

Dr. Bagi Zoltán

Mikrobák, sejtek tenyésztése, fermentáció, termékek kinyerése, tisztítása, monitoringja

Segédlet a BSc záróvizsgára való felkészüléshez

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen
készült az Európai Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014



Biotechnológia

Segédlet a BSc államvizsgára való felkészüléshez

Készítette: Dr. Bagi Zoltán

SZTE 2020

Államvizsga tétel címe: Mikrobák, sejtek tenyésztése, fermentáció,
termékek kinyerése, tisztítása, monitoringja

Mikrobák:

Metanogének:

- **archeák**, ősi életformák, extremofilek (termofil, pszichofil, alkalofil, acidofil) - szélsőséges fizikai vagy kémiai tulajdonságokkal rendelkező élőhelyeken is életképesek
- **obligát anaerobok**, kemolitotrófok, heterotrófok
- speciális koenzimeik vannak: F420, F430, metanofurán: metán anyagcsere elemei
- 3 különböző típus anyagcseréjük alapján:
 - **acetotróf metanogének** (acetátból szén-dioxid és metán)
 - **hidrogenotróf metanogének** (hidrogénből és szén-dioxidból metán)
 - **metilotróf metanogének** (metil csoportot tartalmazó molekulákból metán)
- biotechnológiai felhasználásuk: **biogáz termelés** (metán és szén-dioxid keveréke)

Metanotrófok:

metán oxidálók, aerobok

kulcsenzim: **metán-monooxigenáz**: metánból szén-dioxid (közttermékek: metanol, formaldehid, hangyasav)

szolubilis MMO: sok szubsztrát

partikuláris MMO: szubsztrát csak a metán

biotechnológiai felhasználásuk: **metanol termelés, bioremediáció** (halogénezett veszélyes szennyeződések)

Clostridiumok:

- **obligát anaerobok**, gram pozitívok, **spóráképzők** (igen ellenállóak)
- acetogenezis vs. szolventogenezis
- enzimek termelése: **celluláz** (celluloszórával rendelkeznek), **amiláz**
- *C. botulinum*: **botulin** toxin termelése
- *C. tetani*: **tetanospazmin** toxin termelése
- *C. acetobutylicum*: szerves oldószerek (**aceton**, **butanol**) előállítása
- *C. thermoaceticum*: anaerob **ecetsav** előállítás

Tejsav baktériumok:

- **anaerobok**, gram pozitívok, nem spóráképzők
- fő fermentációs termékük: **tejsav**
- homo vs. heterofermentatív anyagcsere
- biotechnológiai felhasználás:
 - **takarmány tartósítás** (silózás), **élelmiszer tartósítás**
 - **élelmiszeripari termékek**: joghurt, kefir, sajtok, szójaszósz, savanyú káposzta, kovászos uborka
 - gyógyászatban: **probiotikumok**

Élesztő:

- eukarióta gomba, fakultatív anaerob
- **gyógyszeriparban** hasznosítható
- **élelmiszeriparban**: sör, bor, whiskey készítése
- **bioetanol** előállítása

Bacillusok:

- **aerobok, fakultatív anaerobok**, gram pozitívok, spóráképzők
- extrémofilek (hő, pH, sók)
- ***B. licheniformis***: alkalikus proteázt termel (mosószerekben, keratin bontásban használható)
- ***B. thuringiensis***: delta endotoxint termel, fajspecifikus biológiai rovarirtóként használható
- ***B. anthracis***: az egyik legellenállóbb spórával rendelkezik, lépfene kórokozója
- ***B. substilis***: etanol gyárás, bacitracin antibiotikumot termel, szubsztilizin proteolitikus enzim előállítása
- enzimgyártás: **proteázok, lipázok, amilázok, cellulázok** előállítása

Pseudomonasok:

- **aerobok**, gram negatívok, heterotrófok
- ***P. aeruginosa***: szénhidrogén bontásra használható
 - alginát poliszacharid termelő, oportunista patogén
- ***P. fluorescens***: nagyon változatos anyagcsere, bioremediációra használható
- ***P. syringae***: „ice protein”, jégkristály képződést segíti, jégesők elleni védekezés

Sugárgombák:

