


### 4. GÉNMANIPULÁLT MIKRO-ORGANIZMUSOK

A biotechnológiai ipar termékei:


- Elsődleges anyagcseretermékek  
Amelyek bioszintézise közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez
- Másodlagos anyagcseretermékek  
Amelyek bioszintézise nem kapcsolódik a sejt energia-termeléséhez, vagy növekedéséhez, csak kedvező 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.



1

### Egy kis történelem

- 1889 - antibiózis ↔ szimbiózis (Viullemín)
- 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.



4

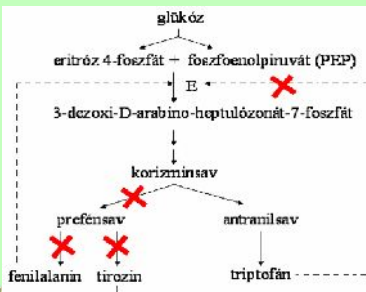

### 4.1. Elsődleges anyagcseretermék: például: triptofán

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

Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:  
Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>,

Rezisztencia:  
5-Me-Trp<sup>r</sup>





3

### 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 (= félszintetikusan). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

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




5

### 4.2. Másodlagos anyagcsere-termékek: az antibiotikumok

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

Alkalmazásuk:

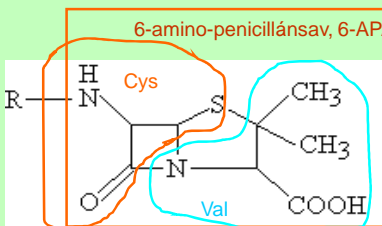

Humán gyógyászat: mikrobiális fertőzések gyógyítására (a hatékony koncentrációban az emberi szervezetet ne károsítsa)  
Rákellenes antibiotikumok: citosztatikus hatásúak, a kemoterápia eszközei  
Állatgyógyászat  
Állattenyésztésben: takarmány-adalékként



3

### Példa: penicillin (csoport)

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

6


### 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

### A penicillin gyártás fejlesztése

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

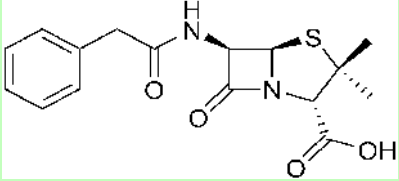

<b>Törzsmunka (biológia):</b>	<b>Technológia (mérnöki):</b>
– törzsiszolálás	– Felületi/szubmerz
– indukált mutáció	– Prekurzorok (4-8 x)
– szelekció	– Táplaldatoptimalás (cukorlimit, C/N, Fe ion)
– törzsfenntartás	– Levegőztetés, reaktor
	– Szabályozások (pH, t)



10

### G-penicillin/benzil-penicillin

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

8


### 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 törzsjavítással érték el (~2-3 ppb → ~50.000 ppb).



11

### Fleming's original plate:

1929 A. Fleming, izolálás, tisztítás, szelekció

1940 hadianyaggá vált

1943 klinikai kipróbálás


1944 2,5 tonna felületi tenyészet, Penicillin

1946 32 tonna szubmerz tenyészet, Penicillin

1952 Magyarország


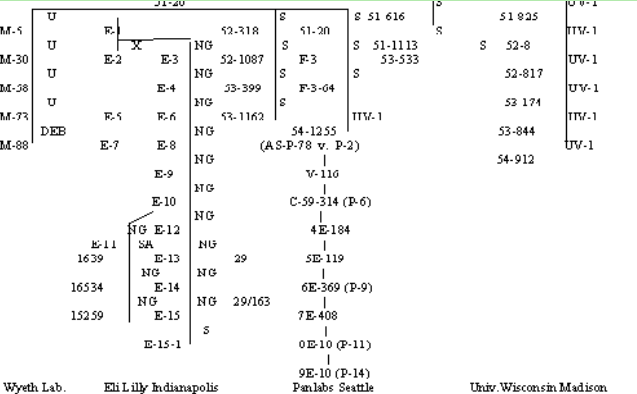
1980 kb. 30.000 tonna

2000 ~ 100.000 tonna



**mold** (pointing to the white growth)

**bacterial colonies** (pointing to the small white spots)

Wyeth Lab. West Chester  
Eli Lilly Indianapolis  
Panlabs Seattle  
Univ. Wisconsin Madison

