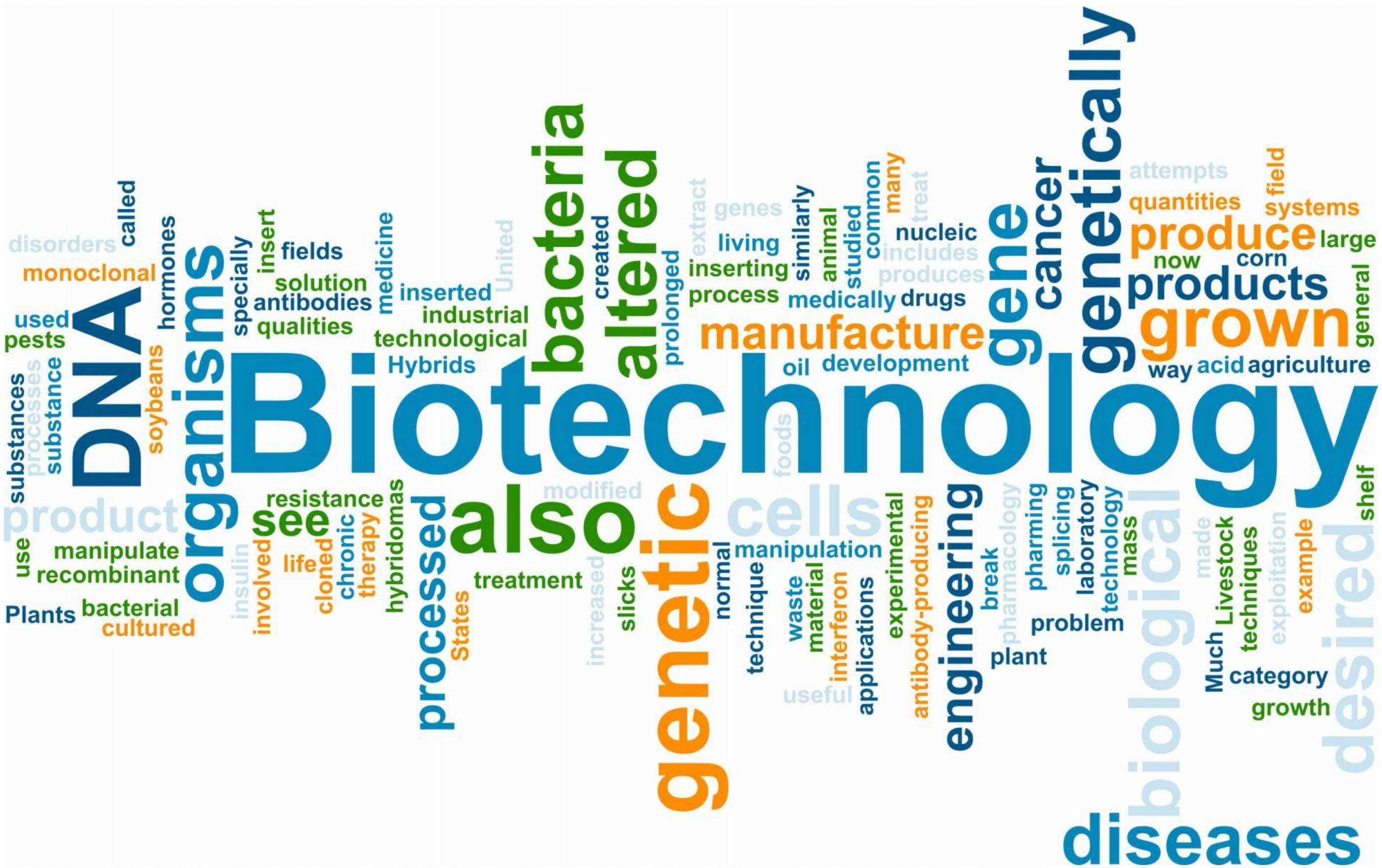
Uvod u molekularnu biologiju i genetiku



9. Biotehnologija i GMO

Biotehnologija:

BIOTEHNOLOGIJA JE TEHNOLOGIJA BAZIRANA NA BIOLOGIJI,

TO NIJE SAMO UPOTREBA GENETIČKOG INŽENJERSTVA.

- *European Federation of Biotechnology* (1989):
  Biotehnologija je integracija prirodnih i inženjerskih znanosti s ciljem primjene organizama, stanica i njihovih dijelova te molekulskih analoga u proizvodnji i uslugama.

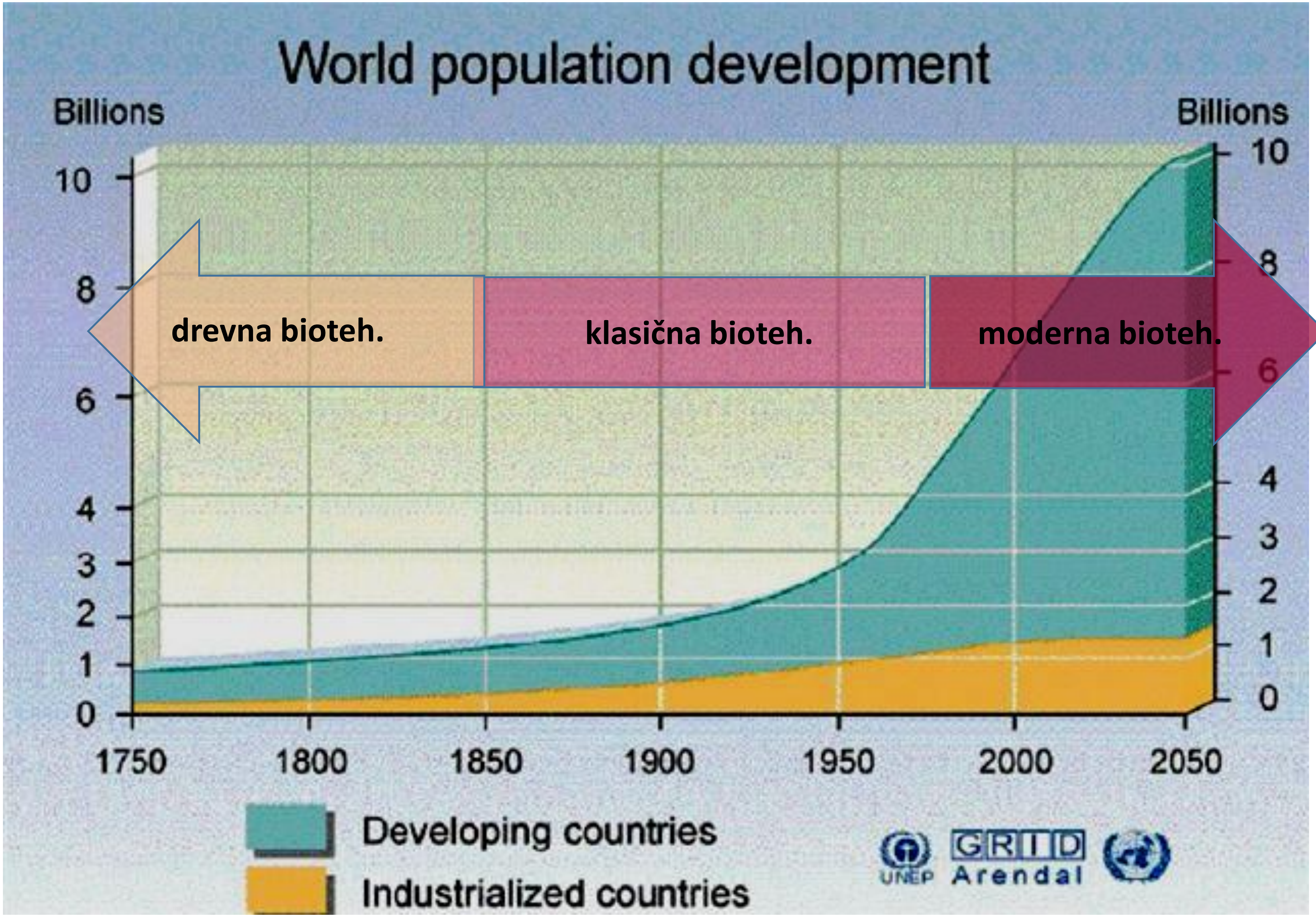
- *Konvencija o biološkoj raznolikosti ujedinjenih naroda* (1992):
  Biotehnologija je svaka tehnologija koja koristi biološke sustave, žive organizme ili njihove dijelove, za proizvodnju ili promjenu proizvoda ili procesa za posebnu namjenu.

Kategorije biotehnologije:

- **Medicinska biotehnologija („crvena”)**
  - vakcine, diagnostika i farmaceutski proizvodi

- **Industrijska biotehnologija („bijela”)**
  - mikroorganizmi i enzimi za obradu proizvoda

- **Biotehnologija u poljoprivredi („zelena”)**
  - nove biljne kulture i životinjske pasmine


World population development
Billions
Billions
10
8
6
4
3
2
1
0
1750
1800
1850
1900
1950
2000
2050
drevna bioteh.
klasična bioteh.
moderna bioteh.
Developing countries
Industrialized countries
UNEP
GRID
Arendal

Što je prethodilo biotehnologiji?

„Faza 0”: korištenje svega što je nastalo <u>prirodnom</u> selekcjom tj. produkt je evolucije

<u>Lovačko-sakupljačke zajednice:</u>

- život „u skladu s prirodom” s minimalnim utjecajem na okoliš → izlov

Prva faza biotehnologije: domestikacija / udomaćivanje:

- preduvjet za razvoj civilizacije
- kulture koje su prve ovladale domestikacijom → brzi napredak
- bile su uspješnije u širenju svojih gena i kulture (jezika)
- međutim: vrlo malo vrsta se dalo domesticirati

domestikacija životinja ≠ pripitomljavanje (eng. *taming*)

- uzgoj u zatočeništvu
- kontrola razmnožavanja
- kontrola prehrane
- selekcija poželjnih osobina

- privremeno dresiranje
- uvijek *de novo* (ispočetka)

Domestikacija pšenice i ječma: genetički aspekt

- povremene mutacije koje <u>sprječavaju otpadanje</u> sjemenki:

  - poželjno svojstvo iz ljudske perspektive!
  - uzgajivač kontrolira reprodukciju

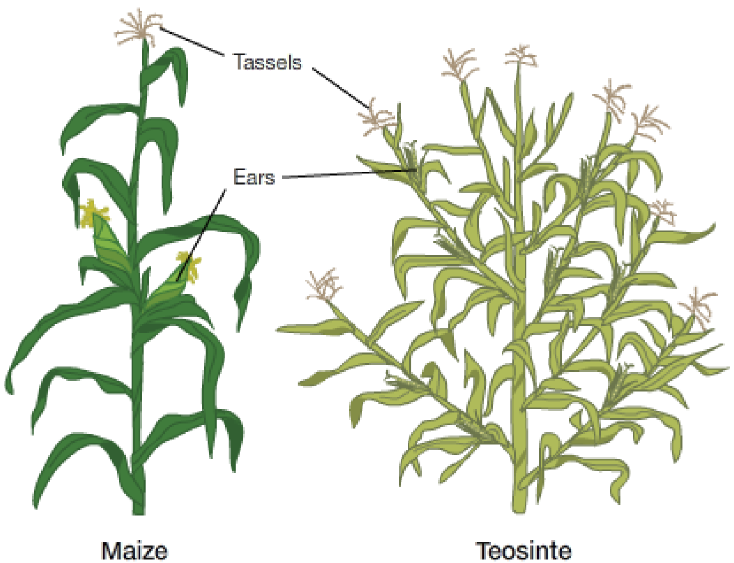
- mutacije koje <u>dokidaju dormanciju (mirovanje)</u> sjemena:
  - klijanje odmah po sjetvi (planiranje sjetve!)

  - uzgajivač čeka optimalne okolišne uvjete

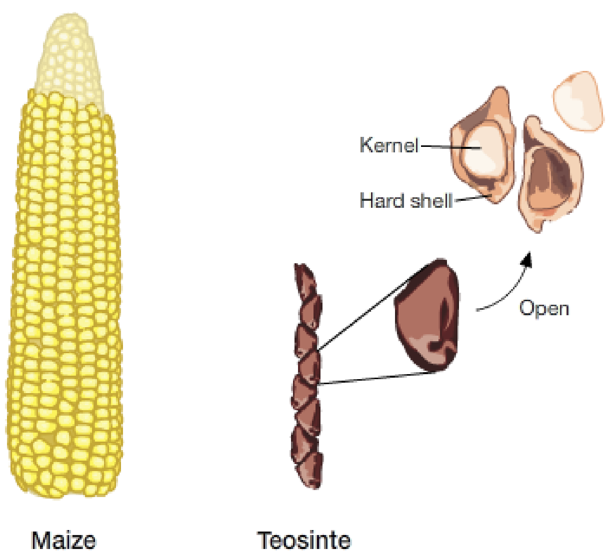
- pšenica, ječam, riža su <u>samooplodni</u>
  - (samo)oprašivanje prije otvaranja cvijeta → čiste linije
  - sprječavanje hibridizacije (križanja) s drugim genotipovima

- mutacija koja daje <u>„golo” zrno</u>
  - zrno se lako odvaja od „ljuske” (ovojnice, mekinje)

Kukuruz (*Zea mays*): predak je teozinta (teosinte)



- kukuruz je domesticiran prije 10.000 godina na području Meksika
- brzo je proširen Amerikom, a u Europu su ga prenijeli već 1493.
- novije genetičke studije pokazuju da je teozinta predak današnjeg kukuruza

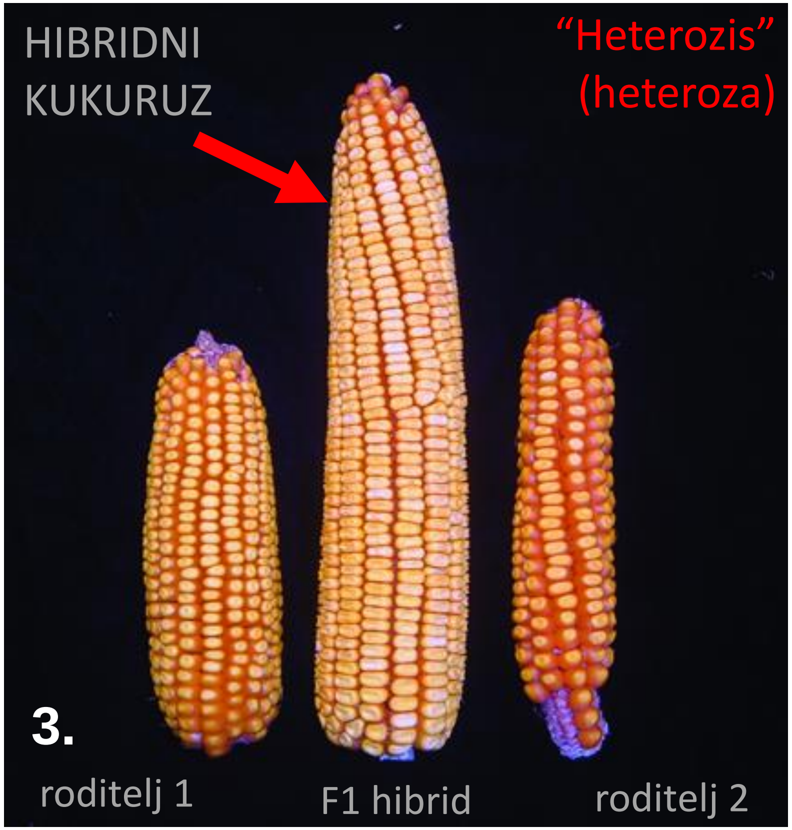


Kukuruz (*Zea mays*)

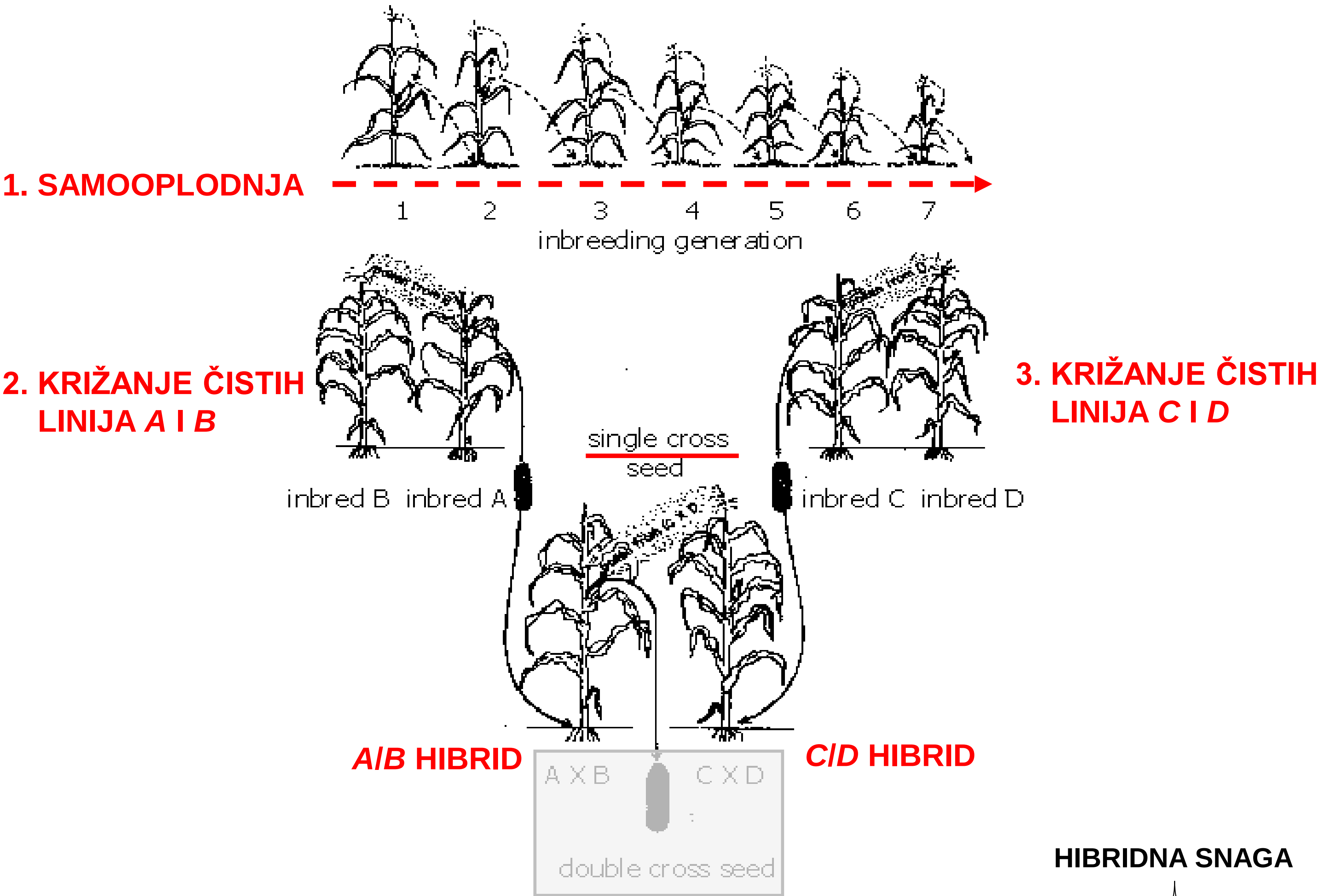
- do 1940.-tih u SAD-u gotovo sve površine pod kukuruzom bile su zasijane hibridima, a do kraja 1950.-tih privatne kompanije su potpuno preuzele trgovinu hibridnog kukuruza.

“Prirodne” varijante kukuruza (*landraces*)

Teozinta (teozinte)



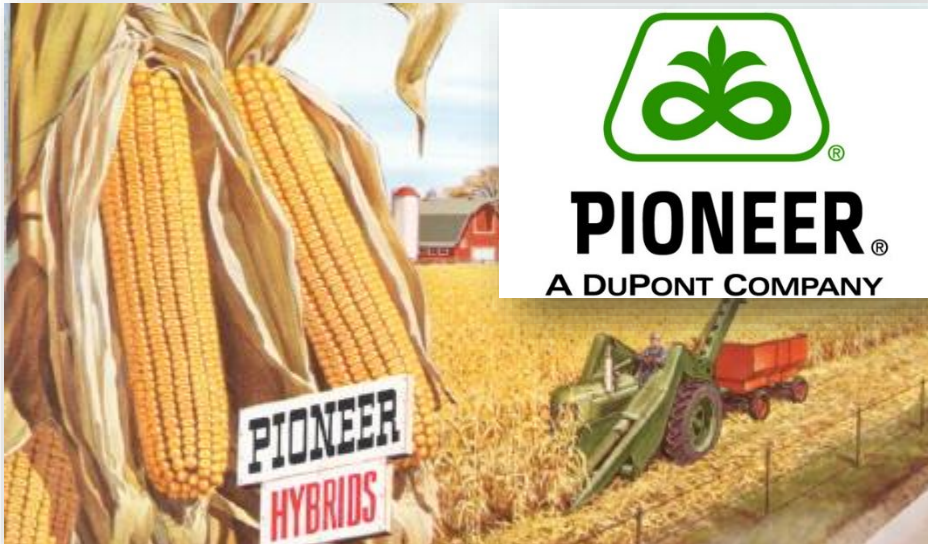
Još malo klasičnog oplemenjivanja: hibridni kukuruz



HIBRIDNA SNAGA

Križanjem čistih linija dobiju se hibridi koji pokazuju heterozis (heterozu).

Dobivanje hibridnog kukuruza: SAD i Hrvatska



<u>Hrvatska:</u>

Hibridi nisu GMO, nego „genetički trik" kojim su kompanije počele „prisiljavati" seljake/farmere da svake godine od njih kupuju novo sjeme.

Tržište hibridne riže i pšenice raste:

Tehnologija hibrida ide ruku pod ruku s komercijalizacijom sjemena (i postojala je prije pojave GM kultura).

Uspješnost domestikacije životinja je bila skromna:

148 vrsta životinja je pogodno za domesticiranje, ali samo **14** ih je domesticirano (13 su euroazijske vrste)

Od 200.000 biljaka, oko 100 je domesticirano.

Table 9.2 Mammalian Candidates for Domestication

	Continent			
	Eurasia	Sub-Saharan Africa	The Americas	Australia
Candidates	72	51	24	1
Domesticated species	13	0	1	0
Percentage of candidates domesticated	18%	0%	4%	0%

A "candidate" is defined as a species of terrestrial, herbivorous or omnivorous, wild mammal weighing on the average over 100 pounds.

Lista 14 uspješno domesticiranih (velikih) životinjskih vrsta:

TABLE 9.1 The Ancient Fourteen Species of Big Herbivorous Domestic Mammals

The Major Five

1. *Sheep*. Wild ancestor: the Asiatic mouflon sheep of West and Central Asia. Now worldwide.
2. *Goat*. Wild ancestor: the bezoar goat of West Asia. Now worldwide.
3. *Cow, alias ox or cattle*. Wild ancestor: the now extinct aurochs, formerly distributed over Eurasia and North Africa. Now worldwide.
4. *Pig*. Wild ancestor: the wild boar, distributed over Eurasia and North Africa. Now worldwide. Actually an omnivore (regularly eats both animal and plant food), whereas the other 13 of the Ancient Fourteen are more strictly herbivores.
5. *Horse*. Wild ancestor: now extinct wild horses of southern Russia; a different subspecies of the same species survived in the wild to modern times as Przewalski's horse of Mongolia. Now worldwide.

The Minor Nine

6. *Arabian (one-humped) camel*. Wild ancestor: now extinct, formerly lived in Arabia and adjacent areas. Still largely restricted to Arabia and northern Africa, though feral in Australia.
7. *Bactrian (two-humped) camel:* Wild ancestor: now extinct, lived in Central Asia. Still largely confined to Central Asia.
8. *Llama and alpaca*. These appear to be well-differentiated breeds of the same species, rather than different species. Wild ancestor: the guanaco of the Andes. Still largely confined to the Andes, although some are bred as pack animals in North America.
9. *Donkey*. Wild ancestor: the African wild ass of North Africa and formerly perhaps the adjacent area of Southwest Asia. Originally confined as a domestic animal to North Africa and western Eurasia, more recently also used elsewhere.
10. *Reindeer*. Wild ancestor: the reindeer of northern Eurasia. Still largely confined as a domestic animal to that area, though now some are also used in Alaska.
11. *Water buffalo*. Wild ancestor lives in Southeast Asia. Still used as a domestic animal mainly in that area, though many are also used in Brazil and others have escaped to the wild in Australia and other places.

12. *Yak*. Wild ancestor: the wild yak of the Himalayas and Tibetan plateau. Still confined as a domestic animal to that area.
13. *Bali cattle*. Wild ancestor: the banteng (a relative of the aurochs) of Southeast Asia. Still confined as a domestic animal to that area.
14. *Mithan*. Wild ancestor: the gaur (another relative of the aurochs) of Indian and Burma. Still confined as a domestic animal to that area.

Lista 14 uspješno domesticiranih (velikih) životinjskih vrsta:


12. Jak (Tibet)


13. Bali-govedo


14. Mithan/Mithun/Gayal (Indija)

12. *Yak*. Wild ancestor: the wild yak of the Himalayas and Tibetan plateau. Still confined as a domestic animal to that area.

13. *Bali cattle*. Wild ancestor: the banteng (a relative of the aurochs) of Southeast Asia. Still confined as a domestic animal to that area.

14. *Mithan*. Wild ancestor: the gaur (another relative of the aurochs) of Indian and Burma. Still confined as a domestic animal to that area.

FERMENTACIJE: osim za „rituale”, alkoholna pića su imala važne prednosti u odnosu na vodu:

- alkoholna pića su se mogla duže čuvati
- bila su <u>sigurnija</u> za piće od (neprokuhane) vode

- alkoholna fermentacija piva (prije 8.000 g.)
- alkoholna fermentacija vina (prije 9.000 g.)
- dizani kruh (prije 6.000 g.)

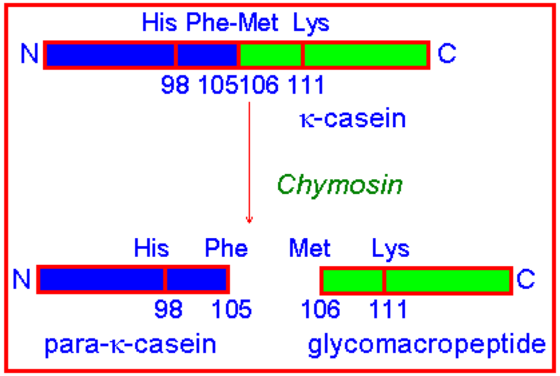
glukoza → etanol + CO_2

- mliječno-kisela fermentacija → dobivanje sira

laktoza → mliječna kiselina → propionska kiselina (*Ementaler*) + CO2

2. Enzim uzrokuje koagulaciju mlijeka:

- osim nekih tipova svježih sireva kod kojih se mlijeko zgrušava mliječnom kiselinom, većina proizvodnje sireva ovisi o stvaranju skute pomoću renina (enzim želuca teladi → vegetarijanci ☹)



MLIJEKO → SIRUTKA I SKUTA

RENIN (proteaza) = kimozin

- hidroliza peptidne veze između Phe105 i Met 106 kazeina → gliko*makro*peptid + para-κ-kazein
- Ca^{2+} pomaže precipitaciju/koagulaciju pri čemu se također zarobe mliječne masti
- koagulacija kazeina je osnovni proces u nastajanju sira
- danas je u širokoj upotrebi rekombinantni kimozin mikoorganizama (vegetarijanci ☺)

…pa to je GMO! ☹

2. Enzim uzrokuje koagulaciju mlijeka:

ili

<u>Sirilo</u> (*rennet*): enzim iz telećeg želuca (ekstrakt iz želuca naziva se *rennet*; sadrži enzim renin)

<u>Kimozin</u>: enzim dobiven biotehnološki

<u>cDNA za goveđi kimozin se eksprimira u:</u>

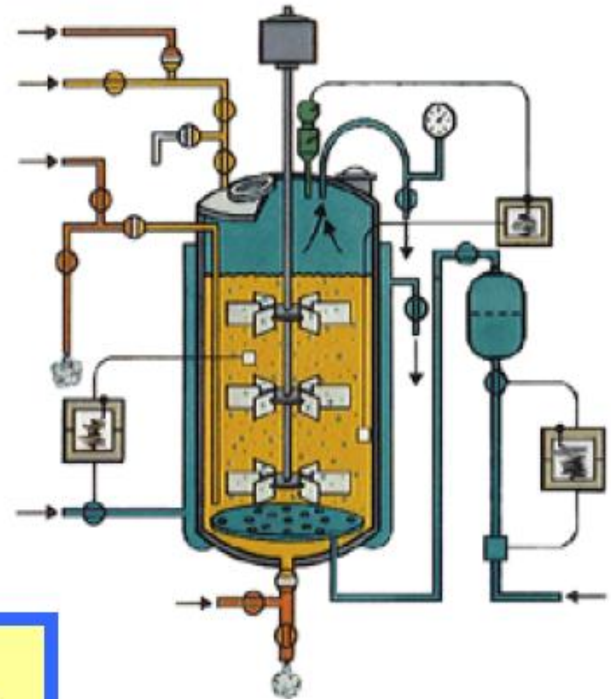
Aspergillus niger (askomiceta), *Kluyveromices lactis* (kvasac) ili *Escherichia coli* (bakterija)

PROIZVODNJA U BIOREAKTORIMA

Koncept rada s bioreaktorima:

2.

Bioproces u bioreaktoru



1.

Upstream processing
- čišćenje i sterilizacija bioreaktora
- priprema hranjivog medija
- priprema staničnog inokuluma

Prije početka bioprocesa:

3.

Downstream processing
- izolacija proizvoda
- pročišćavanje proizvoda

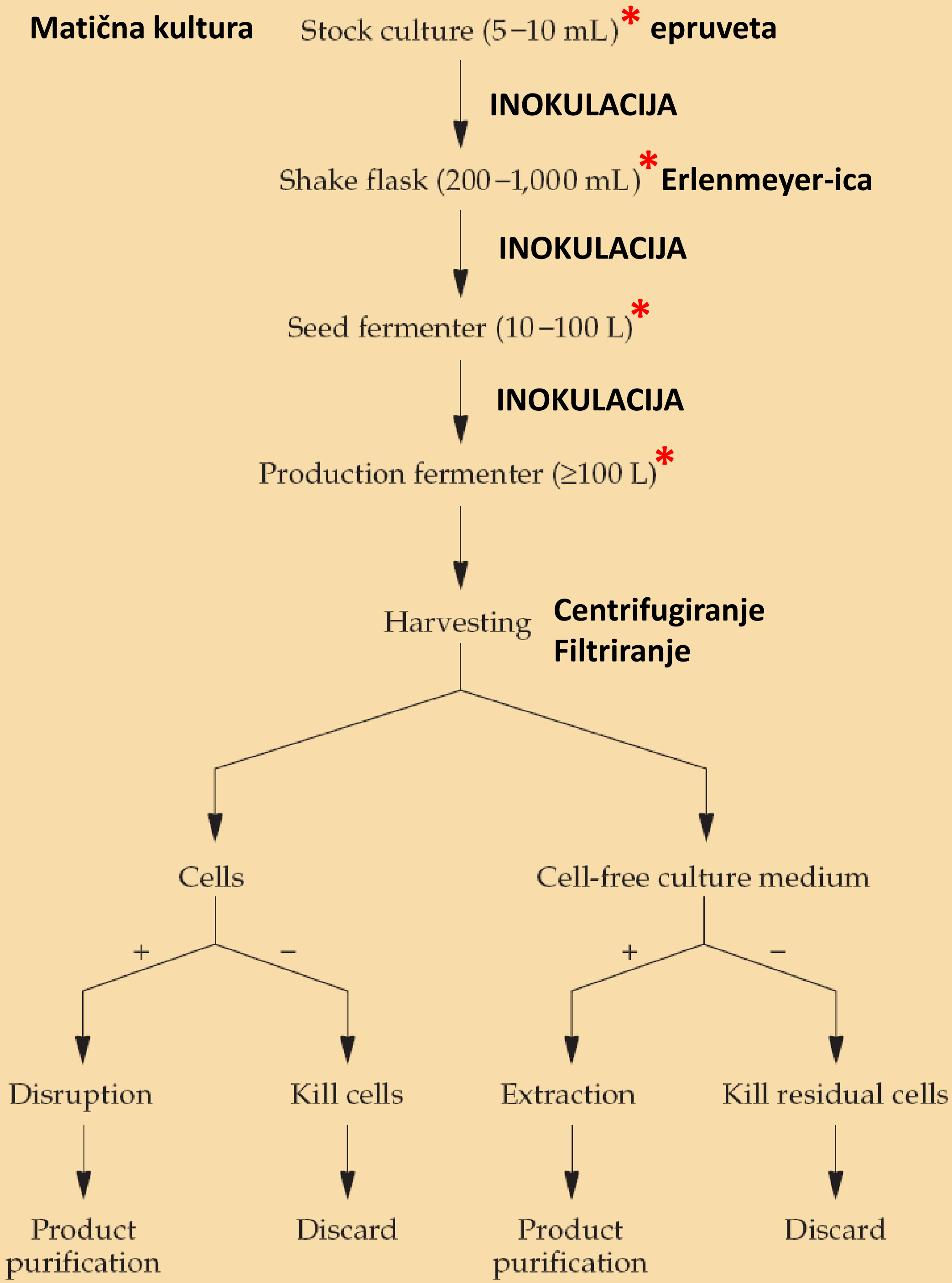
Po završetku bioprocesa:

Osnovni koraci u pripremi biotehnološkog procesa (*bioprocesa*):

- formulacija i sterilizacija odgovarajućeg hranjivog medija

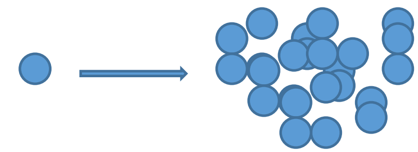
- sterilizacija bioreaktora (fermentora)

- inokulacija (nacijepljivanje) hranjivog medija odgovarajućim sojem

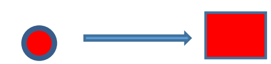


Bioreaktor ili fermentor

- Uređaj ili posuda u kojoj putem biokemijskih reakcija od supstrata nastaje produkt
  - proizvodnja biomase i / ili metabolita



  - biotransformacija jedne molekule u drugu



- Reakcije u bioreaktoru kataliziraju biokatalizatori:
  - mikroorganizmi (bakterije, kvasci, plijesni, alge) te biljne ili životinjske stanice
  - enzimi
- bioreaktori su se počeli razvijati u 20. st. tijekom optimizacije proizvodnje pekarskog kvasca, organskih spojeva (acetona, butanola) i antibiotika (penicilina)

Sterilizacija bioreaktora (fermentora):

Pripremanje staničnog inokuluma:

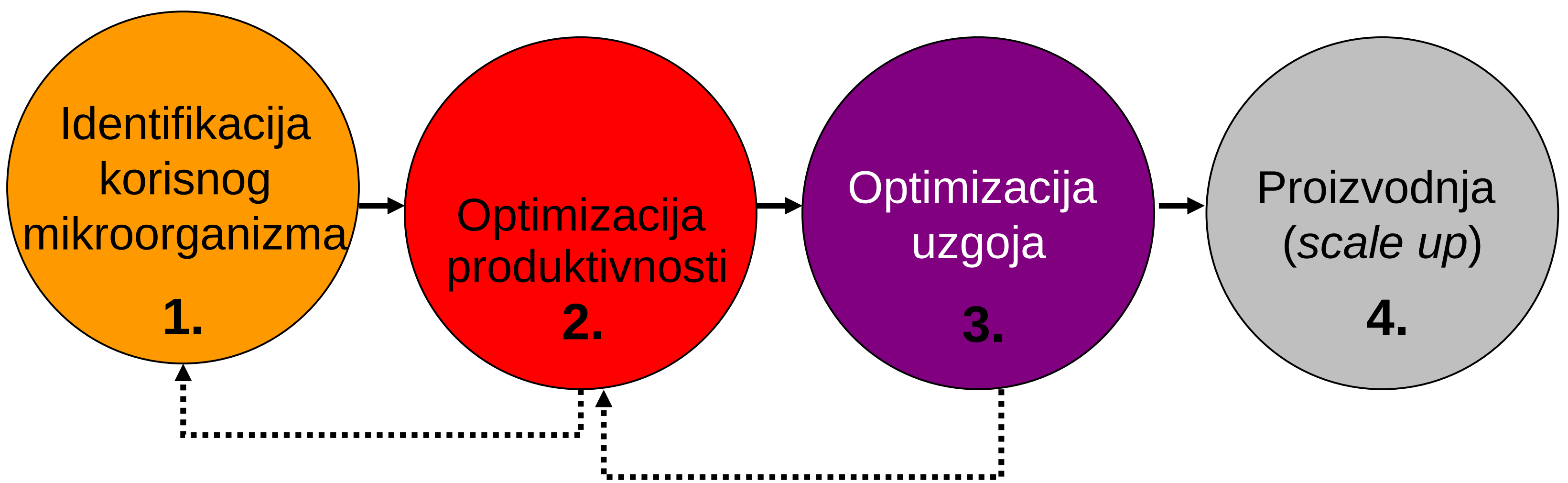
Razvoj i optimiranje uzgoja mikroorganizama:

I) faza: identifikacija vrste koje sintetiziraju željeni produkt

II) faza: povećanje produktivnosti odabranog soja

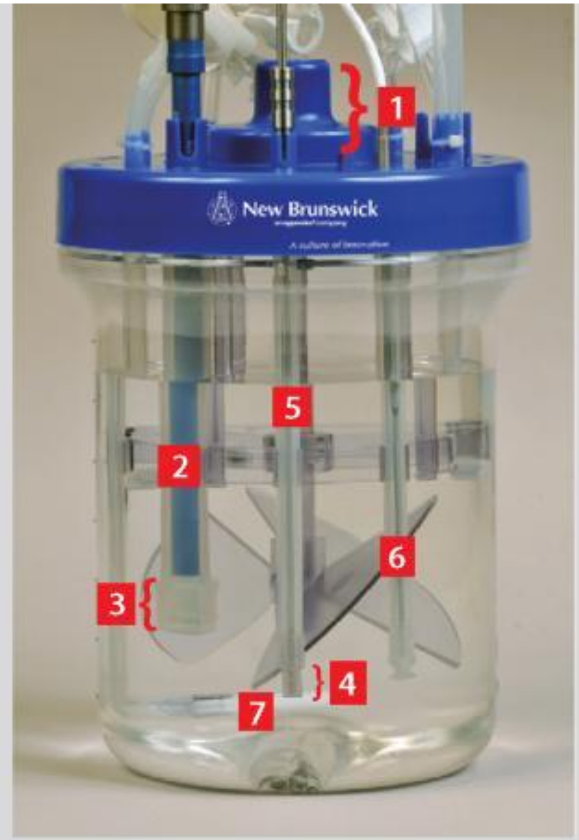
III) faza: optimiranje hranjivih podloga i uvjeta kultiviranja

IV) faza: iz laboratorija do industrije razine (*scale up*)



Optimizacija uzgoja selektiranog genotipa /soja:

Minijaturni *stirred-tank* (s miješalicm) bioreaktor.



[1] Encapsulated magnetic drive

[2] Dissolved oxygen (DO) probe seated in a noninvasive sleeve

[3] Semipermeable silicon DO probe membrane end cap

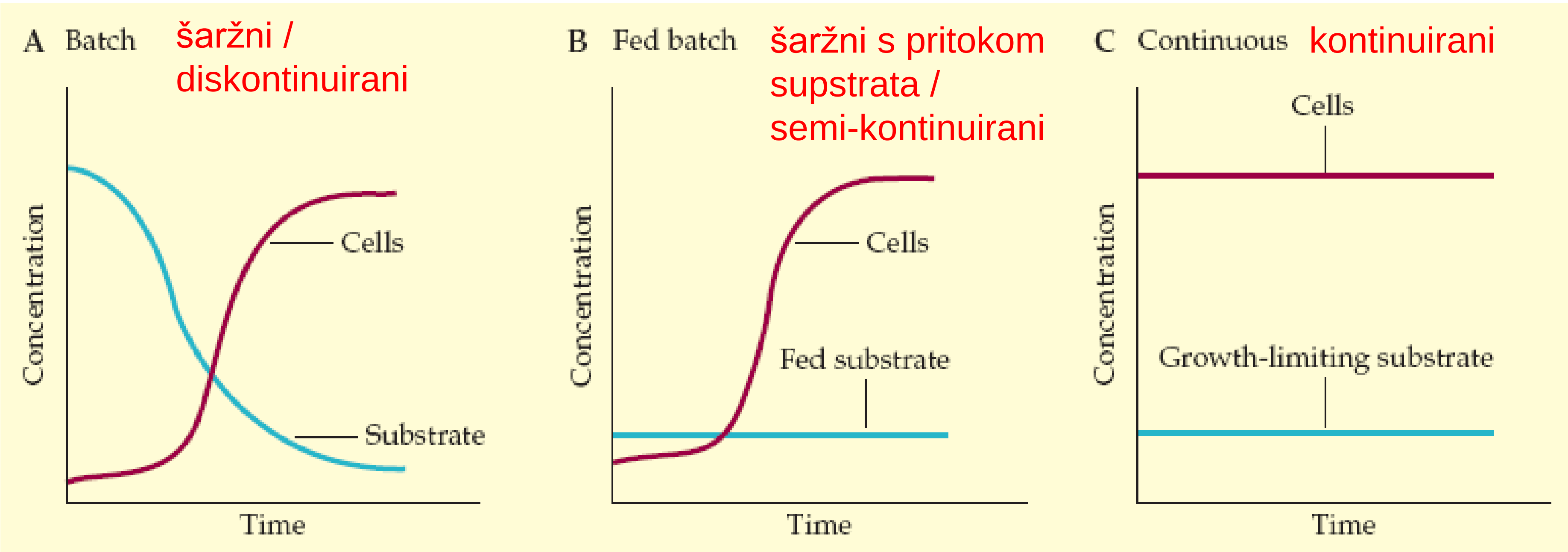
[4] Location of pH probe tip facing dot impregnated with two luminophors

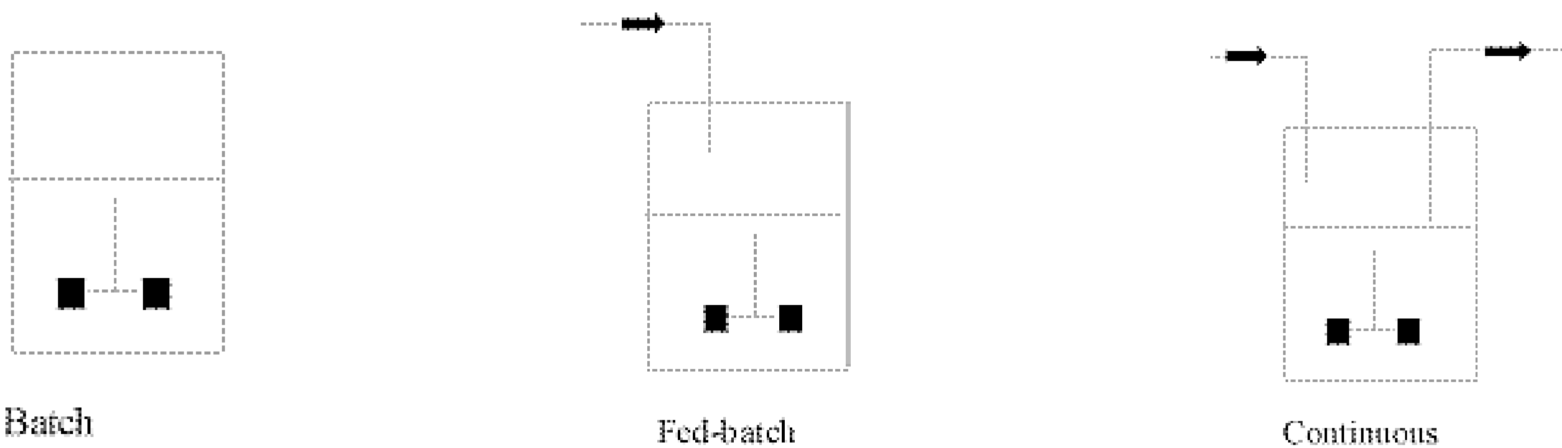
[5] pH probe seated inside a noninvasive silicon sleeve

[6] RTD temperature seated inside a noninvasive silicon sleeve

[7] Porous polymer microsparger (pore size 6–12 μm)

Načini uzgoja mikroorganizama u bioreaktorima (obzirom na dotok hranjivog medija):





BIOREAKTORI S MIJEŠALICOM (*STIRRED-TANK REACTORS*)

Kako <u>jeftino</u> “nahraniti” mikroorganizme u bioreaktorima?

Potrebno je:

- <u>jeftni izvor škroba</u>
  - melasa (nusprodukt proizvodnje šećera iz šećerne repe)
  - sirutka (nusprodukt u proizvodnji sira, bogat laktozom)
- <u>jeftini izvor aminokiselina</u>
  - sojino brašno (sojin ekstrakt)
  - ostaci komine (taloga ječmenih klica) iz pivovara
  - *corn steep liquor* (ostatak “mokro” mljevenog kukuruza)
- <u>minerali</u> (anorganske soli)
- <u>kisik</u> (najčešće su potrebni aerobni uvjeti): čisti O_2 ili zrak

- <u>dvostruka korist</u>: izvor hrane (za bakterije) je jeftin, a ujedno i ekološki najbolji način zbrinjavanja otpadnih produkata iz drugih industrija

Procesi nakon bioreaktora: *downstream processing*

- cijena finalnog produkta najviše ovisi o njegovoj koncentraciji u bioreaktoru (obično 95% voda)

- najčešće se zahtjeva vrlo visoka čistoća produkta, u farmaceutskoj industriji 99,999%

Pet osnovnih koraka:

1. Razbijanje stanica (mehaničko ili npr. termičko)
   - potrebno samo za produkte koji se nakupljaju u stanicama
2. Odvajanje stanica od medija (filtracija ili centrifugiranje)
3. Koncentriranje produkta (precipitacija ili ultrafiltracija)
4. Pročišćavanje produkta (ekstrakcija, kristalizacija, kromatografija)
5. Formuliranje produkta (stabilizacija)

PRIMJERI PROIZVODA IZ BIOREAKTORA
(cijeli mikroorganizmi kao produkt)

Kvasac:

TEKUĆI

KRUTI (SVJEŽI)

KRUTI (SUHI)

Roraty vacuum filter in yeast production:

https://www.youtube.com/watch?v=ciBjxxbO4Xg

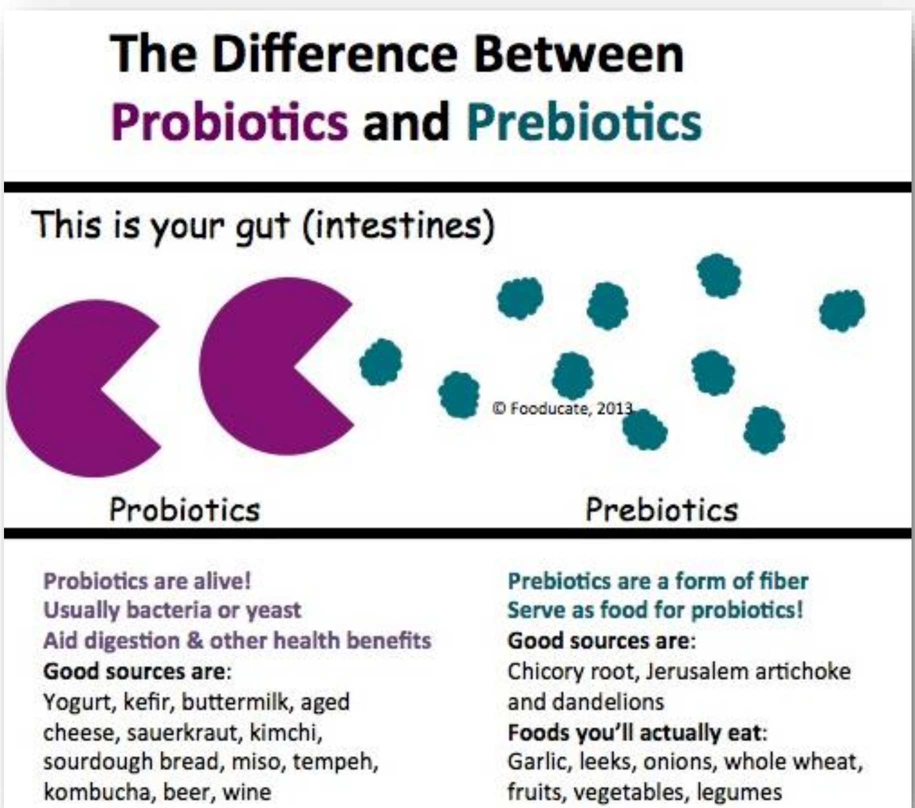
0:10

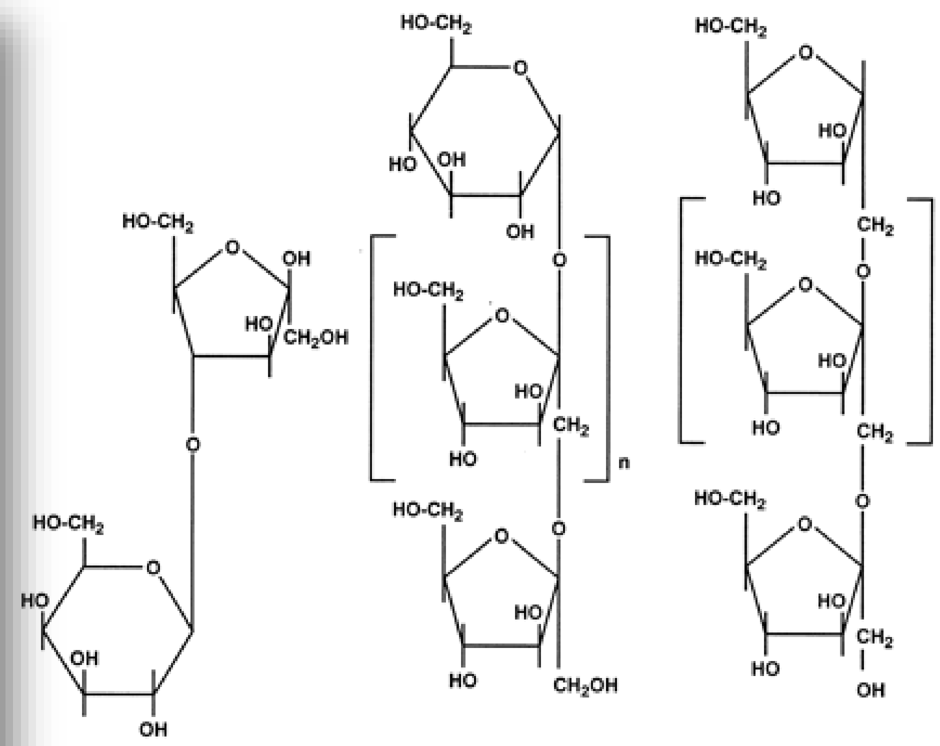
Probiotici:
Lactobacillus
Bifidobacterium

jgl
Kao kap vode na dlanu

Probiotici ≠ prebiotici

- prebiotici su hraniva (hrana) za mikroorganizme probavnog sustava
- u pravilu je riječ o biljnim polisaharidima: inulin, oligofruktoza, laktuloza (cikorija, čičoka ili jeruzalemska artičoka)





Lactulose Inulin Fructooligosaccharide

Spirulina

- popularno ime za dvije vrste cijanobakterija
  - *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima*
  - kultivira se diljem svijeta
    - upotrebljava se kao hrana ili dodatak hrani
    - u obliku tablete, listića ili praška
    - dodatak hrani za životinje – u peradarskoj industriji te u uzgoju riba

- sadrži ukupno 55% proteina (77% u suhoj tvari)
  - sadrži sve esencijalne aminokiseline


https://www.youtube.com/watch?v=mKFvfrEWIhc

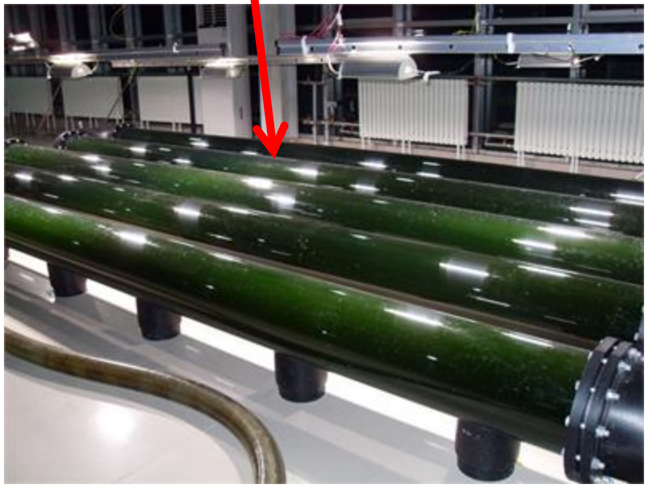

All Natural
Nature's Multi-Vitamin
Pure Hawaiian
Spirulina
pacifica

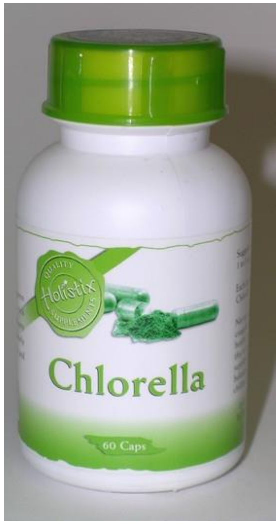

GMP
SPIRULINA
CRVENA ALGA
Haematococcus sp.

Klorela (*Chlorella*)-zelena alga

- sadrži 45% proteina, **20% masti**, 20% ugljikohidrata, 5% vlakana, i 10% minerala i vitamina
- jako korisna i hranjiva, ali <u>teška za uzgoj u prirodnim uvjetima</u>, a bioreaktori zahtijevaju propuhivanje CO_2 i osvjetljavanje, te to jako poskupljuje postupak
- "*No.1 anti-aging food*"

Zbog visokog sadržaja masnih kiselina iznimno zanimljiva u proizvodnji biodizela





PRIMJERI PROIZVODA IZ BIOREAKTORA (male molekule)

Aminokiseline:

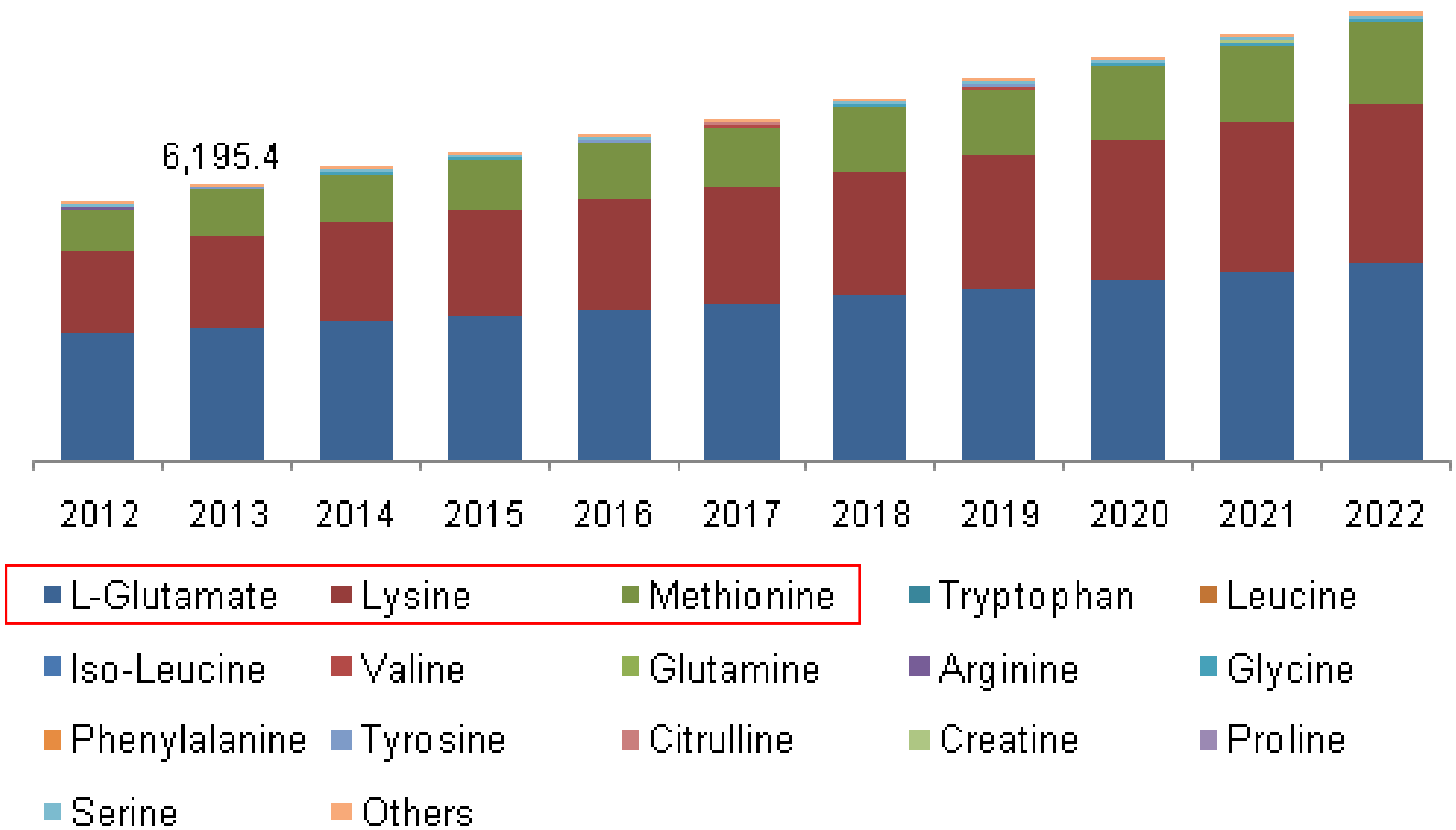
Table 14.1 Amounts of amino acids being currently produced

Production scale (tonnes y^{-1})	Amino acid	Preferred production method	Main use
1200000	L-Glutamic acid	Fermentation	Flavour enhancer
600000	L-Lysine	Fermentation	Feed additive
550000	D,L-Methionine	Chemical synthesis	Feed additive
40000	L-Threonine	Fermentation	Feed additive
16000	Glycine	Chemical synthesis	Food additive, sweetener
14000	L-Aspartate	Enzymatic catalysis	Aspartame, polymer
13000	L-Phenylalanine	Fermentation	Aspartame
4500	L-Cysteine	Reduction of cystine, fermentation	Food additive, pharmaceutical
3500	L-Cystine	Extraction, fermentation	Cysteine, pharmaceutical
2000	L-Arginine	Fermentation, extraction	Pharmaceutical
1500	L-Alanine	Fermentation, extraction	Sweetener, building block
1200	L-Tryptophan	Fermentation	Feed, pharmaceutical
1200	L-Leucine	Fermentation, extraction	Pharmaceutical
1000	L-Valine	Fermentation, extraction	Pesticides, pharmaceutical
500	L-Isoleucine	Fermentation, extraction	Pharmaceutical

Table 12.1 Commercial applications of amino acids

Amino acid	Application(s)
Alanine	Flavor enhancer
Arginine	Therapy for liver diseases
Aspartic acid	Flavor enhancer; sweetener synthesis
Asparagine	Diuretic
Cysteine	Bread production; therapy for bronchitis; antioxidant
Glutamic acid	Flavor enhancer
Glutamine	Therapy for ulcers
Glycine	Sweetener synthesis
Histidine	Therapy for ulcers; antioxidant
Isoleucine	Intravenous solutions
Leucine	Intravenous solutions
Lysine	Feed additive; food additive
Methionine	Feed additive
Phenylalanine	Infusions; sweetener synthesis
Proline	Intravenous solutions
Serine	Cosmetics
Threonine	Feed additive
Tryptophan	Intravenous solutions; antioxidant
Tyrosine	Intravenous solutions; precursor for L-DOPA
Valine	Intravenous solutions

Amino Acids Market Will Grow To $35.40 Billion By 2022



Global Amino Acids Market Volume By Product, 2012-2022 (Kilo Tons)

Aminokiseline iz bioreaktora se masovno koriste u stočarstvu.