- nevükkel ellentétben **baktériumok**
- **mikorrhizát** alakítanak ki növényekkel
- másodlagos anyagcsere termékei bioaktív anyagok (**streptomicin**)

Sejtek tenyésztése, fermentáció:

- általános feltételek: megfelelő **hőmérséklet, pH, szén, nitrogénforrás, oxigénforrás**
- sejtek növekedése: **Monod kinetika** írja le: megmutatja, hogy a növekedést mennyire limitálja a tápanyagok vizes közegben mérhető koncentrációja
- prokarióták tenyésztése: ipari komplex tápok használhatóak (**melasz, kukorica szirup, manióka, tejsavó**)
- eukarióták tenyésztése nehezebb, több komponensre van szükség: megfelelő **szén, nitrogénforrás; vitaminok, lipidek, szervetlen sók, hormonok, növekedési faktorok**
- fermentálást megelőzően a tápoldatot, bejuttatott gázokat sterilizálni szükséges:
 - **szűréssel**: pórusméret kisebb legyen, mint a mikrobák mérete
 - **inaktiválással** (NaClO, perecetsav, hő, elektromágneses sugárzások)
- fermentáció típusok: **batch, fed-batch, folyamatos**
- sejtek szaporodásának nyomon követése:
 - **Bürker kamra**: mikroszkópos módszer, adott térfogatban lévő sejtek számát határozzuk meg
 - **lemezelés**: hígítási sort készítünk, majd agar lemezre szélesztünk, a telepek száma megegyezik az élő sejtek számával
 - **turbiditás**: spektrofotométerrel meghatározzuk a sejteket tartalmazó oldat fényszórását
 - **sejttömeg mérése**: lehet nedves és száraz tömeget is mérni
 - **metabolikus aktivitás** mérése: pl. a metabolikus aktivitás során felszabadult hőt
 - **Coulter számláló**
 - **Flow citometria**

Termékek kinyerése:

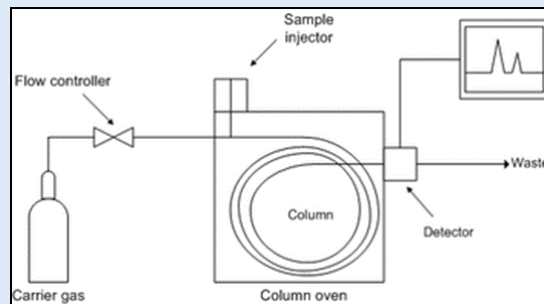
- sejtek elválasztása a tápoldatból:
 - **centrifugálással** (szakaszos, folyamatos eljárások)
 - **szűréssel** (hagyományos, tangenciális szűrés, membránszűrés)
- termékek kinyerése tápoldatból:
 - **extrakció**: szelektív oldószer (extrahálószer) segítségével folyadék fázisból egy vagy több komponenst oldunk ki
 - **micella, reverz micella** segítségével: lipid réteggel határolt micellába zárjuk a tisztítandó molekulát
 - **kristályosítás**: túltelített oldatot készítünk (pl. bepárlással, hűtéssel)
 - **desztilláció** (frakcionált): alapja az elegy összetevőinek eltérő illékonysága
 - **szuperkritikus extrakció**: szuperkritikus oldószerrel kioldjuk a kívánt komponenst
- amennyiben a termék intracelluláris a sejteket fel kell tárnunk:
 - mechanikus módszerek:
 - **French press**: hidraulikus dugattyú nagy nyomást generál, nyíláson átpréseli a sejteket
 - **ultrahang**: 15-25kHz, kavitációs mechanizmus szerint
 - **vágókés**: nyíró hatás
 - **golyós homogenizátorok**: apró gyöngyökkel, dörzsölő, koptató hatás
 - kémiai módszerek:
 - **szerves oldószer, lúg, sav, detergens**
 - enzimatis módszer: **lizozim**: Gram+ baktériumok sejtfalát roncsolja

Termékek tisztítása, monitoringja:

