

## 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

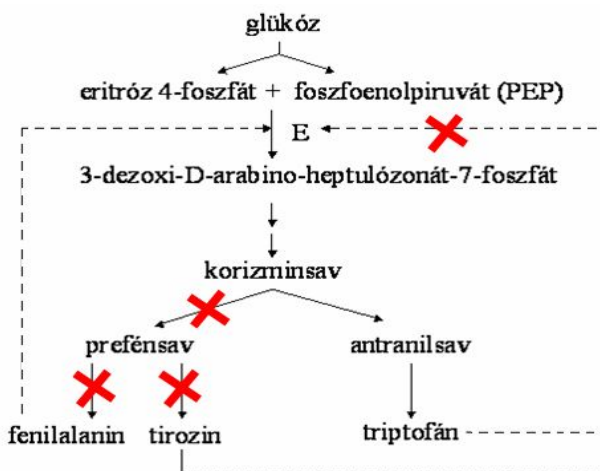
### 4.1. Elsődleges anyagcsere-termék: például: triptofán

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

Anyagcsere-mérnöki szelekció:

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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

## 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

## Antibiotikumok

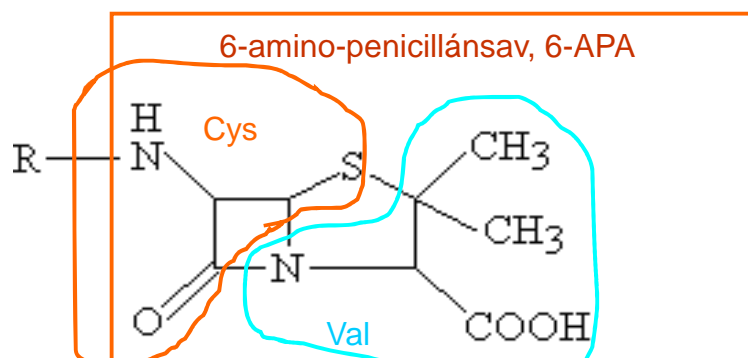
Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer antibiotikumot fedeztek fel. A humán gyógyszer piacon ebből ~2-300 molekula van. Ennek ~10 %-át gyártják tisztán fermentációs úton, ~80 %-ot fermentációval és utána kémiai módosítással (= félszintetikusan). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

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

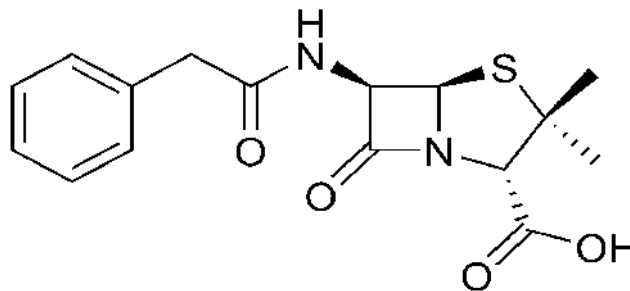
7

## 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, izolálás, tisztítás, szubmerz tenyészet, 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**



BME

## 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)
- Tápladoptimálás (cukorlimit, C/N, Fe ion)
- Leveg ztetés, reaktor
- Szabályozások (pH, t)





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



## Fermentáció

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

Tápanyagellátás a második szakaszban:

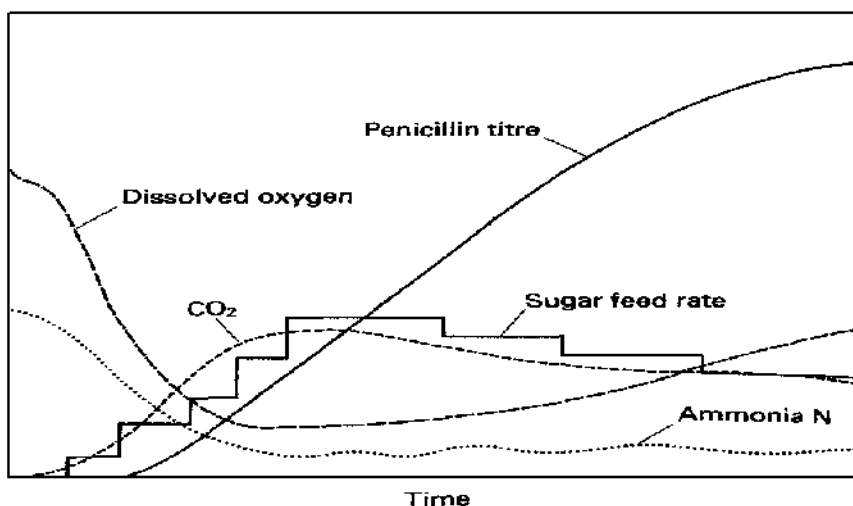
- szénforrás: limitáció (régen: nehezen bontható vegyületek: laktóz, keményít , ma: glükóz adagolás apránként, az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves vegyületek, fehérje formájában: kukoricalekvár, szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt kis koncentráció, apránként adagolva
- foszfát: 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## A penicillin fermentáció lefutása



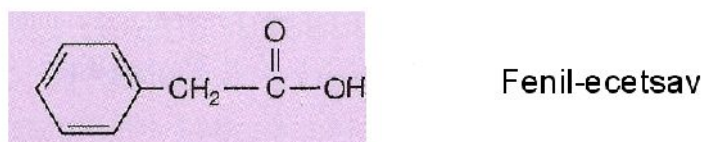
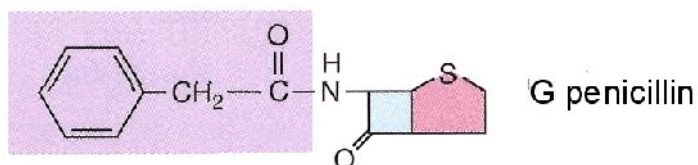
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16



## Prekurzor

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

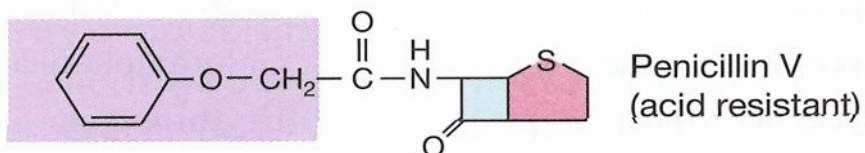
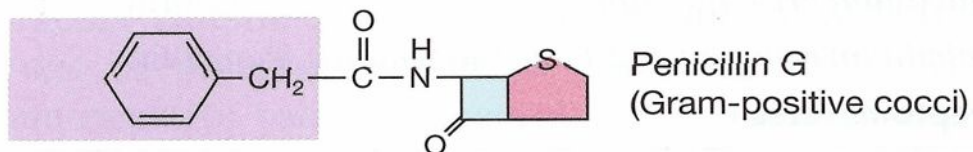


17

## Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

### Natural penicillins



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

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 mutációs – szelekciós módszer ismételt 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)