Zabrana upotrebe „koštanog brašna” (otpad mesne industrije) bila je pokretač rasta potražnje.

INFUZIJSKA OTOPINA

LIFT HERE

15% Amino Acids Injection

NDC 0264-3200-55
REF S3200-SS

1000 mL

PHARMACY BULK PACKAGE – NOT FOR DIRECT INFUSION

Protect from light until use.
For Intravenous Use

Store at 20 to 25°C (68 to 77°F). [See USP Controlled Room Temperature.] Solution that has been frozen must not be used. Do not expose to light before using. Once closure is penetrated, transfer contents promptly, total time not to exceed 4 hours. See package insert for proper use of Pharmacy Bulk Package.

Entry Date:__________ Time:__________

15% Amino Acids Injection

NDC No. (01) 1 0302643 20055 5

Each 100 mL contains:

* **Essential Amino Acids**	
Lysine (from Lysine Acetate, USP)	1.18 g
Leucine, USP	1.04 g
Phenylalanine, USP	1.04 g
Valine, USP	960 mg
Isoleucine, USP	749 mg
Methionine, USP	749 mg
Threonine, USP	749 mg
Tryptophan, USP	250 mg
* **Nonessential Amino Acids**	
Alanine, USP	2.17 g
Arginine, USP	1.47 g
Glycine, USP	1.04 g
Histidine, USP	894 mg
Proline, USP	894 mg
Glutamic Acid	749 mg
Serine, USP	592 mg
Aspartic Acid, USP	434 mg
Tyrosine, USP	39 mg
Sodium Metabisulfite, NF added	30 mg
Water for Injection USP	qs

pH 5.6 (5.2-6.0), adjusted with acetic acid.

Acetate: 151 mEq/L, including quantity used for pH adjustment.

Calculated Osmolarity: 1383 mOsmol/L

Contains no more than 25 mcg/L of aluminum.

Sterile, nonpyrogenic.
Single dose container.
Use only if bottle and seal are undamaged and solution is clear with vacuum present.
Administer intravenously.

Rx only

B|BRAUN

B. Braun Medical Inc.
Irvine, CA 92614-5895 USA
1-800-227-2862
www.bbraun.com
Made in USA

LD-243-1 Y37-002-179

Patent za tijesto: EP 1562433 A1

https://www.google.com/patents/EP1562433A1?cl=en

Ingredients	%
Salt	1.8 - 2.3
Yeast	3.0; 2.5 - 4.5
Sweetener	0.3 - 2.0
Gluten	0.5 - 4.0
L-Cysteine *	10 - 100 PPM
Water	50 - 65
Oxidant	0.1 - 0.5
Enzymes	0.01 - 0.5
Gum	0.01 - 0.5

Amino acid supplement in animal feeds.

Limunska kiselina (E330):

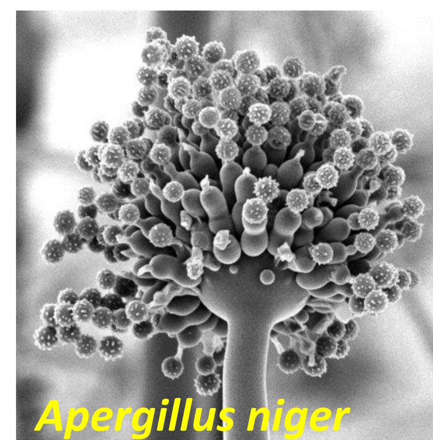
$H_2C\text{-}COOH$
|
$HO\text{-}C\text{-}COOH$
|
$H_2C\text{-}COOH$

LIMUNSKA KISELINA

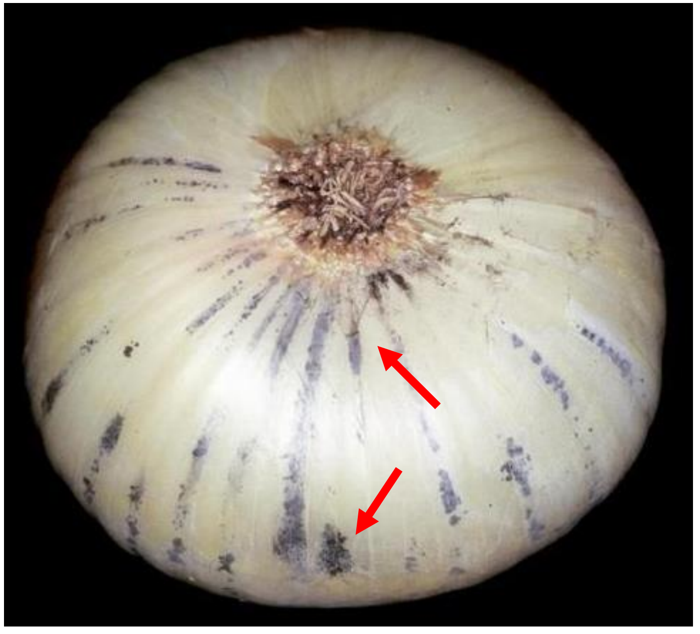
- slaba organska kiselina
  - ciklus limunske kiseline
  - naranče i grejp 0,005 mol/L
  - limun i limeta 0,03 mol/L (8% suhe tvari)
- prirodni konzervans
- antioksidans
- detoksikacija kod trovanja

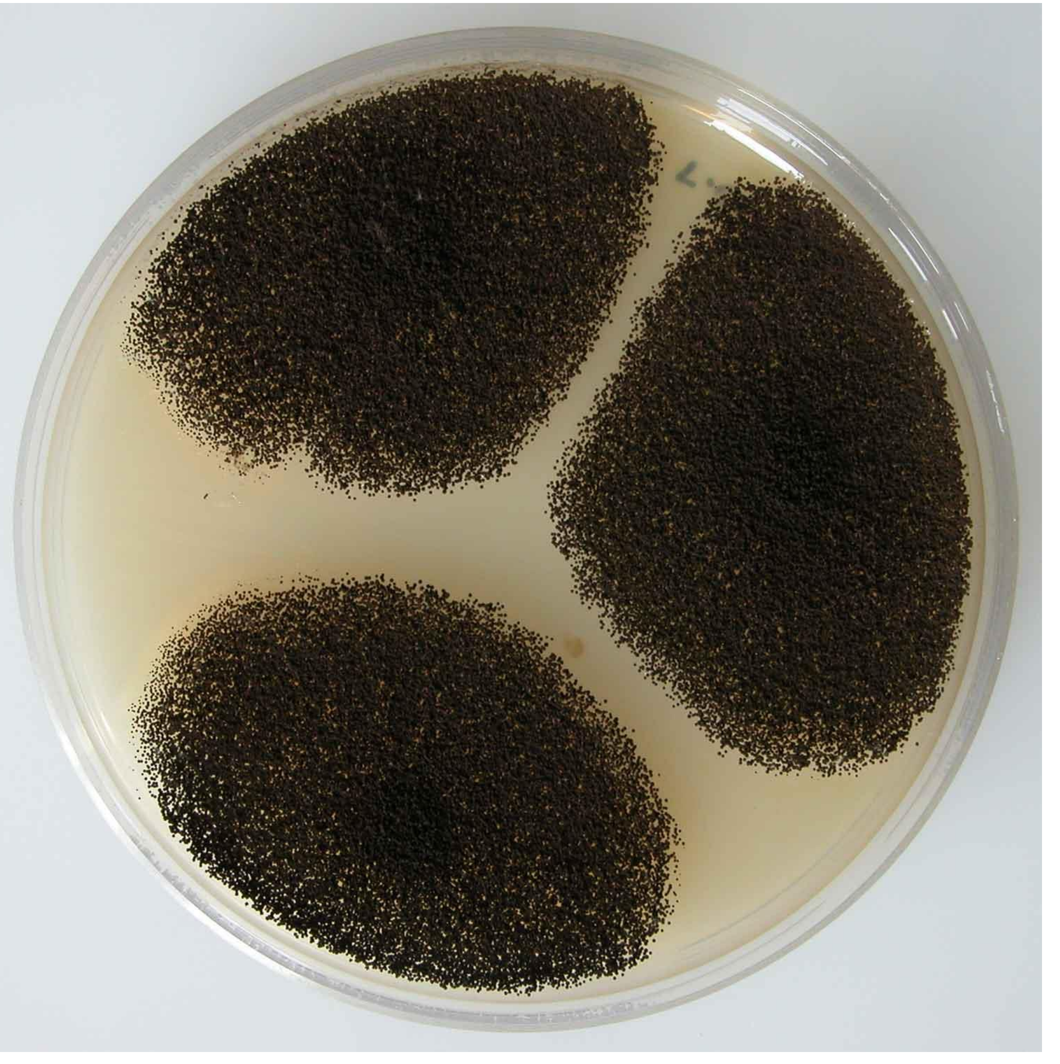
- početak industrijske proizvodnje u Italiji 1860 g. iz limuna

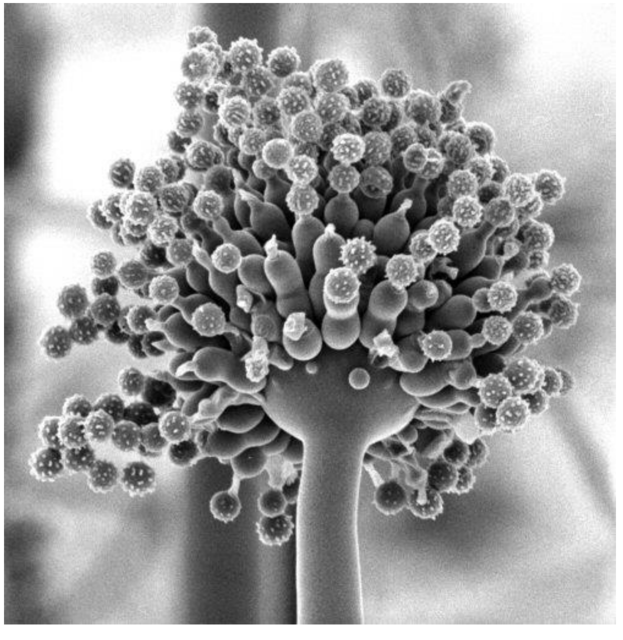
- odabrani sojevi plijesni *Apergillus niger* u nizu biokemijskih reakcija šećere hranjive podloge transformiraju u limunsku kiselinu (godišnja proizvodnja: 2,8 milijuna tona)



Aspergillus niger- crna plijesan (eng. *black mold*)







A.niger stvara limunsku kiselinu u suvišku tijekom kasne *log* faze, a i kasnije ukoliko ima dovoljno glukoze i kisika.

Steroidni hormoni: kortizon, progesteron, testosteron

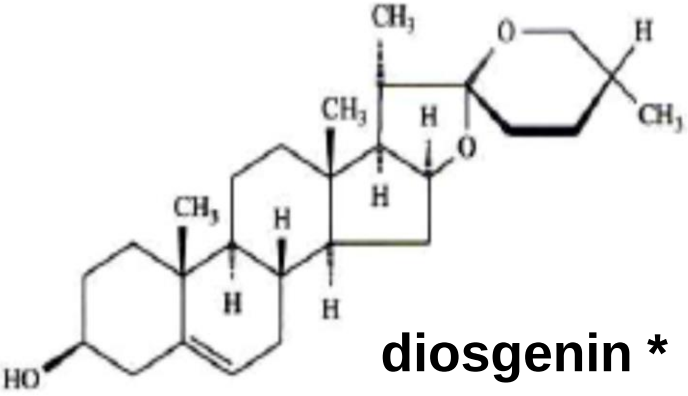
- 1930. Kendall i Reichstein izoliraju i određuju strukturu kortizona
- kortizon ima antiupalno i analgetičko djelovanje npr. kod reumatoidnog artritisa → nagli porast potražnje

- 1. kompleksna kemijska sinteza u 36 koraka (*Merck,* CH)
  - izvor sirovine je goveđa žuč → 1g = 260$ MERCK → MERCK
  KOLESTEROL
- 2. progesteron, testosteron, kortizon → kemijska sinteza iz **diosgenina** (*Syntex*, Meksiko) → proizvodnja iz d. jama

- 3. kemijsko-biotehnološka sinteza u 11 koraka
  - gljivice *Rhizopus arrhizus, Penicillium* sp. i *Curvularia* sp.
  - sirovina je biljka divlji jam (2000 tona godišnje)
  - monopol Meksika do 2000. → diosgenin zamjenjen s **sitosterolom** (iz uljane repice) i **stigmasterolom** (iz soje)
  - proces 26x jeftiniji! → 1g = 10$ →→→ 1g = 1.30$

Steroidni hormoni: kortizon, progesteron, testosteron

- diosgenin je prirodni supstrat za sintezu steroidnih hormona



diosgenin *

- divlji jam, *Dioscorea villosa,* nakuplja 10% diosgenina (suha t.)
- najveći proizvođač je bio Meksiko

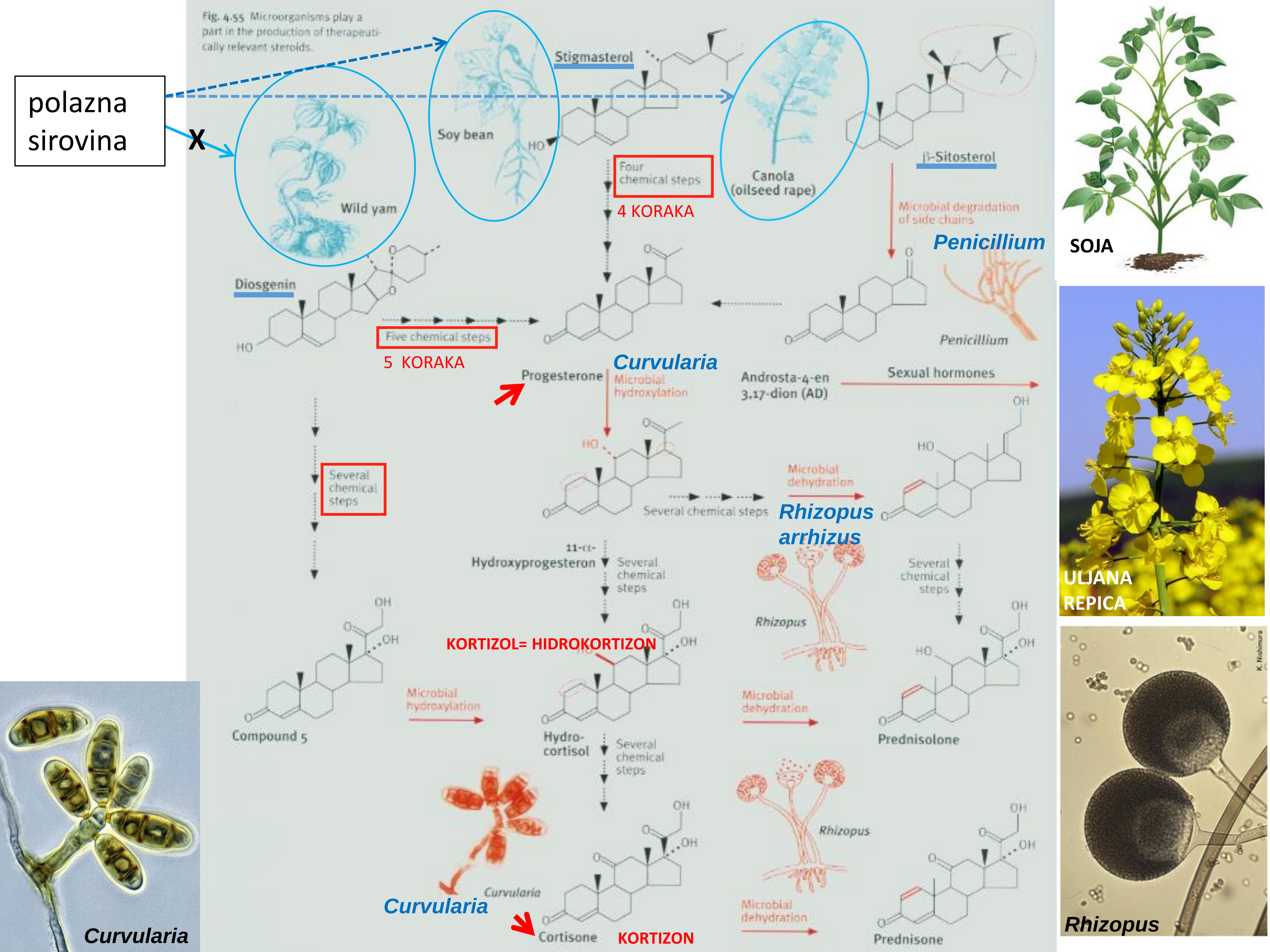
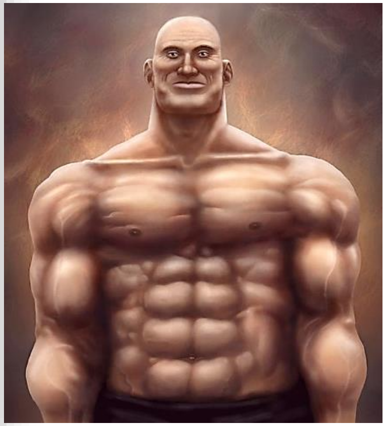


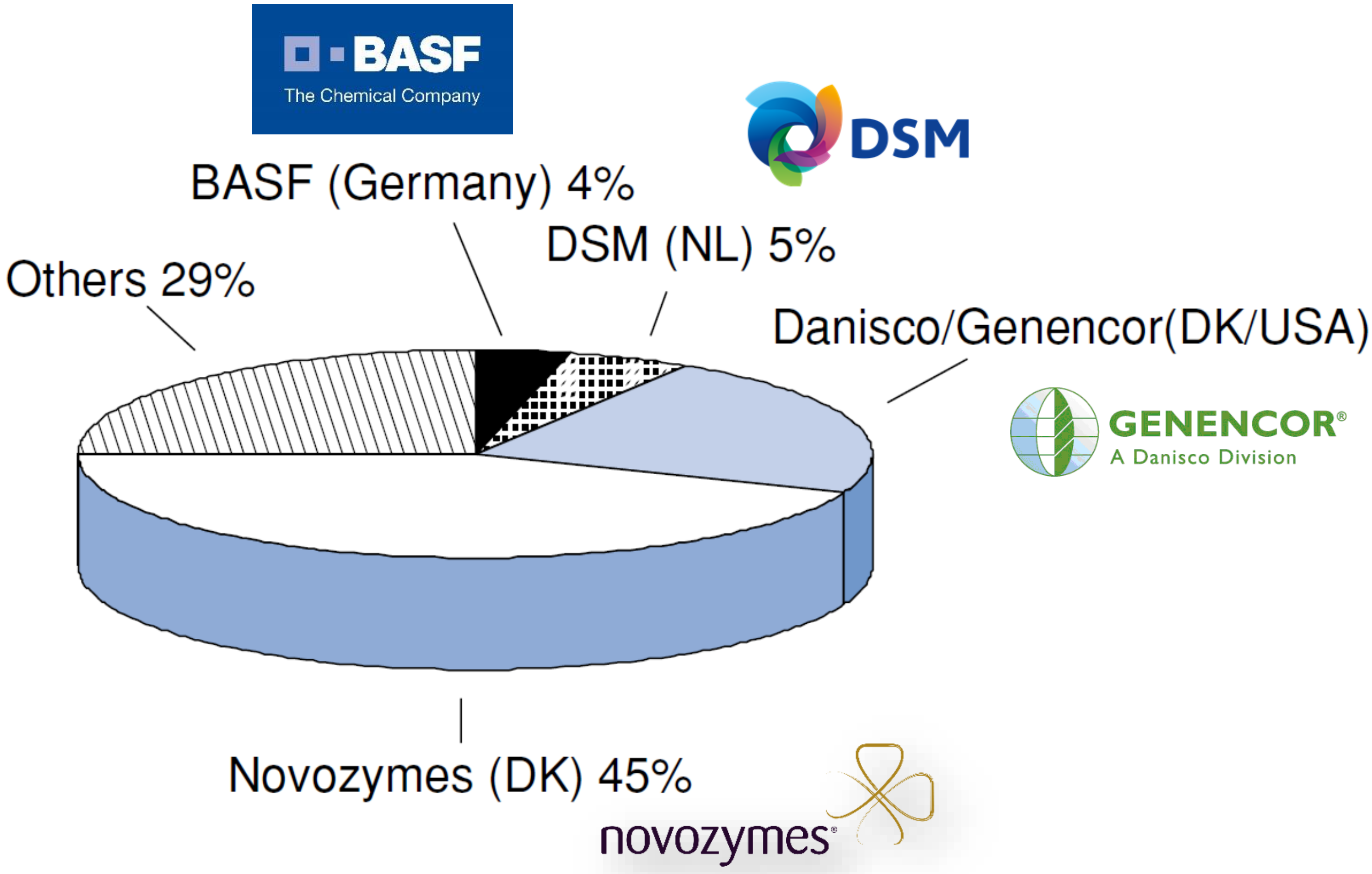
Fig. 4.55 Microorganisms play a part in the production of therapeutically relevant steroids.
polazna sirovina
X
Wild yam
Soy bean
Stigmasterol
Canola (oilseed rape)
β-Sitosterol
SOJA
Four chemical steps
4 KORAKA
Microbial degradation of side chains
Penicillium
Diosgenin
Five chemical steps
5 KORAKA
Progesterone
Curvularia
Microbial hydroxylation
Androsta-4-en 3,17-dion (AD)
Sexual hormones
Several chemical steps
Microbial dehydration
Rhizopus arrhizus
ULJANA REPICA
11-α-Hydroxyprogesteron
Rhizopus
KORTIZOL= HIDROKORTIZON
Compound 5
Hydro-cortisol
Prednisolone
Curvularia
Cortisone
KORTIZON
Prednisone

Steroidni hormoni: kortizon, progesteron, testosteron



PRIMJERI PROIZVODA IZ BIOREAKTORA (makromolekule)

Kompanije koje se bave proizvodnjom enzima:



Svjetsko tržište enzima:

a) enzimi za tehničke aplikacije (deterdženti, tekstil, koža, papir, goriva) **63%**

b) enzimi za prehrambenu industriju **31%**

c) enzimi za hranu za životinje **6%**

Primjer: ubrzano dozrijevanje sira *Cheddar*

Cheddar cheeses treated with microbial enzymes developed higher soluble protein and free volatile fatty acids and displayed better flavor and greater acceptability than control cheeses. Added microbial proteases contributed to the breakdown of casein, especially *β*-casein. Also, αs_1-I casein and free amino acids were high in cheeses treated with protease. Increased rate of proteolysis in enzyme-treated cheese had a direct relation to accelerated ripening.

Enzyme combinations and concentrations were used: fungal **protease** 31000 (Miles), 0.005% + fungal **lipase**-MY (Meito) 0.00005 to 0.0002%; and fungal protease P-53 (Rohm & Haas), 0.0035% + fungal lipase-MY (Meito), 0.00005 to 0.0002%

http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83516-X

Proteoliza i lipoliza stvaraju hlapljive komponente važne za konačnu aromu.

Skraćeno vrijeme dozrijevanja sira.

Novozymes Saphera®

The next generation of lactase

Novozymes Saphera® is the only lactase on the market that achieves

- Better control of lactose elimination
- Better sweetness stability during product shelf life of sweetened lactose-free dairy products
- Improved suitability in fermented dairy products

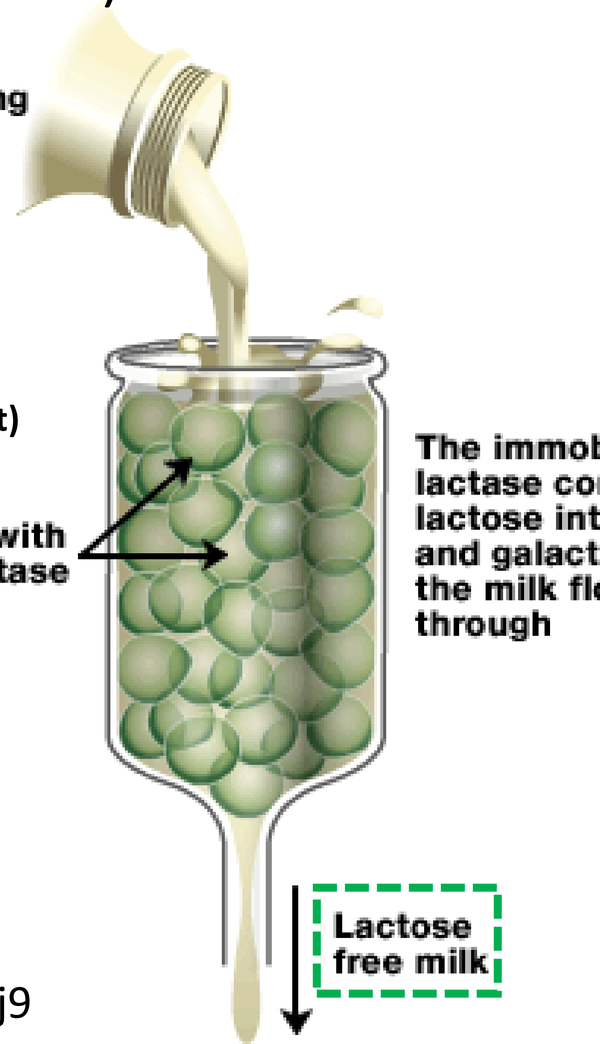
Dairy producers gain improved production control and the versatility to create high-quality lactose-free products with this innovative lactase.