Alkalmazott módszerek: S = szelekció, X = röntgenbesugárzás, M = metil-ubi (p-hidroxetil)amin, NG = nitrozo-guanidin, UV = ultravioleta kezelés, NM = nitrogénmutáció

## A gyártás lépései:

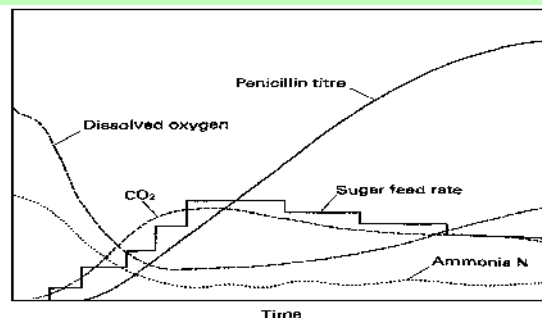
1. Törzsfenntartás
2. Inokulum lépcs (k)
3. F fermentáció
  - "Fed batch" = rátáplálásos szakaszos, glükóz limit
  - Vágás: kb. 80.000 IU/ml ~ 5 % -os oldat
4. Feldolgozás, kulcslépése:
  - extrakció: vízzel nem elegyed szerves oldószerrel kioldják a vizes fermentléb l



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## A penicillin fermentáció lefutása



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

## 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  $\text{NH}_4$  sók formájában, de az a jó, ha a végére elfogy
- foszfor: foszfátként annyit kell bemérni a tápoldatba, hogy éppen elfogyjon a szaporodás végére

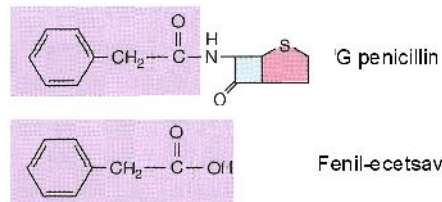


EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## Prekurzor

Olyan kémiai szintézissel el állított vegyület, amit „készén” adunk a mikroorganizmusnak, és az beépíti a termék molekulába. Így a tenyészetnek nem kell e molekularészt felépíteni – anyagot és energiát takarítunk meg a mikrobának.



17

## 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: kukoricalekvár, szójadara, magyórliszt, esetleg kazein, halliszt kis koncentráció, apránként adagolva
- foszfát: jelenlétében nem megy a másodlagos anyagcsere, ezért elfogyása után nem adagolnak többet
- prekurzor: fenil-acetsav, mérések alapján adagolják, koncentrációját a 2-4 g/l sávban tartják.



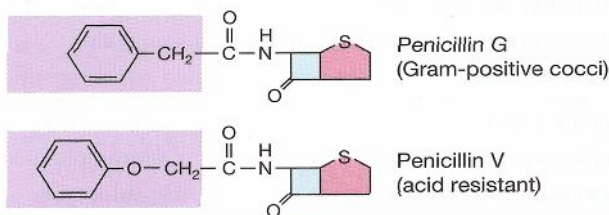
EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

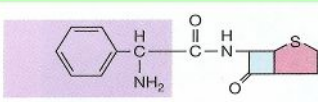
### Natural penicillins



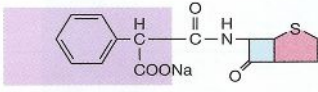
EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

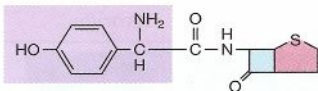
### Félszintetikus penicillinek



**Ampicillin**  
(broad spectrum,  
acid resistant)



**Carbenicillin**  
(broad spectrum)

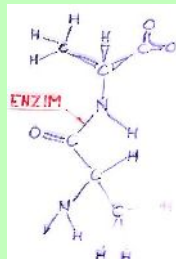


**Amoxicillin**  
(broad spectrum)

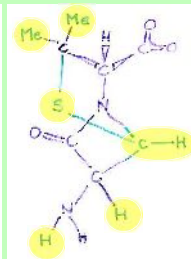
Eötvös Loránd Tudományegyetem, BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### 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

Eötvös Loránd Tudományegyetem, BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A szekunder metabolit gyártás összefoglalása

**Törzsfejllesztés:**  
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 sejtszaporítást, ezután 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)

Eötvös Loránd Tudományegyetem, BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék