimetabolismen & følger veksten
 - sekundær metabolitter dannes hovedsakelig i stasjonærfasen – f.eks.. antibiotika:
 - er ikke essensiell for vekst
 - avhenger av vekstbetingelsene
 - dannes ofte fra primær metabolitter med lignende utgangsstrukturer
 - kan produseres i langt større mengder enn primær metabolitter

Antibiotika – isolering & karakterisering

- Blant de viktigste kommersielle produkter som lages industrielt
- Fås hovedsakelig fra forskjellige filamentøse sopp eller bakterier fra *Acinetomyces* gruppen
- Selv om farmasøytisk industri anvender kjemisk modifisering og modelleringsystemer for å lage nye antibiotika vha. 3-D struktur analyser, skjer nye oppdagelser via ”screening” av mikroorganismer:
 - bruker selektivt medium for *Streptomyces* arter & anvender indikator stammer som er sensitiv for antibiotika
 - stryker ut en antatt antibiotika produserende organisme på agarskål, inkuberer denne og sjekker sensitivitet via agardiffusjon vha. test organismer utstrøket vinkelrett på produsenten
- Organismer som produserer interessante antibiotika gjør vanligvis ikke dette med stort utbytte ⇒ isoleringen av gode produsentstammer
- Kommersielt interessante antibiotika må også lett kunne isoleres, strukturbestemmes og kunne produseres i stor skala

Industriell produksjon av antibiotika

- Når flere kriterier for godkjenningen av et antibiotikum er oppfylt (struktur, toksisitet og effektivitet) og klinisk testing viser de forventede resultater ⇒ denne kan nå produseres kommersielt; dette kan erfaringsmessig ta flere år
- β -laktamer – penicillin og derivater
 - produseres av sopper blant arter av *Penicillium* og *Aspergillus*
 - inneholder β -laktam ring
 - flere strukturer er kjent – et resultat av biokatalyse og senere kjemiske modifiseringer
 - grunnstrukturen er **6-aminopenicillinat** (6-APA)
 - skjer fermentering uten tilsetninger ⇒ naturlige penicilliner (f.eks. penicillin G)
 - tilsettes sidekjede-precursors ⇒ biosyntetiske penicilliner
 - de mest virksomme penicillin varianter fås ved å anvende en kombinasjon av fermentering og kjemiske modifisering ⇒ semisyntetiske penicilliner

Industriell produksjon av antibiotika

□ β -laktamer – produksjonsmetoder

- penicillin G produseres i 40 000 – 200 000 liters fermentorer under aerobe betingelser
- typisk sekundær metabolitt – dannes i store mengder når C-kilden er tom
- produksjonen opprettholdes ved tilsetning av \neq medium komponenter
- hovedingredienser: ”corn steep liquor” – er kilde for N og vekstfaktorer, og laktose (C-kilde)
- celler filtreres bort og penicillin ekstraheres med organisk løsemiddel

□ Tetrasyklin

- biosyntese av dette antibiotikumet involverer mange enzymatiske trinn – opptil 72 intermediater er involvert
- *Streptomyces aureofaciens*
 - produserer klorotetrasyklin – > 300 gener er involvert i prosessen
 - syntesen inhiberes av glukose og fosfat
 - som for penicillin anvendes ”corn steep liquor”, men sukrose benyttes som C-kilde

Kap. 31 – MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER & BIOTEKNOLOGI