Originated from Bifidobacterium bifidum, Saphera® has many advantages:

http://www.novozymes.com/en/solutions/food-and-beverages/dairy/lactose-free/novozymes-saphera

Jedan primjer primjene imobiliziranih enzima:

Imobilizirana laktaza (β-galaktozidaza)



https://www.youtube.com/watch?v=P7e9Mj9ATpQ
0:50

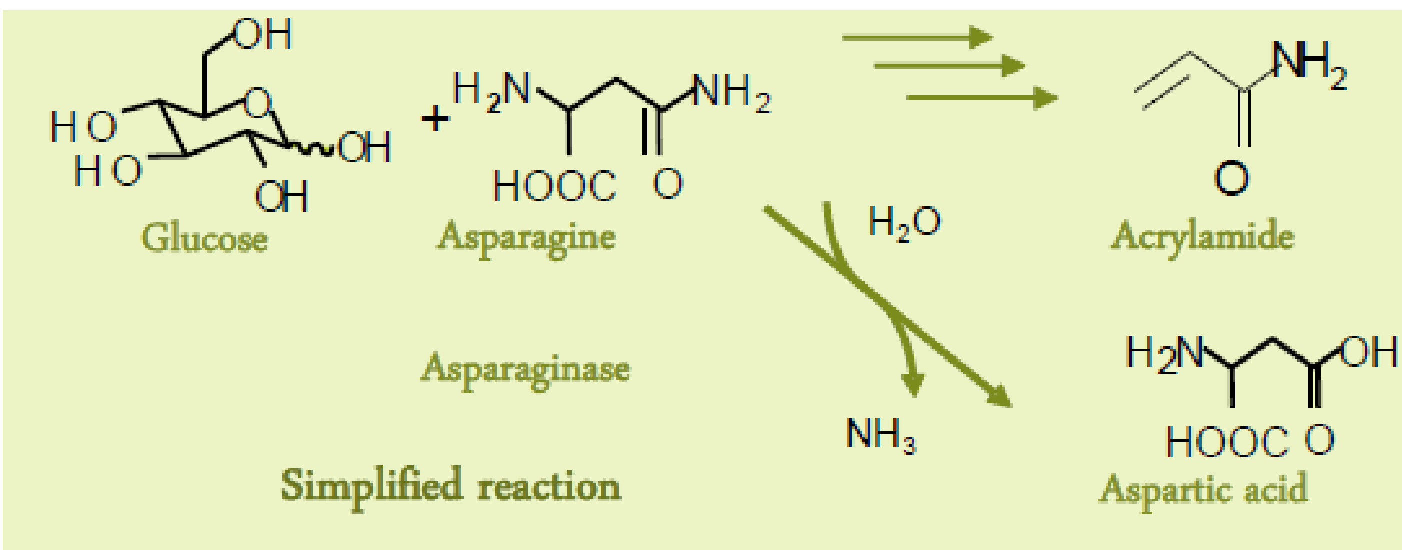
http://www.acrylaway.novozymes.com/en/Pages/default.aspx

Back to basics

Acrylamide is a chemical compound that is naturally formed in starchy foods when they are baked or fried. During heating the amino acid asparagine, naturally present in starchy foods, is converted into acrylamide in a process called the Maillard reaction. The reaction is responsible for giving baked or fried foods their flavor, crust, and brown color.

In 2007, Novozymes, the world's leading enzyme supplier, launched Acrylaway, an enzyme that reduces acrylamide formation by up to 90% in many food products. By adding Acrylaway before baking or frying the food, asparagine is converted into aspartic acid, which does not take part in the acrylamide formation.

ACRYLAWAY = ASPARAGINAZA



Asparaginazu proizvodi genetički modificirani soj *Aspergillus oryzae.*

Primjer enzimskog procesa: industrijska proizvodnja fruktoznog sirupa

***H**igh **F**ructose **C**orn **S**yrup* (HFCS)

- potražnja za šećerom kontinuirano raste:

  - šećerna repa i šećerna trska nisu idealne su za proizvodnju <u>saharoze</u> zbog klimatskih ograničenja za obje vrste i jer se <u>moraju brzo preraditi</u> (veliki udio vlage!)

  - škrob se lako čuva (zrna kukuruza su suha!) i može se dobiti iz više vrsta biljaka → <u>problem:</u> glukoza nije slatka kao saharoza!

HFCS je sirup koji se <u>dobiva iz škroba</u> → ključna reakcija je **enzimska izomerizacija** glukoze u <u>fruktozu</u>

Obrada škroba u proizvodnji HFCS:

šaržni bioreaktor

Škrobna otopina 40% wt., pH 6,5

Termamyl® (**α-amilaza**)
Vodena para
Inkubacija na 105°C, 5-7 min
→ dekstrin

Maltoza

Podesiti pH na 4,5
Sniziti temp. na 95°C
Dodati amiloglukozidazu
(**γ-amilaza**)→ glukoza

Glukoza

Sniziti temp. na 60-70°C
Propustiti kroz imobiliziranu **glukoza izomerazu**
→ fruktoza

Fruktozni sirup

Alternativni pristup: invertni sirup iz saharoze

Proizvodnja invertnog šećera (hidrolizom saharoze)

Saharoza iz š. repe

Saharoza iz š. trske

Enzim invertaza imobilizirana adsorpcijom na ionski izmjenjivač ili kovalentno vezana na makroporozni pleksiglas

BIOREAKTOR (hidroliza saharoze)

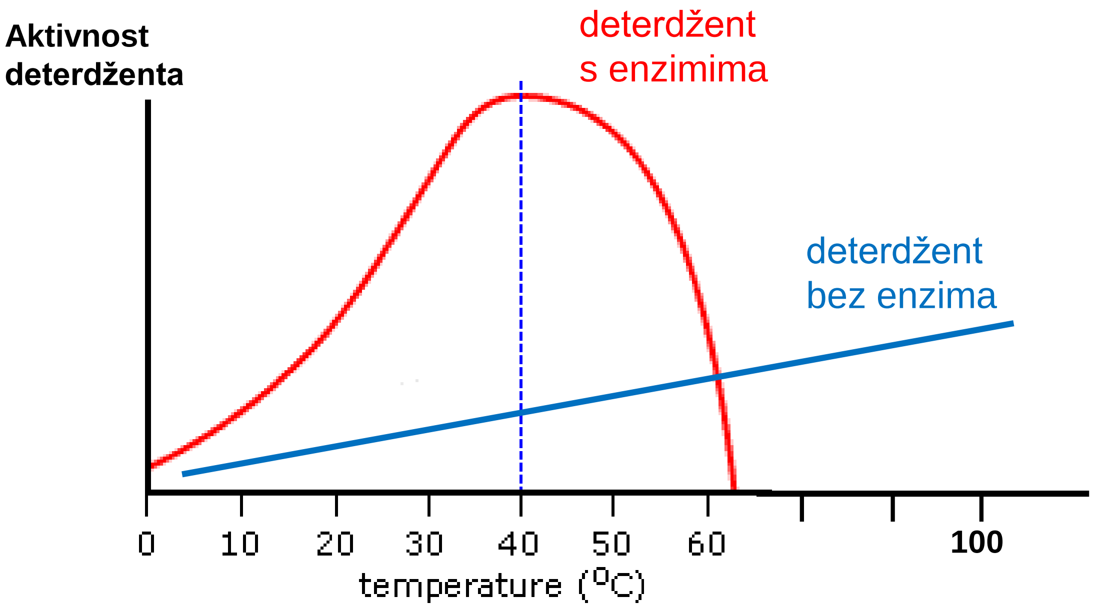
IMOBILIZIRANA INVERTAZA

INVERTNI SIRUP (90% KONVERZIJE)

https://www.youtube.com/watch?v=y0HlwMguR8M

Potpuna ili djelomična hidroliza saharoze na glukozu i fruktozu ("inverzija") daje <u>sirup koji je</u> <u>znatno stabilniji</u> (manje podložan kristalizaciji!) i slađi od čistih otopina saharoze.

Enzimi u deterdžentima:



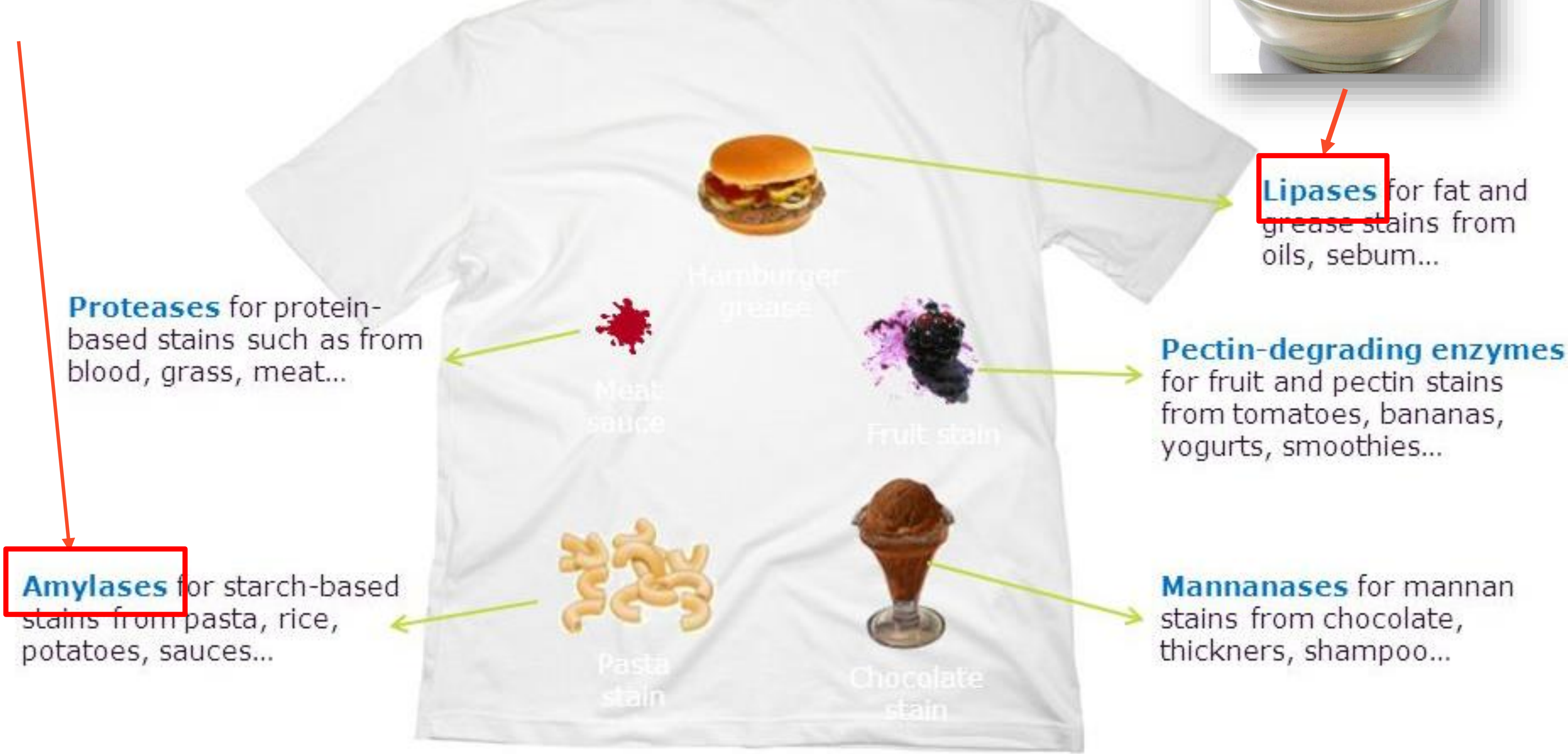
Godišnje se proizvede > 1000 t enzima za deterdžente: najviše su to rekombinantne varijante subtilizina → stabilne kod pH 10 i 60°C, otporne na izbjeljivače, surfaktante...

…u mutiranim ili genetički modificiranim bakterijama (*Bacullus sp.*) ili gljivicama (*Aspergillus sp.*)

Gen za amilazu iz vrsta *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomycetes sp.* i *Pseudomonas sp.* dodan u vrste ***Bacillus amyloliquefaciens*** ili ***Bacillus subtilis***

Gen za lipazu iz vrste *Humicola insolens* dodan u ***Aspergillus niger***

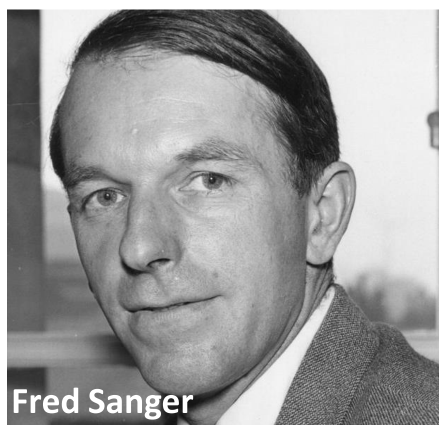
HETEROLOGNA EKSPRESIJA



Enzimi kao terapeutici: inzulin

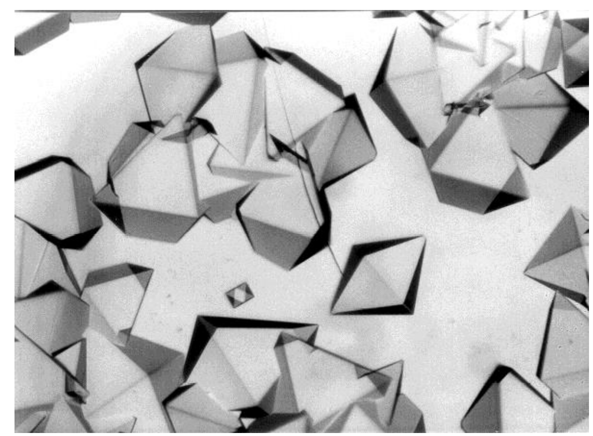
- nakon obroka raste koncentracija glukoze u krvi → gušterača luči inzulin (1.8 mg je dnevna potreba zdrave osobe)
- nedostatak inzulina → hiperglikemija →dehidracija, promjena pH krvi
- prvo rješenje: <u>svinjski inzulin</u>→ od ljudskog različit u 1 a.k.

  (Fred Sanger opisao strukturu inzulina→ Nobelova nagrada)

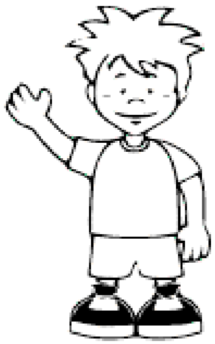

Fred Sanger
Cambridge, UK

50 svinja godišnje → za 1 pacijenta

KRISTALI INZULINA

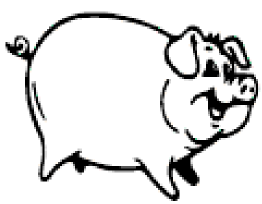


Ljudski, svinjski i goveđi inzulin:



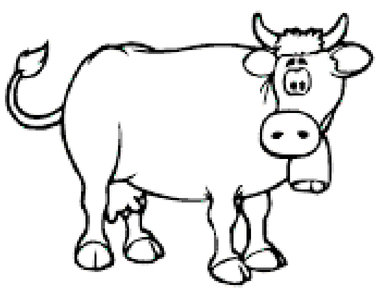
A-lanac → GIVEQCCTSICSLYQLENYCN **21 a.k.**

B-lanac → FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT **30 a.k.**



GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

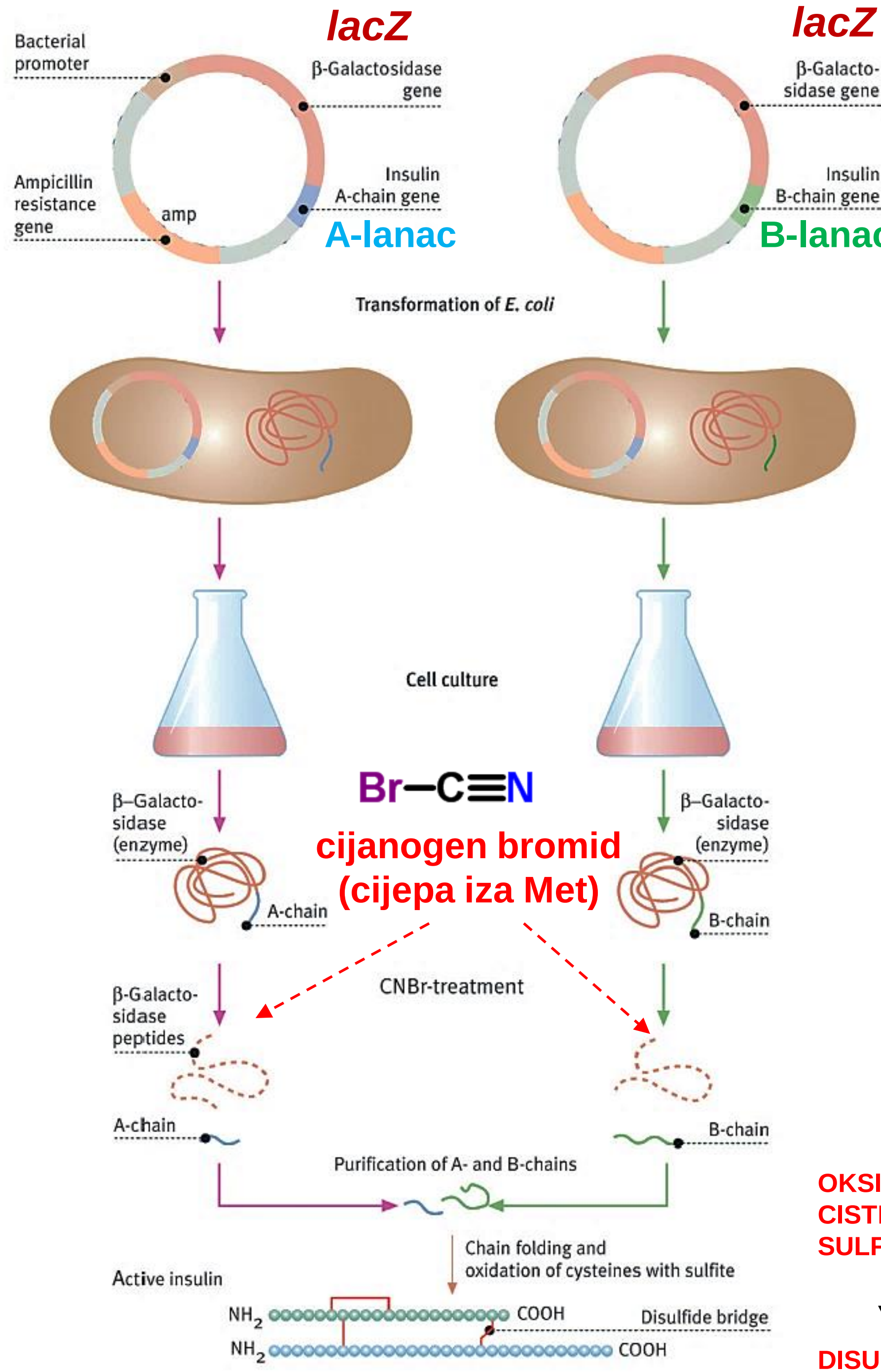


GIVEQCCASVCSLYQLENYCN

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

Proizvodnja inzulina u *E.coli*: 1. način

DNA sintetizator:



A lanac

B lanac

KLONIRANJE

plazmid 1

plazmid 2

OKSIDACIJA CISTEINA SULFITOM

↓

DISULFIDNI MOSTOVI

Najnovije “dizajnerske” varijante inzulina:

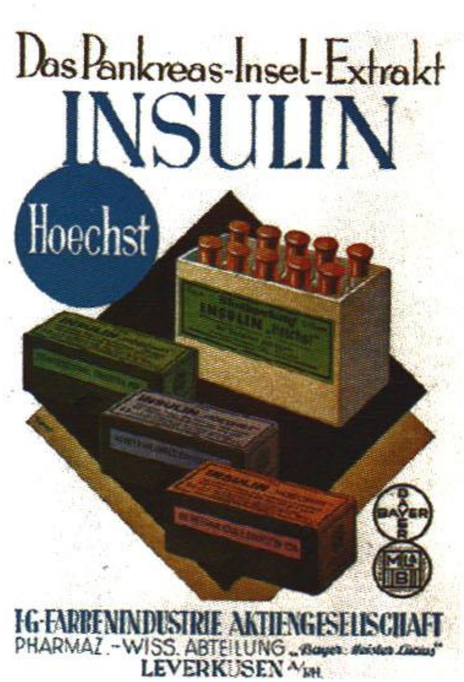
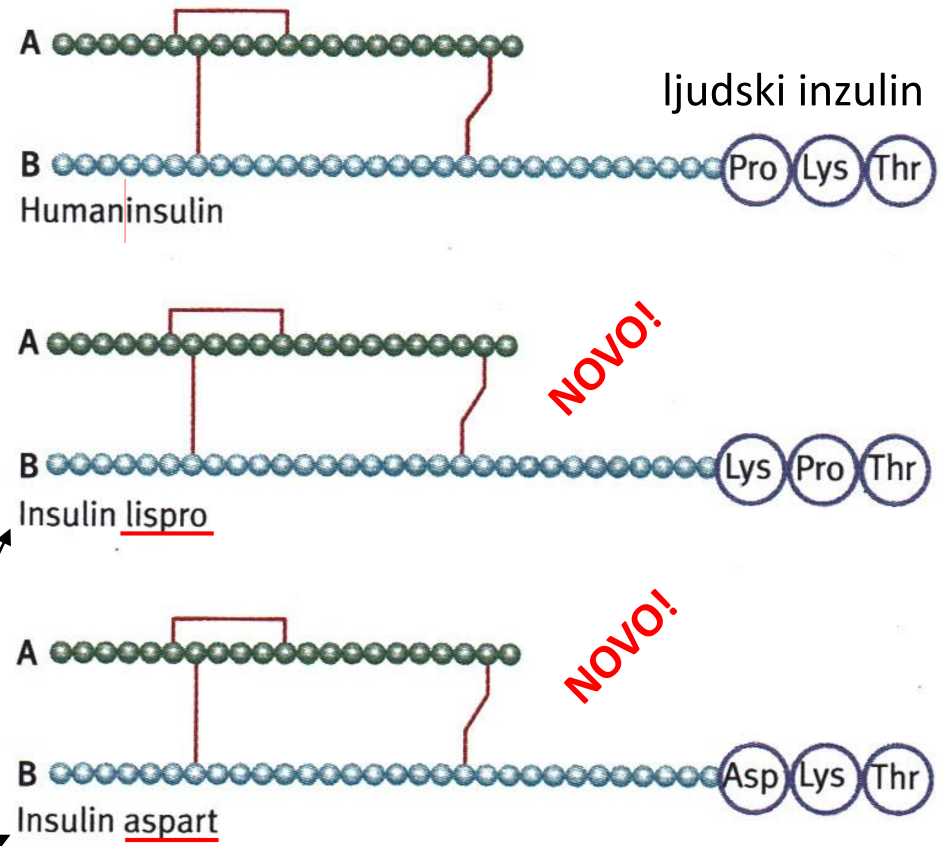


Fig.3.51 Above: Advert for pig insulin from Hoechst in the 30ies; right: Insulin variants.

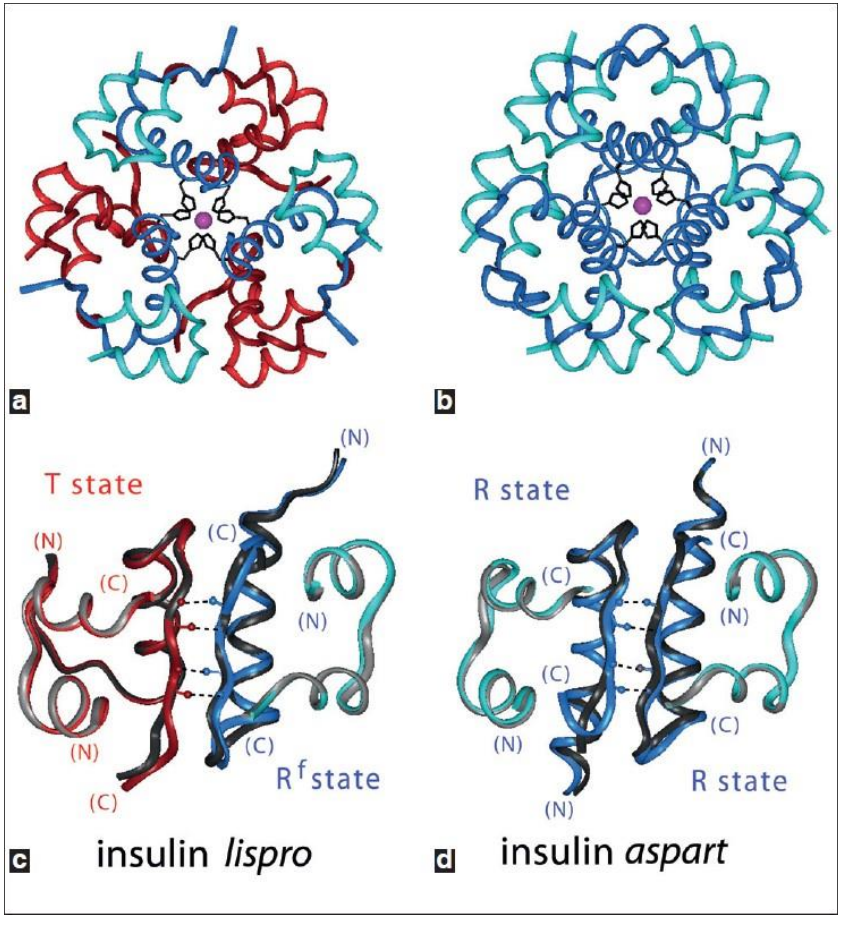


NEKAD (ŽIVOTINJSKI)

DANAS (DIZAJNIRAN)

- <u>brzodjelujući inzulini:</u> dosezanje maksimalne koncentracije aktivnog inzulina u plazmi je 60 min. (inače 90 min.)

