

Biotekniikan sovellukset

Jussi Jäntti
Teknologian tutkimuskeskus VTT

08/11/2023 VTT – beyond the obvious

Luennon rakenne

- **Bioteknologia - yleiskuvaus**
- Mikrobit mahdollisuutena
- Mikrobien hyödyntämiseen liittyvistä menetelmistä
- Mikrobien teollisesta käytöstä

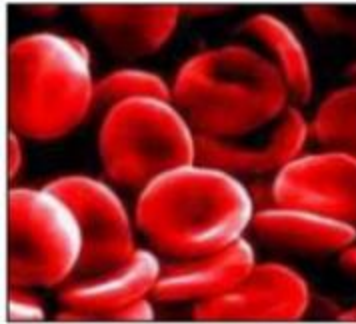
Bioteknologia - yleistä

- Bioteknologia on eliöiden, solujen, solujen osien tai solussa esiintyvien molekyylien ja niiden toimintojen hyödyntämistä
- Bioteknologia on listattuna EU:ssa ja useissa muissa maissa keskeiseksi mahdollistavaksi teknologiaksi siirryttäessä pois fossiilisten raaka-aineiden käytöstä – kohti kestävän kehityksen tuotantoteknologioita

Bioteknologian eri osa-alueet

Punainen biotekniikka

(Terveystekniikka)
Lääketieteen ja terveyden
sovellukset: Esimerkiksi
Rokotteet (esim COVID-19)
Insuliini (diabetes)
CAR-T (syöpäterapia)



Vihreä biotekniikka

(Kasvibiotekniikka) -
Maataloussovellukset:
Esimerkiksi
Paremmat kuivuutta
kestävät kasvit
Biologinen hyönteistorjunta
Elintarvikkeiden biotekninen
tuotto (esim fermentaatiolla)

Harmaa biotekniikka

(Ympäristöbiotekniikka)
Ympäristösovellukset:
Esimerkiksi
Maaperän ja vesien
puhdistus (bioremediaatio)
Myrkköjen tai metallien
poisto mikrobien avulla

Valkoinen biotekniikka

(Teollinen biotekniikka)
Esimerkiksi
Mikrobien avulla
biojalostamoissa tuotettuja
Polttoaineita
Kemikaaleja
Biohajoavia muoveja
Teollisuusentsyymejä

Bioteknologian eri osa-alueet

Muita usein käytettyjä luokituksia

- Keltainen bioteknologia – Ravinteiden bioteknologia
- Sininen bioteknologia – Vesistöjen bioteknologia
- Kultainen bioteknologia – Bioinformatiikka, laskennallinen bioteknologia
- Violetti bioteknologia – Bioteknologian lainopilliset, eettiset ja filosofiset puolet
- Musta bioteknologia – Bioteknologian bioterrorismiin ja biologisiin aseisiin liittyvät puolet

Luennon rakenne

- Bioteknologia - yleiskuvaus
- **Mikrobit mahdollisuutena**
- Mikrobien hyödyntämiseen liittyvistä menetelmistä
- Mikrobien teollisesta käytöstä

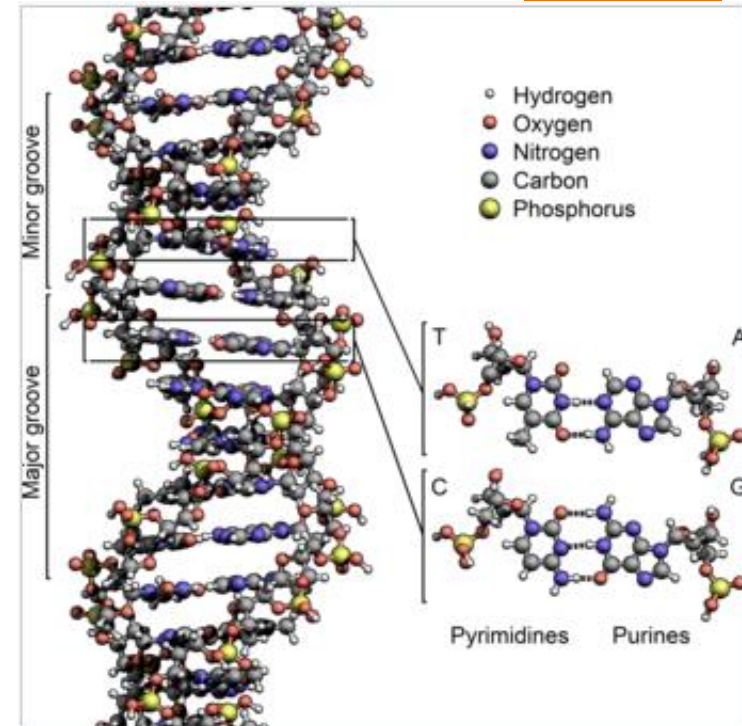
Luonnossa kaikki elollinen materiaali kierrätetään evoluution muokkaamassa ”kierotaloudessa”

Eri eliöiden ja mikrobien yhteistoiminta aikaansaa sekä elollisen materiaalin hajotuksen, että raaka-aineen uudelleenkäytön rakennusaineina.

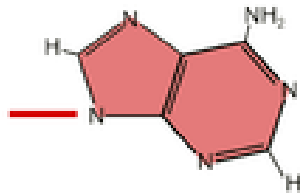


DNA koodi

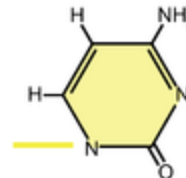
- Kaikki biologiset toiminnallisuudet on sisällytettynä DNA:ssa neljästä puriini tai pyrimidiini emäksestä (adeniin, tymiini, sytosiini ja guaani) koostuvaan elämän koodiin
- Tämä koodi on nykYTEknologioilla helposti muokattavissa.



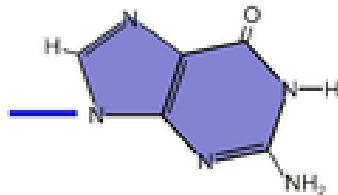
Adeniini



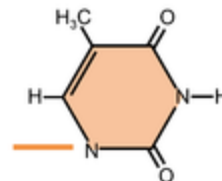
Sytosiini



Guaniini

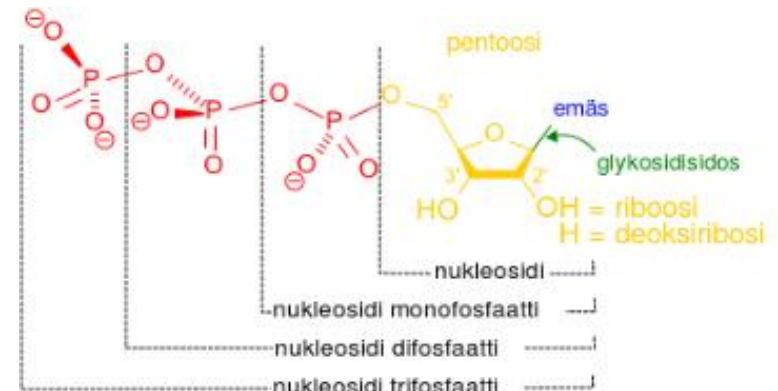


Tymiini



Puriinit

Pyrimidiinit

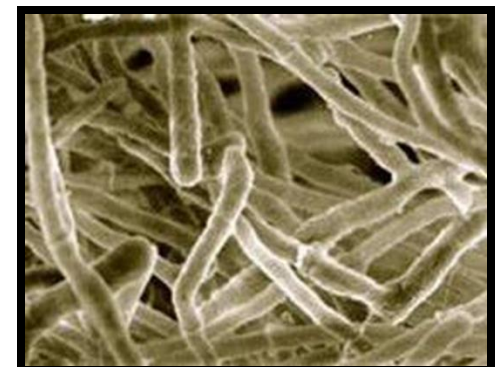
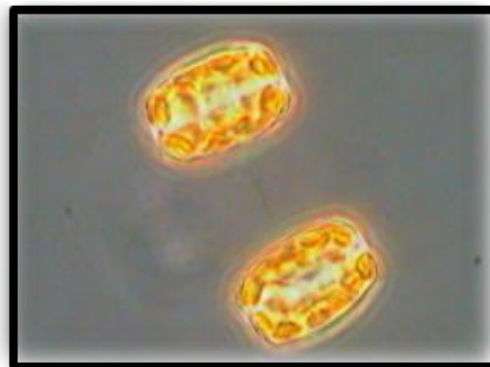


Miten luonnon monimuotoisuutta voidaan hyödyntää ”vihreän siirtymän” toteuttamiseen?

- Otetaan käyttöön luonnon omia ratkaisuja yhdistelemällä ja muokkaamalla niitä
- Tehdään tämä niin, että kehitetyt ratkaisut ovat skaalautuvia ja vastaavat olemassa oleviin kestävyysvajeongelmiin
- Käytetään tähän teollista biotekniikkaa (elävien organismien ja niiden tuottamien proteiinien sekä entsyymien käyttö) .
- Esimerkki: Korvataan muoveja ja polttoaineita ei-fossiilisista raaka-aineista valmistetuilla vaihtoehdoilla teollisen biotekniikan avulla

Solutehdas

- Tyypillisesti bakteeri, levä, hiiva, home tai viljelty nisäkässolu, joka tuottaa joko luonnollisesti tai se on geneettisesti muokattu tuottamaan jotakin yhdistettä tai valkuaisainetta

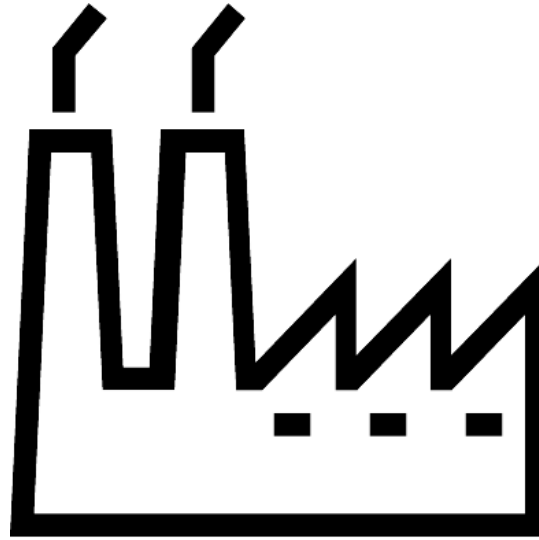


Hiivat ja bakteerit

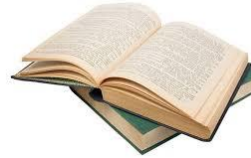
Levät ja
syano-
bakteerit

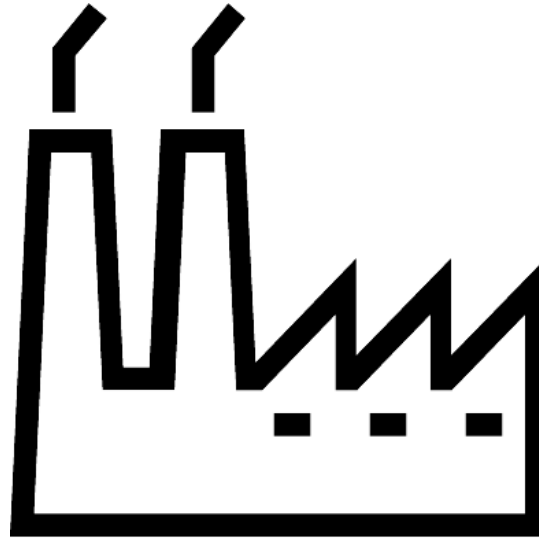


Homeet

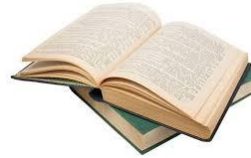


Paperitehdas





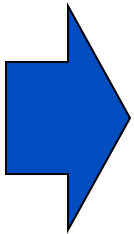
Paperitehdas



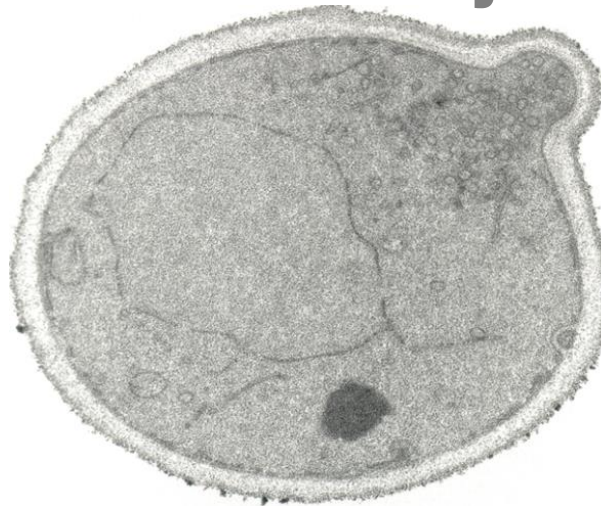
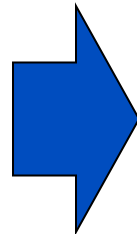
Solutehdas/biojalostamo



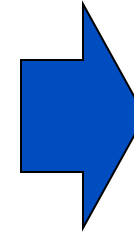
Biomassa, jäte
tai muu sivuvirta



Sokeri



Mikrobisolu (esim. bakteeri, hiiva tai home)

