

Biológia, Biotechnológia

2. ea

Dr Németh Áron
Adjunktus
<http://f-labor.mkt.bme.hu>

Tartalomjegyzék:

1.ea: Sejbiológia

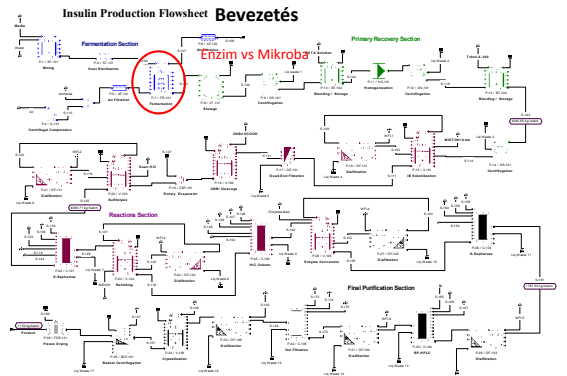
- Mikrobiológiai, és mikrobiális fiziológiai áttekintés
- ipari mikrobák fajtái
- biokémiajuk főbb ismérvei: aerobok és anaerobok,
- alapvető mikrobiális anyagcserefolyamatok

Biokémia vegyészmérnököknek

Bevezetés

Biotechnológia=alkalmazott (mikro)biológia

Biotechnológia=alkalmazott (mikro)biológ



Bevezetés

Biotechnológia=alkalmazott (mikro)biológia

Fermentáció: kívánt nyersanyag átalakítása valamely élőszervezet (v. annak egy részének) segítségével.

Élő szervezet v. része = Mikroorganizmus v. enzim(e)

A biotechnológia mikroorganizmusokon alapszik -> Mikrobiológia

Általános mikrobiológia

Szisztematikus v. részletes mikrobiológia
(Rendszertan v. taxonómia)

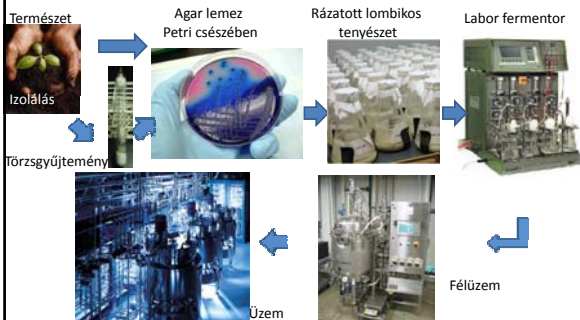
Mikroorganizmus : mikroszkópikus élőlény, szabad szemmel nem látható

Mottó 1: „ It might look that I am doing nothing, but at a cellular level I am really quite busy.”

Comments:

1. „Nincs hülye mikroba”
2. A mikrobák csak élni akarnak
3. Mi önzően kiszolgáljuk (és kihasználjuk) őket
4. Ők cserébe nekünk profitot és megélhetést adnak
5. DE: láthatatlanok, így gyakran egyes kísérő jelenségeik is (pl.: befertőződés)

Technológia fejlesztés ill. termelés – alkalmazott mikrobiológia:



Általános Mikrobiológia

Részletes Mikrobiológia

1. Mikrobiológiai ismeretek:

- A. Mikroba sejt felépítése
- B. Mikroszkópizálás
- C. Mikroökológia

Rendszertan:
-Fenotípusos
-Genotípusos

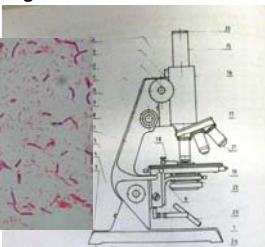
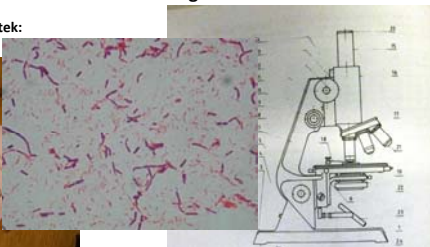
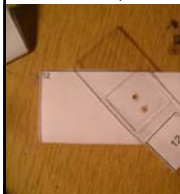
2. Mikrobiológiai műveletek:

- A. Tápközegkészítés
- B. Izolálás
- C. Screening
- D. Identifikáció
- E. Tartósítás, fenntartás
- F. Átoltás
- G. Törzsfeljesztés

Általános Mikrobiológia

1. Mikrobiológiai ismeretek:

B. Mikroszkópizás



Baktériumok: 1-2 μm 1000x
Élesztők: 10 μm 400x
Gombák: 10 μm -1mm 100x

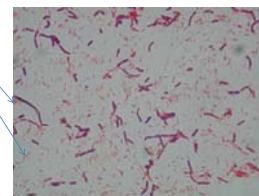
31. ábra
A mikroszkóp felépítése. 1-3 talp; 4 gömb a forróvizes állvány; 5 csukló; 6 tárgytálcán tartó; 7 asztal; 8 fókusz állvány; 9 baloldali a szemlencse; 10-11 a szemlencsekeret; 12 a szemlencse; 13 a szemlencse állvány; 14 a szemlencse állvány; 15 a szemlencse állvány; 16 a szemlencse állvány; 17 a szemlencse állvány; 18 a szemlencse állvány; 19 a szemlencse állvány; 20 a szemlencse állvány; 21 a szemlencse állvány; 22 a szemlencse állvány; 23 a szemlencse állvány.

Általános Mikrobiológia

Mikroszkóp:

Baktériumok: 1-2 μm 1000x
Élesztők: 10 μm 400x
Gombák: 10 μm -1mm 100x

Gram+
Gram -



Általános Mikrobiológia

Mikroba mérés:

1. OD-optical density (UV-Vis photometer, 600-660nm)
2. Turbidimetria (online)
3. Mikroszkóp – sejtszámlálás Bürker kamrával (10⁶ db/ml)
4. Cellcounter (10⁶ db/ml)
5. Sejt Szárazanyag (1-10 g/L)
6. Hígítási szeszeltési módszer (CFU/ml)

Általános Mikrobiológia

1. Mikrobiológiai ismeretek:

C. Mikroökológia

Élőhelyek: levegő, víz, talaj

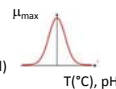
Életformák: szaprofita, szimbióta, kommenzalista, parazita,

Életkörülmények: hőmérséklet tolerancia (pszichrofil, mezofil, termofil)

pH tolerancia (acidophil, neutrophil, alkalophil)

sótűrési (ozmotolerancia)

Mikrobák szerepe a bioszférában: fotoszintetizálók: CO₂-t megköthetnek, E-t termelhetnek
lebontók: C, N, P körforgalomba visszajuttatása



Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

A. Tápközegkészítés

Táppoldat <-> Táptalaj (+agar, v. gelrite)

Mindekettőben: C-forrás: cukrok

N-forrás: fehérjék, aminosavak, oligopeptidek, ammóniumsók

P-forrás: foszfátok

+sók, vitaminok, prekursorok stb.

Anaerobok: redukáló komponensek (DTT, NaSH)+O₂ indikátor

Bakt.: szerves N-forrás (fehérje), C-forrás is ebben, nem (mindig) kell cukor

Élesztő+gomba: N-forrás lehet szervesen is => könnyebb a downstream olcsóbb up és downstream

Tápközeg sterilizése:

Fizikai módszerek (szűrés, besugárzás, hőkezelés)

Kémiai módszerek (dezinfectáló szerek)

Biológiai módszerek (sejtfalbontó enzimek)



Nem minden komponenst lehet, néha külön kell

Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

B. Izoálás

*Szilárd-> ez a leggyakoribb (talaj), mert a legnagyobb diverzitás

-minta->petrire

-minta->vizes szuszpenzió->petrire } Inkubálás

-minta felszínéről steril vattával

*Folyadék->hígabb-> dúsítás: előinkubáció v. szűrés+agar+inkubálás

*Levegő

Izoláló petricsésze+agar:

talajban kevert populáció->selektív nyomás

adalekok az agarhoz: pl.: antibiotikum->csak gombák nőnek

antifungális szerek-> bacik nőnek,

savanyúbb közeg: élesztők

Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

C. Screening

Célja 2x: 1) keresni a célfeladathoz mikrobát a már izoláltak között

2a) jobb termelőt keresni a meglévő eljáráshoz

2b) törzsfeljesztés (ld később)