Visokokoncentrirani inzulin je **heksamer**: mora disocirati da bi djelovao



Humilin (DT)
Lyspro
Aspart
Glargin
Detemir
Degludec

↑

<u>Vrste inzulina:</u>

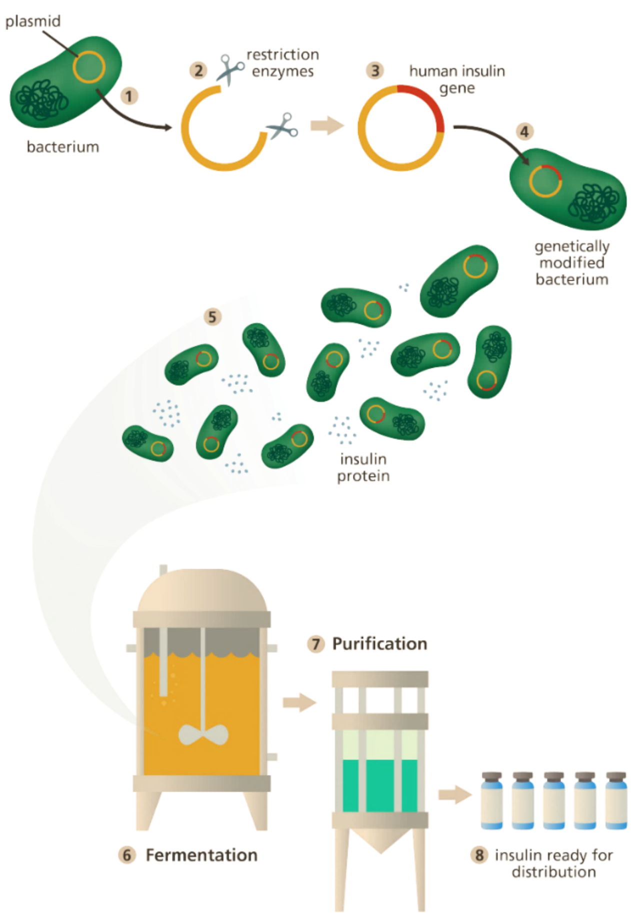
https://www.youtube.com/watch?v=SA7yCKxzzr0&nohtml5=False

<u>Proizvodnja inzulina:</u>

https://youtu.be/y_a7Y2SHTqM?t=149

https://www.youtube.com/watch?v=9CdydQNfAXE

Industrijska (bijela) i medicinska (crvena) biotehnologija:



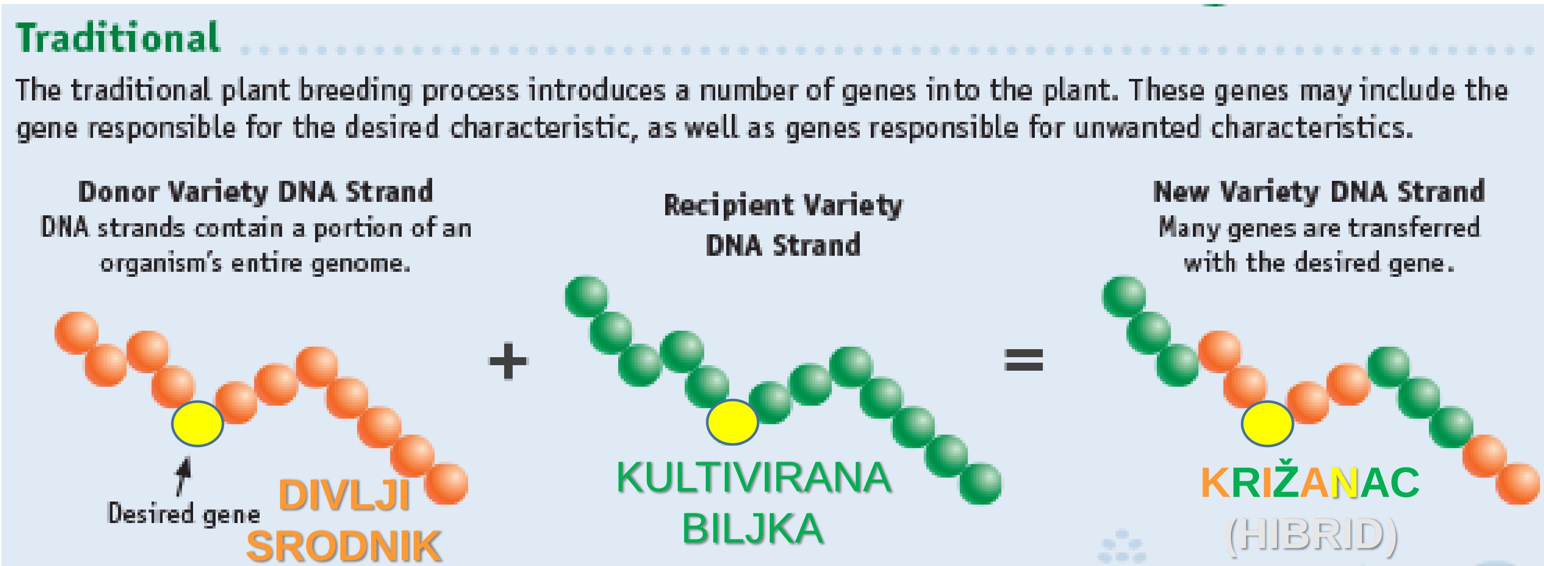
OČITA KORIST + ZATVORENI SUSTAV

Zelena biotehnologija:

KORIST SAMO ZA PROIZVOĐAČA
+ OTVORENI SUSTAV

ZELENA BIOTEHNOLOGIJA (transgenične tj.genetički modificirane biljke i životinje)

Što <u>nije</u> genetičko inženjerstvo: kontrolirana križanja



K R I Ž A N J E

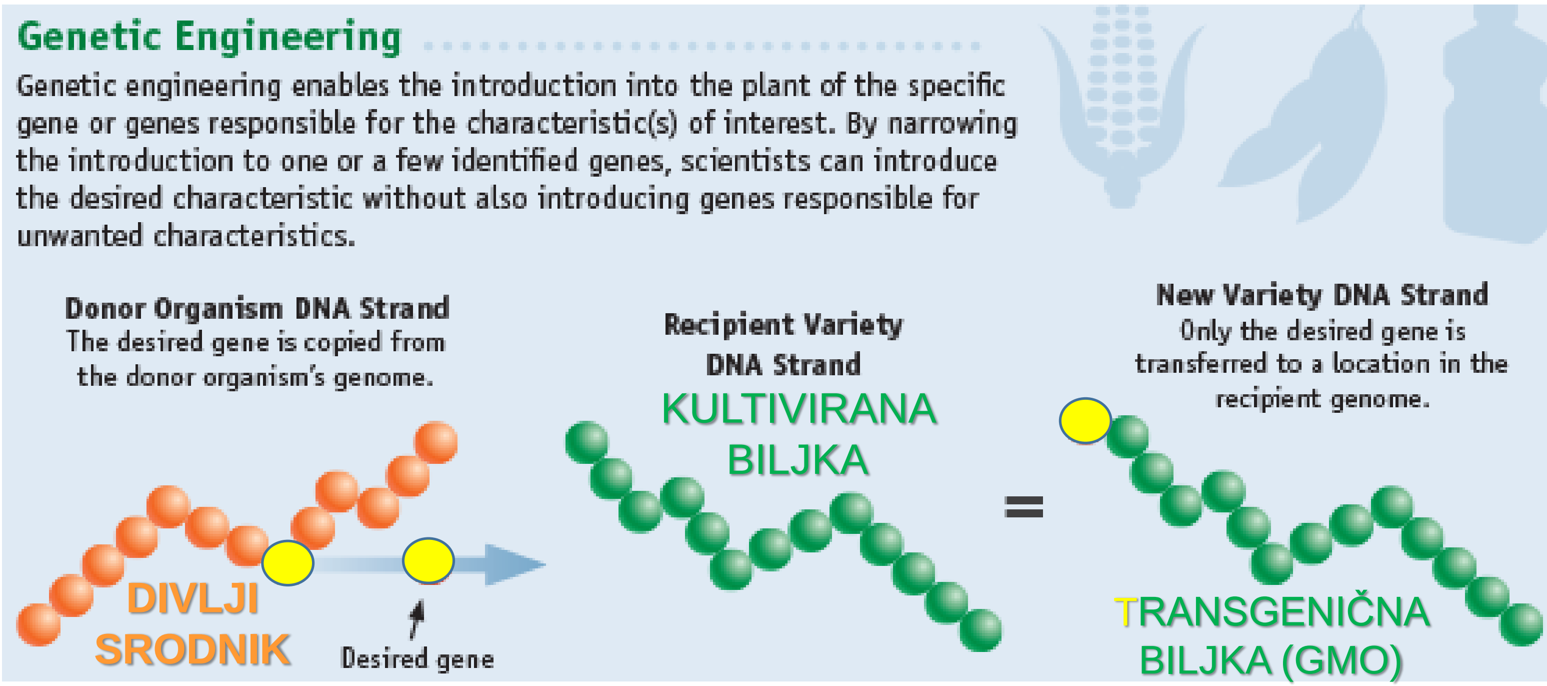
→ 50% → 75% → 87,7% → 93,75% → 96,87% → 98,45 % → → →→ 99,9%

→ 50% → 25% → 12,3% → 6,25% → 3,13% → 1,55 % → → →→ 0,1%

P1 P2 P3 P4 P5 P6, 7, 8, 9

Dugotrajan postupak + „višak” gena divljeg srodnika.

Genetičko inženjerstvo u modernom smislu:



Na ovaj način dodajemo samo željeni gen
iz divljeg srodnika.

Što nije genetičko inženjerstvo: mutageneza

- inducirana mutageneza → izazivanje mutacija kemijskim ili fizikalnim putem

Zračenje:

- X-zrake
- ɣ- zrake

KROMOSOMSKI REARANŽMANI

Kemijski mutageni:

- etil metansulfonat
- 5-bromouracil
- 2- aminopurin

TOČKASTE MUTACIJE

Mutageneza:

- nasumično izazivanje mutacija
- nepoznate promjene DNA
- selekcija poželjnog fenotipa

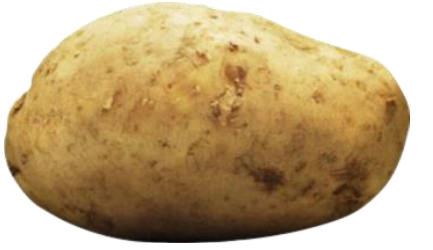
Table 1. Crops improved through induced mutation and the traits improved.

Crop	Mutagen	Trait alteration	
Rapeseed*	EMS	Increased oleic acid, reduced poly unsat. fats	(Auld et al., 1992)
Rapeseed	EMS	Sylfonyl-urea resistance	(Tonnemaker et al., 1992)
Rice	Gamma	Dwarf, high yield	(Chakrabarti, 1995)
Rice	Gamma	Thermosensitive, genetic, male sterility	(Maruyama et al., 1991)
Flax	EMS	cooking oil quality	(Rowland, 1991)
Sunflower	X-ray	High oleic acid, high palmitic	(Fernández-Martínez et al., 1997)
Apple	Gamma	Skin color	(Brunner and Keppl, 1991)
Pear	Gamma	Disease resistance	(Masuda et al., 1997)
Grapefruit	X-ray	Flesh color, seedlessness	(Hensz, 1991)
Pineapple	In vitro	Spineless	(Lapade, 1995)

* Largely adapted from Ahloowalia and Maluszynski, 2001

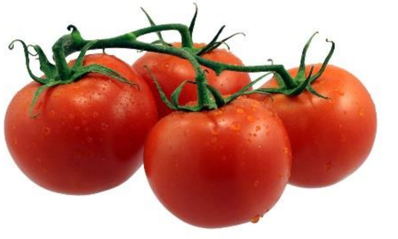
„Pomato” dobiven <u>cijepljenjem</u>, ne genetičkim inženjerstvom:

(KALEMLJENJEM)



Solanum tuberosum

\+



Solanum lycopersicum

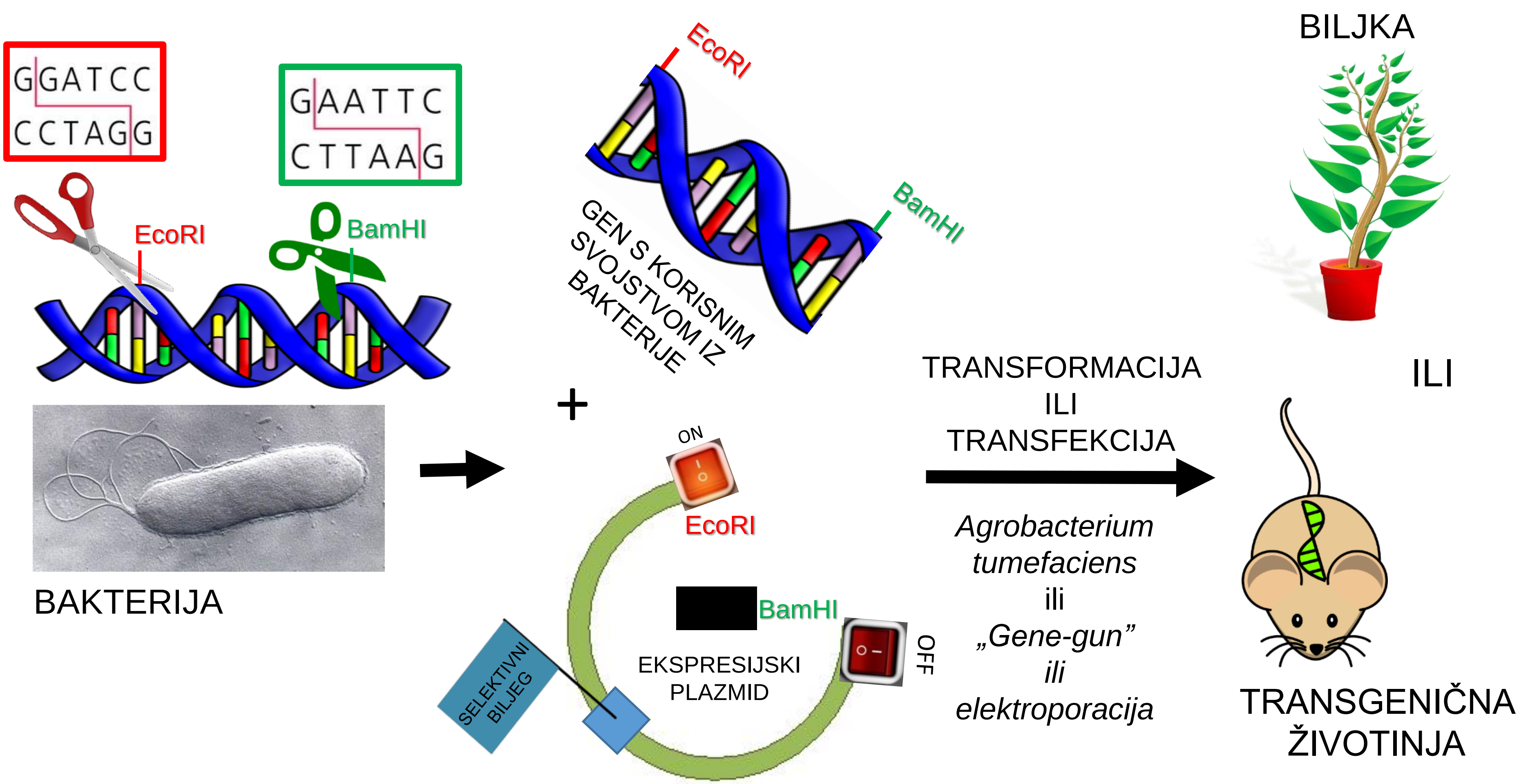
- „dvostruka” žetva
- ne može se „plagirati”

https://youtu.be/I4Ky1cyTuzk

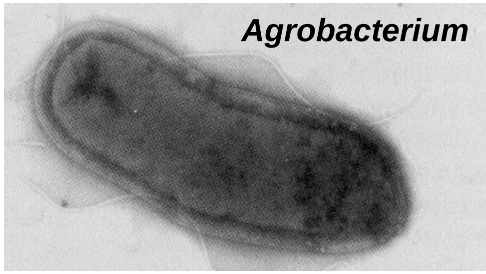
https://www.youtube.com/watch?v=j4NuN6XP7HU

Genetičko inženjerstvo u modernom smislu: otkriće restrikcijskih endonukleaza (1970.-te)

- postaje moguće ***in vitro*** prekrajanje DNA iz potpuno <u>nesrodnih</u> organizama



GMO biljke: transformacija biljnih stanica



- posredovanjem agrobakterija

  Agrobacterium tumefaciens i
  Agrobacterium rhizogenes

KOSMATO KORIJENJE

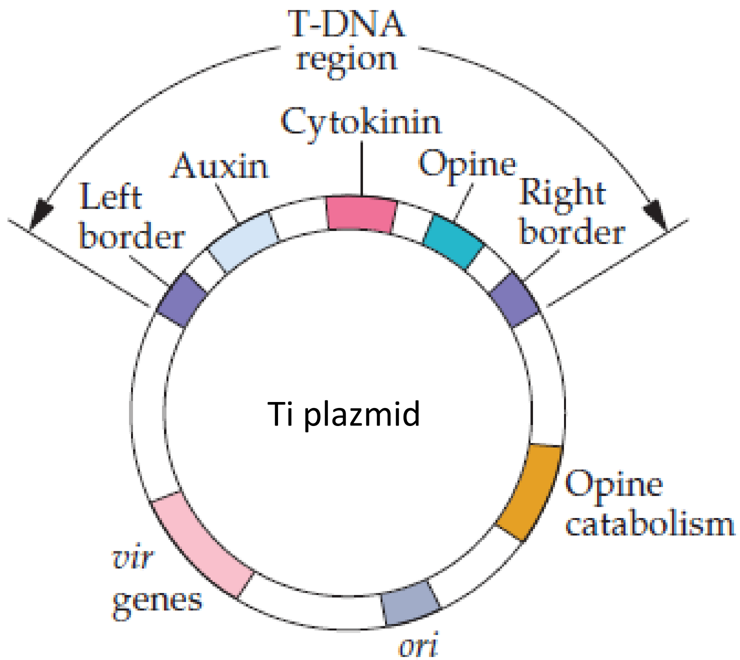
TUMOR VRATA KORIJENA

DIKOTILEDONI (DVOSUPNICE):
soja, pamuk, uljana repica itd.

- bombardiranjem tkiva
  (eng. *particle bombardment*)
  - *particle gun / gene gun / biolistic*

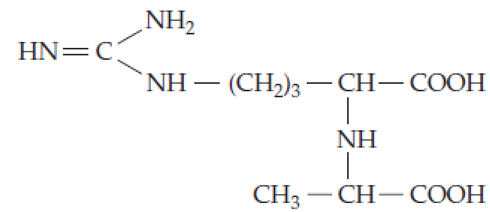
MONOKOTILEDONI (JEDNOSUPNICE):
riža, kukuruz, ječam itd.

Agrobacterium tumefaciens: prirodni “genetički inženjer”:

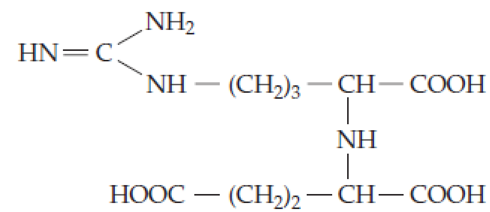


Right 5′-TGNCAGGATATATNNNNNNGTNANN-3′

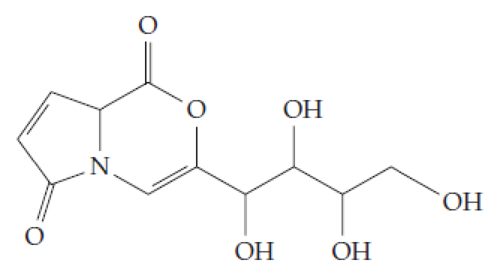
Left 5′-TGGCAGGATATATNNNNNTGTAAAN-3′



Octopine



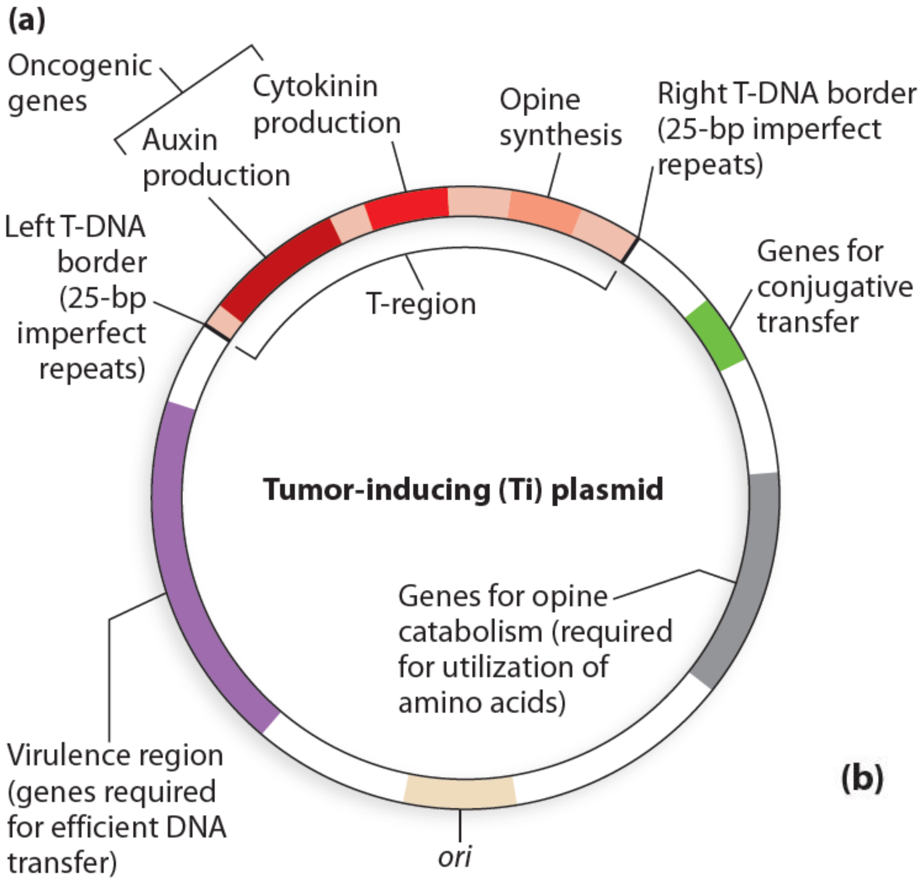
Nopaline



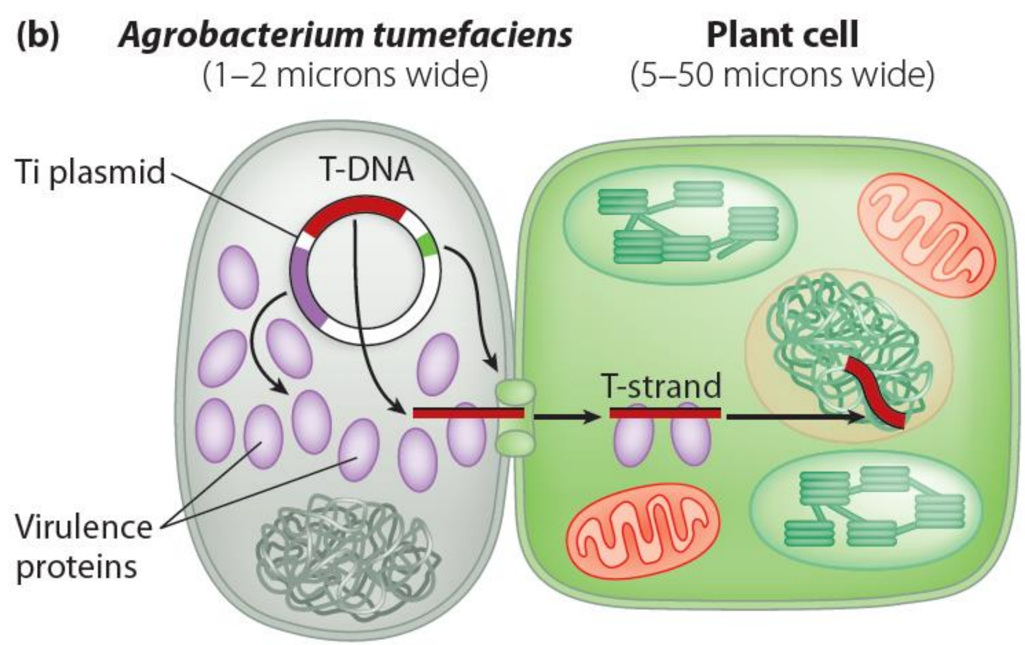
Agropine

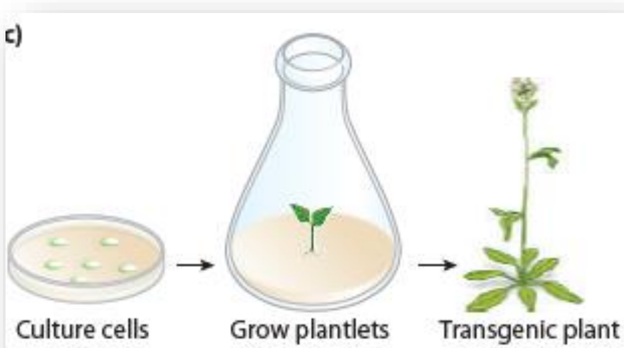
Kod prirodnih sojeva *A.tumefaciens*, tumori su “tvornica” hrane za agrobakterije.

Agrobacterium tumefaciens: prirodni genetički inženjer

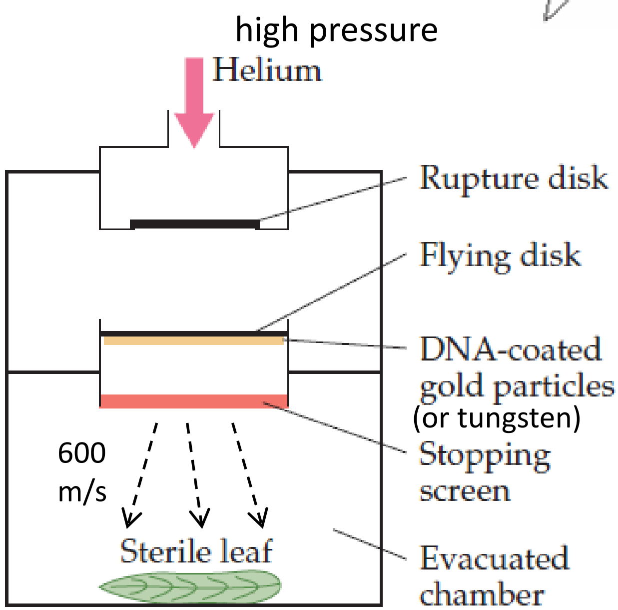


Transfer DNA (T-DNA) contains auxin and cytokinin biosynthetic genes and genes for amino acid biosynthesis.

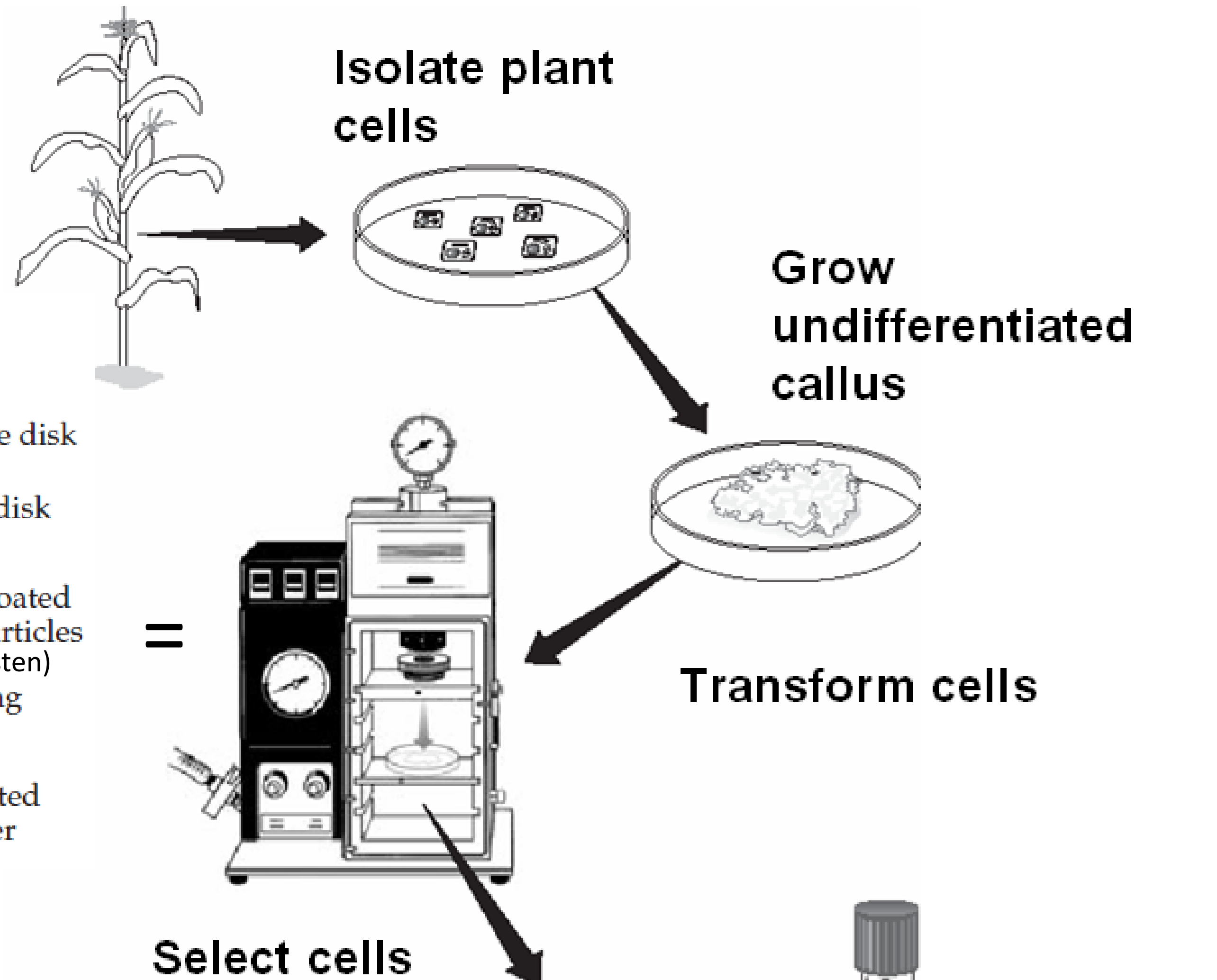


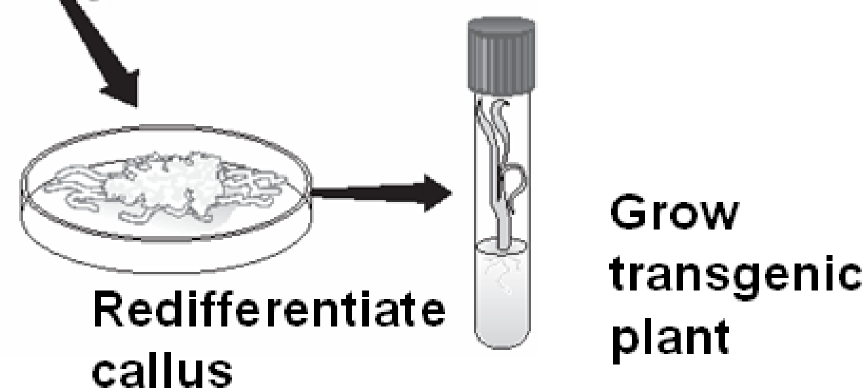


Biolistic: particle (gene) gun



=

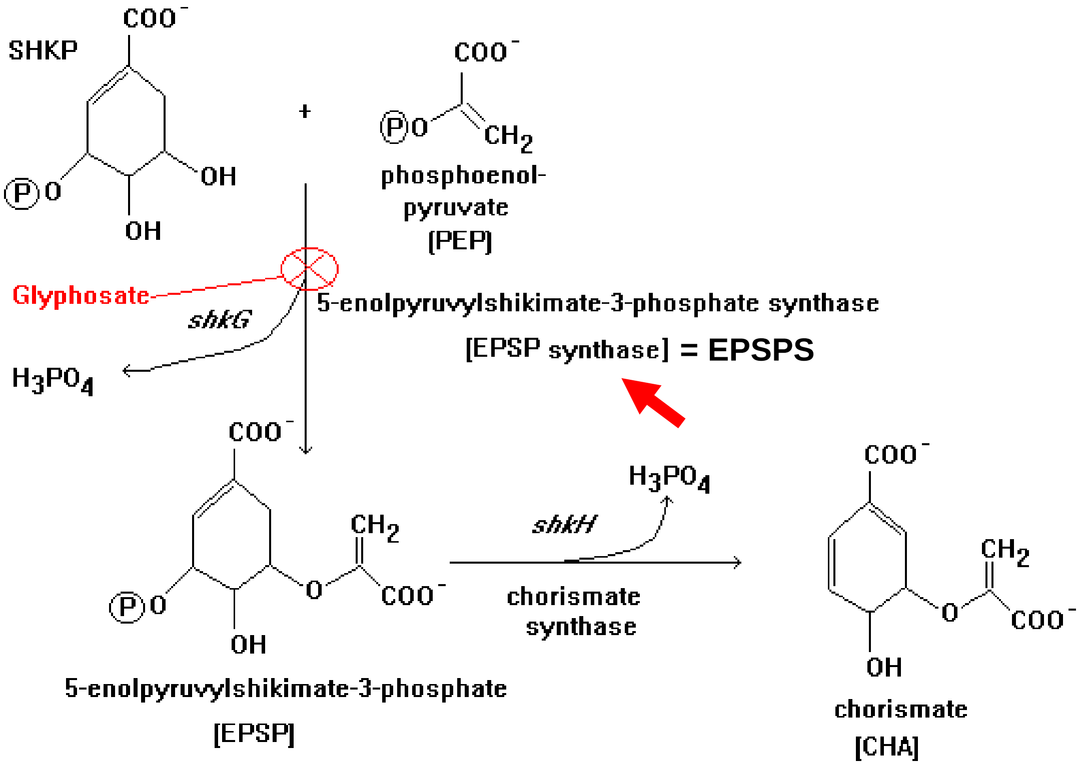


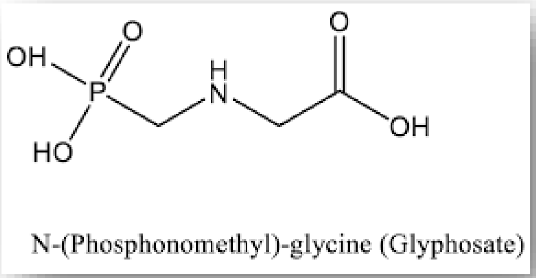


- bombardiranje “mikroprojektilima” (čestice zlata ili volframa s DNA)
- <u>ilegitimna</u> integracija DNA

Rezistencija na herbicid glifozat (*Roundup*): MONSANTO BAYER

- glifozat inhibira sintezu aromatskih a.k.