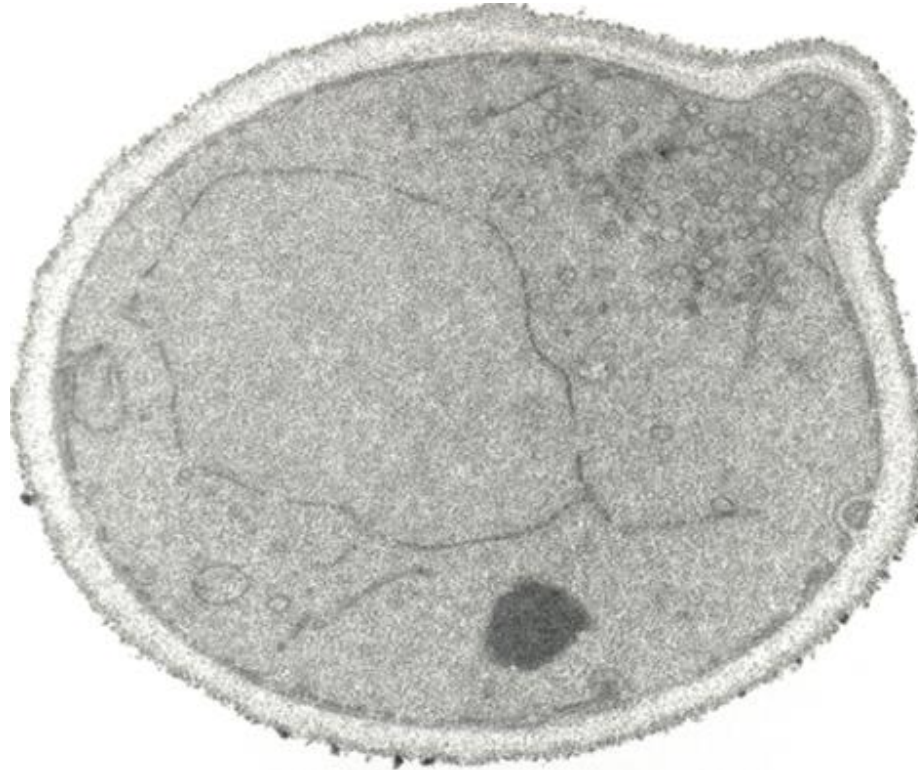


Kemikaaleja
Polttoaineita
Polymeerejä
Valkuaisaineita

Solutehdas

**Raaka-
aine**

Sokeri
CO/CO₂
Muut C-1 yhdisteet:
metanoli, formaatti



Tuote

- ✓ **Solutehdas rakentaa itse koneensa (entsyymit) ja rakennusaineensa (lipidit, rakenneproteiinit, polysakkaridit jne) perimässä sijaitsevan rakennusohjeen mukaan (DNA-koodi)**

Mikrobien potentiaali

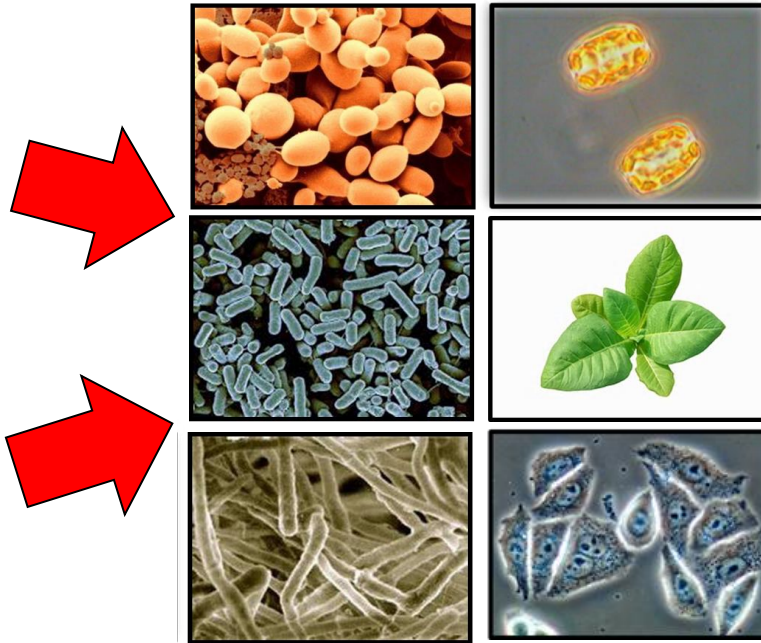
- ✓ Arvioiden mukaan maapallolla on 0,8-1,6 miljoonaa prokaryoottilajia (bakteerit ja arkeonit) ja n. 2,2-4,3 miljoonaa eliölajia (aikaisemmat arviot biljoonissa (10^{12})) (<https://earthmicrobiome.org/>)
- ✓ Vain n. 10000 lajia on kasvatettu laboratorio-olosuhteissa
- ✓ Teollisessa käytössä vain murto-osa (määrittelytavasta riippuen muutamia satoja)
- ✓ Mikrobeista identifioitu >22000 biologisesti aktiivista yhdistettä.
- ✓ >1000X tuottotasojen parannukset kantojen muokkauksella

Sokeri

Biomassasta
Teollisen
prosessin
sivuvirrasta

C1-yhdisteet:

CO/CO₂
Metaani
Metanoli
Formaatti



Kemikaalit

Polttoaineet (EtOH, rasvat)

Proteiinit

- Entsyymit
- Vasta-aineet, rokote
antigeenit ym

Materiaalit

- Polymeerit
 - PLA, PHA
 - Silkkiproteiinit
 - Filamenttisieni-
materiaalit (sieninahka)

Solumaatalous

- Mikrobiomassa
ravintona
- Esim proteiinit, lipidit

Haaste: Jotta kykenemme vastaamaan luonnon ja ympäristön kestävyysasteisiin tulee meidän parantaa kykyämme käyttää biologisia ratkaisuja

Luennon rakenne

- Bioteknologia - yleiskuvaus
- Mikrobit mahdollisuutena
- **Mikrobien hyödyntämiseen liittyvistä menetelmistä**
- Mikrobien teollisesta käytöstä

Perinteinen mikrobikantojen parantaminen



**Maapallolla
esiintyvä elämän
monimuotoisuus**

- Ennen molekyylibiologian aikakautta:
- ✓ Spontaanit tai aiheutetut mutaatiot
 - ✓ Mikrobien adaptoiminen
pitkäaikaisissa kasvatuskokeissa
 - ✓ Lähestymistapana hidas
 - ✓ Lopputuloksen ennustaminen
vaikeaa

Synteettinen biologia

- Synteettisen biologian menetelmien avulla solujen DNA:ta kyetään lukemaan (DNA sekvensointi, koodin lukeminen), syntetisoimaan (koodin kirjoittaminen) ja muokkaamaan tehokkaasti (Esim. CRISPR-Cas9 geenisakset & PCR).
- “Engineering of biology remains complex because we have never made it simple” (Thomas F Knight, MIT/Ginkgo Bioworks) – insinööritieteet biologiaan
- Keskeistä on biologisten systeemien matemaattinen mallintaminen ja siitä saadun tiedon käyttö erilaisten ominaisuuksien suunnittelussa ja kirjoittamisessa solujen DNA:han (elämän koodi).

Synteettisen biologian menetelmistä/ käytännön sovellutuksista

- ✓ Synteettinen biologia mahdollistaa mm:
 - ✓ Erilaisten valkuaisaineiden (entsyymien) rakennusohjeiden kirjoittamisen soluihin
 - ✓ Solujen kasvuominaisuuksien muokkaamisen
- ✓ DNA-koodia muuttamalla voidaan kokeilla erilaisten entsyymien toimintaa solutehtaassa ja rakentaa kokonaan uudentyyppisiä entsyymejä (AlphaFold algoritmi)
- ✓ Toiminnallisuuden ennustaminen edelleen iso haaste

Synteettisen biologian tarjoamat mahdollisuudet mikrobien käytölle teollisuudessa



Maapallolla esiintyvä elämän monimuotoisuus

Synteettinen biologia

- ✓ DNA sekvensointi
- ✓ DNA synteesi
- ✓ Mallintaminen ja suunnittelu
- ✓ Tekoäly
- ✓ CRISPR/Cas9 geenisakset
- ✓ PCR
- ✓ Automaatio

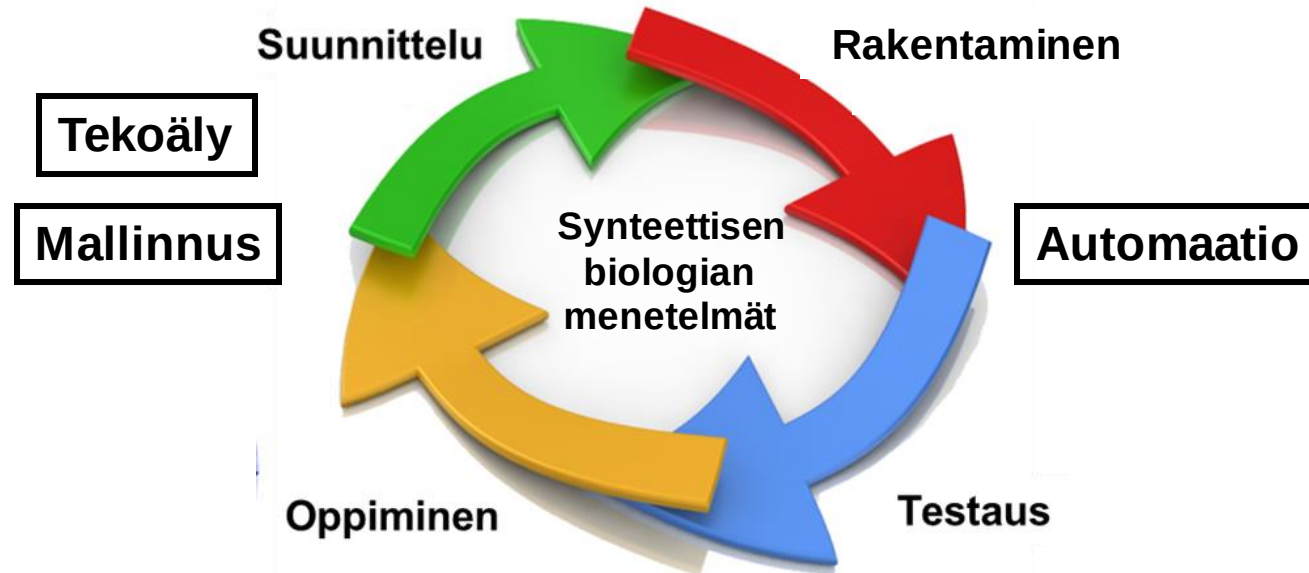
Kestävän kehityksen mukaiset tuotteet

Haaste:

Riittävän taloudellinen, nopea ja mahdollisimman ennustettava mikrobien muokkaus teollisuuden tarpeisiin

Synteettisen biologian testausalusta

Tuotantokantojen ja entsyymien tehostettuun rakentamiseen ja seulontaan



Nopeutettu tuotekehitys
Kustannussäästöt

**Paremmat
entsyymit ja
tuotantokannat**

Tuotesaannon parannus
Uudet tuotteet

**Kiertotalouden
raaka-aine**
Esim.
teollisuuden
sokerivirrat

**Raaka-aineen
biotekninen
hajotus**
Entsyymit

**Mikrobi-
fermentaatio**
Esim. hiiva tai
home

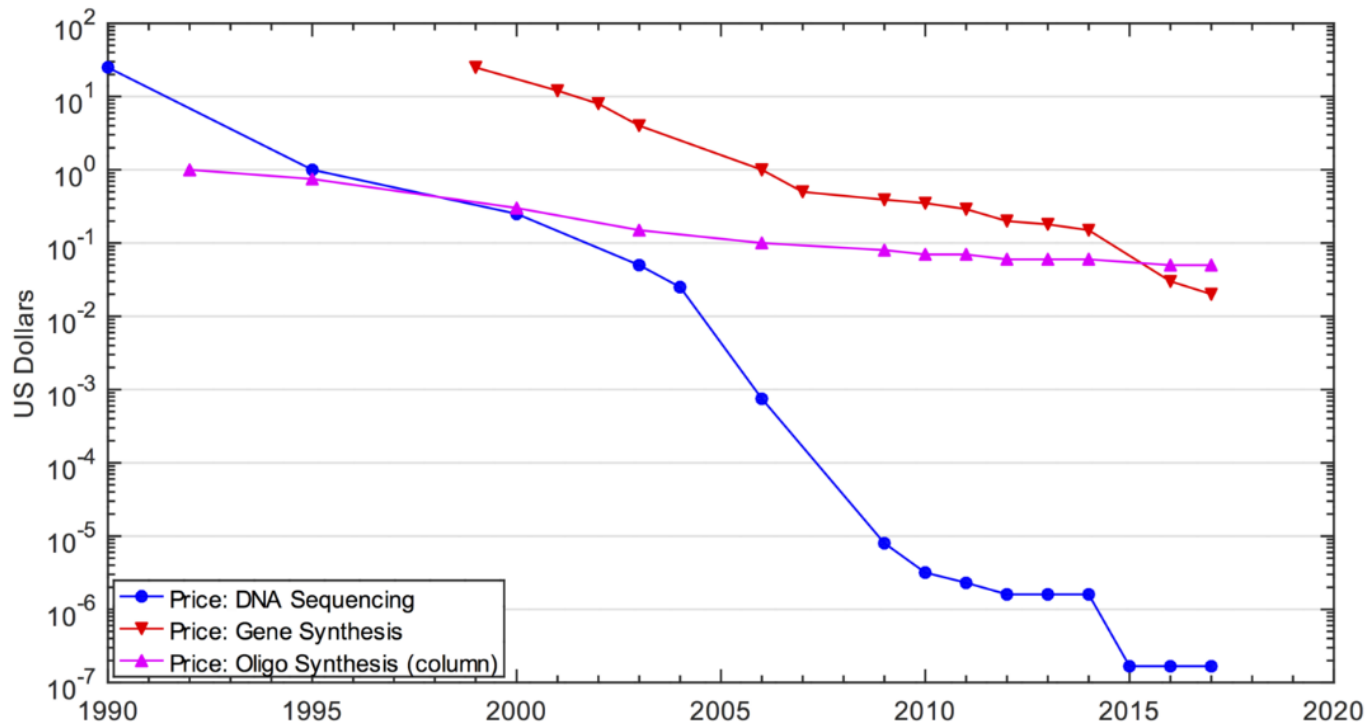
Tuote
Kemikaalit
Polttoaineet
Entsyymit

Bioteknologinen tuotantoprosessi

Keskeiset mahdollistajat synteettiselle biologialle

- DNA sekvensointiteknologiat
- DNA synteessiteknologiat

Price Per Base of DNA Sequencing and Synthesis (circa 2017)



- Kykenemme lukemaan ja kirjoittamaan DNA koodia kohtuullisin kustannuksin
- Ihmisen perimän sekvensointi <1000 USD
- DNA synteesi esim. 0,25 €/emäs

Biologisille ratkaisuille nähdään erittäin suuret markkinat

- Globaalisti biologiaan liittyvien teknologioiden arvioidaan aikaansaavan vuoteen 2040 mennessä 2-4 triljoonan arvosta taloudellista toimintaa.
- Tähän tavoitteeseen liittyy aikaisemmasta biologian teollistamisesta poiketen lähetymistapa, joka pyrkii biologisoimaan teollisuuden.

BOLD GOALS FOR U.S. BIOTECHNOLOGY AND BIOMANUFACTURING

**HARNESSING RESEARCH AND DEVELOPMENT
TO FURTHER SOCIETAL GOALS**

MARCH 2023



THE WHITE HOUSE
WASHINGTON

Yhdysvallat panostaa suuresti biotekniikan tutkimukseen ja biotuotantoon

- Nykyhallinto on ilmoittanut pyrkivänsä käyttämään 2 miljardia dollaria tutkimus- ja kehitystoimintaan ja infrastruktuurien kehittämiseen.

Otteita asetetuista kunnianhimoisista tavoitteista:

- Viidessä vuodessa sekvensoidaan miljoonan mikrobin perimän DNA ja ymmärretään 80%:lle identifioiduista geeneistä niiden toiminta.
- Viidessä vuodessa kehitetään menetelmiä, joiden avulla voidaan ennustettavasti (90% onnistumisasteella) suunnitella ja optimoida kaupallisen bioprosessin ylösskaalaus kolmessa kuukaudessa.

Mckinsey & Company. The Bio Revolution: Innovations transforming economies, societies, and our lives. 2020.

<https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/the-bio-revolution-innovations-transforming-economies-societies-and-our-lives>

<https://www.whitehouse.gov/wp-content/uploads/2023/03/Bold-Goals-for-U.S.-Biotechnology-and-Biomanufacturing-Harnessing-Research-and-Development-To-Further-Societal-Goals-FINAL.pdf>

Science. 2010, 2;329(5987): 52-6.

Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

Daniel G. Gibson,¹ John I. Glass,¹ Carole Lartigue,¹ Vladimir N. Noskov,¹ Ray-Yuan Chuang,¹ Mikkel A. Algire,¹ Gwynedd A. Benders,² Michael G. Montague,¹ Li Ma,¹ Monzia M. Moodie,¹ Chuck Merryman,¹ Sanjay Vashee,¹ Radha Krishnakumar,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Cynthia Andrews-Pfannkoch,¹ Evgeniya A. Denisova,¹ Lei Young,¹ Zhi-Qing Qi,¹ Thomas H. Segall-Shapiro,¹ Christopher H. Calvey,¹ Prashanth P. Parmar,¹ Clyde A. Hutchison III,² Hamilton O. Smith,² J. Craig Venter^{1,2*}

We report the design, synthesis, and assembly of the 1.08-mega-base pair *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 genome starting from digitized genome sequence information and its transplantation into a *M. capricolum* recipient cell to create new *M. mycoides* cells that are controlled only by the synthetic chromosome. The only DNA in the cells is the designed synthetic DNA sequence, including “watermark” sequences and other designed gene deletions and polymorphisms, and mutations acquired during the building process. The new cells have expected phenotypic properties and are capable of continuous self-replication.

crude *M. mycoides* or *M. capricolum* extracts, or by simply disrupting the recipient cell’s restriction system (8).

We now have combined all of our previously established procedures and report the synthesis, assembly, cloning, and successful transplantation of the 1.08-Mbp *M. mycoides* JCVI-syn1.0 genome, to create a new cell controlled by this synthetic genome.

Synthetic genome design. Design of the *M. mycoides* JCVI-syn1.0 genome was based on the highly accurate finished genome sequences of two laboratory strains of *M. mycoides* subspecies *capri* GM12 (8, 9, 11). One was the genome donor used by Lartigue *et al.* [GenBank accession CP001621] (10). The other was a strain created by transplantation of a genome that had been cloned and engineered in yeast, YCpMmyc1.1- Δ typeIIIres [GenBank accession CP001668] (8). This project was critically dependent on the accuracy of these sequences. Although we believe that both fin-

- ✓ *Mycoplasma capricolum* eliölajin muuntaminen *M. genitalium* eliöksi rakennetun perimän avulla.
- ✓ Hinta vuonna 2010 n. 40 miljoonaa dollaria

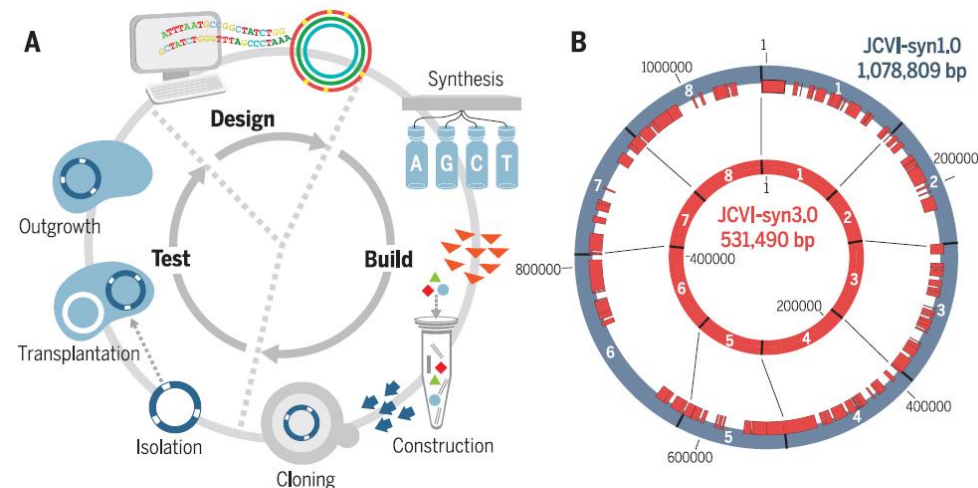
Design and synthesis of a minimal bacterial genome

Clyde A. Hutchison III,^{1*} Ray-Yuan Chuang,^{1†} Vladimir N. Noskov,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Thomas J. Deerinck,² Mark H. Ellisman,² John Gill,³ Krishna Kannan,³ Bogumil J. Karas,¹ Li Ma,¹ James F. Pelletier,^{4§} Zhi-Qing Qi,³ R. Alexander Richter,¹ Elizabeth A. Strychalski,⁴ Lijie Sun,^{1||} Yo Suzuki,¹ Billyana Tsvetanova,³ Kim S. Wise,¹ Hamilton O. Smith,^{1,3} John I. Glass,¹ Chuck Merryman,¹ Daniel G. Gibson,^{1,3} J. Craig Venter^{1,3*}

We used whole-genome design and complete chemical synthesis to minimize the 1079-kilobase pair synthetic genome of *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0. An initial design, based on collective knowledge of molecular biology combined with limited transposon mutagenesis data, failed to produce a viable cell. Improved transposon mutagenesis methods revealed a class of quasi-essential genes that are needed for robust growth, explaining the failure of our initial design. Three cycles of design, synthesis, and testing, with retention of quasi-essential genes, produced JCVI-syn3.0 (531 kilobase pairs, 473 genes), which has a genome smaller than that of any autonomously replicating cell found in nature. JCVI-syn3.0 retains almost all genes involved in the synthesis and processing of macromolecules. Unexpectedly, it also contains 149 genes with unknown biological functions. JCVI-syn3.0 is a versatile platform for investigating the core functions of life and for exploring whole-genome design.

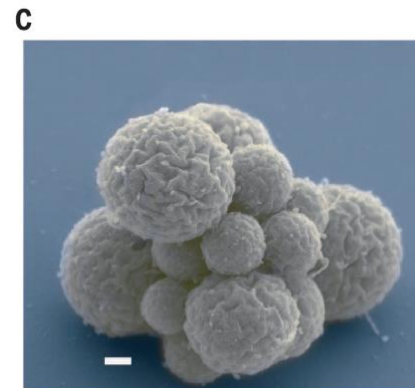
- Pienin tiedossa oleva itsenäisesti jakautuvan eliön perimä
- 473 geeniä (joista 149:n tehtävää ei tunnettu)

tial genes. These results showed that it should be possible to produce a minimal genome that is smaller than any found in nature, but that the minimal genome would be larger than the common set of 256 genes. At that time, we proposed to create and test a cassette-based minimal artificial genome (5). We have been working since then to produce the tools needed to accomplish this. We developed methods to chemically synthesize the *M. genitalium* genome (7). However, *M. genitalium* grows very slowly, so we turned to the faster-growing *M. mycoides* genome as our target for minimization. We developed the method of genome transplantation, which allowed us to introduce *M. mycoides* genomes, as isolated DNA molecules, into cells of a different



Four design-build-test cycles produced JCVI-syn3.0.

(A) The cycle for genome design, building by means of synthesis and cloning in yeast, and testing for viability by means of genome transplantation. After each cycle, gene essentiality is reevaluated by global transposon mutagenesis. (B) Comparison of JCVI-syn1.0 (outer blue circle) with JCVI-syn3.0 (inner red circle), showing the division of each into eight segments. The red bars inside the outer circle indicate regions that are retained in JCVI-syn3.0. (C) A cluster of JCVI-syn3.0 cells, showing spherical structures of varying sizes (scale bar, 200 nm).



Design and synthesis of a minimal bacterial genome

Clyde A. Hutchison III,^{1*} Ray-Yuan Chuang,^{1†} Vladimir N. Noskov,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Thomas J. Deerinck,² Mark H. Ellisman,² John Gill,³ Krishna Kannan,³ Bogumil J. Karas,¹ Li Ma,¹ James F. Pelletier,^{4§} Zhi-Qing Qi,³ R. Alexander Richter,¹ Elizabeth A. Strychalski,⁴ Lijie Sun,^{1||} Yo Suzuki,¹ Billyana Tsvetanova,³ Kim S. Wise,¹ Hamilton O. Smith,^{1,3} John I. Glass,¹ Chuck Merryman,¹ Daniel G. Gibson,^{1,3} J. Craig Venter^{1,3*}

We used whole-genome design and complete chemical synthesis to minimize the 1079-kilobase pair synthetic genome of *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0. An initial design, based on collective knowledge of molecular biology combined with limited transposon mutagenesis data, failed to produce a viable cell. Improved transposon mutagenesis methods revealed a class of quasi-essential genes that are needed for robust growth, explaining the failure of our initial design. Three cycles of design, synthesis, and testing, with retention of quasi-essential genes, produced JCVI-syn3.0 (531 kilobase pairs, 473 genes), which has a genome smaller than that of any autonomously replicating cell found in nature. JCVI-syn3.0 retains almost all genes involved in the synthesis and processing of macromolecules. Unexpectedly, it also contains 149 genes with unknown biological functions. JCVI-syn3.0 is a versatile platform for investigating the core functions of life and for exploring whole-genome design.

tial genes. These results showed that it should be possible to produce a minimal genome that is smaller than any found in nature, but that the minimal genome would be larger than the common set of 256 genes. At that time, we proposed to create and test a cassette-based minimal artificial genome (5). We have been working since then to produce the tools needed to accomplish this. We developed methods to chemically synthesize the *M. genitalium* genome (7). However, *M. genitalium* grows very slowly, so we turned to the faster-growing *M. mycoides* genome as our target for minimization. We developed the method of genome transplantation, which allowed us to introduce *M. mycoides* genomes, as isolated DNA molecules, into cells of a different species, *M. capricolum* (8, 9). In this process, the *M. capricolum* genome is lost, resulting in a cell containing only the transplanted genome. In 2010, we reported the complete chemical synthesis and installation of the genome of *M. mycoides* JCVI-syn1.0 [1,078,809 base pairs (bp) (10); hereafter abbreviated syn1.0). This genome was an almost exact copy of the wild-type *M. mycoides* genome, with the addition of a few watermark and vector sequences.

Genome reduction in bacteria such as *E. coli* and *B. subtilis* has previously been achieved by a series of sequential deletion events (11, 12). After each deletion, viability, growth rate, and other phenotypes can be determined. In con-

- Tämän minimaalisen perimän sisältävän bakteerin kasvukyky laski 50%
- Hämmästyttävästi, evoluutiokokeissa kasvukyky palautui vain 300 päivässä vastaavaksi muokkaamattoman *M. mycoides* kannan kanssa
- Koe on hyvä osoitus DNA koodin muovautumiskyvystä

Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome

Narayana Annaluru,^{1*} Héloïse Muller,^{1,2,3,4*} Leslie A. Mitchell,^{2,5} Sivaprakash Ramalingam,¹ Giovanni Stracquadanio,^{2,6} Sarah M. Richardson,⁶ Jessica S. Dymond,^{2,7} Zheng Kuang,² Lisa Z. Scheifele,^{2,8} Eric M. Cooper,² Yizhi Cai,^{2,9} Karen Zeller,² Neta Agmon,^{2,5} Jeffrey S. Han,¹⁰ Michalis Hadjithomas,¹¹ Jennifer Tullman,⁶ Katrina Caravelli,^{2,12} Kimberly Cirelli,^{1,12} Zheyuan Guo,^{1,13} Viktoriya London,^{1,13} Apurva Yeluru,^{1,13} Sindurathy Murugan,⁶ Karthikeyan Kandavelou,^{1,14} Nicolas Agier,^{15,16} Gilles Fischer,^{15,16} Kun Yang,^{2,6} J. Andrew Martin,^{2,6} Murat Bilgel,¹³ Pavlo Bohutski,¹³ Kristin M. Boulter,¹² Brian J. Capaldo,¹³ Joy Chang,¹³ Kristie Charoen,¹³ Woo Jin Choi,¹³ Peter Deng,¹¹ James E. DiCarlo,¹³ Judy Doong,¹³ Jessilyn Dunn,¹³ Jason I. Feinberg,¹² Christopher Fernandez,¹² Charlotte E. Floria,¹² David Gladowski,¹² Pasha Hadidi,¹³ Isabel Ishizuka,¹² Javaneh Jabbari,¹² Calvin Y. L. Lau,¹³ Pablo A. Lee,¹³ Sean Li,¹³ Denise Lin,¹² Matthias E. Linder,¹² Jonathan Ling,¹³ Jaime Liu,¹³ Jonathan Liu,¹³ Mariya London,¹² Henry Ma,¹³ Jessica Mao,¹³ Jessica E. McDade,¹³ Alexandra McMillan,¹² Aaron M. Moore,¹² Won Chan Oh,¹³ Yu Ouyang,¹³ Ruchi Patel,¹³ Marina Paul,¹² Laura C. Paulsen,¹³ Judy Qiu,¹³ Alex Rhee,¹³ Matthew G. Rubashkin,¹³ Ina Y. Soh,¹² Nathaniel E. Sotuyo,¹² Venkatesh Srinivas,¹³ Allison Suarez,¹³ Andy Wong,¹³ Remus Wong,¹³ Wei Rose Xie,¹² Yijie Xu,¹³ Allen T. Yu,¹² Romain Koszul,^{3,4} Joel S. Bader,^{2,6} Jef D. Boeke,^{2,11,5†} Srinivasan Chandrasegaran^{1†}