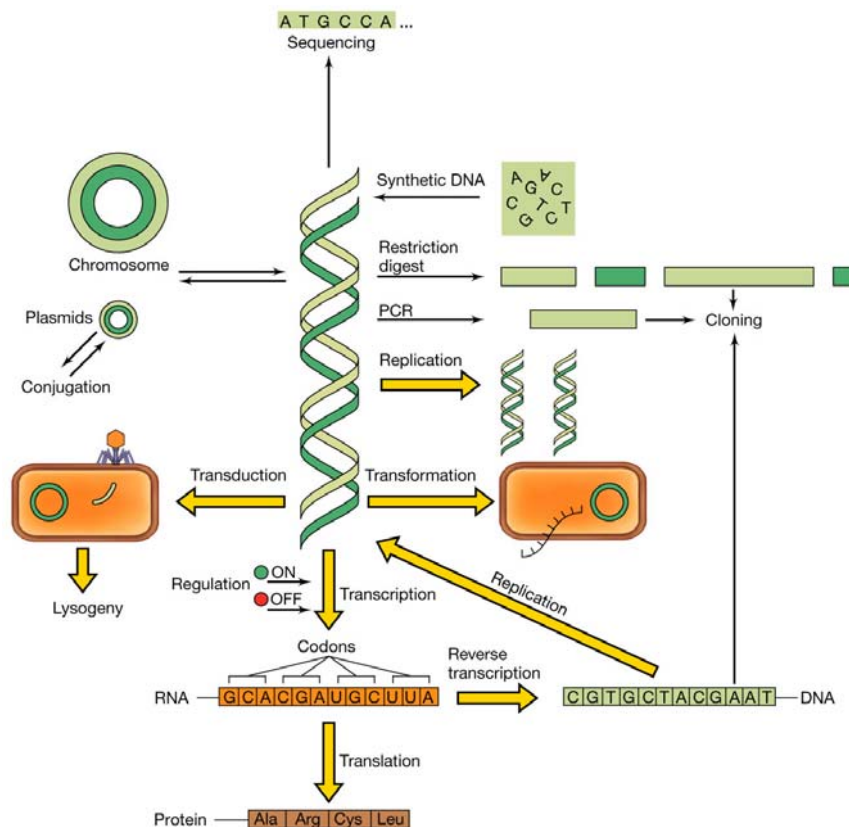
Bioteknologi – bruken av levende organismer til å utføre definerte kjemiske prosesser i industriell eller kommersiell sammenheng

I all industriell bioteknologi anvendes ofte organismer som har blitt gen-manipulert – enten via seleksjon eller vha. \neq *in vitro* teknikker

Innenfor bioteknologien benyttes \neq molekylærbiologiske metoder til å genetisk modifisere organismen \Rightarrow dannelse av GMO

Viktige prinsipper som grunnlag for moderne bioteknologi

- Mye av metodene som anvendes innenfor bioteknologien er basert på **molekylær kloning** – et hvilket som helst DNA-fragment klones inn i en vektor og introduseres inn i en passende vert for å uttrykke en spesifikk egenskap
- Vanlige kloningsvektorer inkluderer plasmider og bakteriofager
- Molekylær kloning oppstod ut ifra den økte kunnskap en fikk fra egenskapene til DNA, RNA, proteinkjemi, molekylær genetikk mm.



Vertsorganismer for kloningsvektorer

- I laboratoriet ønsker man å studere en organisme med den hensikt å lære denne å kjenne & å bestemme ≠ funksjoner vha. genetiske analyse metoder
- I industriell bioteknologi er det ønskelig å bruke kunnskapen man tilegner seg om organismer i kommersielle anvendelser – f.eks. ved produksjon av antibiotika, et spesifikt protein/enzym mm.
- I begge tilfeller er det viktig å velge rett vertsorganisme for vektoren
⇒ flere kriterier er nødvendig å ta i betraktning
 - ved anskaffelse av store mengder DNA, må verten
 - vokse raskest mulig i enklest og billigst mulig medium
 - lett kunne ta opp DNA som replikeres
 - være ikke-patogen og stabil i en kultur
 - de viktigste vertene for kloning er mikroorganismer – de vanligste er
 - bakterier som *E. coli* og *Bacillus subtilis*
 - gjærceller som eks. *Saccharomyces cerevisiae*

Vertsorganismer for kloningsvektorer

- Prokaryote verter
 - i de fleste tilfeller brukes *E. coli* da det er lett å få denne kompetent til å ta opp DNA (elektroporering eller transformasjon)
 - noen ulemper finnes likevel vba. denne
 - den finnes i tarmen hos mennesker
 - WT varianter er potensielle patogener
 - selv ikke-patogene arter kan produsere endotoksiner som kontaminerer sluttproduktet i storskala produksjoner
 - proteiner som uttrykkes i store mengder forblir ”låst inne i” periplasma ⇒ vanskelig å isolere og rense opp
 - genmodifiserte varianter har blitt lagd s.a. de fleste av problemene nevnt her er overvunnet ⇒ *E. coli* er den vanligste brukte organismer ved kloning
 - alternativ vert for kloning prosedyrer er *B. subtilis*
 - ikke-patogen bakterie
 - produserer ikke endotoksiner
 - utsondrer lett proteiner i store mengder ut i vekstmediet
 - imt. *E. coli* er denne organismen vanskeligere å transformere og plasmider er mindre stabile ⇒ klonet DNA tapes ofte

Vertsorganismer for kloningsvektorer

□ Eukaryote verter

- er viktige ved utledning av hvordan gener reguleres i eukaryoter
- benytter som oftest gjærsoppen *Saccharomyces cerevisiae*
 - kjenner sekvensen til alle gener
 - relativt lett å manipulere
 - ikke-patogen som kan brukes til overekspressjon av proteiner
 - plasmider og YACs finnes
- i enkelte tilfeller er det bedre å anvende mammalske celler
 - disse har de nødvendige posttranslasjonelle modifikasjonssystemer for prosessering av RNA og proteiner ⇒ genmodifisering ikke alltid nødvendig
 - de gir riktige sluttprodukter *in vivo* – imt. prokaryoter hvor modifiseringer ofte må gjennomføres i etterhånd
 - ulempen er at disse systemene er dyre og vanskelig å opprettholde, samt at genekspressjonen og utbyttet av protein er lave

Vertsorganismer for kloningsvektorer

□ Eukaryote verter

- insekt cellelinjer er lettere å anvende enn mammalske celler, og molekylære verktøy i form av plasmider (baculovirus) eksisterer for disse
- planteceller er viktige instrumenter for å bedre utbyttet i landbruket – f.eks. finnes det genmodifiserte kornarter, mais, soyaplanter mm.
- prosessen for å transformere høyere eukaryote celler kalles **transfeksjon**
 - i den tidligste fase ble celler manipulert s.a. DNA i konsentrert form ble tatt opp via fagocytose
 - i senere stadier ble celler modifisert til å ta opp DNA via elektroporering slik som prokaryote celler
 - i nyere tid er det utviklet en partikkelkanon der gullpartikler dekkes med DNA som siden skytes inn i spesifikke celler eller i vev
 - mikroinjeksjon – metode som stadig oftere anvendes

Vektorer

- Innledningsvis finnes det ≠ måter å klonere DNA/gener på:
 - gen bibliotek – lages fra kromosomal DNA
 - cDNA bibliotek – lages vba. RNA og RT-PCR
 - PCR kan utføres på et gen(-er) – anvendes hovedsakelig på kjent DNA
- Identifisering av celler som har tatt opp DNA (her: plasmider) skjer vanligvis ut fra tilstedeværelse av **antibiotika resistens markører**
- For vertsceller som inneholder virus ser man etter **plakk** – klare soner på agarskåler
- Identifisering av spesifikke gener kan skje på en av 2 måter:
 - dersom det klonede genet uttrykkes i en vertscelle kan man detektere dette enten visuelt eller via enzymatiske reaksjoner f.eks. vha. antistoffer
 - dersom genet ikke uttrykkes må man screene etter DNA – anvender da en radioaktiv merket probe (DNA/RNA) og utfører kolonihybridisering
 - en alternativ variant av sistnevnte metode benytter fluorescerende prober i kliniske undersøkelser

Vektorer

- Hensikten med å klonere et gen er vanligvis å oppnå høyest mulig ekspresjon av denne i en passende vert ⇒ spesialiserte vektorer har blitt lagd for dette formålet:
 - shuttle vektorer – tillater forflytning av DNA mellom ulike organismer f.eks. vektorer som kan skyfles mellom G⁻ og G⁺ bakterier
 - ekspresjonsvektorer – anvendes både til kloningsformål og inneholder de nødvendige regulatoriske elementer for å uttrykke klonede gener:
 - promoterer som anvendes må være sterk (jfr. konsensus sekvens i *E. coli*)
 - transkripsjon av et gen må kunne kontrolleres iht. tidspunkt for ekspresjon
 - det må ikke være bakgrunnslekkasje dersom genet er toksisk
 - effektive terminatorer
 - translasjonen av gener må være effektivt – avhenger av Shine-Dalgarno sekvensen (RBS), DNA sammensetningen (codon usage), start codon (ATG er foretrukket i de fleste tilfeller) og vba. bakterier: ingen introns
 - reporter gener anvendes ofte i vektorer for å kartlegge promoter styrke (lacZ ekspresjon) og topologi/lokalisering av proteiner (GFP)

Ekspresjon av mammalske proteiner i bakterier

- Int. hos bakterier inneholder de aller fleste mammalske gener introns
⇒ vanskeligheter med å uttrykke disse i prokaryoter
- 2 metoder finnes for å overvinne denne problemstillingen:
 - funksjonelle gener kan isoleres ved å fange opp mRNA
 - alle introns er fjernet
 - lett å isolerer pga. polyA hale
 - omdannes til ds nukleinsyre vha. RT-PCR + enzymet *revers transcriptase*
 - muliggjør studier av vevsspesifikke gener
 - gener kan detekteres ut fra aminosyre sammensetningen til et protein via *revers translasjon*
 - kjenner codons og varianter som koder for et aminosyre
 - noen aminosyrer har unike codons (ATG = Met; TGG = Trp), andre har flere varianter (jfr. ”den genetiske kode er degenerert”)
 - prober for detektering av gener på DNA kan benyttes (Southern blotting), og kunstige gener uten introns kan lages
- God ekspresjon av mammalske gener avhenger av ”codon usage”, evnen til å folde proteinet riktig og stabiliteten av proteinet i verten

Praktiske anvendelser av bioteknologien

- Noe av det første man anvendte *E. coli* til var å uttrykke nyttige proteiner som DNA polymeraser og restriksjonsenzymmer – senere gikk man over til å klonere gener som koder for proteiner av farmasøytisk verdi, f.eks. insulin
 - insulin (består av 2 peptider) ble tidlig uttrykt i mikroorganismer, men for å få den riktig foldet og aktiv måtte man endre måten genet ble uttrykt på – 2 måter ble brukt for å oppnå dette i bakterier:
 - produksjon av proinsulin til dannelse av insulin via kjemisk kløving med cyanogen bromid (CnBr)
 - produksjon av de 2 peptidene A og B i separate bakteriekulturer med påfølgende kjemisk sammensetting
 - siden insulin er et lite protein, var det altså mer fordelaktig med disse løsningene enn å bruke genet pga. de ≠ posttranslasjonelle modifiseringer som må til etter transkripsjon for å få aktivt hormon

Praktiske anvendelser av bioteknologien

□ Rekombinante vaksiner

- genteknologien kan også benyttes til å endre bakterier/virus via molekylærbiologiske metoder s.a. disse får egenskaper som pirrer immunsystemet uten å virke toksisk mm.
- en metode anvender bruken av **vaccinia virus** :
 - er en del av en *E. coli* vektor hvorpå fremmed genet av interesse klones internt i vaccinia virus thymidine kinase (TK) genet
 - denne transfekteres så inn i en vertscelle med inaktivert TK, men som tidligere har vært infisert med WT vaccinia virus
 - dersom homolog rekombinasjon inntreffer ⇒ man får rekombinante virus med inaktivt TK
 - disse kan likevel infisere humane celler og uttrykke genet som er internt introdusert i TK
- vaksiner kan også lages ved kun å bruke deler av et virus, f.eks. kappe proteinet – kalles **subunit vaccine**
- DNA vaksiner – her benytter man kromosomal DNA til immunisering

Anvendelse av bioteknologien i animaler/mennesket

□ Transgene dyr

- gener kan lett introduseres i f.eks. mus vha. mikroinjeksjon i befruktede eggceller for å tilføre nye egenskaper eller endre eksisterende gener ⇒ brukes til *in vivo* studier av proteiner
- bruken av dyr til å uttrykke humane proteiner er i emningen – dette vil kunne forenkle produksjonen mht. posttranslasjonelle modifiseringer som er nødvendig for å få riktig foldete aktive proteiner

□ Human genetikk

- ≠ *in vitro* teknikker eksisterer for å identifisere karakteristikk hos enkelt individer, f.eks. metoden kalt **DNA fingerprinting**
 - kan detektere abnormaliteter i kromosomet hos individer som lider av genetisk betingede sykdommer
 - kan anvendes i tilfeller der det er nødvendig å identifisere individer
- genterapi – man forsøker her å introdusere normale gener i celler som har genfeil slik at disse blir ”normalisert”