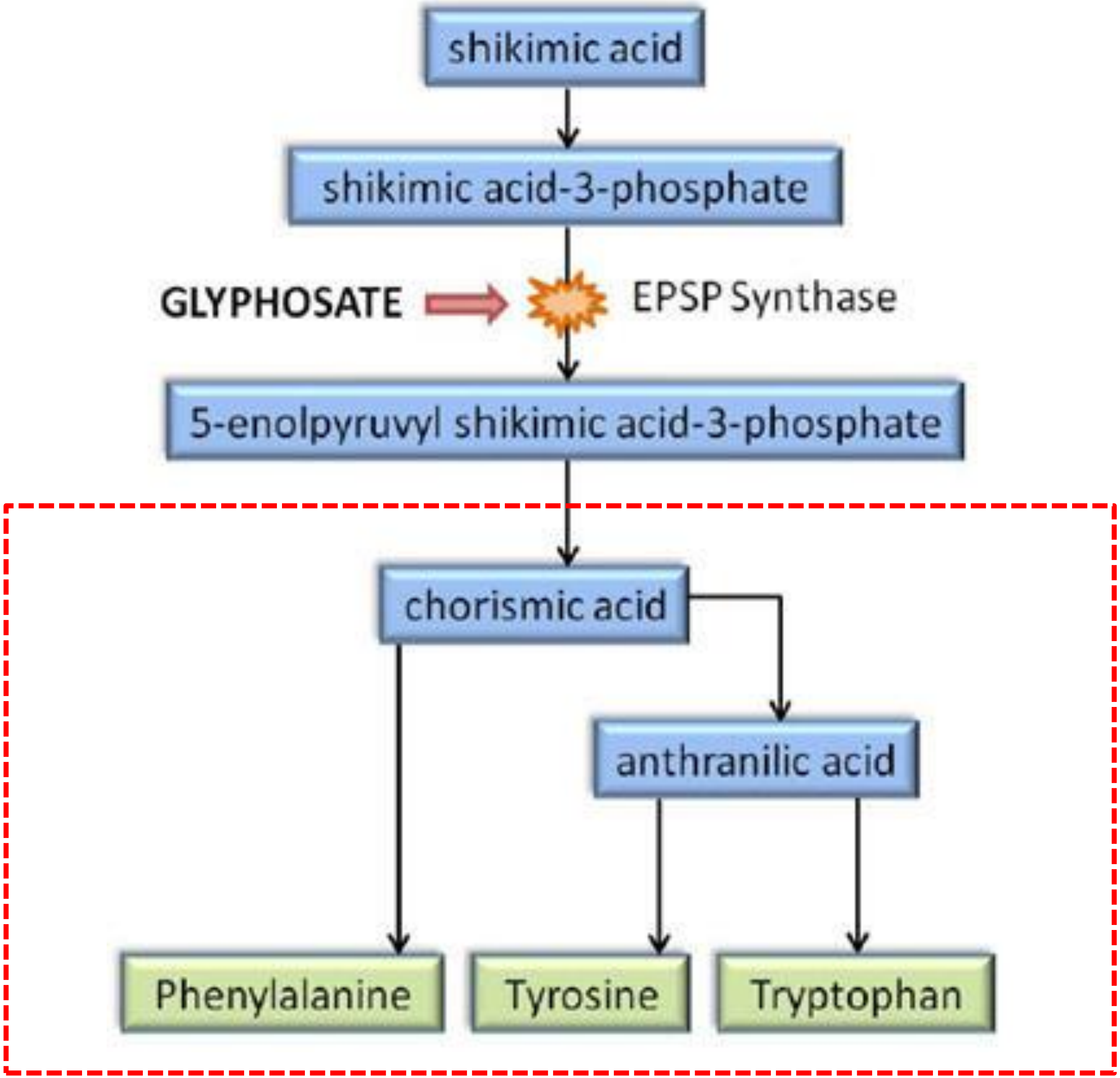




Roundup blokira sintezu aromatskih aminokiselina kod svih biljaka (sistemski herbicid): GM i non-GM!

Rezistentne GM biljke imaju <u>bakterijski enzim</u> (EPSPS) otporan na glifosat (na T-DNA).

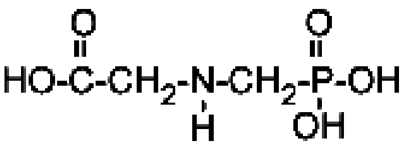
Glifozat inhibira sintezu aromatskih a.k.



Biljke <u>osjetljive</u> na *Roundup* (Monsanto → Bayer):

Šikimatna kis. + fosfoenol piruvat

+ Glifosat



Biljna EPSP sintaza

3-Enolpiruvil šikimat-5-fosfat (EPSP)

Bez aromatskih AK biljka vene

Aromatske AK

GM biljke <u>otporne</u> na *Roundup* (Monsanto → Bayer):

Šikimatna kis. + fosfoenol piruvat

+ Glifosat

Bakterijska EPSP sintaza
(T-DNA)

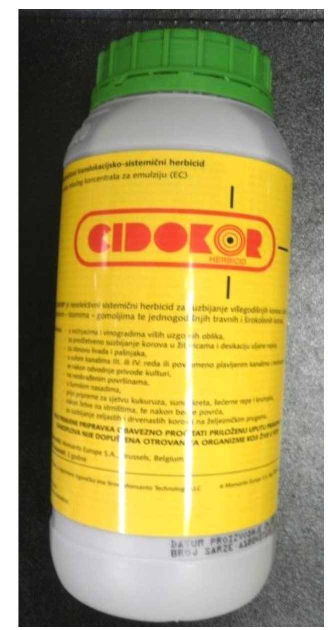
+ Glifosat

Biljna EPSP sintaza

3-enolpiruvil šikimat-5-fosfat (EPSP)

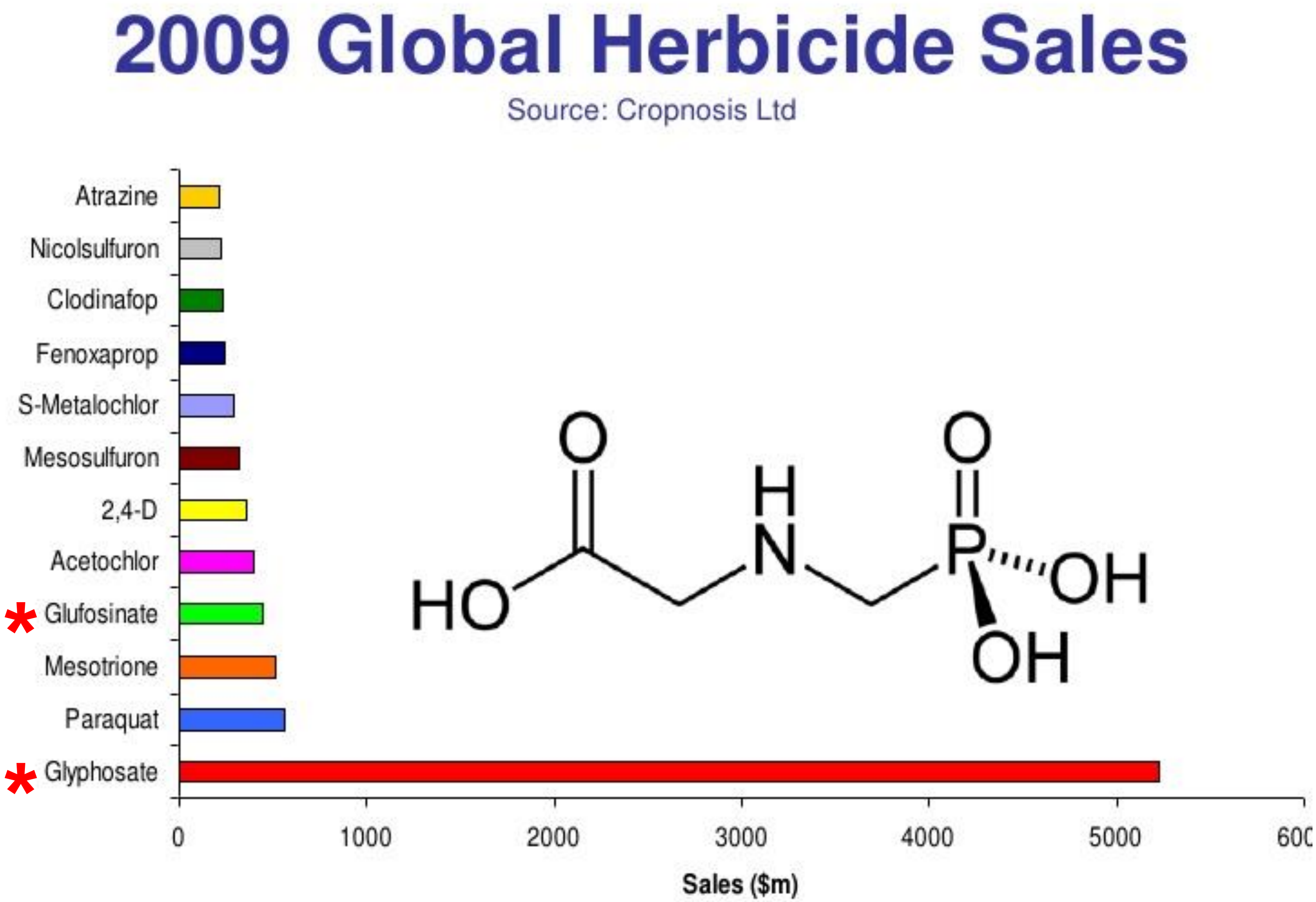
Žive (otporne) biljke

Aromatske aminokiseline

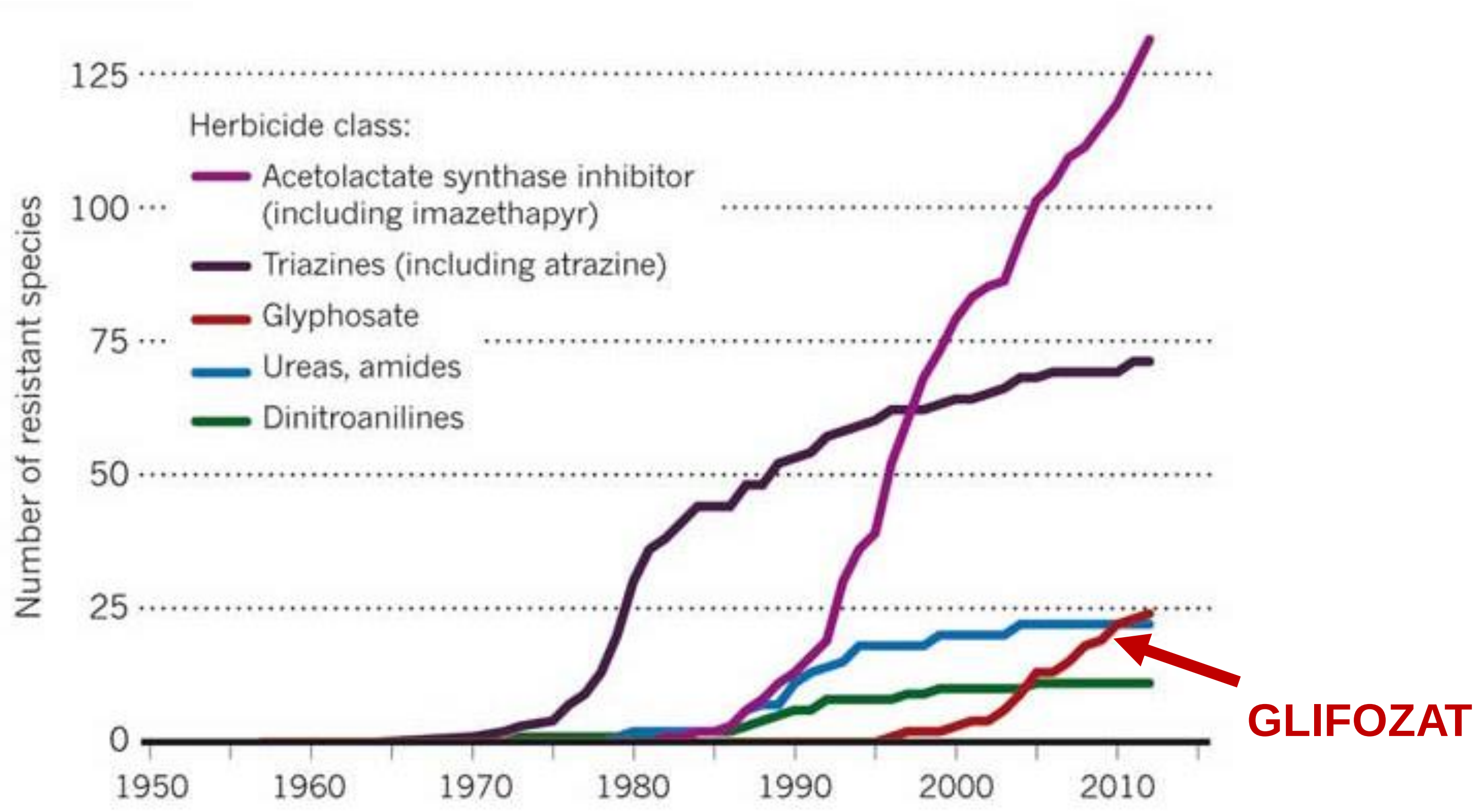


RoundUp nema učinka jer bakterijski enzim nije supstrat za vezanje glifozata.

Problem: rezistencija na herbicide



Problem: rezistencija korova na herbicide



Rezistancija se javlja na sve herbicide (GM & non-GM kontekst).

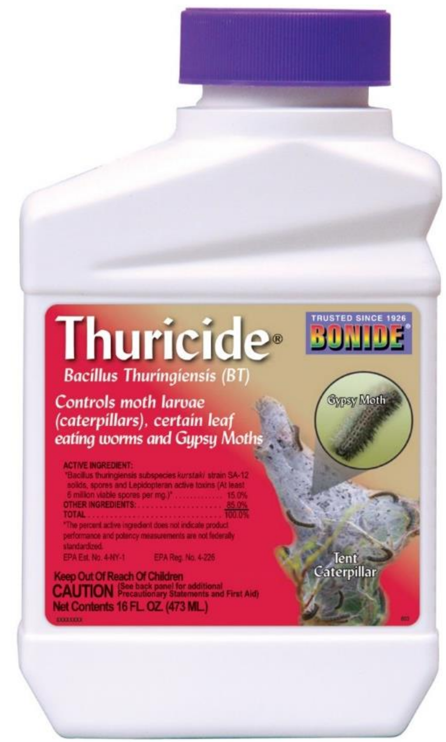
„Rješenje": prskanje korova s većom koncentracijom herbicida.

Novi problem: GM biljka ima svoj maksimum tolerancije.

Bt kulture: otpornost na insekte

- Bt toksini su za insekte toksični bakterijski proteini
  - nakupljaju se u sporama bakterije *Bacillus thuringiensis,* čine kristale koji su toksični za insekte
  - sinteza toksina kodirana *cry* genima
  - GM biljke s dodanim *cry* genima su otporne na insekte

Bt toksin u ekološkoj poljoprivredi: različite formulacije su na tržištu od 1961.



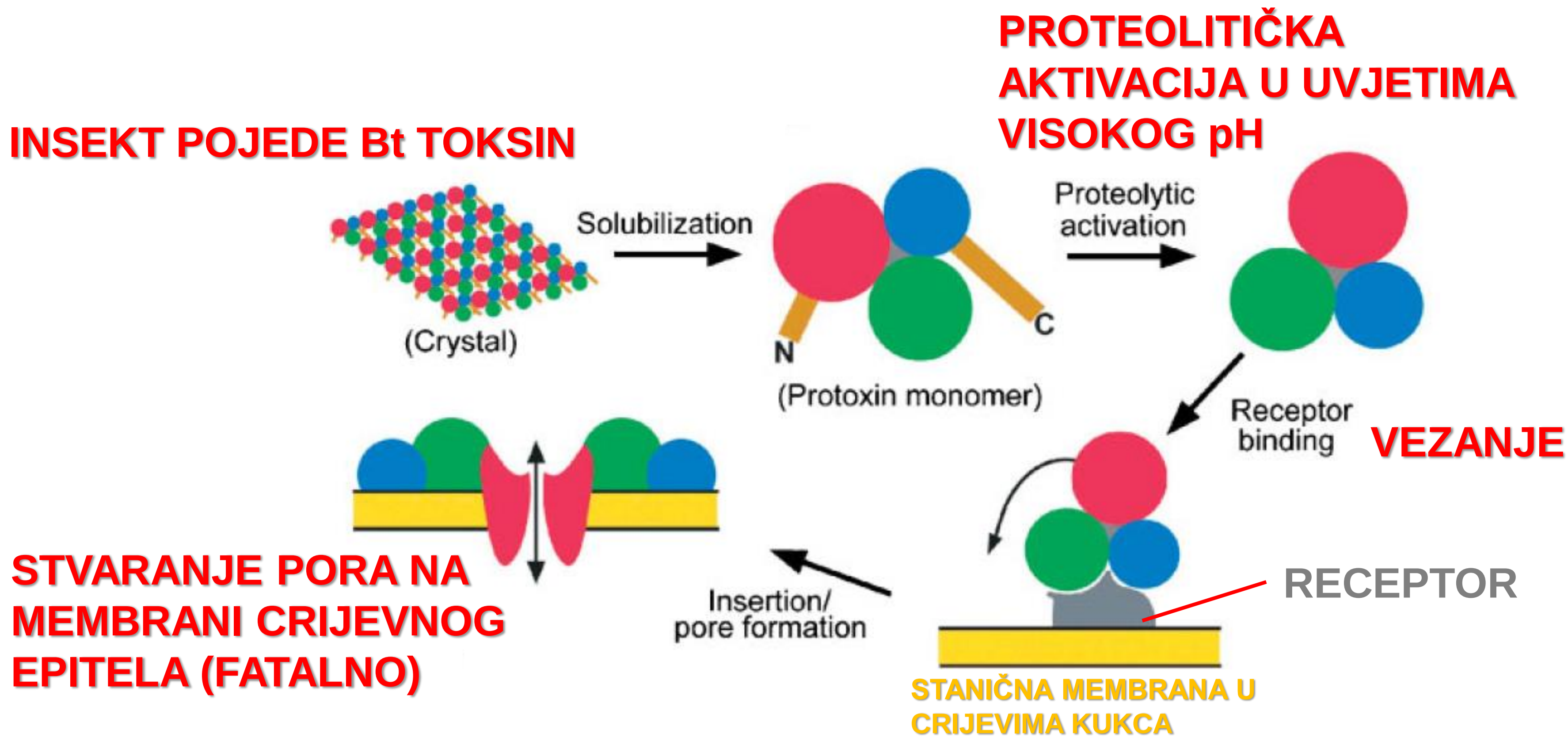
- „organski” *Bt* insekticid, ali i konvencionalni insekticidi apliciraju se na površinu biljke → insekti unutar bilje su nedostupni
- *Bt* toksin koji proizvode GM biljke eksprimiraju se u svim stanicama → insekt se ne može „sakriti” dublje u tkivo

Table 1. Insect-resistant transgenic plants expressing *B. thuringiensis* toxins.

Crop plant	Toxin	Target insect	Reference
Alfalfa	cry1Ca	*Spodoptera litoralis* (Boiusduval) (Lep.)	Sthrizhov *et al*. (1996)
Broccoli	cry1C	*Plutella xylostella* (L.) (Lep.)	Zhao *et al*. (2001)
Cabbage	cry1Ab	*P. xylostella*	Bhattacharya *et al*. (2002)
Canola	cry1Ac	*Thrichoplusia ni* (Hübner) (Lep.), *Spodoptera exigua* (Hübner), *Heliothis virescens* (Fabr.), *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.)	Stewart *et al*. (1996b)
	cry1Ac	*P. xylostella*	Ramachandran *et al*. (1998)
Cotton	cry1Ab	*H. virescens*, *H. zea*	Perlak *et al*. (1990)
	cry1Ac and cry2Ab	*S. exigua*, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lep.)	Adamczyk *et al*. (2001)
Eggplant	cry1Ab	*Leucinodes orbonalis* Guenée (Lep.)	Kumar *et al*. (1998)
	cry3A	*Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.)	Jelenkovic *et al*. (1998)
Corn	cry1Ab	*Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lep.)	Koziel *et al*. (1993)
	cry9c	*O. nubilalis*	Jansem *et al*. (1997)
Poplar	cry1Aa	*Lymantria dispar* (L.) (Lep.)	McCown *et al*. (1991)
	cry3Aa	*Chrysomela tremulae* F. (Col.)	Cornu *et al*. (1996)
Potato	cry1Ab	*Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lep.)	Peferoen *et al*. (1992), Rico *et al*. (1998)
	cry1Ab	*Heliothis armigera* (Hübner)	Chakrabarti *et al*. (2000)
	cry3Aa	*L. decemlineata*	Adang *et al*. (1993), Perlak *et al*. (1993) Coombs *et al*. (2002)
Rice	cry1Ab	*Chilo supressalis* Walker (Lep.)	Fujimoto *et al*. (1993)
	cry1B	*C. supressalis*	Marfa *et al*. (2002)
		Cnaphalocrosis medinalis Guenée (Lep.)	Wunn *et al*. (1996)
	cry1Ac, cry2A and GNA	*C. medinalis*, *Scirpophaga incertulas* Walker (Hom.) *Nilaparvata lugens* Stål (Hom.)	Maqbool *et al*. (2001)
	cry1Ab and cry1Ac	*C. supressalis*	Cheng *et al*. (1998)
Soybean	cry1Ac	*H. virescens*, *H. zea* *P. includens*	Stewart *et al*. (1996a)
Tobacco	cry1Aa	*Manduca sexta* (L.) (Lep.)	Barton *et al*. (1987)
	cry1Ab	*M. sexta*	Vaeck *et al*. (1987)
	cry1Ab and cpTI	*M. sexta*	Perlak *et al*. (1991)
	cry1Ab	*M. sexta*	Williams *et al*. (1993)
	cry1Ac	*H.virescens*, *H. zea*, *S. litoralis*	McBride *et al*. (1995)
	cry1C	*S. litoralis*	Strizhov *et al*. (1996)
	cry2A	*H. armigera*	Selvapandiyan *et al*. (1998)
	cry2A	*H. virescens*, *H. zea* *S. exigua*	Kota *et al*. (1999)
Tomato	cry1Ab	*H. virescens*	Fischolff *et al*. (1987)
	cry1Ac	*H. armigera*	Mandaokar *et al*. (2000)

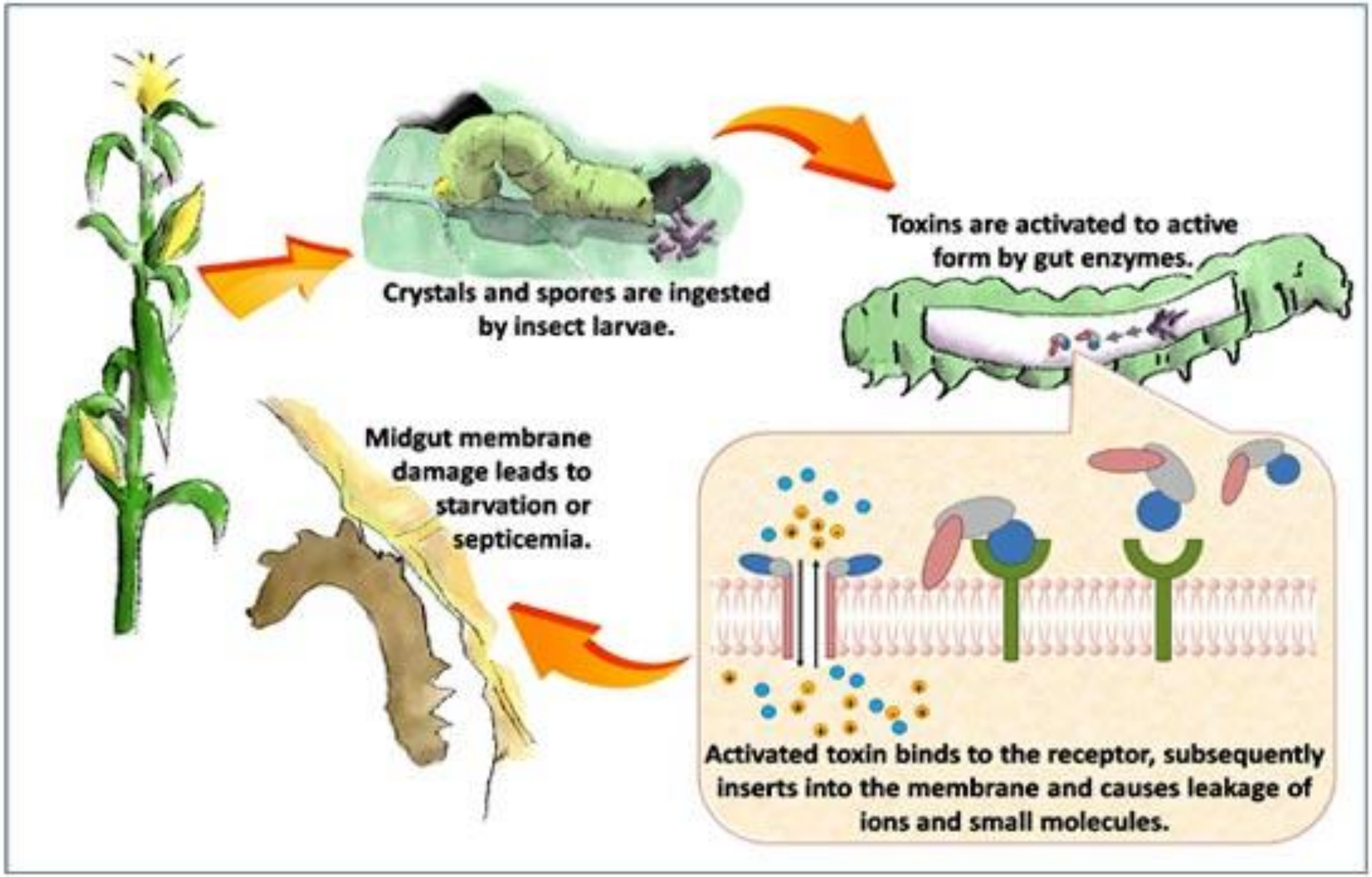
Lep = Lepidoptera; Col = Coleoptera; Hom = Homoptera

Bacillus thuringiensis: mehanizam djelovanja Bt toksina



- vezanjem *Bt* toksina (Cry proteina) na odgovarajući membranski receptor stanična membrana crijevnog epitela kukca postaje propusna (kralješnjaci nemaju taj receptor)
- različite varijante *Bt* toksina za različite redove insekata: *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* te nematode

