

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 energiatermeléséhez, 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

4.1. Elsődleges anyagcsere-termék: például: triptofán

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

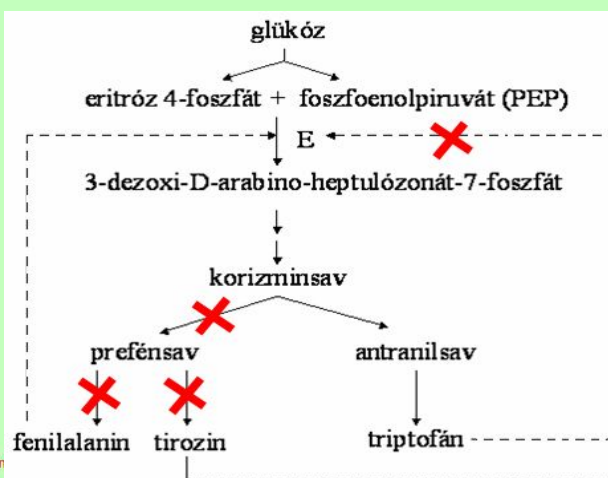
Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:
Phe⁻, Tyr⁻,

Rezisztencia:
5-Me-Trp^r



BME Alkalmazott



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



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.



Antibiotikumok

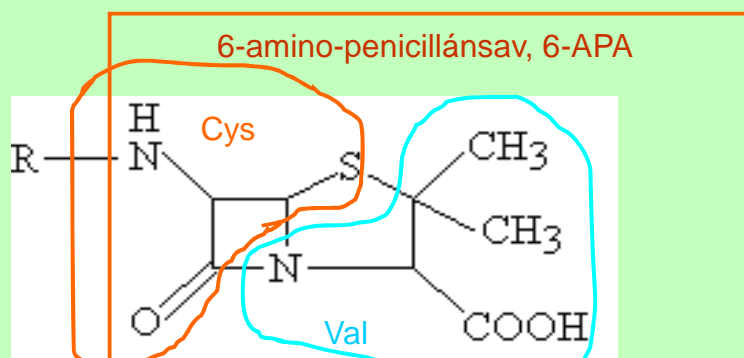
Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer antibiotikumot fedeztek fel. A humán gyógyszer piacon ebből ~2-300 molekula van. Ennek ~10 %-át gyártják tisztán fermentációs úton, ~80 %-ot fermentációval és utána kémiai módosítással (= félszintetikusan). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

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



Példa: penicillin (csoport)

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



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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

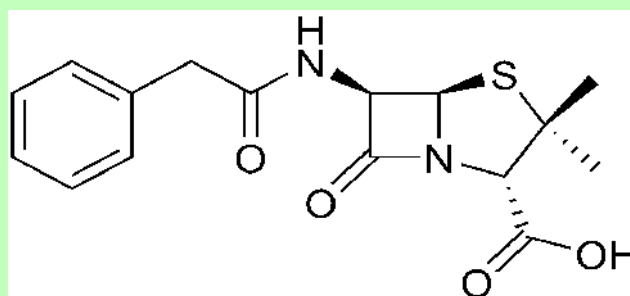
7

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 szedhet, csak injekcióban adták.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8


Fleming's original plate:

1929 A. Fleming, k
 izolálás, tisztítás, sze
 1940 hadianyaggá v
 1943 klinikai kipróbál
 felületi tenyészet, Pe
 1944 2,5 tonna
 szubmerz tenyészet,
 1946 32 tonna
 1952 Magyarország
 1980 kb. 30.000 tonn
 2000 ~ 100.000 tonn



mold

bacterial colonies



A penicillin gyártás fejlesztése

Fermentációs úton, mert a kémiai szintézis nem gazdaságos.

A technológia fejlesztése két f irányban mehet:

Törzsmunka (biológia):

- törzsizolálás
- indukált mutáció
- szelekció
- törzsfenntartás

Technológia (mérnöki):

- Felületi/szubmerz
- Prekurzorok (4-8 x)
- Tápoldatoptimalás
(cukorlimit, C/N, Fe ion)
- Leveg ztetés, reaktor
- Szabályozások (pH, t)



Törzsnemesítés

Célok:

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

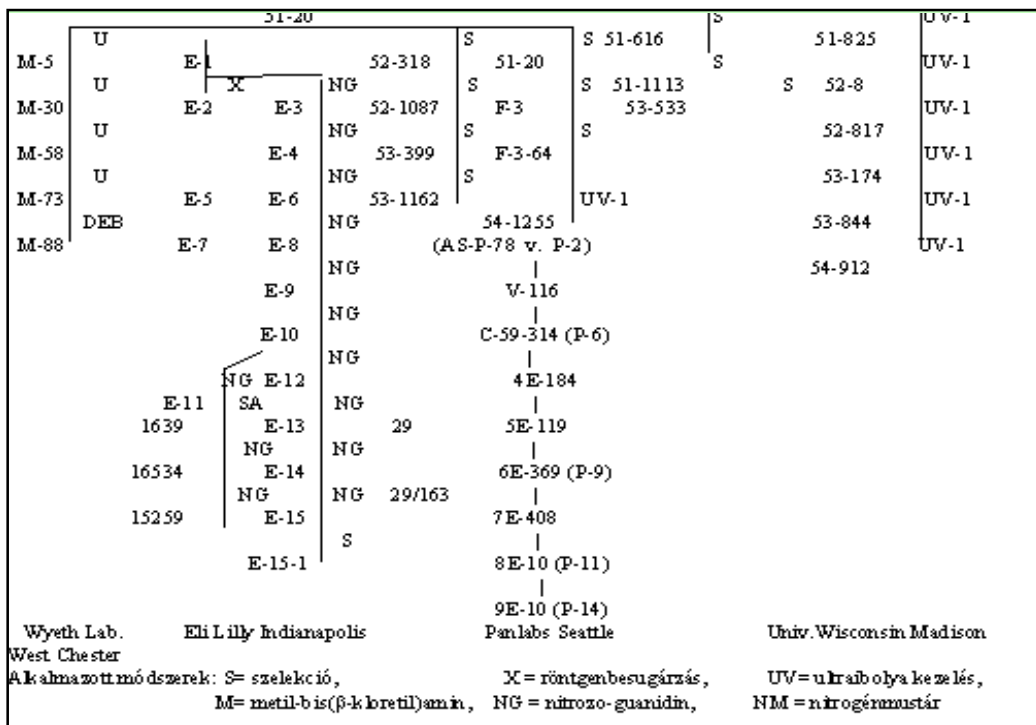
Eszközök:

- 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).



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 elegendő szerves oldószerrel kioldják a vizes fermentléb l



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



Fermentáció

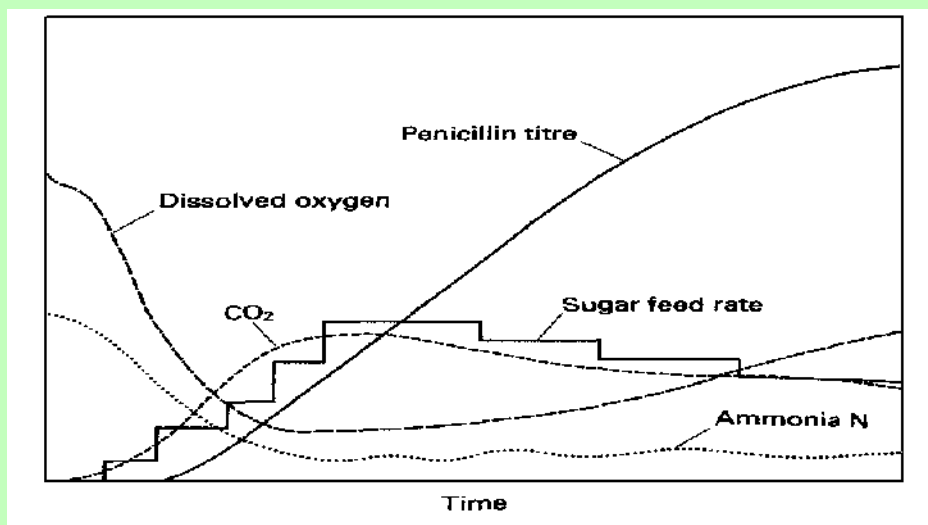
Második szakasz, termelési fázis: 120-160 h, többszörös tápanyag limit, kikényszerített másodlagos anyagcsere.

Tápanyagellátás a második szakaszban:

- szénforrás: limitáció (régen: nehezen bontható vegyületek: laktóz, keményít, ma: glükóz adagolás apránként, az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves vegyületek, fehérje formájában: kukoricalekvár, 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.

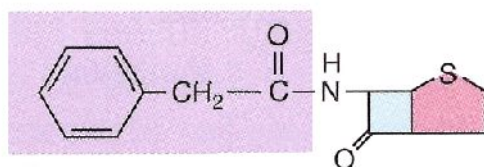


A penicillin fermentáció lefutása

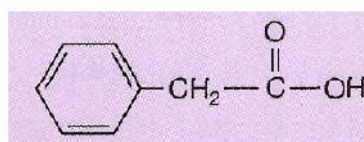


Prekurzor

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



G penicillin



Fenil-ecetsav

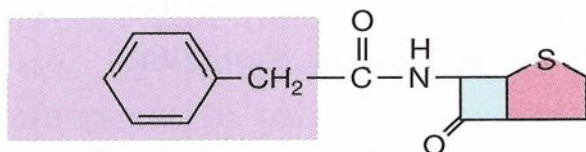
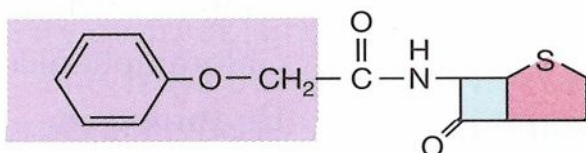


17

Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins

Penicillin G
(Gram-positive cocci)Penicillin V
(acid resistant)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

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

ENZIM

penicillin

Irreverzibilisen kapcsolódik egy enzim köt. helyéhez

a sejtfal-szintézis leáll

a sejt nem tud 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 mutációk – szelekciós módszert ismételték évtizedeken keresztül. Lassan eléri a határait.

Technológia:

Kétszakaszos fermentáció, előbb sejtszaporítás, 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)

