

4. GÉNMANIPULÁLT MIKRO-ORGANIZMUSOK

A biotechnológiai ipar termékei:

- Elsődleges anyagcsere-termékek
Amelyek bioszintézise közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez
- Másodlagos anyagcsere-termékek
Amelyek bioszintézise nem kapcsolódik a sejt energia-termeléséhez, vagy növekedéséhez, csak kedvezőtlen körülmények (pl. tápanyaghiány) hatására indul be. A termék molekulának nincs közvetlen haszna.
- Fehérjék, amelyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, máshonnan bevitt gén(ek) termékei.



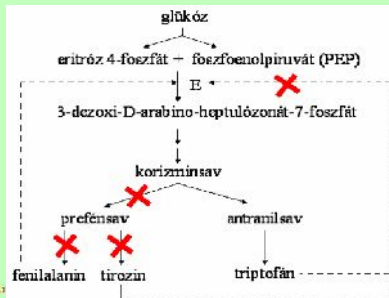
4.1. Elsődleges anyagcsere-termék: például: triptofán

Bioszintézis: szénhidrátokból sok lépéssel. A japánok oldották meg *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsekkel

Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:
Phe⁻, Tyr⁻,

Rezisztencia:
5-Me-Trp^r



4.2. Másodlagos anyagcsere-termékek: az antibiotikumok

= Mikroorganizmusok által termelt szekunder metabolitok, melyek más mikroorganizmusokat elpusztítanak vagy gátolják fejlődésüket.

Alkalmazásuk:

Humán gyógyászat: mikrobiális fertőzések gyógyítására (a hatékony koncentrációban az emberi szervezetet ne károsítsa)

Rákkellenes antibiotikumok: citosztatikus hatásúak, a kemoterápia eszközei


Állatgyógyászat

Állattenyésztésben: takarmány-adalékként



Egy kis történelem

1889 - antibiózis ↔ szimbiózis (Viullemin)
 1912 - Salvarsan, szerves arzén származék, vérbaj ellen, (Ehrlich-Hata)
 1936 - Szulfonamidok (p-amino-szulfonsav-amidok), Domagk
 1929 - penicillin észlelése, Fleming
 1944 - a penicillin ipari gyártása
 1944 - 1960 új antibiotikumok felfedezésének korszaka
 1950 - félszintetikus származékok
 1990 - nincsenek új molekulák, a szabadalmak lejártak → generikus terméké váltak, verseny a piacon.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Antibiotikumok

Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer antibiotikumot fedeztek fel. A humán gyógyszer piacon ebből ~2-300 molekula van. Ennek ~10 %-át gyártják tisztán fermentációs úton, ~80 %-ot fermentációval és utána kémiai módosítással (= félszintetikus). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

Miért ilyen kevés? - toxicitás
 - nem elég hatásos, van nála jobb
 - mellékhatások
 - rezisztencia

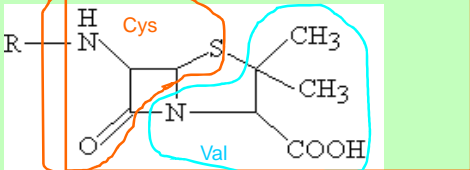



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Példa: penicillin (csoport)

Szerkezet: alapváz: 6-amino-penicillánsav
 két aminosavból tevődik össze, cisztein + valin

6-amino-penicillánsav, 6-APA





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


A penicillin tulajdonságai

BOMLÉKONY! Savak, lúgok és enzimek hatására többféle reakcióban is gyorsan bomlik – a gyomorsavtól is meg kell védeni.

Mennyiségét nem súlyra mérik, hanem az antibiotikus hatását:

1 biológiai egység: 50 ml-nyi standard összetétel tápoldatban éppen meggátolja egy adott *Staphylococcus aureus* törzs szaporodását.

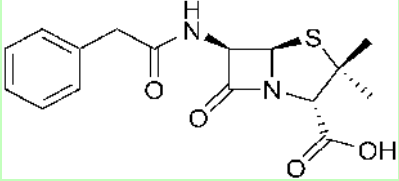

1 IU = 0,6 µg G-penicillin Na sónak felel meg.



7

G-penicillin/benzil-penicillin


Az R oldallánc fenil-ecetsav
Ez a fermentált alapmolekula, ebből gyártják a többit.
Savra érzékeny vegyület, a gyomorsav elbontja, ezért szájon át nem szedhető, csak injekcióban adták.

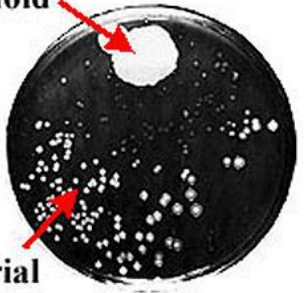



8

Fleming's original plate:

1929 A. Fleming, penicillin izolálás, tisztítás, szűrés
1940 hadianyaggá való előállítás
1943 klinikai kipróbálás
felületi tenyésztés, Penicillin
1944 2,5 tonna penicillin
szubmerz tenyésztés,
1946 32 tonna penicillin
1952 Magyarország első
1980 kb. 30.000 tonna penicillin
2000 ~ 100.000 tonna penicillin





mold

bacterial colonies

A penicillin gyártás fejlesztése

Fermentációs úton, mert a kémiai szintézis nem gazdaságos.
A technológia fejlesztése két irányban mehet:

Törzsmunka (biológia): <ul style="list-style-type: none"> - törzsz izolálás - indukált mutáció - szelekció - törzsfenntartás 	Technológia (mérnöki): <ul style="list-style-type: none"> - Felületi/szubmerz - Prekurzorok (4-8 x) - Tápladoptimalálás (cukorlimit, C/N, Fe ion) - Levegőtztetés, reaktor - Szabályozások (pH, t)
---	--

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
10

Törzsnemesítés

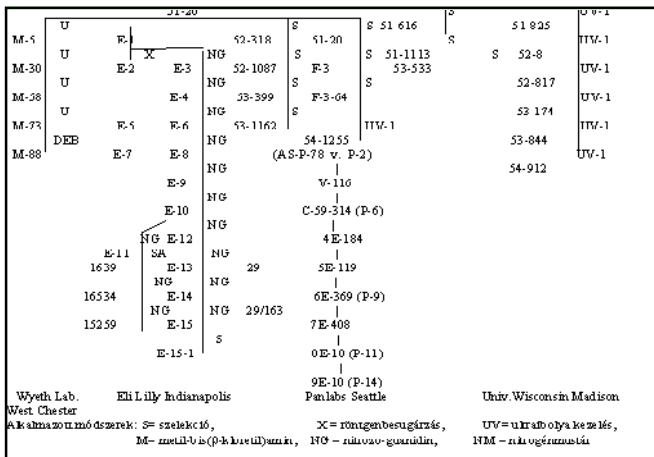
Célok:

- hozamnövelés,
- fermentációs illetve feldolgozási kritériumok szerinti hatékonyság növelés
- az eredeti pigment-termelés megszüntetése

Eszközök:

- a génmanipuláció igen bonyolult (sok gén vesz részt a folyamatban), a titernövekedés túlnyomó részét a régi (65 év – több ezer lépés) mutációs–szelekciós törzsjavitással érték el (~2-3 ppb → ~50.000 ppb).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
11



A gyártás lépései:

1. Törzsfenntartás
2. Inokulum lépcs (k)
3. F fermentáció
 - "Fed batch" = rátáplálásos szakaszos, glükóz limit
 - Vágás: kb. 80.000 IU/ml ~ 5 % -os oldat
4. Feldolgozás, kulcslépése:

extrakció: vízzel nem elegyed szerves oldószerrel kioldják a vizes fermentléb l



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fermentáció

Jellegzetes szekunder metabolit fermentáció, két szakasza van:

Els szakasz (kb. 40 h): a sejtek elszaporítása, jó tápanyag-ellátás intenzív leveg ztetés, keverés, els dleges anyagcsere.

Tápanyagforrások az els szakaszban:

- szénforrások: néhány könnyen bontható cukor (glükóz, melasz), ami a szaporítás végére elfogy
- nitrogén: ebben a szakaszban még lehet NH₄ sók formájában, de az a jó, ha a végére elfogy
- foszfor: foszfátként annyit kell bemérni a tápoldatba, hogy éppen elfogyjon a szaporodás végére




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fermentáció

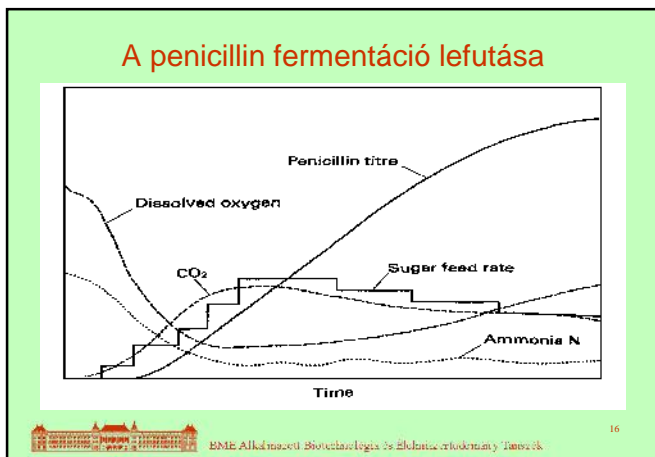
Második szakasz, termel fázis: 120-160 h, többszörös tápanyag limit, kikényszerített másodlagos anyagcsere.