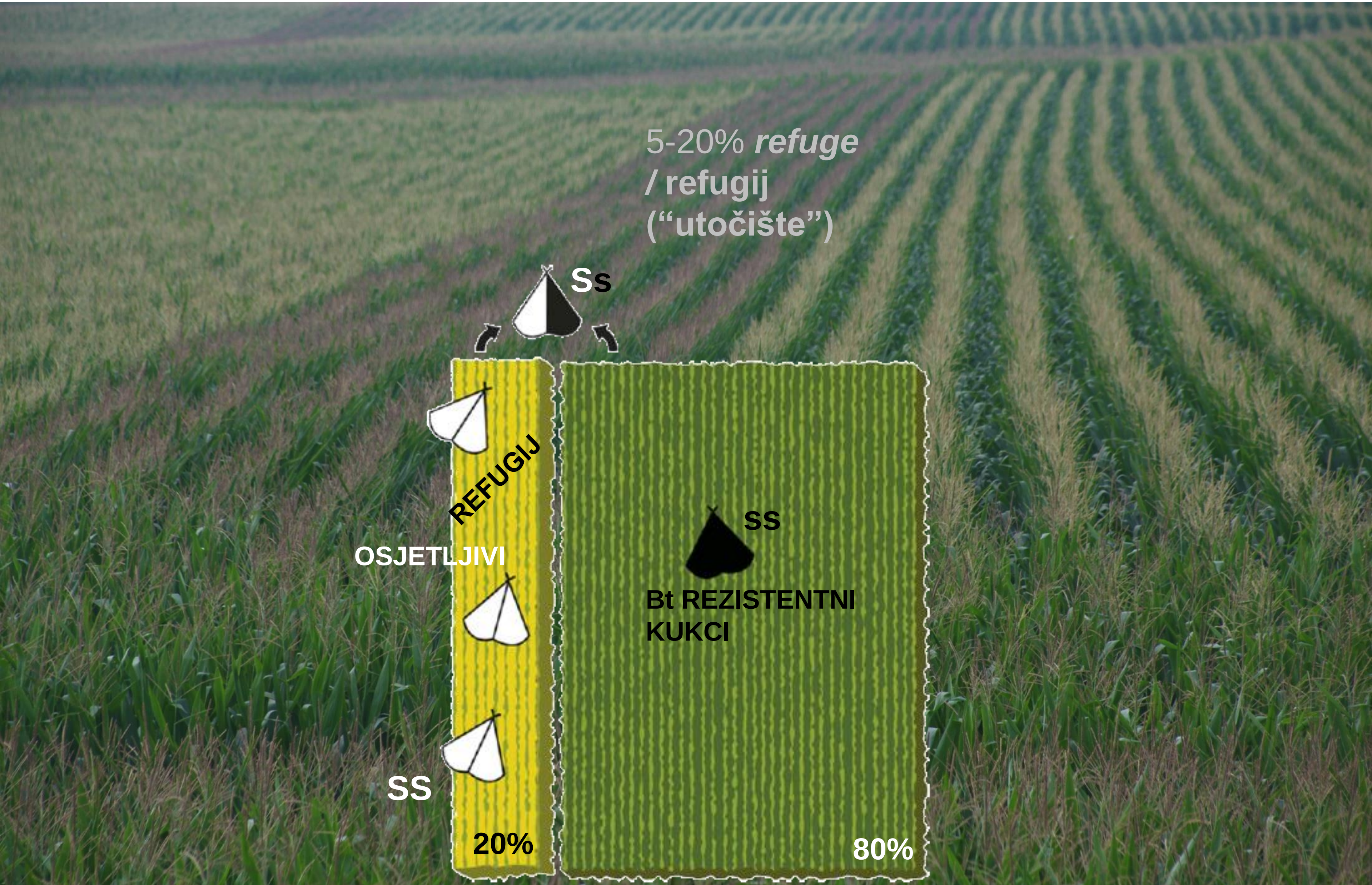
Djelovanje *Bt* toksina: razvoj rezistencije



<u>Problem:</u> pojava rezisencije na *Bt*

<u>Rješenje:</u> sađenje pojasa *običnog* kukuruza→ osjetljive biljke

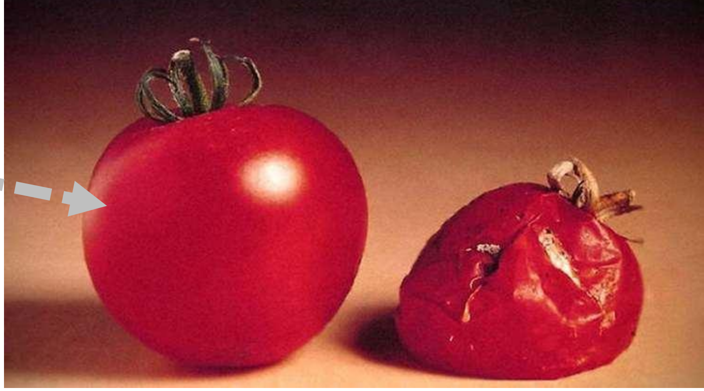
Strategija sprječavanja brzog širenja otpornosti na *Bt* toskin:



Obavezna sadnja refugij zone: ovisi o zakonodavstvu zemlje

- u zemljama koje su provodile ovu mjeru ni 25 godina od početka upotrebe nema razvoja rezistencije na Bt
- još jedna strategija: rotacija različitih Bt kultura

“*FlavrSavr*” rajčica (1994.)



Zrioba voća i povrća – etilen (eten)

– voće i povrće se bere zeleno te se naknadno tretira etilenom

Prva GM hrana na tržištu : *Flavr Savr* rajčica

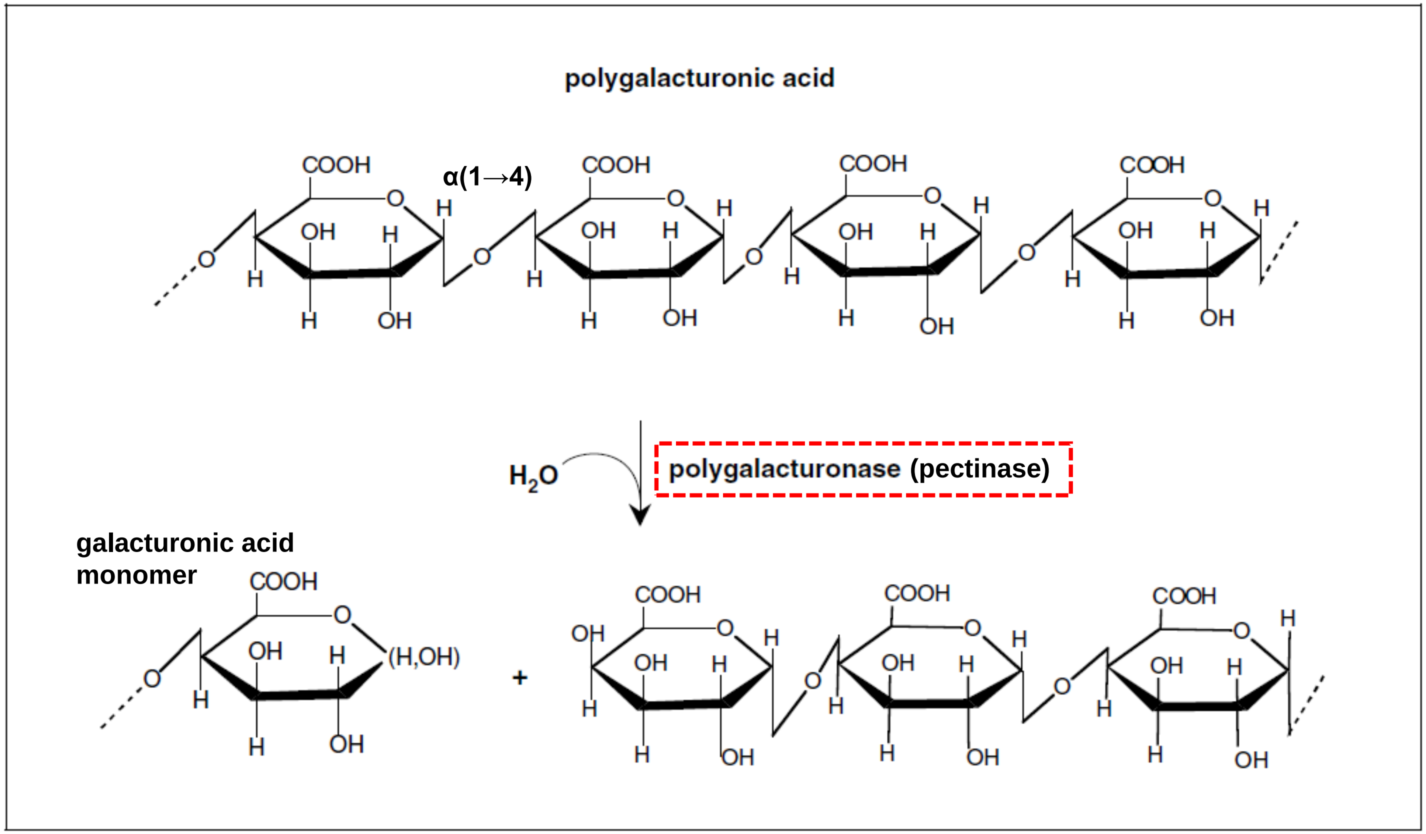
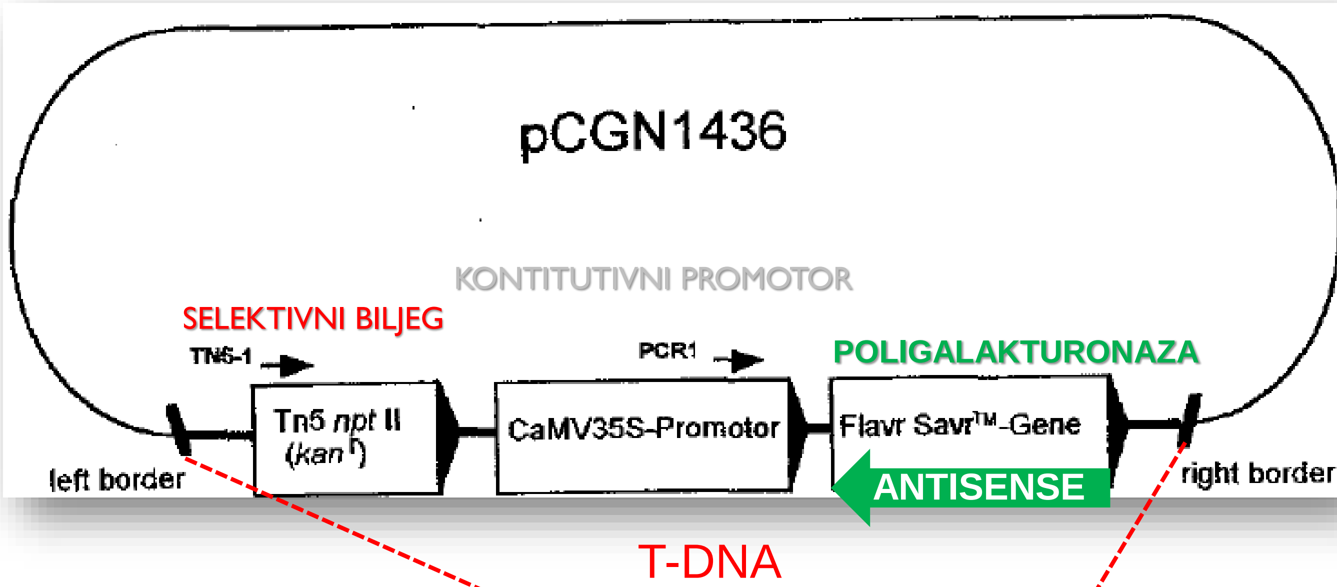


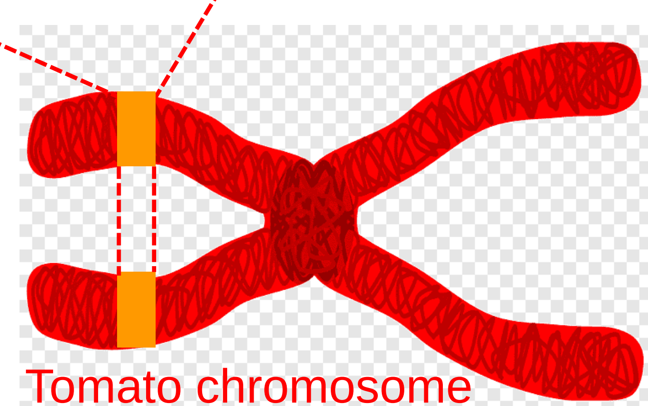
Figure C1.2.1 Reaction catalyzed by polygalacturonase.

Sazrijevanje rajčice je usporeno zbog stabilne strukture pektina → kasnija berba (razvijanje prirodne arome).

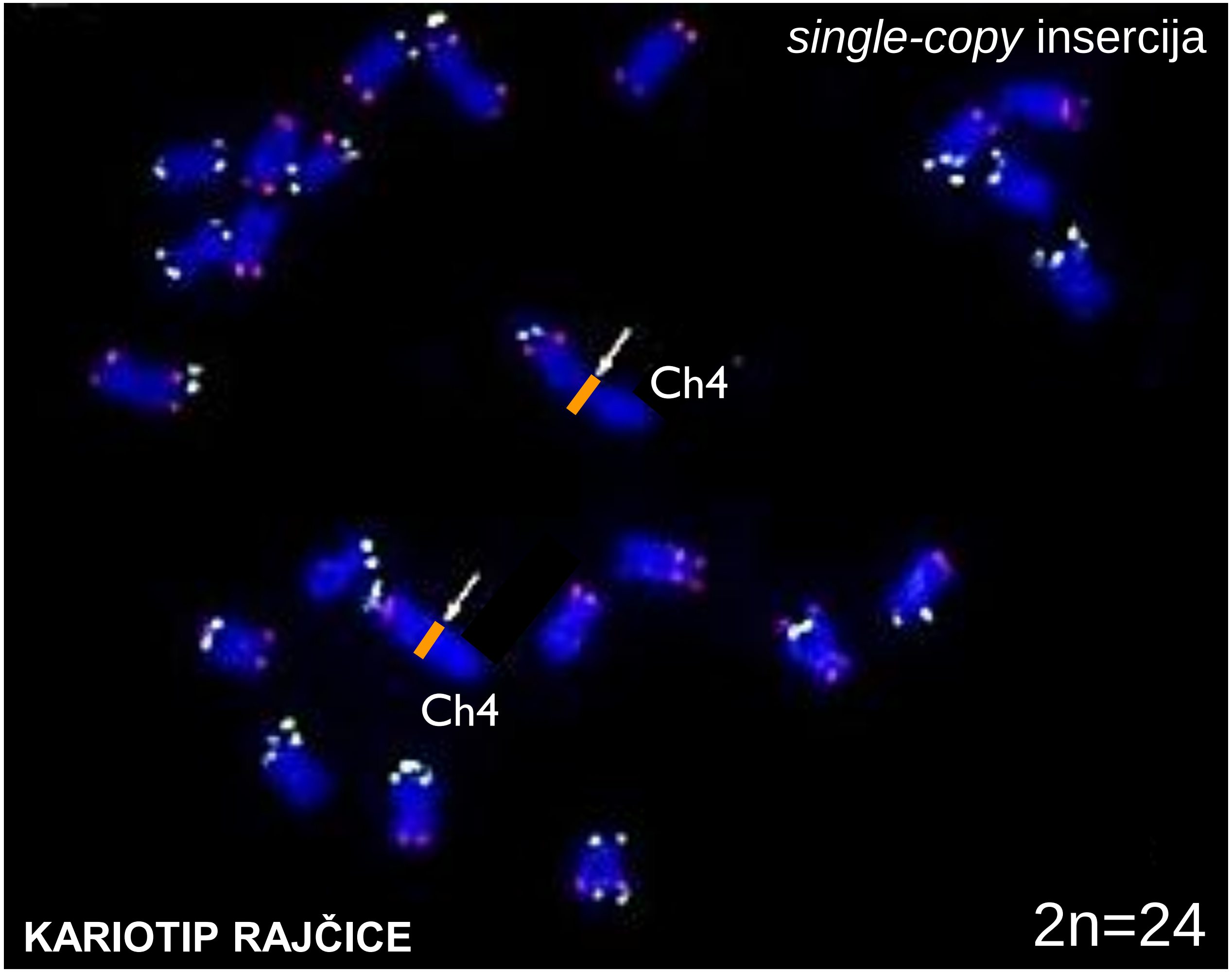
Prva GM hrana na tržištu : *Flavr Savr* rajčica

Binarni vektor (plazmid)



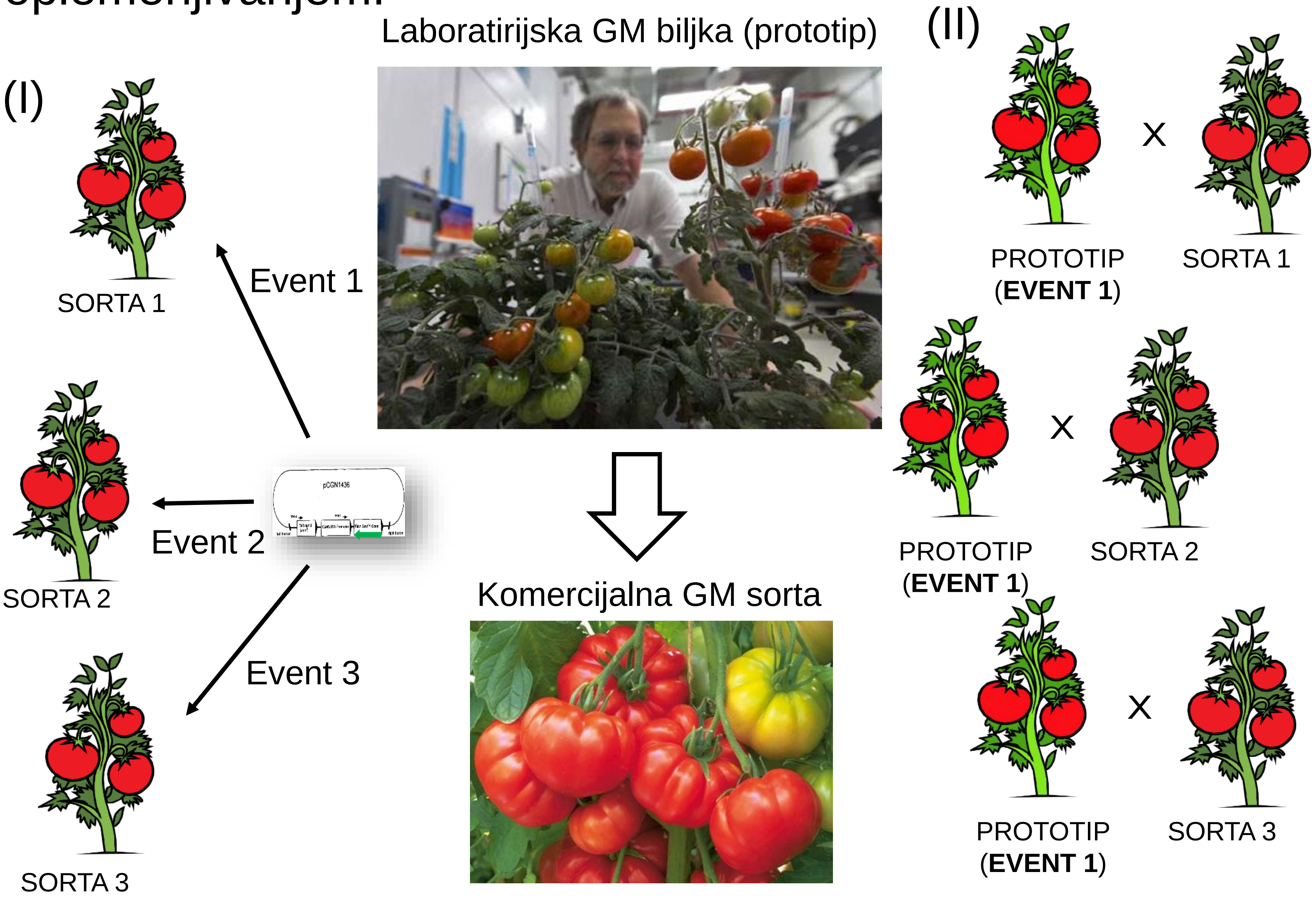


Kromosomi GM rajčice:



- genom rajčice: 790.000.000 nukleotida
- veličina transgena (T-DNA): ~ 4.000 nukleotida
- udio dodane DNA u genomu: 0,0005 %

Genetičko inženjerstvo se kombinira s klasičnim oplemenjivanjem:

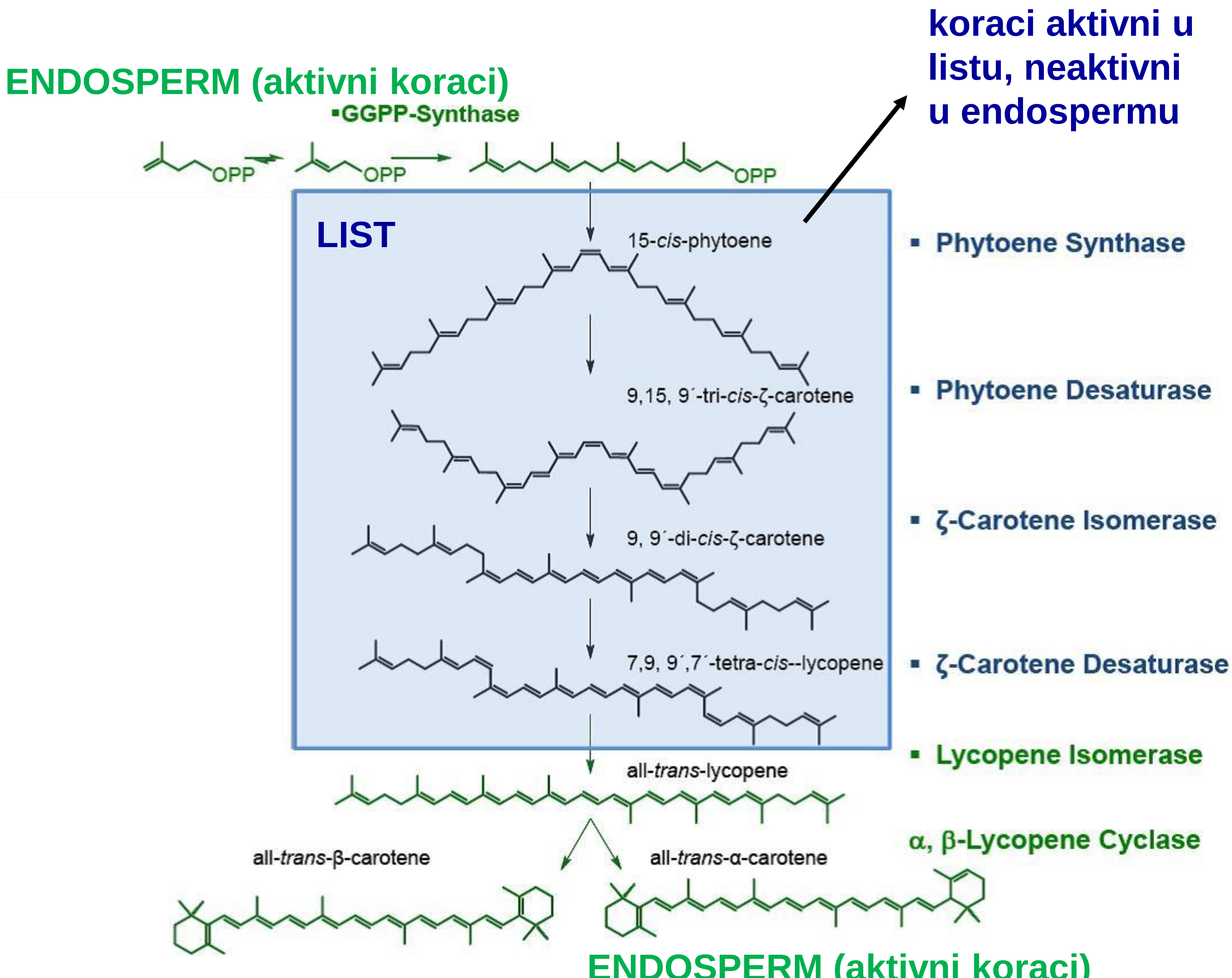


Zlatna riža:

- nedostatak β-karotena (provitamina A) uzrokuje sljepoću 350.000 djece god. (provitamin A → vitamin A ili retinol)

- kako povećati količinu β-karotena u endospermu (ljuštene) riže?

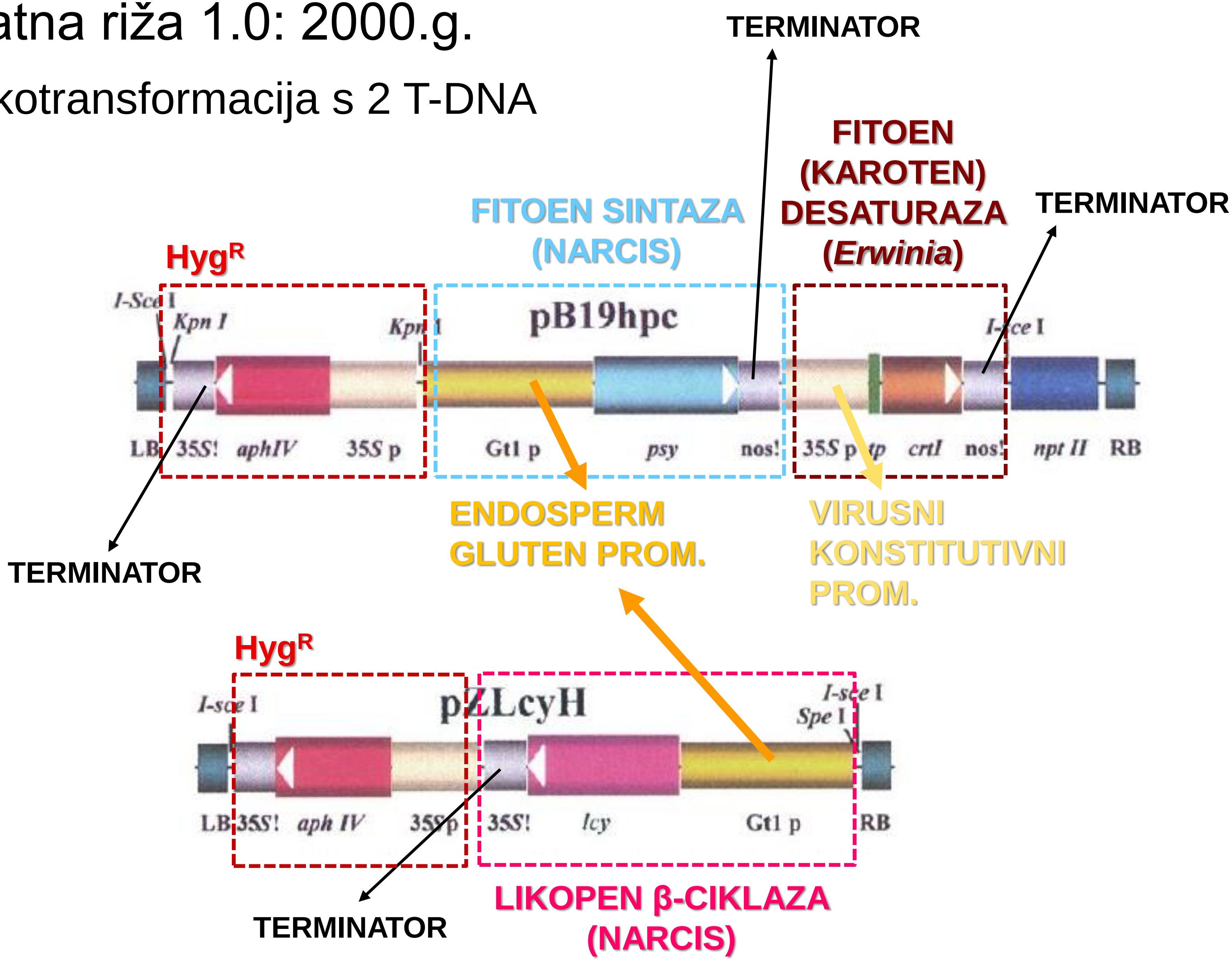
Zlatna riža:



ENDOSPERM (aktivni koraci)
koraci aktivni u listu, neaktivni u endospermu
▪GGPP-Synthase
OPP
OPP
OPP
LIST
15-cis-phytoene
▪ Phytoene Synthase
9,15, 9´-tri-cis-ζ-carotene
▪ Phytoene Desaturase
9, 9´-di-cis-ζ-carotene
▪ ζ-Carotene Isomerase
7,9, 9´,7´-tetra-cis--lycopene
▪ ζ-Carotene Desaturase
▪ Lycopene Isomerase
all-trans-lycopene
α, β-Lycopene Cyclase
all-trans-β-carotene
all-trans-α-carotene
ENDOSPERM (aktivni koraci)

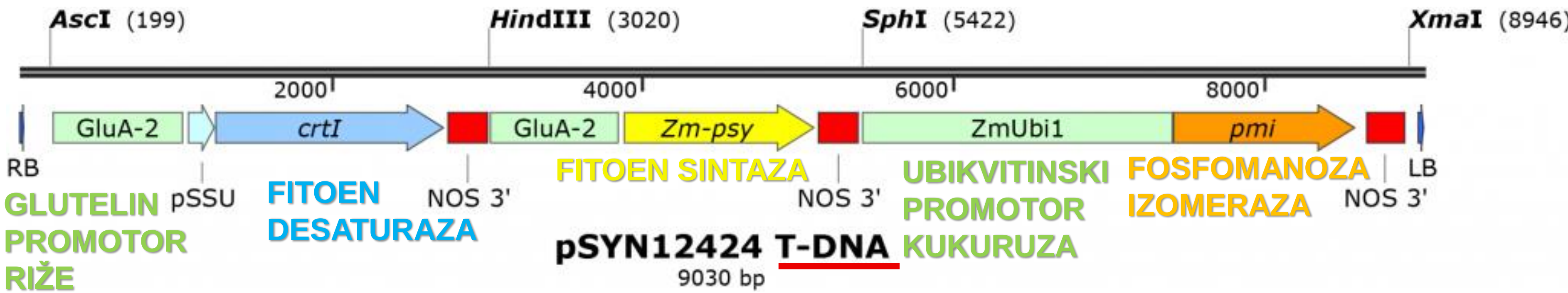
Zlatna riža 1.0: 2000.g.