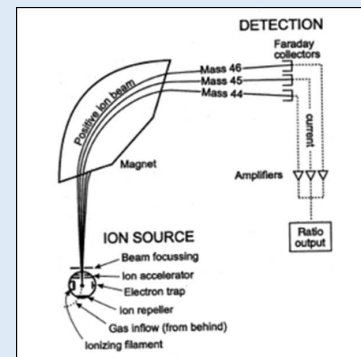
- kromatográfia:
 - **gélszűrés**
 - méret szerinti elválasztás, porózus járatok, nagy molekula rövidebb úthossz
 - **elektroforézis** (egy, kétdimenziós)
 - töltött részecske mozog elektromos térben térhálós polimerben
 - 2 dimenzió esetében izoelektromos fókuszálással lehet kombinálni
 - **izoelektromos fókuszálás:**
 - össztöltés alapján választ el
 - töltött részecske mozog elektromos térben, pH gradiensben
 - a fehérje töltése az izoelektromos pontján semleges, nem vándorol tovább
 - **ioncserélő kromatográfia** (anion, kation)
 - felületi töltés alapján választ el
 - töltött aminosav oldalláncok elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek a hordozóval
 - anioncserélő oszlop: pozitív töltésű funkciós csoportokkal rendelkeznek
 - kationcserélő oszlop: negatív töltésű funkciós csoportokkal rendelkeznek
 - **hidrofób kromatográfia:**
 - hidrofób felületi csoportok a hordozón, melyek a hidrofób fehérje oldalláncokkal lépnek kapcsolatba
 - **affinitás kromatográfia:**
 - elválasztás specifikus biológiai kölcsönhatás alapján, specifikus ligand található a hordozón

Termékek tisztítása, monitoringja:

- termék mérése gáz fázisban: **gázkromatográf (GC)**
 - felépítése: **vivőgáz, kromatográfiás oszlop, detektor**
 - **GC-MS**: ionizáló forrást is tartalmaz, az elektronok a vizsgálandó gáz molekuláit ionizálják, molekulákat akár alkotórészeiké bontják (elektromos tér gyorsít, mágneses tér eltérít, ion tömeg szerint frakciók jönnek létre, csúcsok megfelelnek egy-egy atomfajtának, molekula alkotórésznek)
 - detektorok típusai:
 - **TCD (thermal conductivity detector)**: elektromosan fűtött szál ellenállását mérjük, ami a hőmérsékletétől függ, amit az áramló gáz hővezető képessége határoz meg
 - **FID (flame ionization detector)**: a hidrogén lángban a szerves vegyületek lebomlanak és ionizálódnak, ezért a két elektród között a koncentrációval arányos áram fog folyni



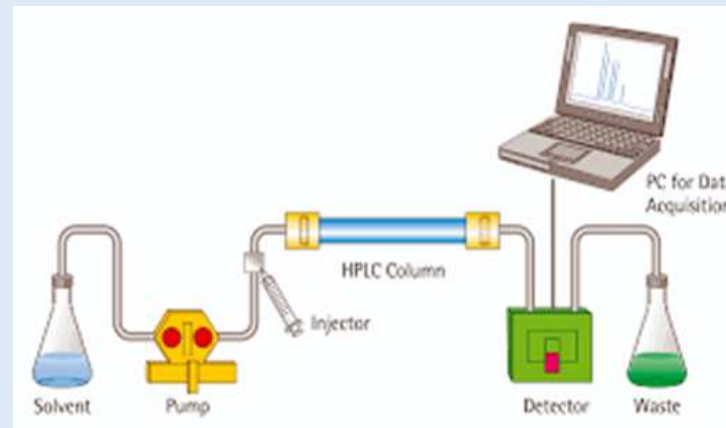
GC



GC-MS

Termékek tisztítása, monitoringja:

- termék mérése folyadék fázisban: **folyadékkromatográf (HPLC)**
 - felépítése: **oldószer, kromatográfiás oszlop, detektor**
 - detektorok típusai:
 - **UV- VIS** (Ultribolya–látható spektrofotometriás) detektor: adott hullámhosszon fényelnyelés (ha nincs UV fényelnyelés kromofór csoport szükséges)
 - **fluoreszcens detektor**: választott hullámhosszúságú fénnel megvilágítás, gerjesztés hatására fluoreszcencia
 - **vezetőképesség detektor**: oldat vezetőképességének detektálása, platina elektródok közötti ellenállás mérése, arányos az oldott anyag koncentrációval
 - **RI detektor**: átfolyó anyag törésmutatójának mérése, törésmutató változik amennyiben a detektálási cella mintát tartalmaz



HPLC