Synthetic Yeast 2.0

Building the world's first synthetic eukaryotic genome together



<http://syntheticyeast.org/sc2-0/>

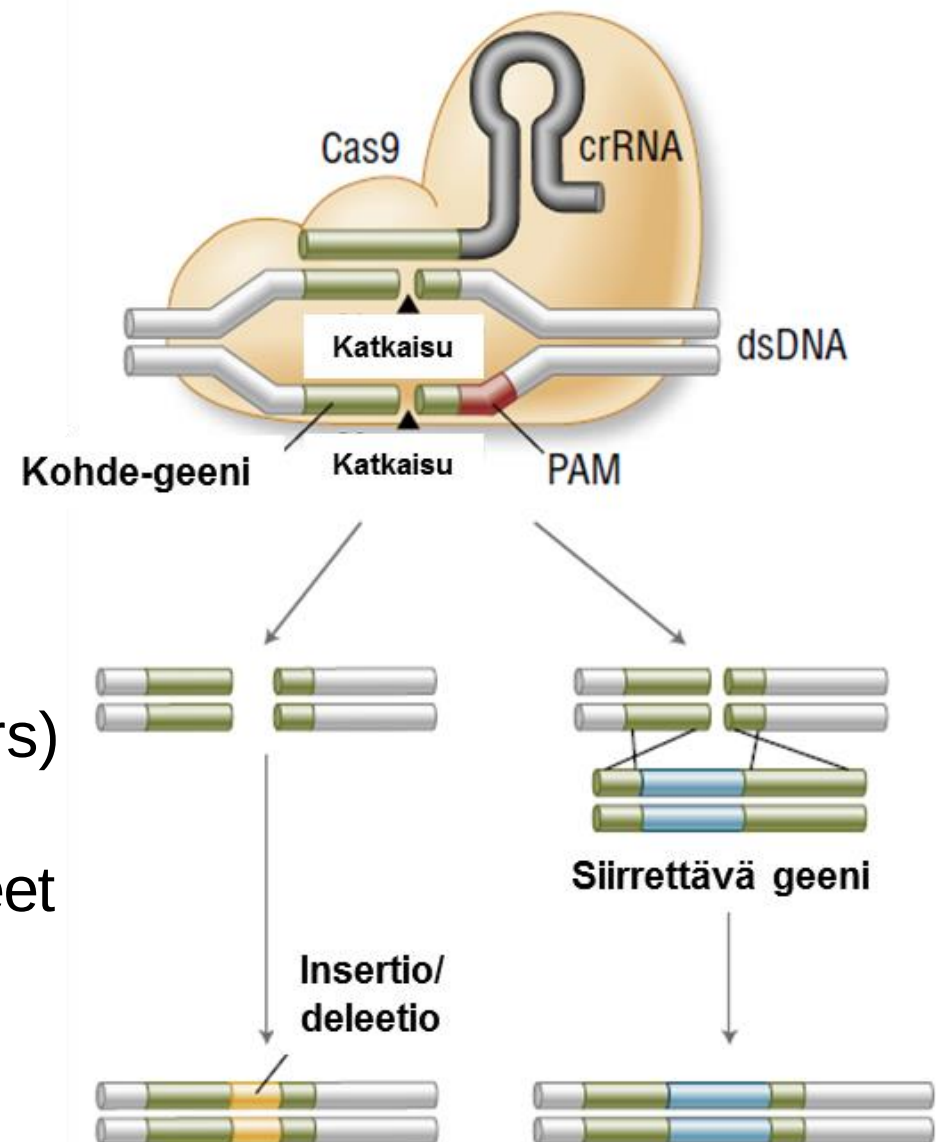
Leivinhiivan koko perimän uudelleen rakentaminen (16 kromosomia, 12 000 000 emäsparia)

Science 2014 Apr 4;344(6179):55-8

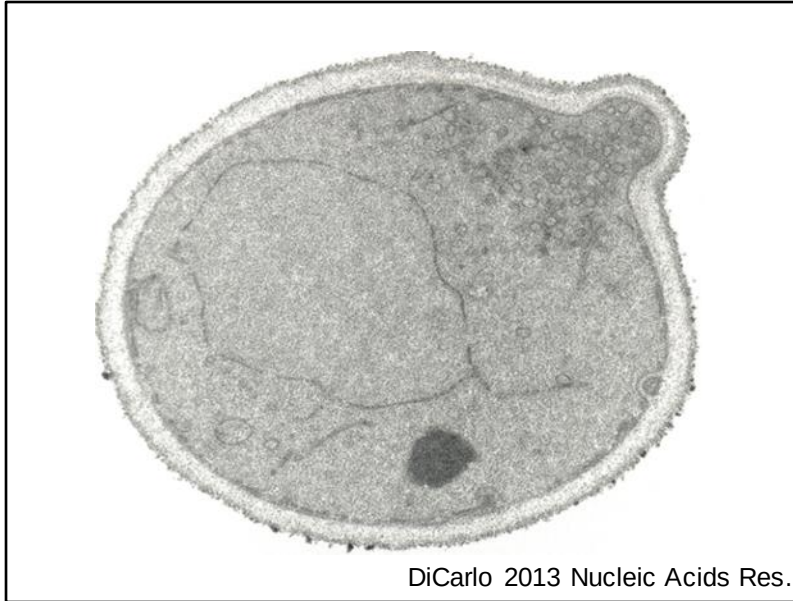
CRISPR/Cas9 genomimuokkaustekniikka

”Geenisakset”

- Alun perin bakteerien puolustusmekanismi viruksia vastaan
- Mahdollistaa aikaisempaa huomattavasti tehokkaamman DNA muokkauksen
- DNA:n kohdennettu katkaisu tai sekvenssin muokkaus (base-editors)
- Aiemmin liian työläinä pidetyt kokeet nyt mahdollisia



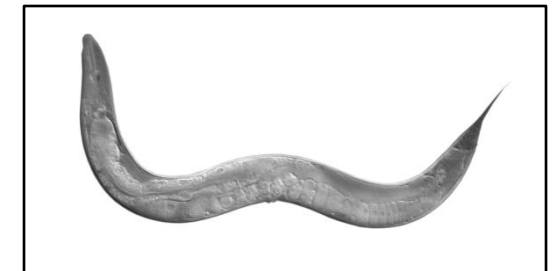
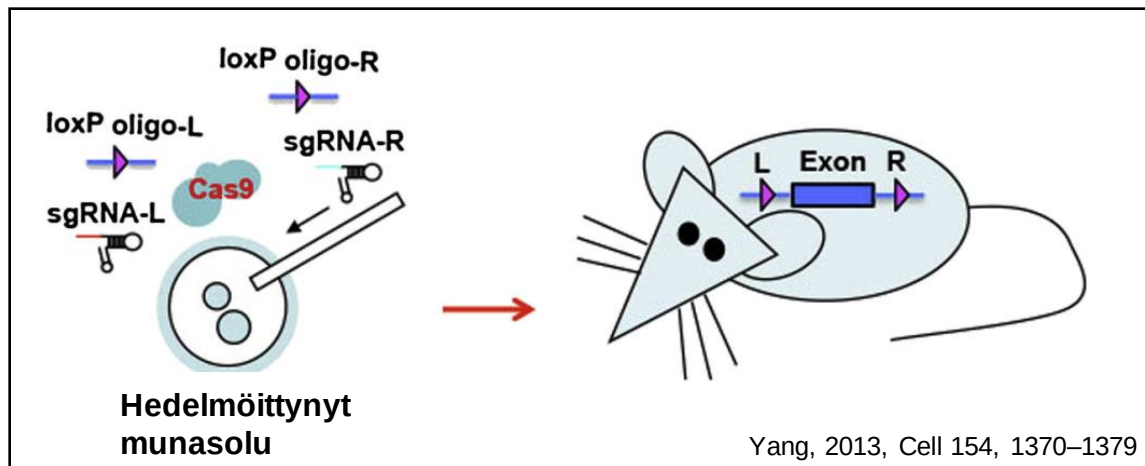
CRISPR/Cas9 genomimuokkaustekniikka



Woo 2015. Nature Biotechnology 33:1162-1164



Lee JS 2014. G3. 4:1291-5



Cho SW 2013. Genetics. 195:1177-80

Synteettisen biologian tulevaisuus

VTT

Automaatio



Laitteistojen kehitys



Mittausteknologiat
Analytiikka

DNA-
synteesi

Suunnittelu

Kokoaminen
Valmistus

Oppiminen

Testaus

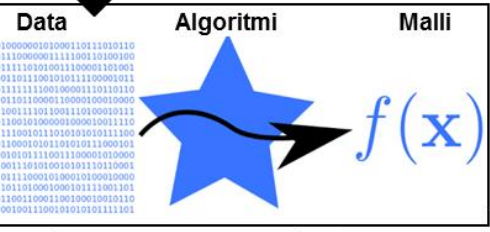
Genomitiedosta
biologian
ymmärtämiseen

Tieto-
kanta

Tieto-
kanta

Tieto-
kanta

Tieto-
kanta



DNA koodin
lukeminen ja
kirjoittaminen

Tekoäly

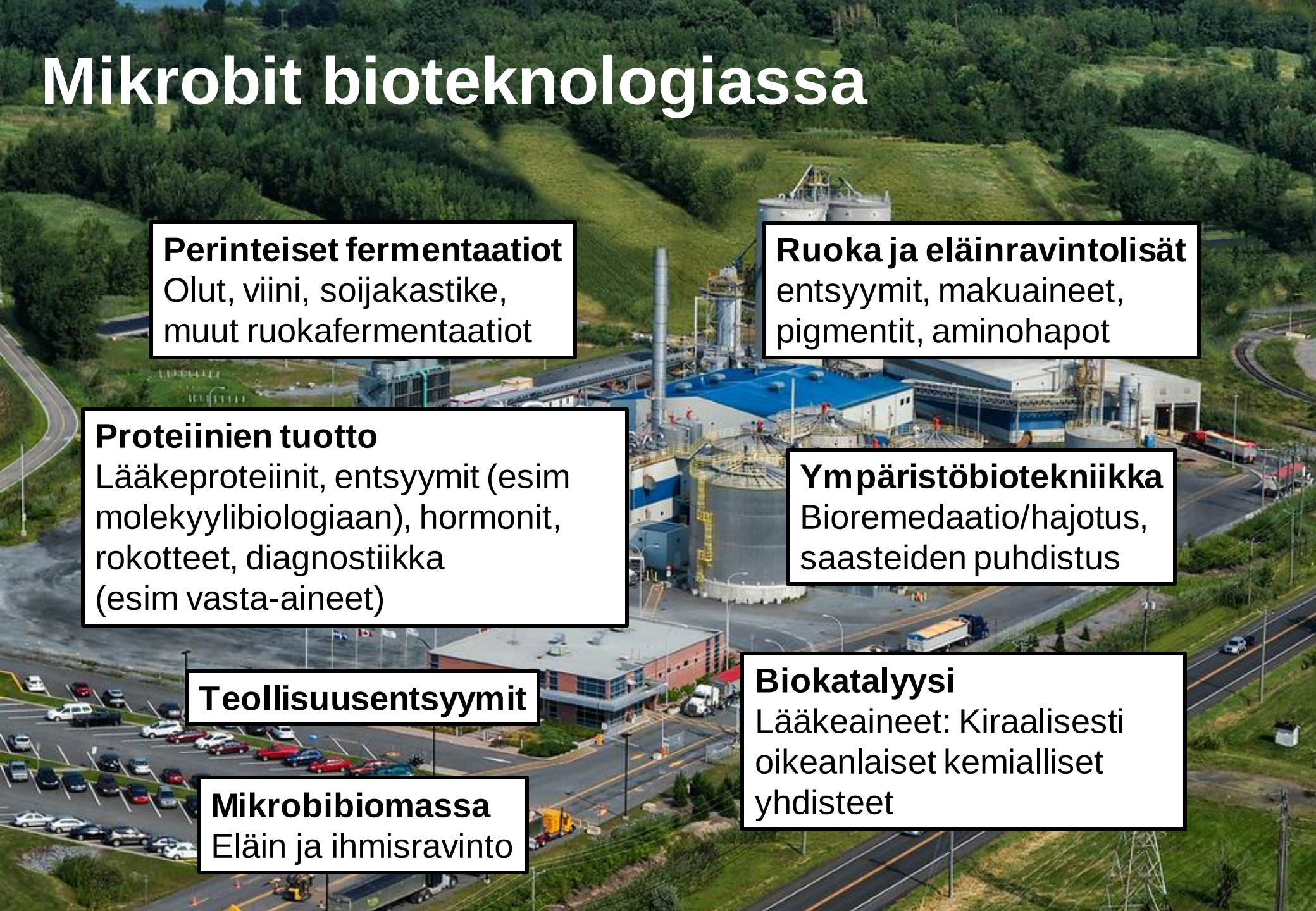


Matemaattinen mallinnus
Bioinformatiikka

Luennon rakenne

- Bioteknologia - yleiskuvaus
- Mikrobit mahdollisuutena
- Mikrobien hyödyntämiseen liittyvistä menetelmistä
- **Mikrobien teollisesta käytöstä**

Mikrobit bioteknologiassa



Perinteiset fermentaatiot

Olut, viini, soijakastike,
muut ruokafermentaatiot

Ruoka ja eläinravintolisät

entsyymit, makuaineet,
pigmentit, aminohapot

Proteiinien tuotto

Lääkeproteiinit, entsyymit (esim
molekyylibiologiaan), hormonit,
rokotteet, diagnostiikka
(esim vasta-aineet)