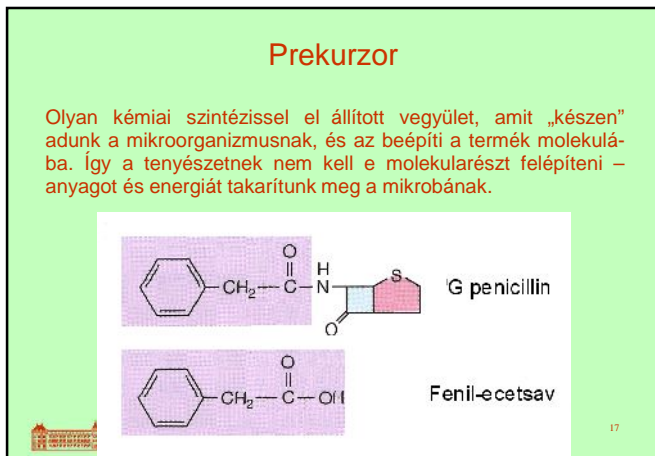
Tápanyagellátás a második szakaszban:

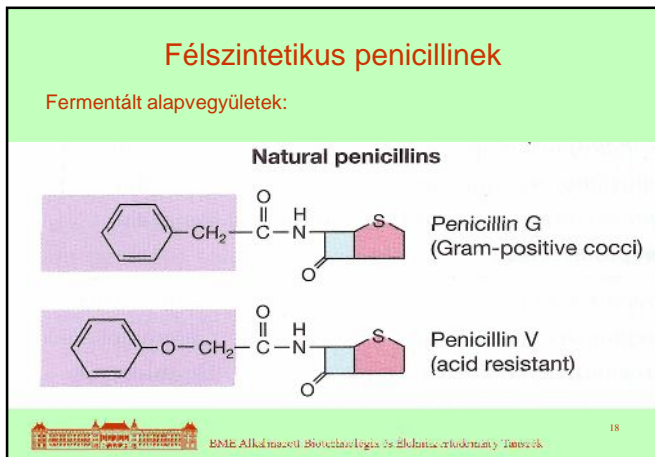
- szénforrás: limitáció (régén: nehezen bontható vegyületek: laktóz, keményít , ma: glükóz adagolás apránként, az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves vegyületek, fehérje formájában: kukorica-lekvár, szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt kis koncentráció, apránként adagolva
- foszfát: jelenlétében nem megy a másodlagos anyagcsere, ezért elfogyása után nem adagolnak többet
- prekursor: fenil-ecetsav, mérések alapján adagolják, koncentrációját a 2-4 g/l sávban tartják.



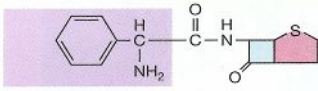
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



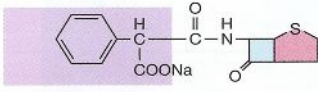




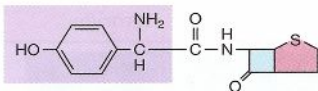
Félszintetikus penicillinek




Ampicillin
(broad spectrum,
acid resistant)



Carbenicillin
(broad spectrum)



Amoxicillin
(broad spectrum)

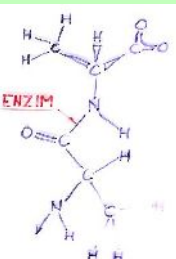


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

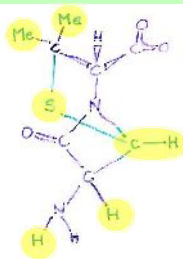
19

A penicillin hatásmechanizmusa: szerkezet-analógián alapul

D-Ala-D-Ala




penicillin



Irreverzibilisen kapcsolódik egy enzim kötőhelyéhez

a sejtfal-szintézis leáll

a sejt nem tud nőni, osztódni, elpusztul



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


20

A szekunder metabolit gyártás összefoglalása

Törzsfejlesztés:
a génmanipuláció majdnem lehetetlen, mert a bioszintézis nagyon sok lépésből áll, és sokféle szabályozás érvényesül. A klasszikus mutációs – szelekciós módszert ismételt évtizedeken keresztül. Lassan eléri a határait.

Technológia:
Kétszakaszos fermentáció, elbővíti a sejttermelését, azután termék-képzés

Piaci helyzet:
a szabadalmak lejártak, generikus készítmények, éles versenyhelyzet, nyomott árak. A gyógyszerkönyvek szigorú előírásai miatt a kínaiak még nem tudnak elretörni, de az indiaiak igen (outsourcing)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21