Ehhez: nagyszámú (100-1000 v. több) mikroba vizsgálata – nagy mintaszám=>automatizálni DE

Minden feladat egyedi (mi a célparaméter, milyen módszerrel detektál stb.)->manuális



Kombinálják

Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

C. Screening

-HTS rendszerek: High Throughput System



-manuális: agarba adalekok: ált. zavarosodás/tisztulás a céltelep körül
pl.: CaCO₃-> savtermelők (tisztulás)
szenzitív mikroba->antibiotikum termelők (tisztulás)
olajemulzió+Ca->lipáz termelők (zavarosodás)
kicsapott fehérje->proteáz termelők (tisztulás)

Általános Mikrobiológia

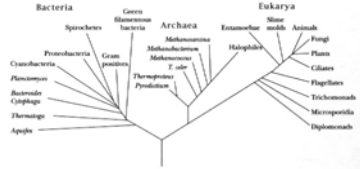
2. Mikrobiológiai műveletek:

D. Identifikáció

Cél: azonosítás, rendszertani csoportba besorolás

-HTS rendszerek: automatizált feno/genotípus alapján is
fenotípus alapú: ~manuális (L.d. Kőv)

genotípus: konzervált genetikai állomány ->rokonság (filogenetikai család)



Bővebben: részletes mikrobiológia

Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

D. Identifikáció

-manuális: fenotípus és biokémiai tulajdonságok alapján pl.:

makroszkópius: telep színe, szaga, formája

mikroszkópius: sejt alakja, csoportosulása, mozgásszerve,
sejtmagja, sejtfala (Gram festés, más festések)

Biokémiailag: oxidáz próba, aerob/anaerob dextróz fogyasztás,
ureáz, kénhidrogén stb

Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

E. Tartósítás, fenntartás

Izolátumok eltartása:

-aktív formában:

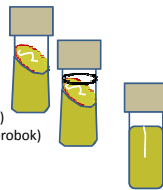
-szárítva ampullában (líofilezve)

-lelassítva agaron, hűtőben

-ferdeagar kémcsőben (+olaj)

-szűrt agar kémcsőben (anaerobok)

-petricsészés agaron



-inaktív formában: spórák, szaporítóképletek



Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

F. Átoltás

-Napi használat-> aktív formában eltartás->de „öregszik” a tenyészet->átoltás
-eltartó tenyészetből inokulum készítés (szilárdról folyadékra)

Eszközök:

- steril tér
- steril kacs
- bunzen égő
- sterilizéshez_ autokláv
- steril pipettahegy v. üvegpipetta+vatta (folyadék)
- steril víz (szuszpenzióhoz)

Laminár boks <-> steril fülke



Átoltás: az új tenyészetet inkubáljuk, majd lezárjuk, hűtőben tároljuk. Legközelebb erről oltunk

Általános Mikrobiológia

2. Mikrobiológiai műveletek:

G. Törzsfeljesztés

Az élőszervezet képességeit a genomja határozza meg =>a fejlesztéshez genomot kell módosítani =mutáció

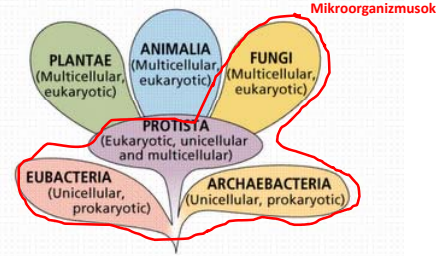
Dózis:

Fizikai mutagének: -besugárzás (UV, gamma) -sugárzó λ és intenzitás, ill. idő
Kémiai mutagének: -DNS-t megváltoztató anyagok (rákkeltők) - koncentráció+kontakt idő

