

TRAINEESHIPS

Voorbeelden van stage / afstudeeronderwerpen bij Dyadic Nederland BV.

Dyadic Nederland (DNL) ontwikkelt enzymen en enzym producerende schimmelstammen voor een scala aan toepassingen. DNL heeft er belang bij dat deze schimmels zo veel mogelijk enzym aanmaken op een zo efficiënt mogelijke manier. Hiertoe worden er in allerlei disciplines onderzoeksprojecten uitgevoerd. Hieronder wordt het algemene R&D traject aan de hand van voorbeelden toegelicht. Het betreft hier voorbeelden die typisch zijn voor een stage dan wel afstudeeronderwerp.

Genexpressie

Het enzym van interesse wordt gecodeerd door een gen dat efficiënt tot expressie moet komen in de schimmel. Daarom is het belangrijk dat de beste (DNA) elementen die die genexpressie reguleren en aansturen gebruikt worden. Veel onderzoek wordt gedaan aan gen promoters. De werkzaamheden en aanpak in dit soort projecten zijn de volgende: het identificeren van een geschikte promotor, de isolatie van het promotor DNA fragment, de constructie van een promoter –reportergen expressie vector, de transformatie van de schimmel met de expressievector, de analyse van transformanten, het bepalen van de promoteractiviteit middels het reportereiwit (denk bijvoorbeeld aan GFP) en reporter-RNA metingen. Op deze manier komt er duidelijkheid of de promotor inderdaad gebruikt kan worden onder de condities en eisen die van te voren waren bedacht.

Technieken die o.a. gebruikt worden: kloneringen, schimmel transformatie (vrij unieke techniek!), Southern, northern en western blotting, SDS-PAGE, PCR, reporter eiwit / enzym assays, eiwitbepaling, fermentaties.

Constructie van een enzym producerende schimmelstam

In dit geval is er interesse in een bepaald enzym dat bijvoorbeeld een mogelijk product kan worden. Het betreffende gen wordt dan gekloneerd in een expressievector en overgebracht in een schimmelstam middels transformatie. Na analyse van een aantal transformanten worden de beste transformanten uitgekozen op basis van hun productie capaciteit. Deze worden vervolgens gekweekt in een fermentor. Het geproduceerde enzym wordt gezuiverd en gekarakteriseerd.

Technieken die o.a. gebruikt worden: kloneringen, schimmel transformatie, Southern, Northern en blotting, SDS-PAGE, PCR, enzym assays, eiwitbepaling, fermentaties.

Gen disruptie (knock-out)

Soms is het in de schimmel belangrijk om juist een gen uit te schakelen in plaats van een gen “er bij te zetten”. Als voorbeeld wordt hier een protease aangehaald. Aangetoond is dat dit protease in een aantal gevallen de gewenste enzymen of eiwitten afbreekt. Om dit te verhelpen moet in de gastheer het protease gen uitgeschakeld worden. Dit kan op verschillende manieren die gemeen hebben dat er een DNA fragment in de betreffende gastheer wordt gezet, waardoor het protease gen niet meer actief is: knock-out.



Naast dit voorbeeld zijn er ook andere redenen om bepaalde genen uit te schakelen. Mogelijke knock-out kandidaten worden uitgebreid onderzocht om vast te stellen dat het gen inderdaad is uitgeschakeld.

Technieken die o.a. gebruikt worden: kloneringen, schimmel transformatie, Southern, Northern en Western blotting, SDS-PAGE, PCR, enzym assays, eiwitbepaling, fermentaties.

Fysiologie en procescondities

De prestatie van een productiestam kan natuurlijk ook op het gebied van groeiomstandigheden op een positieve manier beïnvloed worden. Hiertoe worden zaken zoals de samenstelling en hoeveelheid van mediumcomponenten, effect van mogelijke genexpressie inducerende stoffen, procescondities, fermentor configuratie en dergelijke onderzocht. Er wordt een profiel gemaakt van het eiwit productieniveau, met name dat van het product-enzym, kwaliteit van het product-enzym, geconsumeerde stoffen, geproduceerde stoffen (secundaire metabolieten) etc.

Technieken die o.a. gebruikt worden: eiwitbepaling, enzym assays, SDS-PAGE, western blotting, schudkolf en fermentatie cultures, biochemicals diagnostic kits, HPLC analyse.

Down stream processing

Na fermentatie komt de "down stream processing" (DSP) aan bod. Het gewenste product-enzym bevindt zich meestal in de extracellulaire fractie (in het fermentatiemedium). De DSP bestaat uit het verder verwerken van de extracellulaire vloeistof tot een "eindpreparaat". Dit kan de celvrije extracellulaire vloeistof zelf al zijn, maar ook de geconcentreerde of gevriesdroogde variant hiervan of zelfs het product-enzym in zuivere vorm. Tijdens al deze processen treedt er verlies van materiaal op en kan het product-enzym gevoelig zijn voor bepaalde DSP stappen. De stabiliteit van het product-enzym moet dus behouden blijven door DSP procedures aan te passen. Een eerste onderzoek richt zich dan ook op de stabiliteit van het enzym-product in de gangbare DSP procedures. Hierbij worden zowel commerciële als experimentele enzympreparaten gebruikt en onderzocht op instabiliteit en de oorzaak van die instabiliteit.

Technieken die o.a. gebruikt worden: centrifugatie, microfiltratie, diafiltratie, vriesdrogen, product formulering, eiwitbepaling, SDS-PAGE, enzym assays, HPLC analyse.

Enzymzuivering en karakterisatie

Zoals eerder aangegeven kan het eindproduct een ongezuiverd enzym preparaat zijn, maar ook het product-enzym in zuivere vorm. Om enzymen te zuiveren wordt gebruik gemaakt van verschillende zuiveringstechnieken. Met name nieuwe experimentele enzymen worden vervolgens geanalyseerd op eigenschappen zoals het moleculair gewicht, iso-elektrisch punt (pI), substraat specificiteit, kinetische parameters, specifieke activiteit, stabiliteit etc. Dit alles met een mogelijke industriële toepassing in het achterhoofd.

Technieken die o.a. gebruikt worden: diafiltratie, eiwitbepaling, eiwituivering (IEC, HIC, SEC) middels een AKTA FPLC systeem, enzym assays, HPLC analyse.