Ympäristöbiotekniikka

Bioremedaatio/hajotus,
saasteiden puhdistus

Teollisuusentsyymit

Biokatalyyysi

Lääkeaineet: Kiraalisesti
oikeanlaiset kemialliset
yhdisteet

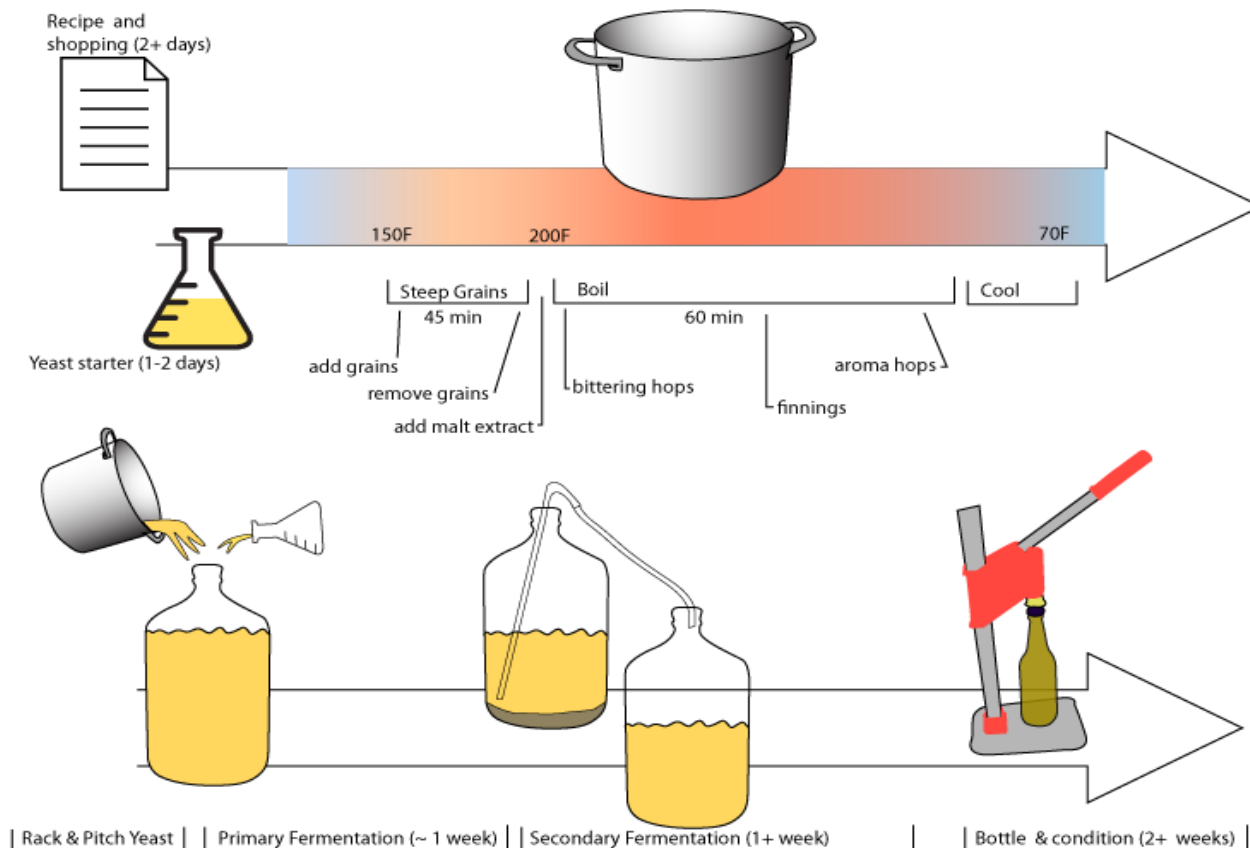
Mikrobibiomassa

Eläin ja ihmisravinto

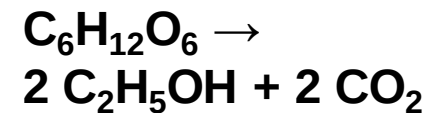
Oluen ja viinin tuotto

Perinteiset fermentaatiot:

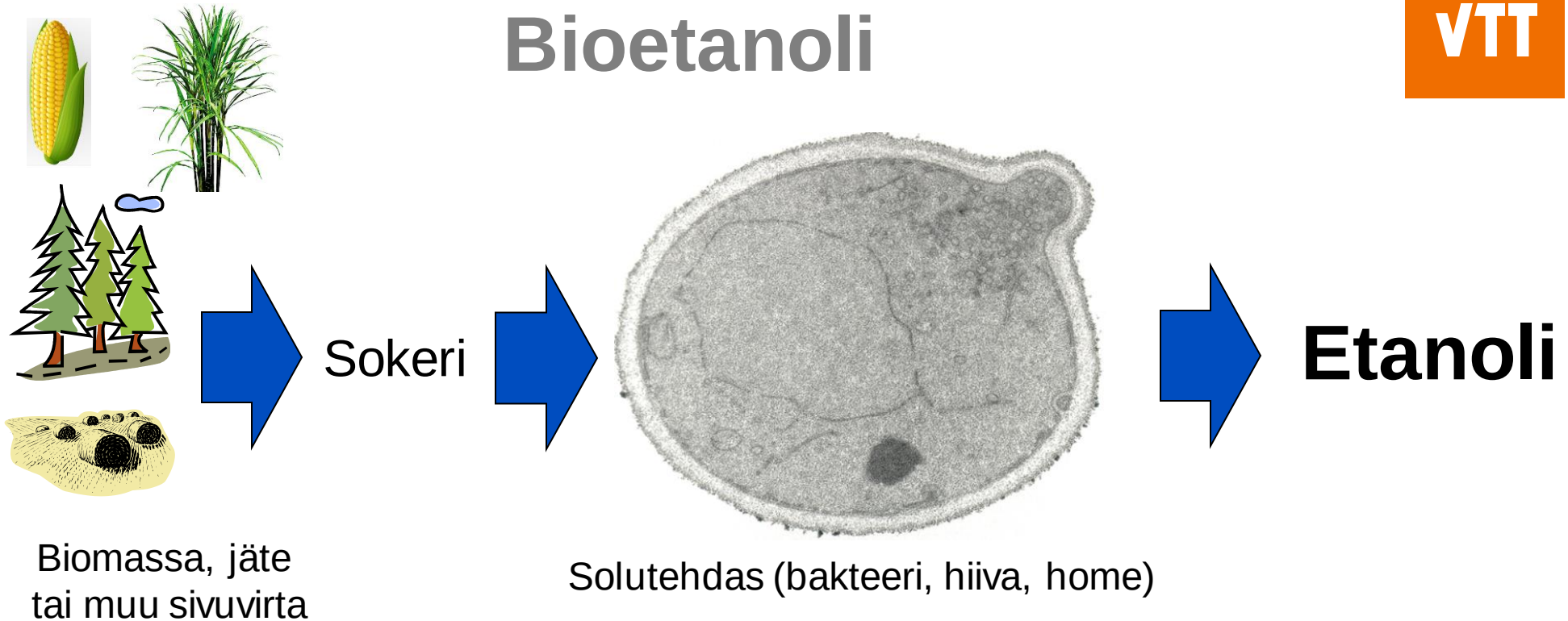
- Todisteita hiivojen käytöstä Kiinassa, Iranissa ja Egyptissä 8500-4000 vuotta ennen ajanlaskun alkua.



Etanolifermentaatio



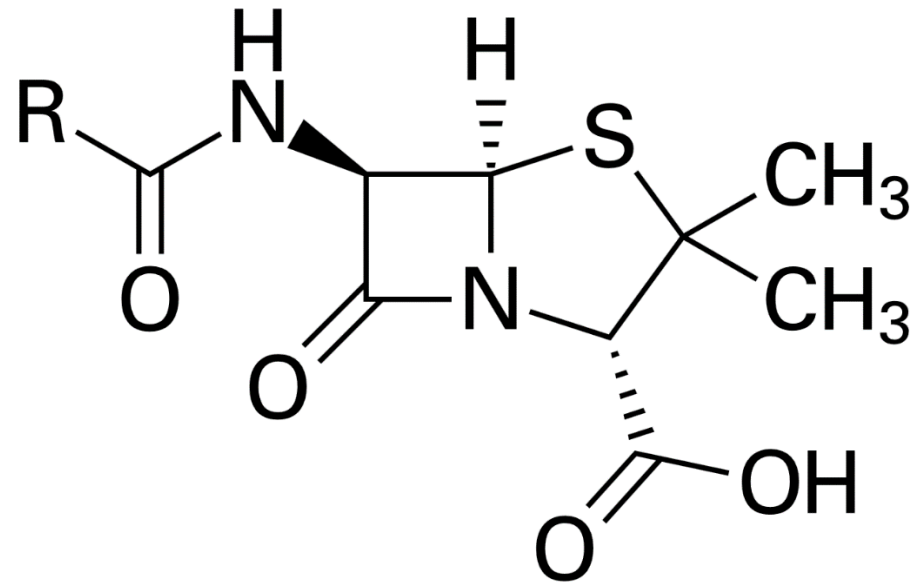
Bioetanoli



- Ensimmäisen sukupolven tuottosysteemit, elintarviketuotantoon soveltuvia raaka-aineita, kuten maissia
- Toisen sukupolven tuottosysteemit, raaka-aineena käytetään pääasiassa biomassaa tai jätettä, jossa on korkea lignoselluloosapitoisuus.
- Esimerkki: Polttoaine tai polyetyleenin valmistus sokeriruokosta valmistetusta etanolista (hiivafermentointi)

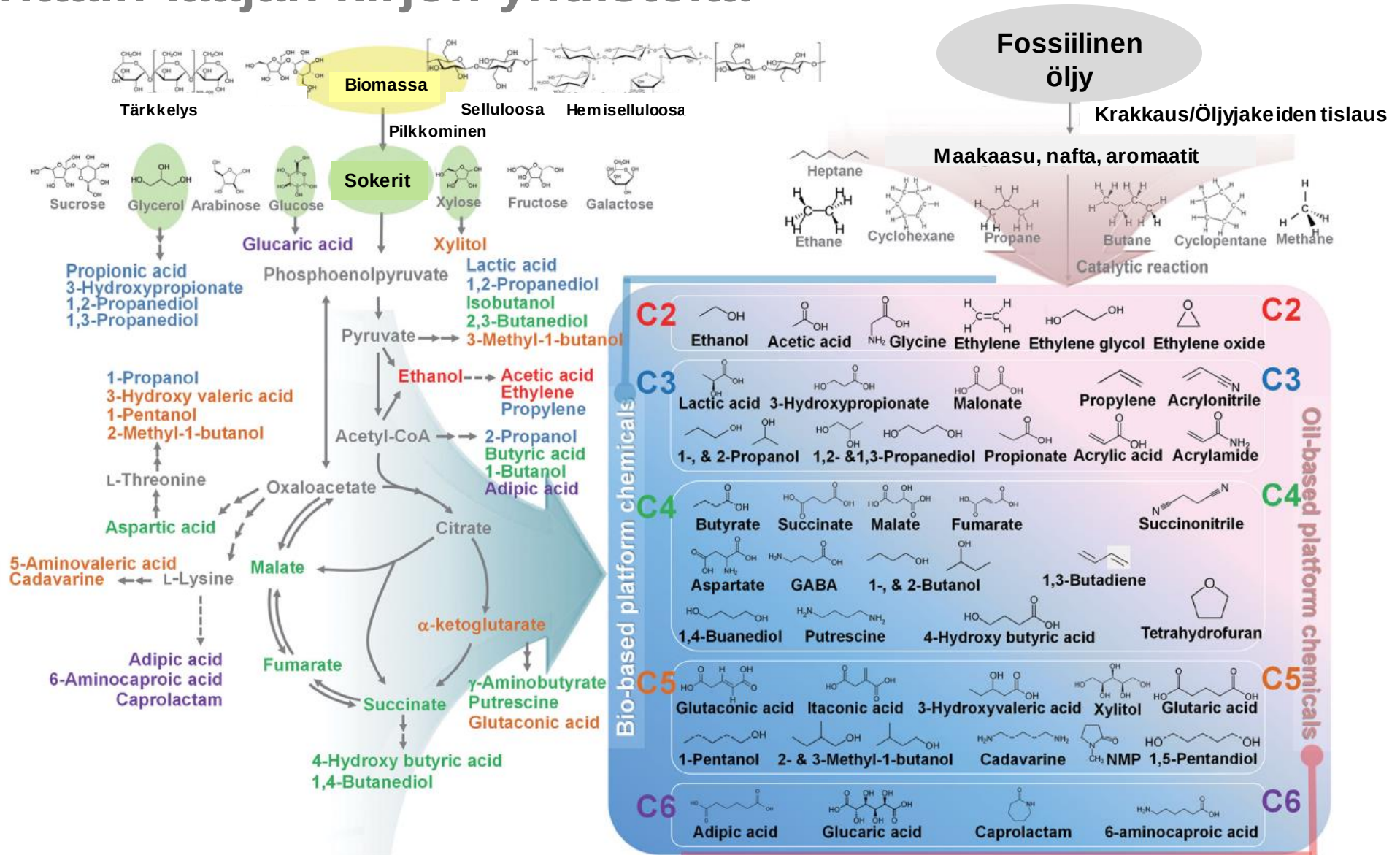


Penisilliini

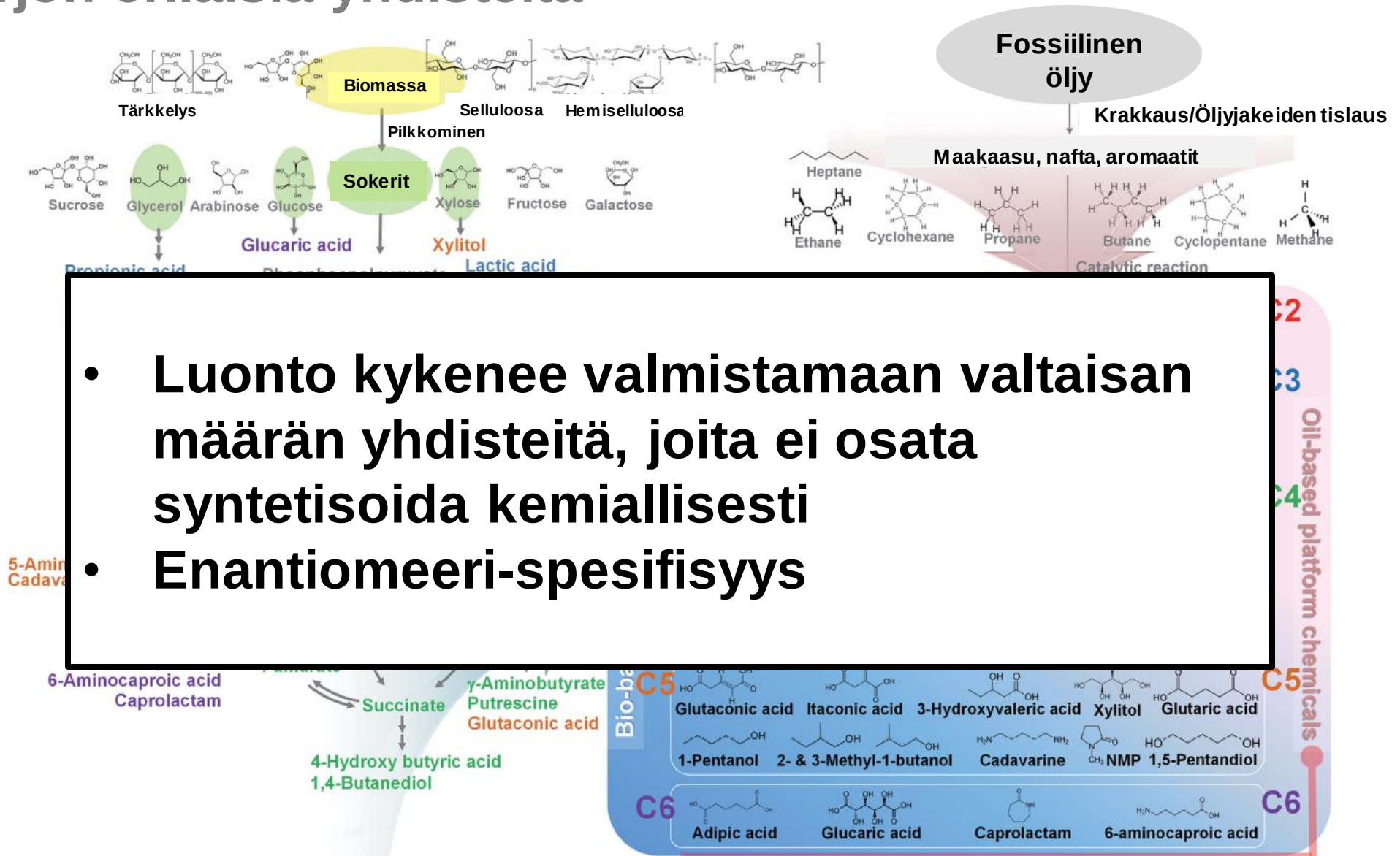


- Alexander Fleming onnistui eristämään penisilliiniä *Penicillium*-homeesta 1928.
- Teollinen laajamittainen tuotanto kehitettiin 1940-luvulla
- Valmistuksen mahdollisti aiemmin kehitetty toiselle homeelle kehitetty aerobinen bioprosessi (*Aspergillus niger*, käytetyn ilman sterilointi) sitruunahapon tuottoon
- *Penicillium chrysogenum* homeetta käytetään edelleen iseen tuotantoon (esim. DSM yritys).

Solujen kemialliset reaktiot kykenevät tuottamaan erittäin laajan kirjon yhdisteitä

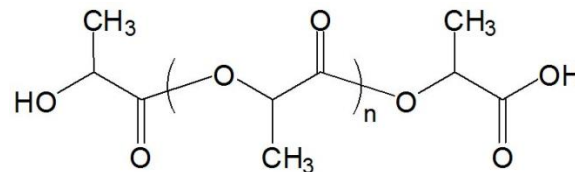
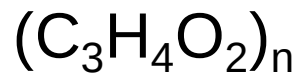


Solujen kemialliset reaktiot tuottavat erittäin laajan kirjon erilaisia yhdisteitä

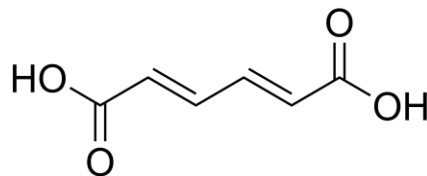
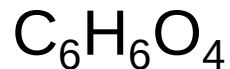


Synteettisen biologian avaamat mahdollisuudet öljyn korvaajana teollisessa tuotannossa

- Biohajoava maitohappo-polymeeri (PLA)



- Mukonihappo



Toimii rakenneyksikkönä:

Nylon

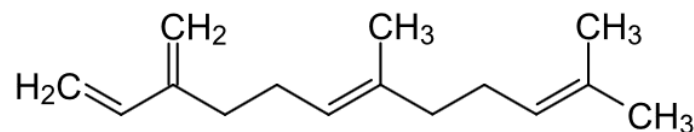
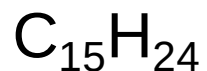
Polyuretaani

Polyetyleenitereftalaatti (PET)

Pakkausteollisuus



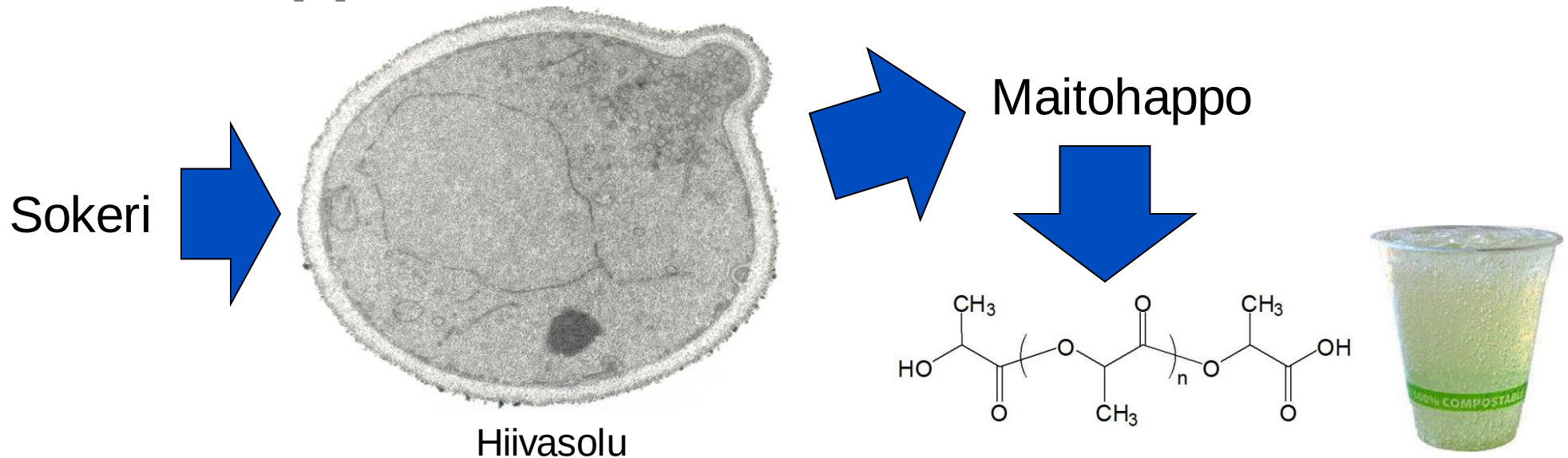
- Farneseeni



Poltto- ja voiteluaineet

**Toimii rakenneyksikkönä
lukuisille eri tuotteille**

Maitohappo



Tavoite: Saada aikaan parempi maitohapon teolliseen tuotantoon soveltuva hiivakanta

Ratkaisu: VTT muokkasi *Candida sonorensis* hiivan, joka tuottaa teollisesti kannattavia määriä (100 g/l maitohappoa).

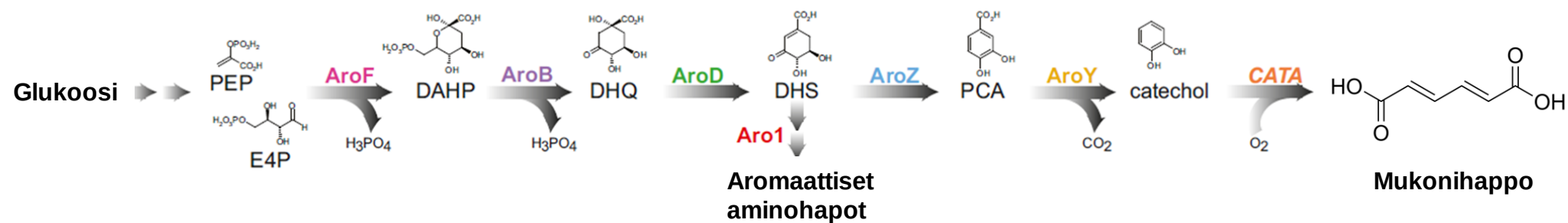
- ✓ Kahden geenin poisto (*PDC1* ja *PDC2*) ja *Lactobacillus helveticus* bakteerin Laktaatti dehydrogenaasi entsyymien ilmentäminen
- ✓ Ei sivutuotteen (etanoli) muodostusta (Saanto 0,94 g maitohappoa 1 grammasta glukoosia)
- ✓ Tuotettu maitohappo rakenneyksikkö ensimmäiseen teollisessa mittakaavassa tuotettuun biohajoavaan muoviin (NatureWork's, USA)

- Biotekninen tuotto mahdollistaa erilaisten lähtömateriaalien käytön lopputuotteiden valmistuksessa.
- Teollisen soijatuotannon sivuvirrassa olevista sokereista voidaan valmistaa hiivasolujen avulla maitohappoa, joka voidaan polymerisoida kompostoitavaksi biomuoviksi PLA
- Aikaisemmin tämä ravinnoksi kelpaamaton sivuvirta hävitettiin polttamalla
- Neljän vuoden projekti viiden eri toimijan kesken (Finnfoam, Brightplus, VTT, Nordic Soya ja Business Finland)
- Valmistettavaa polymeeriä voidaan käyttää esimerkiksi eristemateriaaleissa.



Mukonihappo

- Mukonihapon tuotto hiivassa vaatii aromaattisten aminohappojen synteesin uudelleenreitittämisen.



- Edellyttää 6 geenin viemistä hiivan perimään
- CRISPR/Cas9 teknologia mahdollistaa kaikkien näiden kuuden geenin DNA:n siirron perimään yhdellä kertaa (yhteensä 24000 emäsparia, jotka koodaavat näitä entsyymejä)
- Huomattava ajan ja siten kustannusten säästö verrattuna aikaisempiin menetelmiin

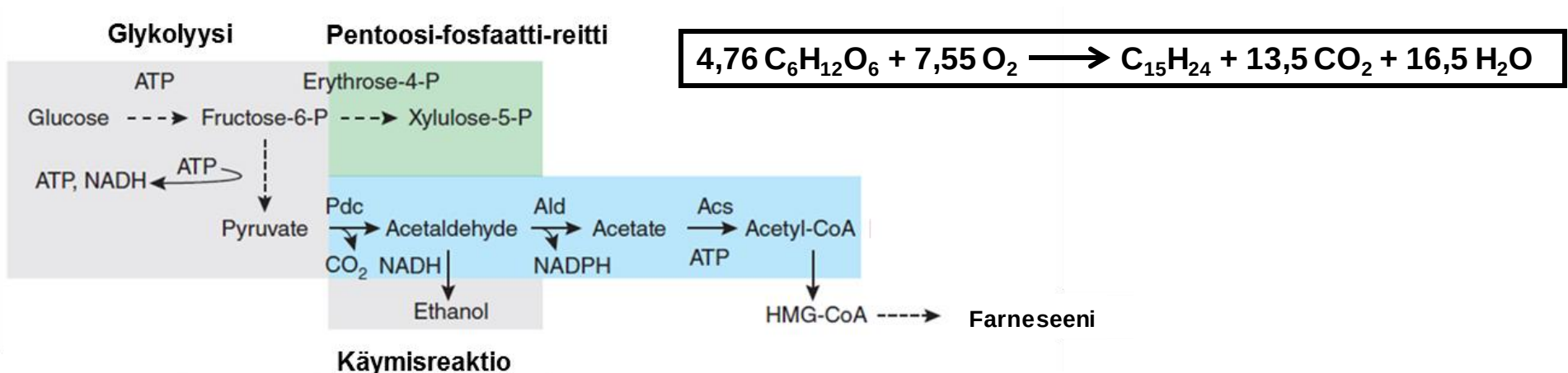
Farneseeni

Voidaan käyttää esimerkiksi valmistettaessa:

- Ihonhoitotuotteita
- Liuottimia
- Vitamiineja
- Biodieseliä

Haaste:

- Biologinen farneseenin tuotto mikrobeissa on tehotonta
- Vaatii suuren määrän happea – lisäkustannus valmistusprosessiin



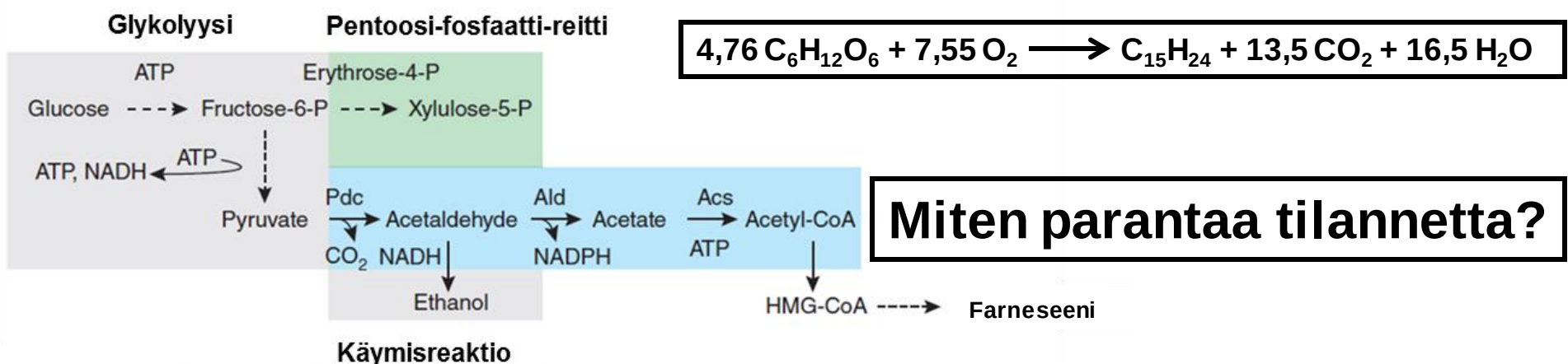
Farneseeni

Voidaan käyttää esimerkiksi valmistettaessa:

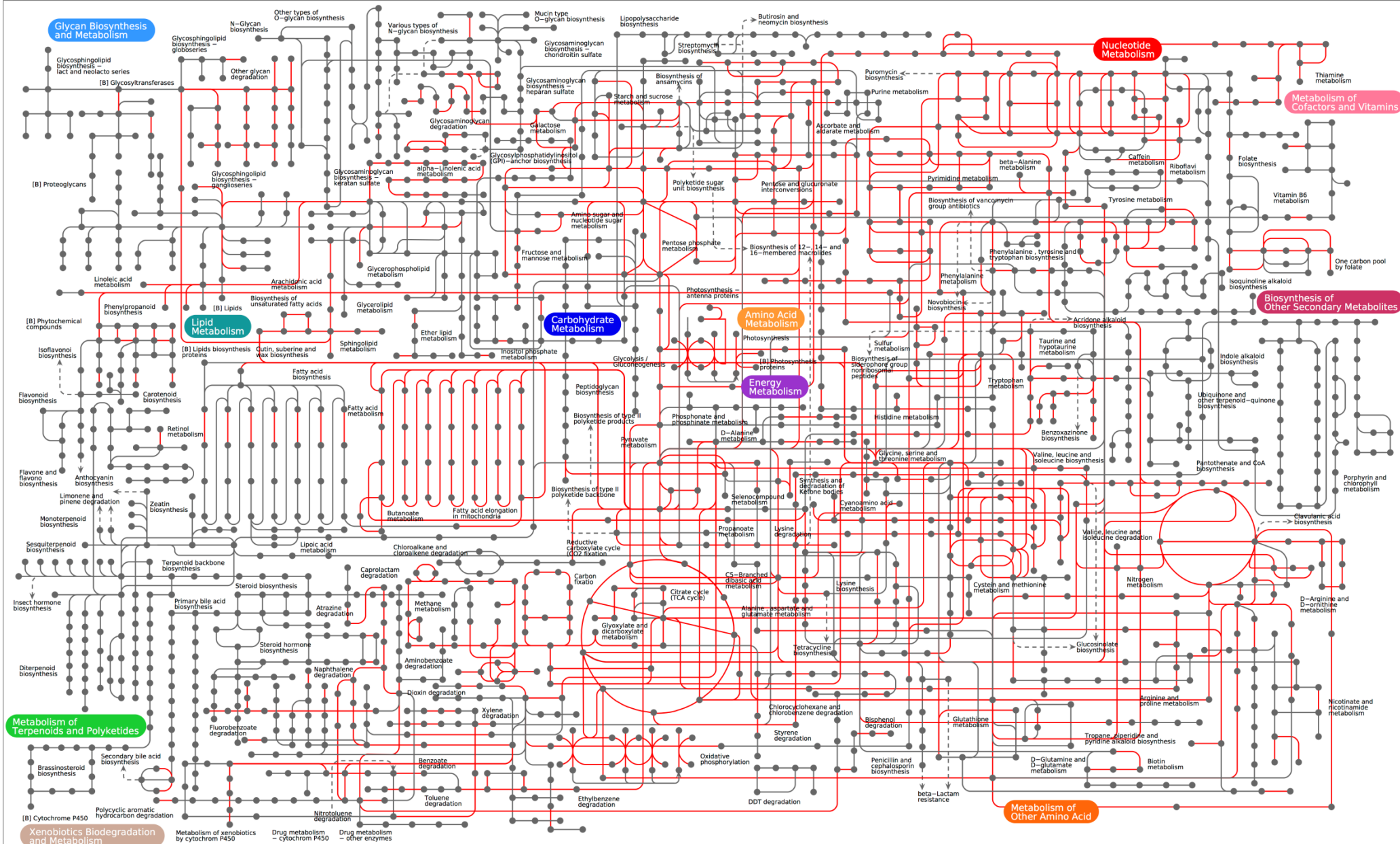
- Ihonhoitotuotteita
- Liuottimia
- Vitamiineja
- Biodieseliä

Haaste:

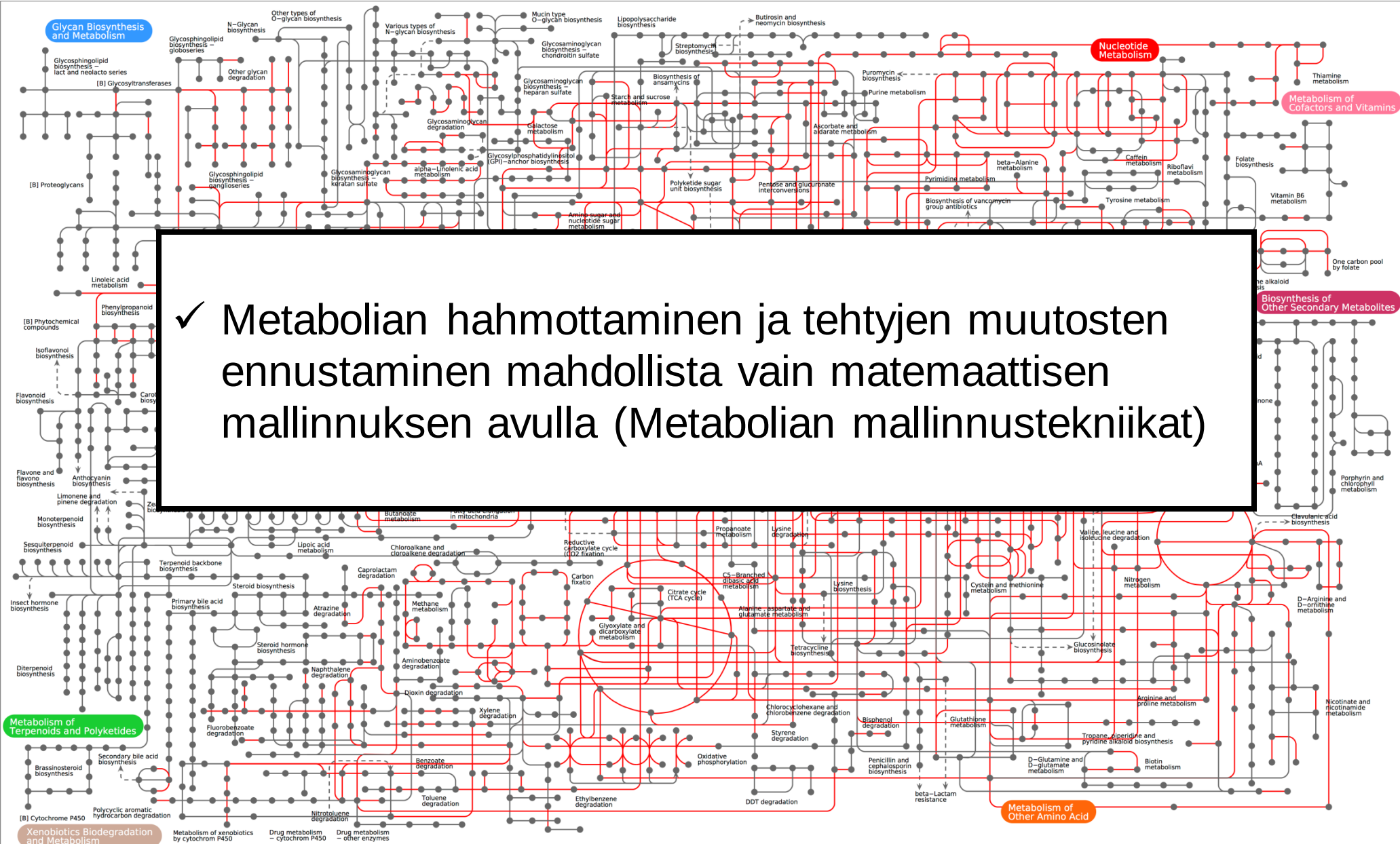
- Biologinen farneseenin tuotto mikrobeissa on tehotonta
- Vaatii suuren määrän happea



Solujen metabolia on laajasti verkottunut

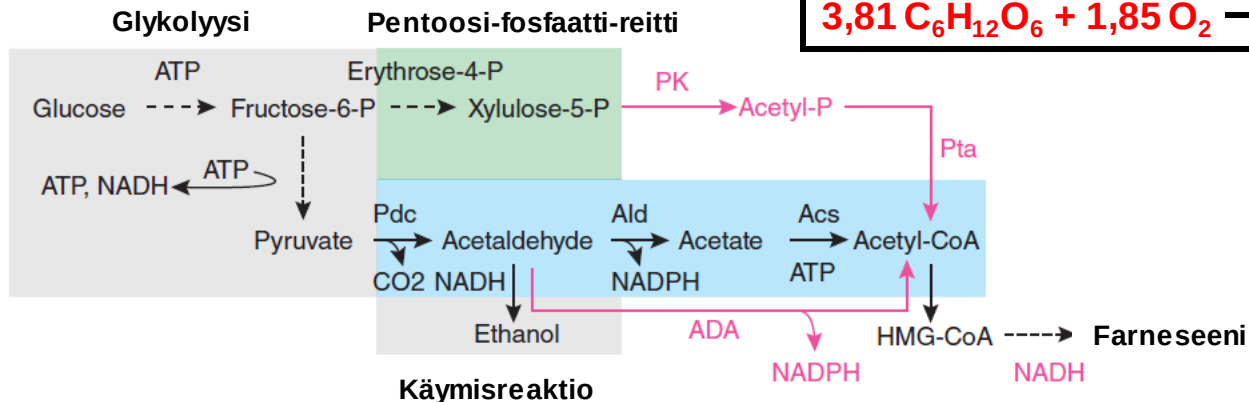


Solujen metabolia on laajasti verkottunut



Farneseeni

- Farneseenin tuoton tehostamiseen käytettiin hiivan
- (*S. cerevisiae*) metabolian matemaattista mallintamista
- Mallin perusteella hiivasoluihin tehtiin lukuisia muutoksia, joista merkittävimpiä kahden uuden metabolisen reitin vieminen hiivaan
- Muutosten johdosta farneseenin saanto glukoosista nousi **21%**
- Tuotantoprosessi tarvitsee nyt **75%** vähemmän happea
- Kaupallista tuotantoa tehty sokeriruoko-raaka-aineesta (Biofene®, Amyris USA)



SYNTHETIC BIOLOGY

Complete biosynthesis of opioids in yeast

Stephanie Galanie,¹ Kate Thodey,² Isis J. Trenchard,² Maria Filsinger Interrante,² Christina D. Smolke^{2*}

Opioids are the primary drugs used in Western medicine for pain management and palliative care. Farming of opium poppies remains the sole source of these essential medicines, despite diverse market demands and uncertainty in crop yields due to weather, climate change, and pests. We engineered yeast to produce the selected opioid compounds thebaine and hydrocodone starting from sugar. All work was conducted in a laboratory that is permitted and secured for work with controlled substances. We combined enzyme discovery, enzyme engineering, and pathway and strain optimization to realize full opiate biosynthesis in yeast. The resulting opioid biosynthesis strains required the expression of 21 (thebaine) and 23 (hydrocodone) enzyme activities from plants, mammals, bacteria, and yeast itself. This is a proof of principle, and major hurdles remain before optimization and scale-up could be achieved. Open discussions of options for governing this technology are also needed in order to responsibly realize alternative supplies for these medically relevant compounds.

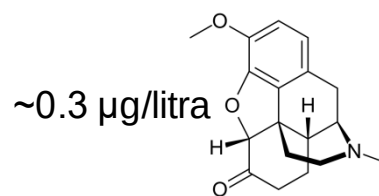
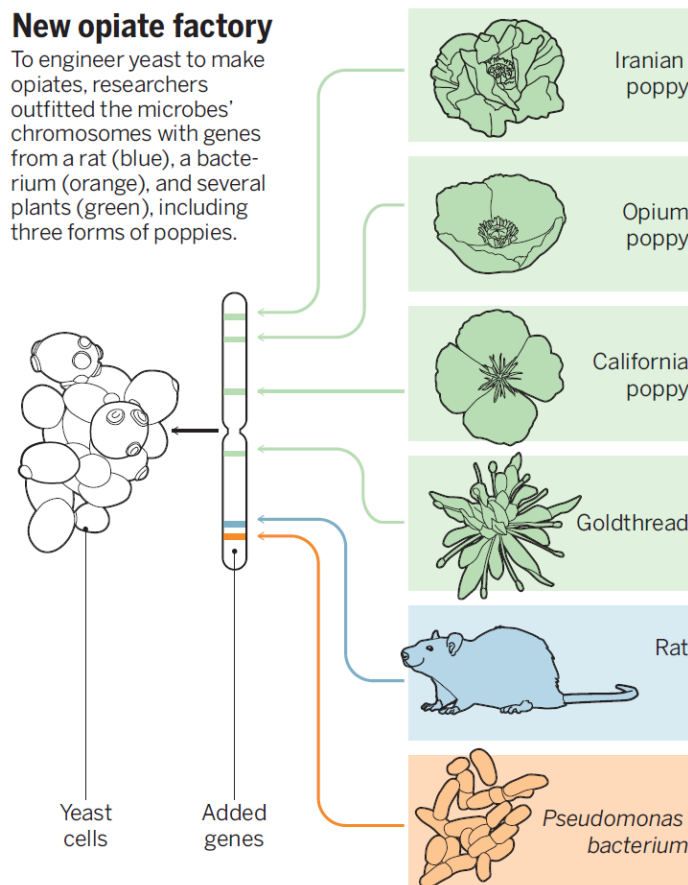
Opioids are an important class of medicines that include the analgesic morphine and the antitussive codeine. The World Health Organization (WHO) classifies these compounds as essential medicines because of their utility in treating severe pain, in pain management, and in palliative care (1). In the developing world, there are shortages of painkillers; the WHO has estimated that 5.5 billion people have "low to nonexistent access to treatment for moderate or severe pain" (2).

All natural opiates (e.g., morphine and codeine) and semisynthetic opioids (e.g., oxycodone, hydrocodone, and hydromorphone) are currently de-

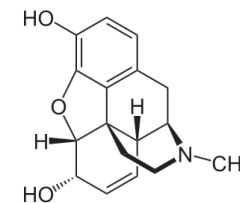
rived from the opium poppy (*Papaver somniferum*). Approximately 100,000 ha of opium poppy are cultivated annually to yield poppy straw containing more than 800 tons of opiates, primarily morphine and thebaine, to meet licit medical and scientific demand (3). The majority of poppy-derived morphine and thebaine is chemically converted into higher-value compounds, including codeine, oxycodone, and hydrocodone. Industrial poppy farming is susceptible to environmental factors such as pests, disease, and climate, which can introduce instability and variability into this geographically concentrated supply chain, resulting in pressure to diversify supply (4). Despite diverse market demands and increasing supply risks, poppy farming remains the sole source of opioids, in part because chemical synthesis of these complex molecules is not commercially competitive. Approximately 30 chemical syntheses

New opiate factory

To engineer yeast to make opiates, researchers outfitted the microbes' chromosomes with genes from a rat (blue), a bacterium (orange), and several plants (green), including three forms of poppies.



Hydrocodone



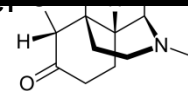
Morphine

¹Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA. ²Department of Bioengineering, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA.

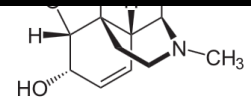
*Corresponding author. E-mail: csmolke@stanford.edu



- Mitä moniportaisempi tuottoreitti, sitä alhaisempi saanto
- Alhaisella saannolla lopputuotteen oltava riittävän arvokas
- Laajamittainen käyttöönotto erilaisille biologisesti tuotetuille tuotteille edellyttää sitä, että niiden valmistus on taloudellisesti kilpailukykyistä verrattuna esim. suoraan kasveista eristämiseen tai kemialliseen synteysiin



Hydrocodone



Morphine

Valkuaisaineiden tuotto mikrobeilla

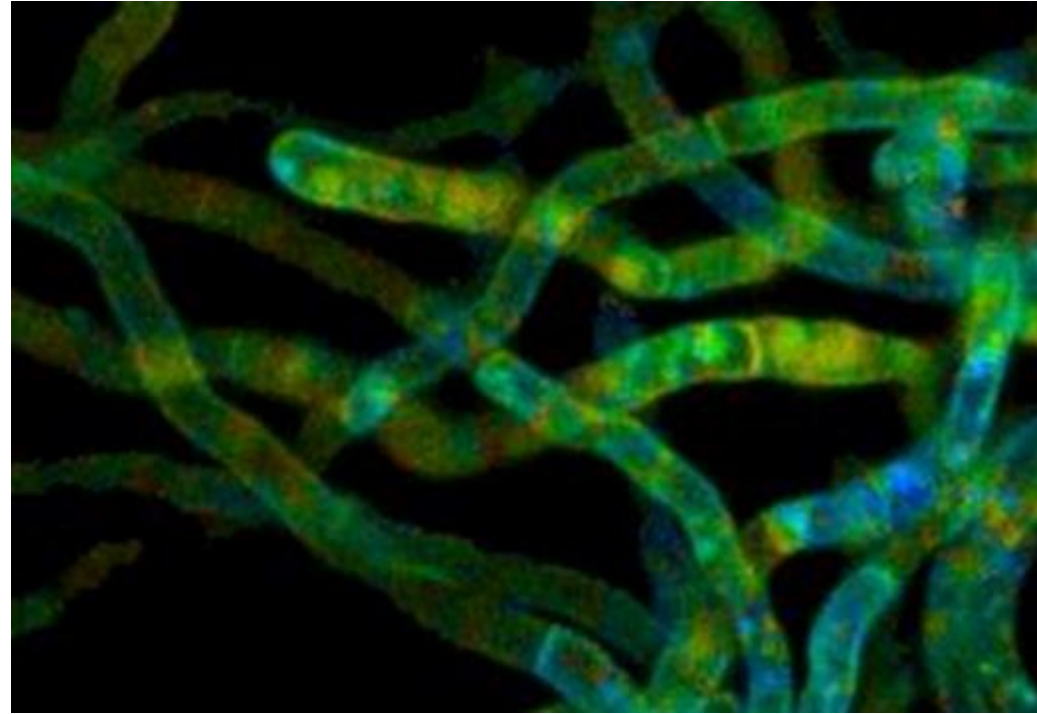
Keskeiset tuottoisännät

- *E. coli*
 - *Bacillus subtilis*
 - *Saccharomyces cerevisiae*
 - *Pichia pastoris*
 - *Trichoderma reesei*
 - *Aspergillus sp.*
 - *Myceliophthora thermophila*
- } Bakteereja
- } Hiivoja
- } Homeita
- Rekombinanttiproteiinien markkinat 200-300 miljardia
 - Maailmanlaajuinen teollisuussentsyymien markkina-arvo n. 6 miljardia
 - Rekombinanttiproteiinien markkinat kasvussa

Valkuaisaineiden tuottaminen teollisuusmittakaavassa

Teollisuussensyymit:

- Pesuaineissa (esim tahranpoisto)
 - Ruoan käsittelyssä (rakenne)
 - Rehun käsittelyssä (ravinteiden vapautuminen)
 - Tekstiilien muokkauksessa
 - Puu- ja paperiteollisuudessa
 - Biojalostamoissa biomassan hajotuksessa
-
- **Materiaalisovellukset:**
 - Proteiinikuidut (hämähäkin seitti)
 - Komposiittimateriaalit
 - Proteiinien tuottotasot jopa 100 g/l. Tyypillisesti 1-15 g/l



Ruokasovellukset:

- "Solumaatalous" – kasvatettu solumassa ravintona (esim. Quorn)
- "Maitoa ilman lehmiä" – Maitoproteiini tuotetaan mikrobeilla (esim. Laktalbumiini)
- "Munia ilman kanoja" – Kananmunan valkuainen tuotetaan mikrobeilla (esim. Ovalbumiini)

Table 1. Modes of biomass production and their environmental impacts.^a

Products		Water footprint ^b (m ³ water kg ⁻¹)	Carbon footprint ^c (kg CO ₂ -eq kg ⁻¹)	Land use ^d (m ² kg ⁻¹)
Animal	Beef	15 400	99.5	326.2
	Pork	6000	12.3	17.4
	Chicken	4325	3.5	9
	Egg	3300	4.5	6.3
Fish	Salmon	1400	5.8	3.7
Plant	Soya bean	2145	3.2	3.5
	Wheat	1827	1.6	3.9
Microorganism	<i>Fusarium venenatum</i> (Quorn [®])	500	5.5	2
	<i>Methylococcus capsulatus</i> (FeedKind [†])	20–58	2.2	0.034
	<i>Arthrospira plantensis</i> (Spirulina [®])	104	0	0.086

Kyky skaalata tuotantoprosessi isoon mittakaavaan on kriittisen tärkeää vaikuttavuuden aikaansaamiseksi

- Kontrolloidut olosuhteet bioreaktoreissa, joiden sisältö ei pääse kontaktiin ympäristön kanssa
- Tuotanto riippumaton vuodenaajoista (24/7)
- Tuotanto mahdollista toteuttaa periaatteessa missä vain
- Vähäinen ympäristöjalanjälki (maa, vesi, hiilijalanjälki)



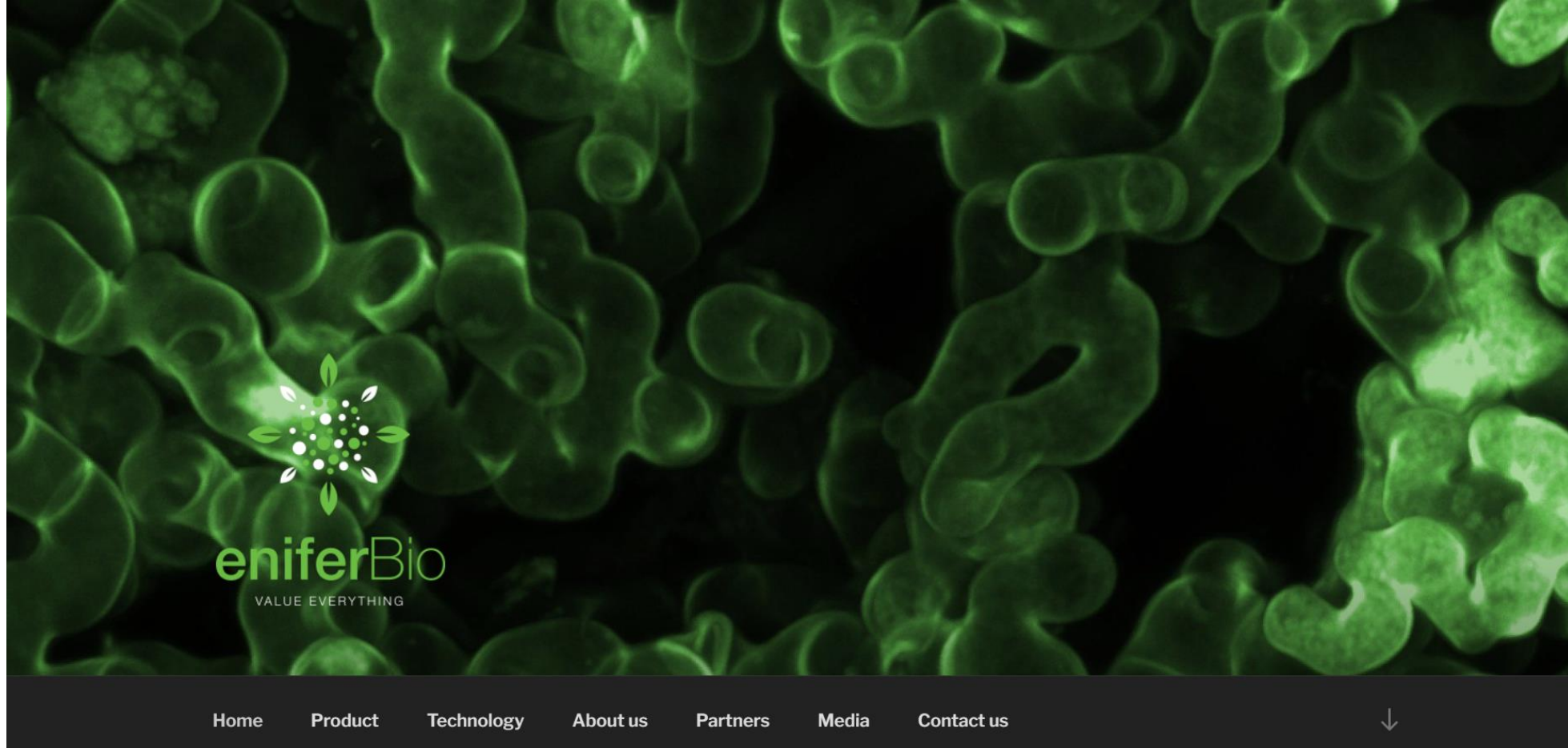
Versalis company, Crescentino biorefinery, Vercelli, Piedmont, Italy

FOOD OUT OF THIN AIR

For the first time in history, humankind is able to produce food without burdening its home planet.

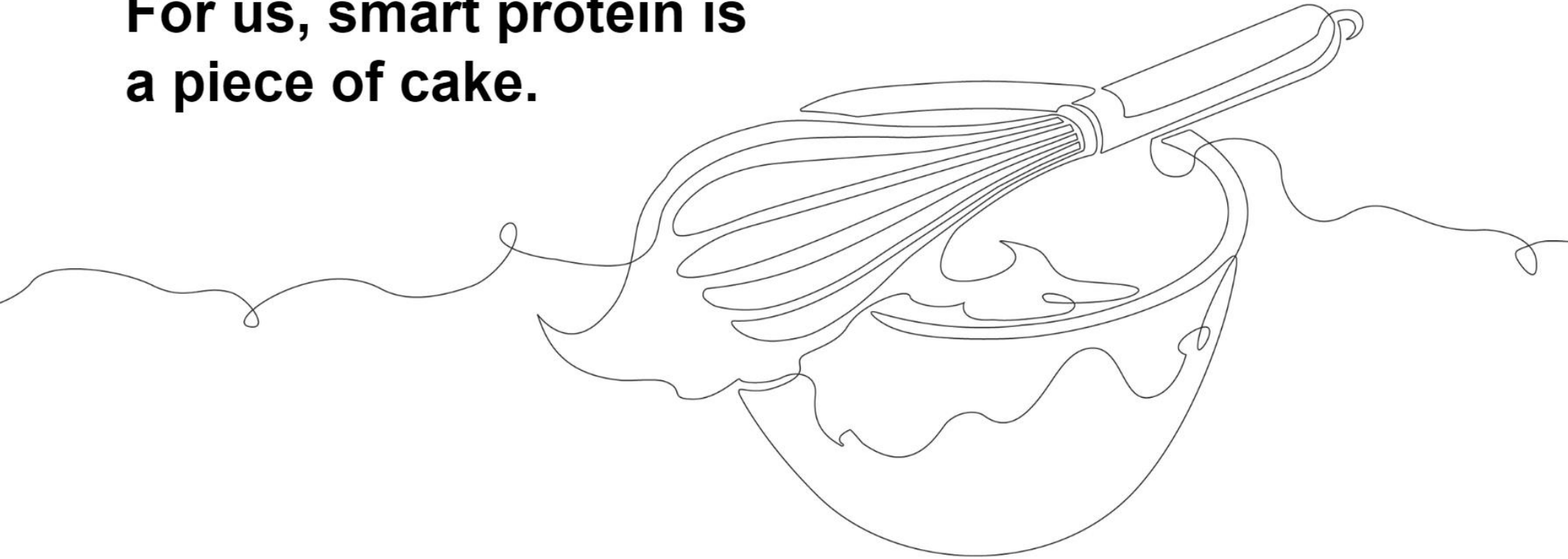


- Solein on bakteeria kasvattamalla saatu proteiininrikas biomassa (ravintolisä)
- Tuotetaan kasvattamalla bakteeria pelkästään vettä sähköllä (esim aurinko/tuulienergia) vedestä aikaansaadulla vedyllä ja prosessiin syötettävällä hiilidioksidilla.



- PEKILO® mycoproteiini on tuote joka koostuu kasvatetuista homesoluista
- Proteiini-rikas biomassa jota voidaan käyttää eläinravintona
- Pekilo-home kasvaa hyvin laimeissakin teollisuuden sivuvirroissa (esim sellutehdas)

**For us, smart protein is
a piece of cake.**



- Homeella bioreaktoreissa tuotettu puhdas kananmunan valkuisproteiini
- Munan valkuainen on laajasti ruokateollisuudessa käytetty raaka-aine

Mikrobien käytön haasteita

- Teollisuushiivat usein polyploideja tai aneuploideja
 - Haaste genomimuokkaukselle
- Uusien organismien käyttöönotto ollut haasteellista geneettisten työkalujen puuttuessa
- Usein pitkä kehitystyö hyvän tuottokannan rakentamiseksi
- Teolliselle tuotannolle saanto ja lopputuotteen puhdistus
 - Tuotteen puhdistaminen tyypillisesti suurin kustannus
- Ongelmana usein proteiinien oikeanlainen laskostuminen
 - Sekä lopputuotteena että osana metaboliareaktioreittiä
- Ei olemassa menetelmiä ennustaa aktiivisen proteiinin tuottoa.

bey⁰nd

the obvious

First Name Surname
jussi.jantti@vtt.fi
+358 505227846

@VTTFinland
@your_account

www.vtt.fi