- kotransformacija s 2 T-DNA



Zlatna riža 2.0: 2005.

- transformacija s 1 T-DNA



FITOEN SINTAZA (*psy*)- kukuruzni enzim (*Zea mays*), umjesto narcisa

FITOEN DESATURAZA (*crtI*)- bakterijski enzim (*Erwinia uredovora*)

FOSFOMANOZA IZOMERAZA (*pmi*)- selektivni marker (*E.coli*)

Zlatna riža 2.0:

- postignuta je željena količina provitamina A

0 μg/g **1,6 μg/g** **31 μg/g β-karotena**

Golden rice 1.0 Golden rice 2.0

- pojačana ekspresije gena → više β-karotena
- fitoen sintaza iz kukuruza efikasnija od one iz narcisa
- ima ~20 puta više β-karotena od 1. generacije zlatne riže

Nature Biotechnology, May 2005

Javno-privatno partnerstvo:

- *Syngenta*:

  Dr. Adrian Dubock

- Akademija:

  Prof. Ingo Potrykus (Švicarska)

  Prof. Peter Beyer (Njemačka)

THE ROCKEFELLER FOUNDATION

syngenta

http://www.goldenrice.org/

Zlatna riža 1.0 i 2.0 su zapravo bile laboratorijske linije → *proof of concept*

Problemi na putu do tržišta: administrativni i NGOs

… devastacija poljskih pokusa
na Filipinima

GREENPEACE

Međutim, osnovni problem bio je tehničko-regulatorni:

Os var. japonica (cultivar *Taipei 309*)

<u>23 *event*-a:</u>

I) GR2G (nedostaje sekvenca!)

II) GR2R (niski prinosi → mutacija!)

III) GR2E (konačno dobar *event* !)

APLIKACIJA REGULATORNIM TIJELIMA → DOZVOLA (DEREGULACIJA)

Golden rice 2.0 (prototip)

Os var. indica cultivars:

PSB Rc82

BR29

IR64

IR36

SORTA 1

SORTA 2

SORTA 3

SORTA 4

Zlatna riža je „deregulirana” / autorizirana u više zemalja:

Event Name: GR2E

Event Code : IR-00GR2E-5
Trade Name: Golden Rice

Crop: *Oryza sativa L.* - Rice

Basic Information | Authorizations | Documents and Links

Summary of Regulatory Approvals: Country, Year and Type of Approval

Country	Food direct use or processing	Feed direct use or processing	Cultivation domestic or non-domestic use
Australia	2017		
Canada	2018		
New Zealand	2017		
Philippines	2019 *	2019 *	2021
United States	2018	2018	

* point mouse arrow over year for notes

Last updated: July 23, 2021

Autorizacija u tijeku: Indija, Bangladeš, Vijetnam, Indonezija…

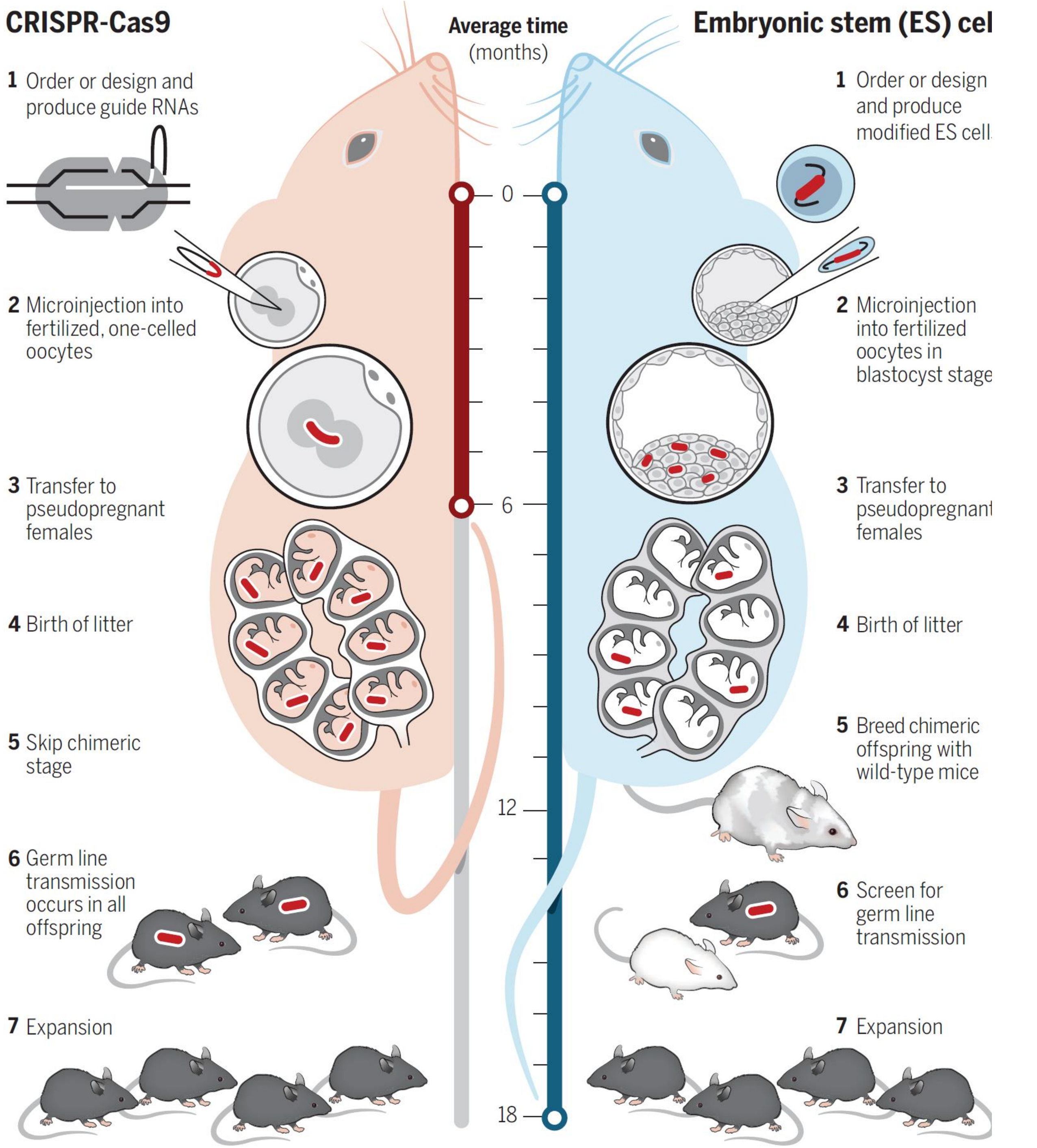
Dopušten (komercijalni) uzgoj na Filipinima 2021.

Kako se dobivaju transgenične životinje?
(tj. životinje sa stranim genima)

- *gene gun* (čestice zlata prekrivene s DNA)
- unos gena pomoću „razoružanih” virusa (ne mogu stvarati nove viruse); kapacitet >8 kb
- direktno <u>mikroinjektiranje</u> u zigotu
- *in vitro* unos stranog gena u EMS, te vraćanje transformiranih EMS u blastocistu (EMS-embrionalne matične stanice)

Najpoznatije transgenične životinje su KO (*knock-out*) miševi:

- koriste se u eksperimentima
- služe kao modeli za ljudske bolesti
- obično imaju inaktiviran samo jedan gen (zanima nas fenotip)



Transgenične životinje na tržištu:

Životinje:

- transgenični losos (brži rast)

- transgenične akvarijske ribice (fluoresciraju u akvariju pod UV-om)

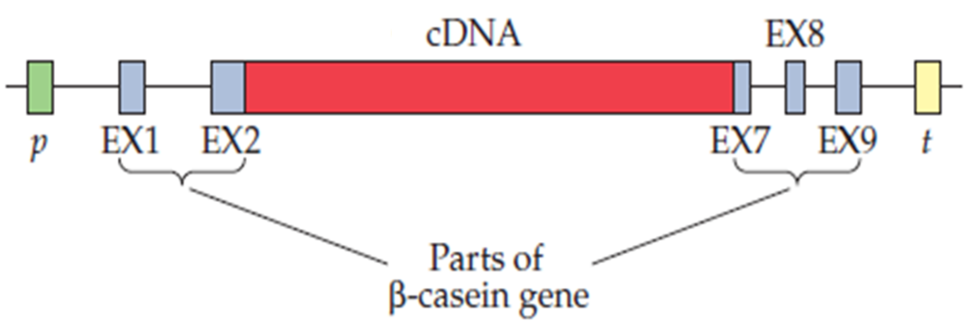
- transgenična koza (proizvodi ljudski antitrombin u mlijeku)

- transgenična kokoš (proizvodi ljudsku lizosomsku lipazu u jajima)

Proizvodnja rekombinantnih proteina u mlijeku:

- gen za protein koji se želi proizvoditi u mlijeku ugrađuje su u nefunkcionalan gen za β-kazein

- promotor osigurava <u>tkivno-specifičnu ekspresiju.</u> Egzoni kazeinskog gena osiguravaju lučenje rekombinantnog proteina u mlijeko, a introni kazeinskog gena osiguravaju pojačanu transkripciju.



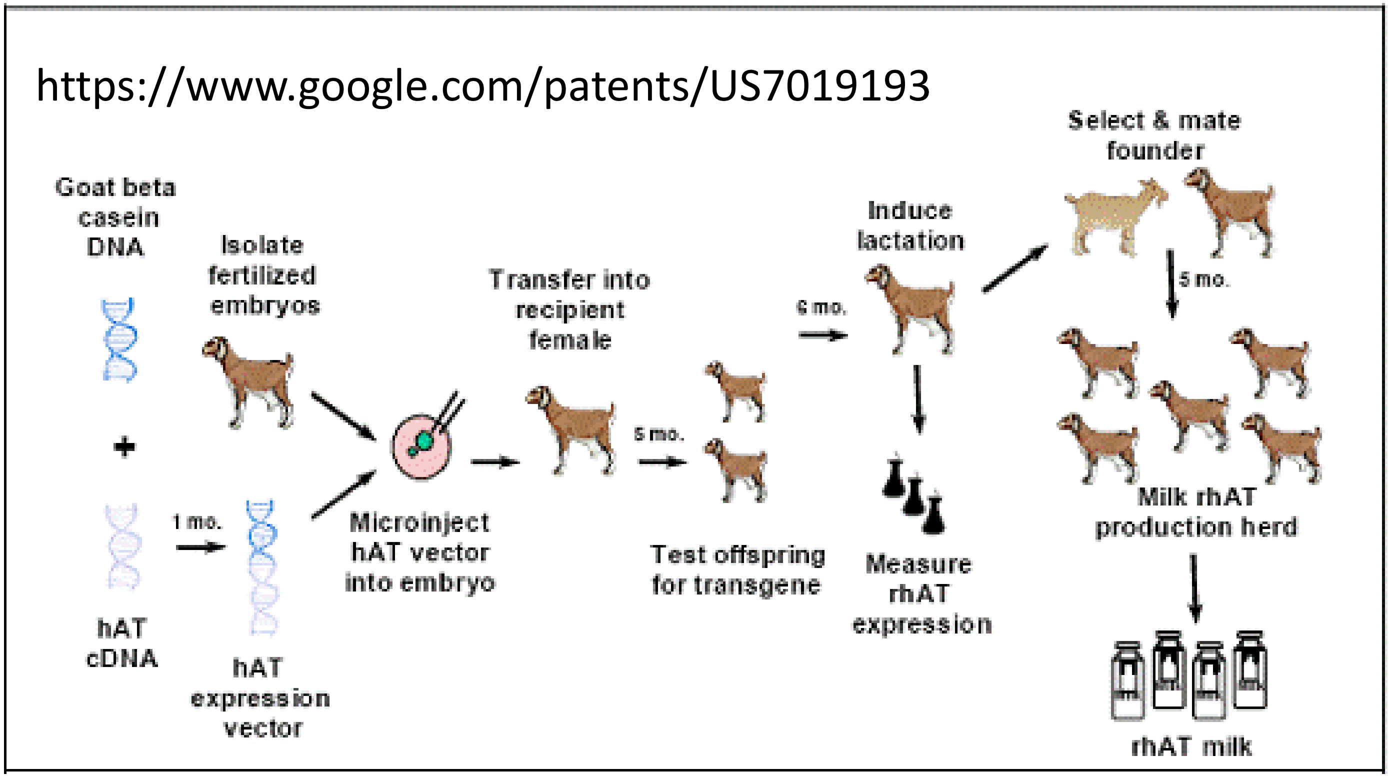
Organism	Annual milk yield (liters)	Estimated recombinant protein per female (kg/year)
Rabbit	5	0.02
Pig	300	1.5
Sheep	500	2.5
Goat	900	4
Cow	10,000	60

1 krava zadovoljava godišnje potrebe!

TABLE 21.2 Some human proteins that have been expressed in the mammary glands of transgenic animals

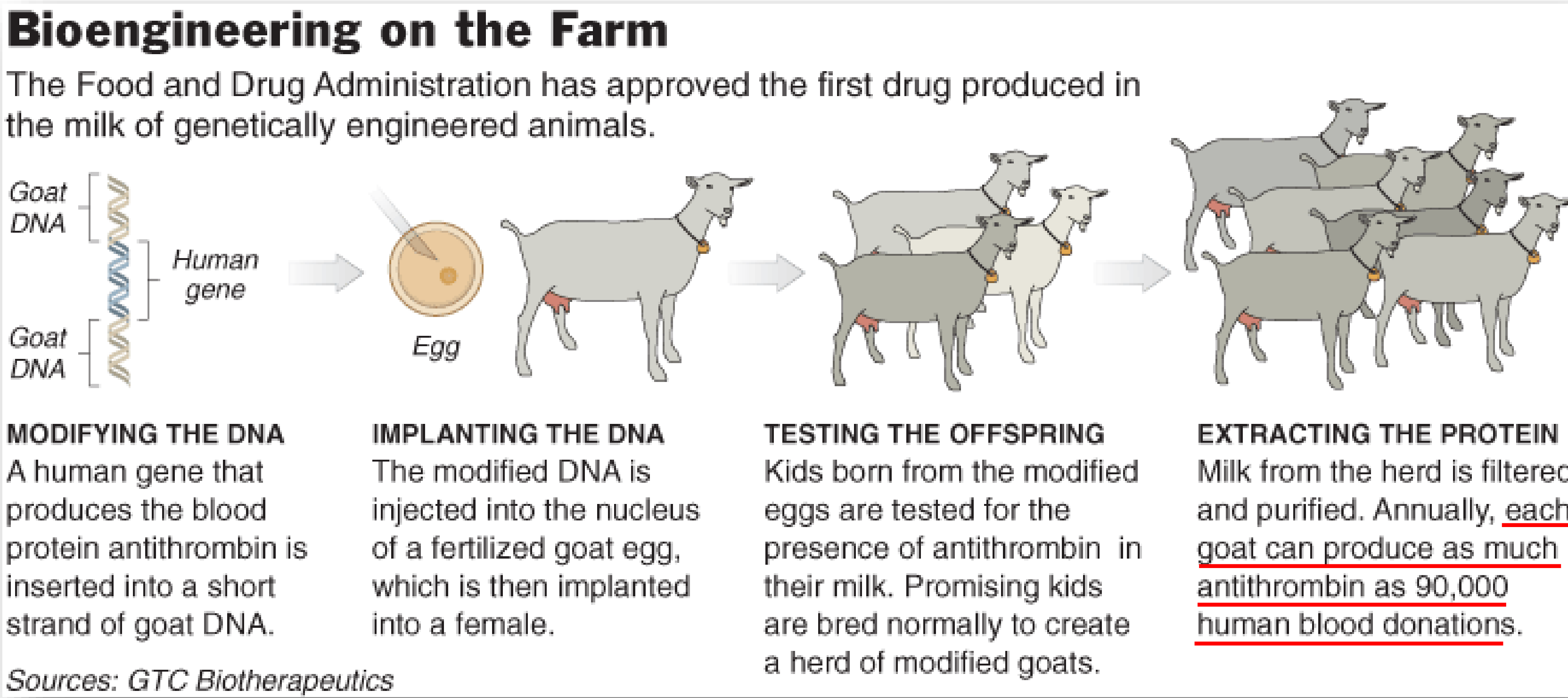
Antithrombin III
α_1-Antitrypsin
Calcitonin
Erythropoietin
Factor IX
Factor VIII
Fibrinogen
Glucagon-like peptide
α-Glucosidase
Granulocyte colony-stimulating factor
Growth hormone
Hemoglobin
Serum albumin
Insulin
Insulin-like growth factor 1
Interleukin 2
α-Lactalbumin
Lactoferrin
Lysozyme
Monclonal antibodies
Nerve growth factor
Protein C
Superoxide dismutase
Tissue plasminogen activator

Antitrombin je prvi rekombnantni protein životinjskog porijekla (koza) odobren za terapiju ljudi: ATryn



- ekspresijski konstrukt: nefunkcionalni kozji gen za kazein s dodanom ljudskom cDNA za antitrombin

Antitrombin je prvi rekombnantni protein životinjskog porijekla (koza) odobren za terapiju ljudi: ATryn



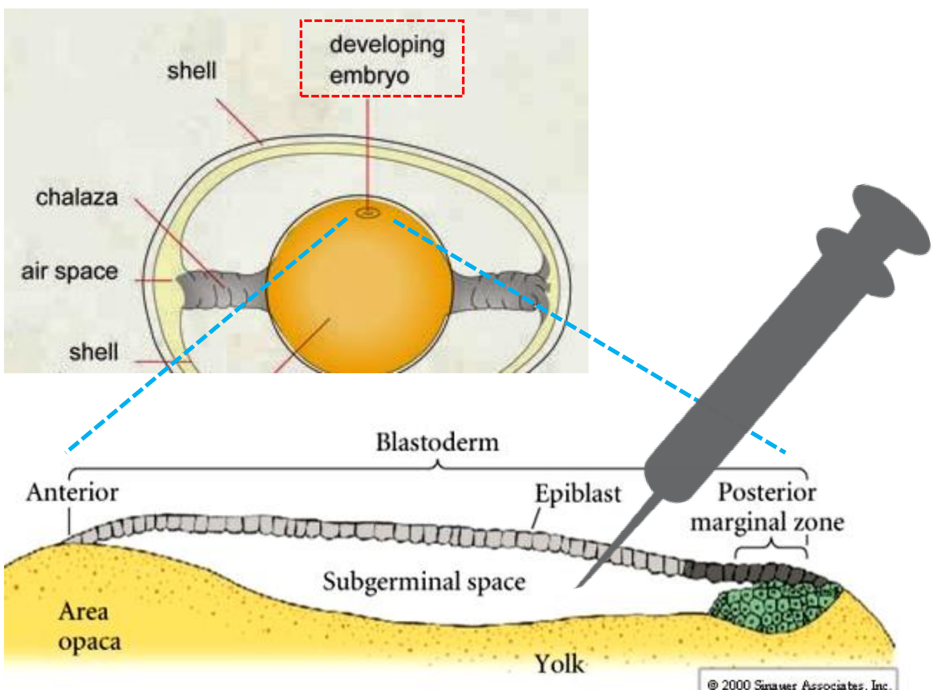
- pročišćavanje iz mlijeka: afinitetnom kromatografijom gdje stacionarna faza ima imobiliziran <u>heparin</u>

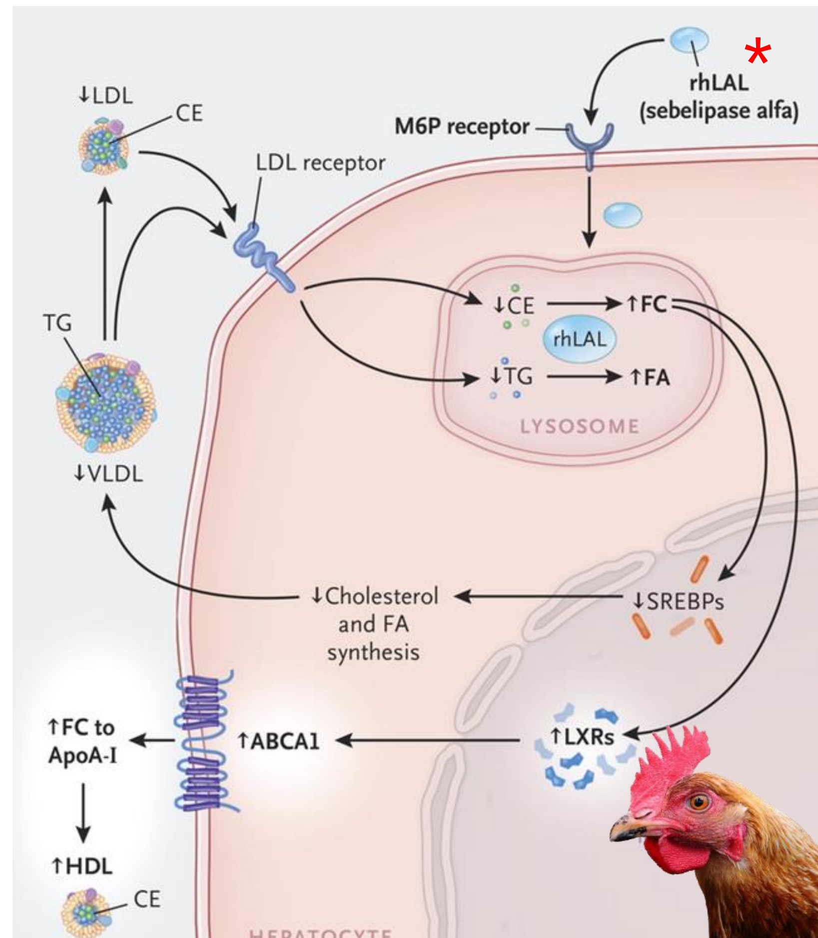
Transgenične kokoši (jaja):

- <u>problem:</u> nasljedna deficijencija lizosomske kisele lipaze (LAL)→ par tisuća pacijenata (SAD)
- rješenje: proizvodnja ljudske kisele lipaze (rhLAL*) u jajima

(„*orphan drug*”)

- u oplođeno jaje se uštrcava 10.000 kopija virusa s vektorom





Transgenične kokoši (jaja):

- rhLAL se nakuplja u bjelanjku jajeta selektiranih jedinki; koriste se ovalbuminski ili lizozimski promotori aktivni u jajovodu) → 1-10 mg proteina/mL bjelanjka

- rhLAL se pročišćava iz bjelanjka

- pacijenti jednom tjedno primaju injekcije rhLAL-a → godišnji troškvi su oko 375.000 $ → etički problem

Transgenične ribe: GM losos odobren za tržište (FDA)

https://aquabounty.com/innovation/

GM losos (*AquaBounty Technologies*)

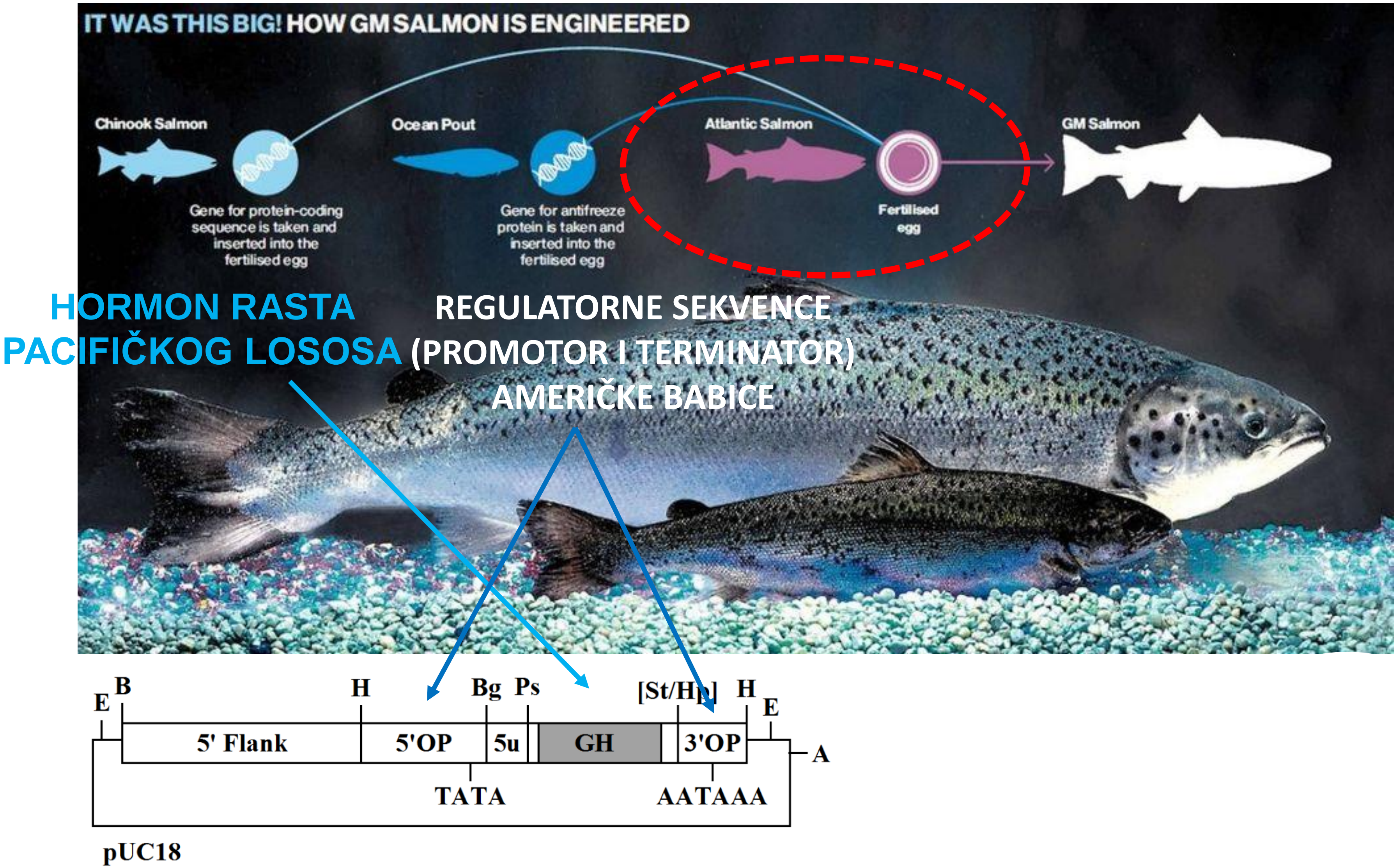
Prednosti:

- odgovor na povećanu potražnju za ribom
- smanjenje izlova divljih populacija
- brži rast → manja cijena
- efikasno iskorištavanje hrane (1:1)

Nedostaci:

- nepoznati dugoročni efekti
- utjecaj na prirodne populaciju u slučaju bijega u okoliš?
- raspoloženje tržišta negativno?
- obvezno obilježavanje (deklaracija)?

Atlantski GM losos je još uvijek losos, samo brže raste:



Transgenične ribe: GM losos odobren za tržište (FDA)

Mjere osiguranja:

- uzgoj u zatvorenom sustavu
- sve jedinke su ženke
- nisu fertilne (99%) → triploidne

GM losos je prva GM životinja odobrena za ljudsku prehranu (prodaje se u Kanadi, ne i u SAD-u).

http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/GeneticEngineering/GeneticallyEngineeredAnimals/ucm473237.htm

http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm469802.htm

GM hrana u kontekstu stavljanja za tržište:

- do sada je postupak stavljanja GM sorte na tržište koštao oko 100 milijuna $ te je u prosjeku trajao > 10 godina

- testira se: mjesto ugradnje i broj transgena, kemijski sastav, hranjiva vrijednost, toksičnost, alergenost, stabilnost novog svojstva (višegodišnji poljski pokusi), procjena rizika utjecaja na okoliš i srodne vrste i kukce, domet širenja polena

- posljedica: uglavnom samo velike multinacionalne kompanije mogu podnijeti takve uvjete poslovanja → monopol na tržištu

Pile on left: documents required in support of the application for the GMO flax variety CDC Triffid, which was approved for Canadian release only. *File folder on right*: documents supporting the non-GMO flax variety CDC Normandy, approved for worldwide distribution, cultivation, and sale. © Alan McHughen. Used with permission.

Ed Regis: „Golden rice" (2020)