

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

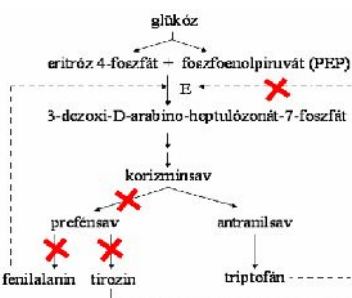
4.1. Elsődleges anyagcseretermék: például: triptofán

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

Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:
Phe⁻, Tyr⁻,

Rezisztencia:
5-Me-Trp^r



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

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

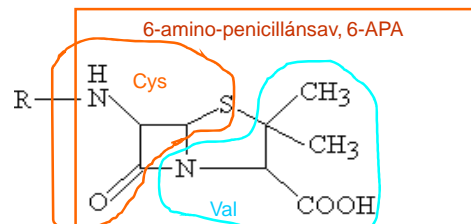


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Példa: penicillin (csoport)

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

A penicillin tulajdonságai

BOMLÉKONYI! 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

A penicillin gyártás fejlesztése

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

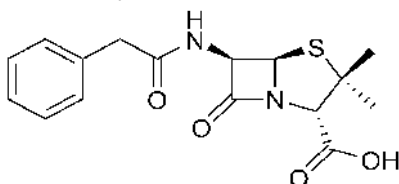
10

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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



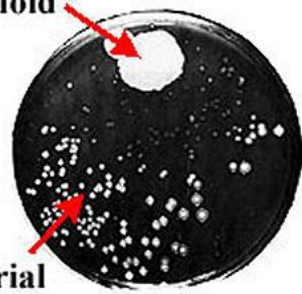
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Fleming's original plate:

1929 A. Fleming, törzsiszolálás, tisztítás, szelektálás, 1940 hadianyaggá vált, 1943 klinikai kipróbálás felületi tenyészet, Pe, 1944 2,5 tonna szubmerz tenyészet, 1946 32 tonna, 1952 Magyarország, 1980 kb. 30.000 tonna, 2000 – 100.000 tonna

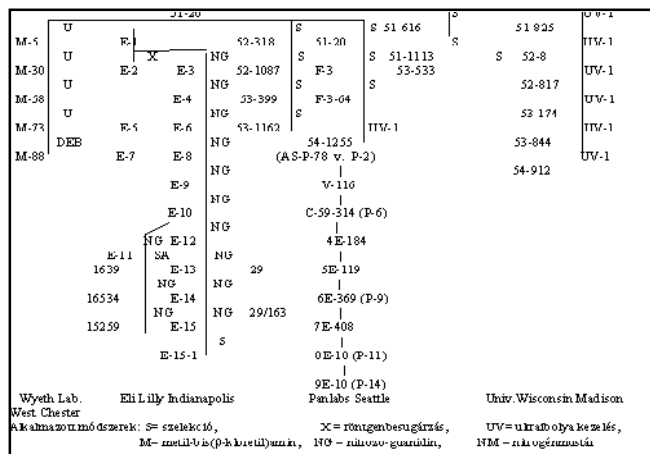
mold



bacterial colonies



BME



A gyártás lépései:

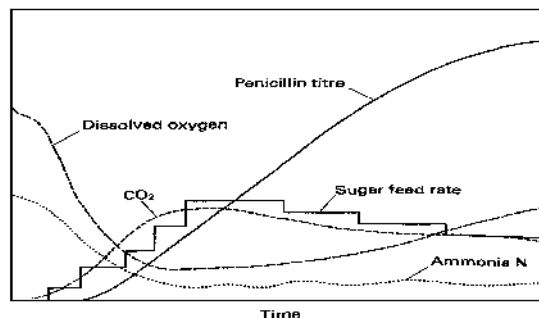
1. Törzsfenntartás
2. Inokulum lépcs (k)
3. F fermentáció
 - "Fed batch" = rátáplálásos szakaszos, glükóz limit
 - Vágás: kb. 80.000 IU/ml ~ 5 % -os oldat
4. Feldolgozás, kulcslépése:
 - extrakció: vízzel nem elegyed szerves oldószerrel kioldják a vizes fermentléből



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

A penicillin fermentáció lefutása



BME 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 levegőztetés, keverés, elsődleges anyagcsere.

Tápanyagforrások az első szakaszban:

- szénforrások: néhány könnyen bontható cukor (glükóz, melasz), ami a szaporítás végére elfogy
- nitrogén: ebben a szakaszban még lehet 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

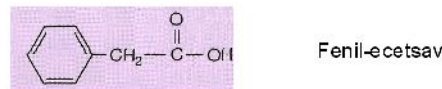
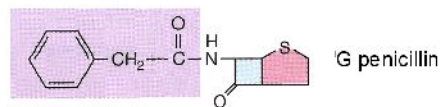


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Prekursor

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



17

Fermentáció

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

Tápanyagellátás a második szakaszban:

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



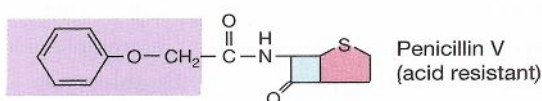
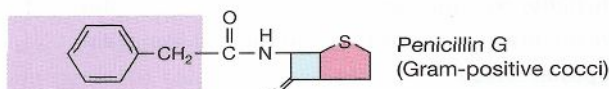
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Félszintetikus penicillinek

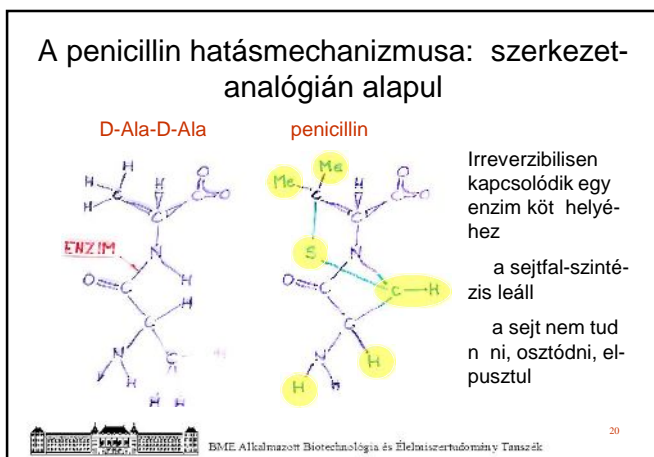
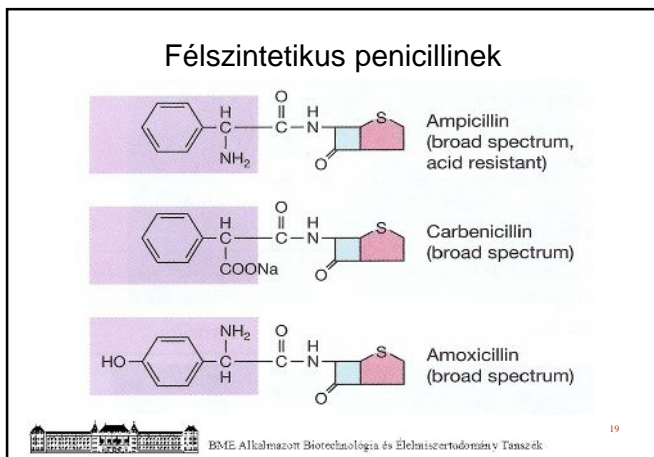
Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18



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, elbb sejtspóráztatás, 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