1. Mutáció->2.mutánsok kitenyészése (izolálása)->3.mutánsok szűrése (ki lett jobb)->

4.kicsit jobbak újra mutáltatása

Részletes Mikrobiológia

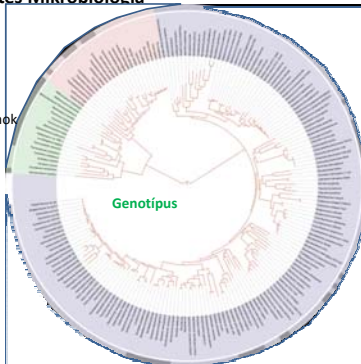


Részletes Mikrobiológia

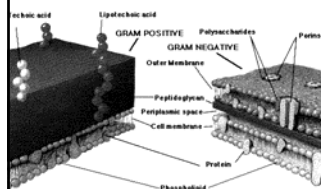
A) Prokarióták

- Bergey I. kiadás (1980-90-es évek)
 - 4 divízió (tagozat)
 - I. Gram (-) baktériumok
 - II. Gram (+) baktériumok
 - III. Merev sejtfal nélküli baktériumok
 - IV. Ósbaktériumok
- Fenotípus+Biokém.**

- Bergey II. kiadás (2001-től)
- 2 domén 25 törzs (phylum)
- I. Archea
- 1. A1 phylum
- 2. A2 phylum
- II. Eubacteria
- 1. B1 phylum
- ...
- 23.823 phylum



Részletes Mikrobiológia



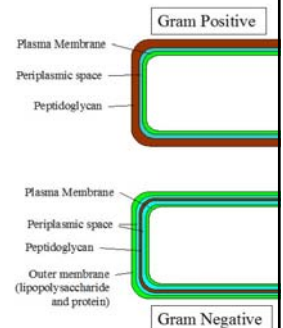
Sejtfal szerint:

1. Ósbaktériumok: nincs mureinháló v. pseudomurein

2. Gram (-) baktériumok
3. Gram (+) baktériumok

Alak szerint:

1. Gömb (Coccus)
2. Pálcika (bacillus)
3. Csavart (spirohéta)



Részletes Mikrobiológia

A) Prokarióták

Ósbaktériumok (Archeák)

Gram (-) Coccusok
Pálcák:
-aerob Pseudomonas, Brucella, Legionella
-fakultatív anaerob Enterok :Escherichia, Klebsiella, Salmonella
-anaerob

Gram (+) Coccusok
Pálcák:
-endospórák Staphylococcus, Streptococcus
-spórátlán Bacillus (aerob), Clostridium (anaerob)
-spórátlán szabálytalan alakú Lactobacillus
Corynebacterium, Streptomyces, Actinomyces

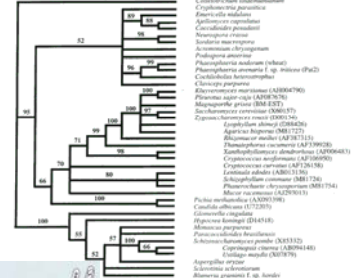
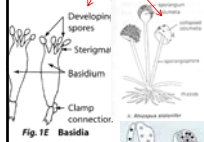
B) Parabióták (vírusok, prionok)

Részletes Mikrobiológia

C) Eukarióták

Protiszták Amőbák,
Ostorosok

Gombák Bazidomyceták
Ascomyceták
Zygomyceták



Perfect és Imperfect gombák =
élesztő és fonális forma

Biotechnológiai potenciál

Mit lehet előállítani mikrobákkal?

- 1) Primer metabolitokat:
normál élettani folyamatokat kísérő vegyületek:
- 2) Szekunder metabolitokat
az élethez szorosan nem kapcsolt anyagcsere termékek (antibiotikumok)
- 3) Biokonverziós termékeket
- 4) (rekombináns) fehérjéket, enzimeket

Biotechnológiai potenciál

Mit lehet előállítani mikrobákkal?

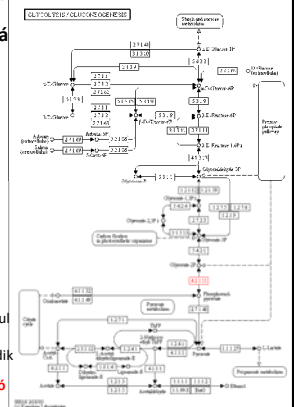
1) Primer metabolitokat:

Energia termelés: **glikolízis+Citrát kör**
glükóz/fruktóz/más cukrok

Kémiai energia: ATP v. NADH₂

Közvetlen E hasznosítás
ATP-vé alakul és regenerálódik

Terminális oxidáció



Biotechnológiai potenciál

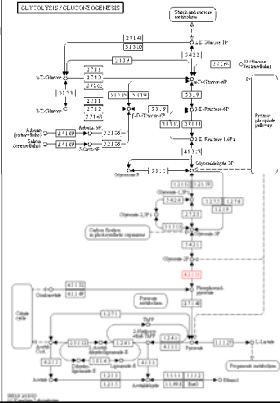
Mit lehet előállítani mikrobákkal?

1) Primer metabolitokat:

A) Glikolízis+Terminális oxidáció

Ehhez kell O₂ – aerob anyagcsere

Ox. Nélkül (anaerob anyagcsere):
Más úton regenerálódik a NADH,
pl.: piruvát->tejsav redukció NAD képz.
v. Ac-CoA->AcOH



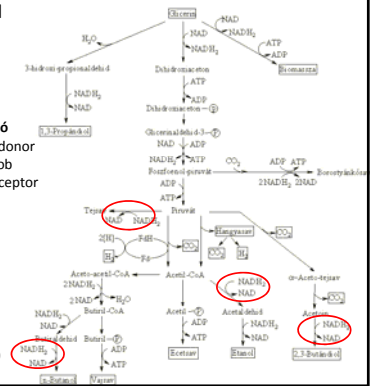
Biotechnológiai potenciál

Mit lehet előállítani mikrobákkal?

1) Primer metabolitokat:

Respiráció <-> Fermentáció
Szerves e donor Szerves e donor
Aerob/anaerob Anaerob
Sztlen e akceptor Szerves e akceptor

Egy sor termék,
Különböző erjedések:
-tejsavas (*Lactobacillusok*)
-ecetsavas (*Acetobacterek*)
-alkoholos (Élesztők: *S. cerevisiae*)
-vajsavas (*Clostridium butyricum*)
-aceton-butanolos (*C. acetobutylicum*)



Biotechnológiai potenciál

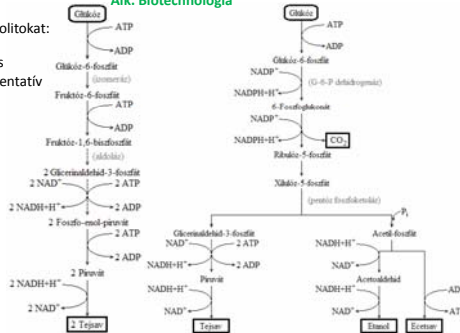
Mit lehet előállítani mikrobákkal?

Alk. Biotechnológia

Élelmiszéripár

1) Primer metabolitokat:

Pl.: Tejsavas erjedés
Homo/hetero fermentatív



Biotechnológiai potenciál

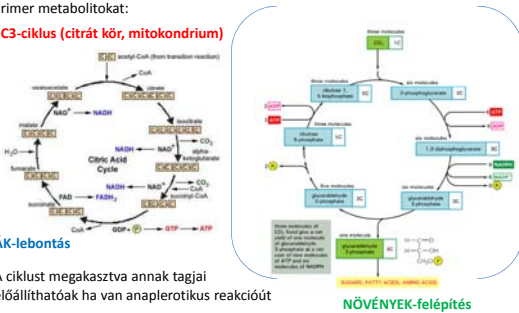
Mit lehet előállítani mikrobákkal?

1) Primer metabolitokat:
B) C3-ciklus (citrát kör, mitokondrium)

MIKROBÁK-lebontás

A ciklust megakasztva annak tagjai
előállíthatók ha van anaplerotikus reakcióit

Calvin ciklus - kloroplaszt



NÖVÉNYEK-felépítés

