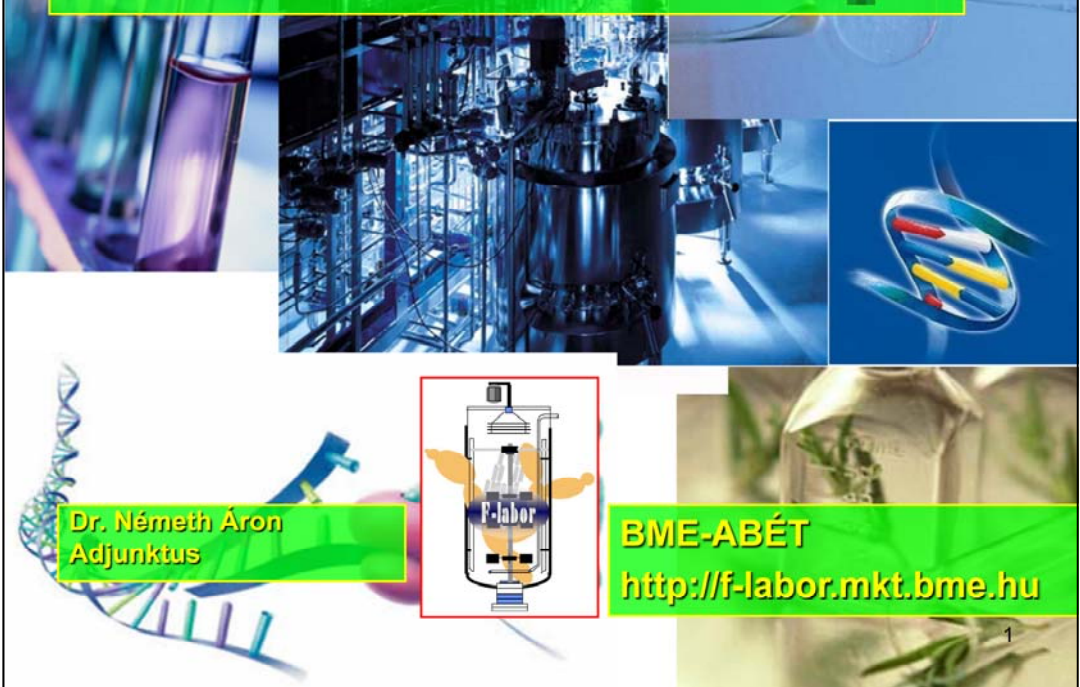


Alkalmazott biotechnológia



Dr. Németh Áron
Adjunktus

BME-ABÉT
<http://f-labor.mkt.bme.hu>

Biotechnológia alkalmazása



Definíció: Biotechnológia= biológiai folyamatok alkalmazása

Évezredek óta: sör gyártás, kenyér sütés, ecet készítés stb.

'70-es évek

„új biotechnológia”: rendszerezett tudás alapján

Biotechnológia alkalmazása



„új biotechnológia”: rendszerezett tudás alapján



Mit érdemes biotechnológiailag gyártani?
Hol érdemes alkalmazni?

Zöld biotechnológia:
Mez.gazd., élelm., körny.

Vörös biotechnológia:
Egészségügyi termék

Fehér biotechnológia:
Ipari termék

Biotechnológia alkalmazása



MA:

Vörös biotechnológia:

Pl.: Antibiotikumok:
penicillinek és cephalosporinok

Szteroidok

Pl.: Hidrokortizon

Fehér biotechnológia:

Pl.: Szerves savak:

tejsav

Zöld biotechnológia:

Pl.: Transzgenikus
növények:

inszekticid termelők

Zöld biotechnológia alkalmazása



Cél:

Haszonnövény termesztés
hatékonyságának növelése

Pl.: herbicidrezisztencia

Pl.: stressz tolerancia

Pl.: betegség rezisztencia

Pl.: *in situ* inszekticid termelés
pl.: *Bacillus thuringiensis*
endotoxinnal

Zöld biotechnológia alkalmazása



Pl.: stressz tolerancia

pl. *Pseudopleuronectes americanus* (nyelvhal) gén bevittele
hidegtoleranciát okoz



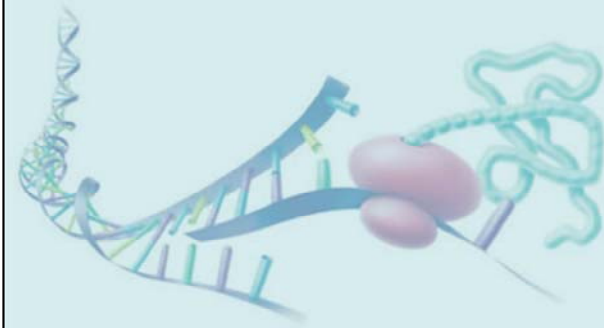
© 1992 Jonathan Bird

Zöld biotechnológia alkalmazása

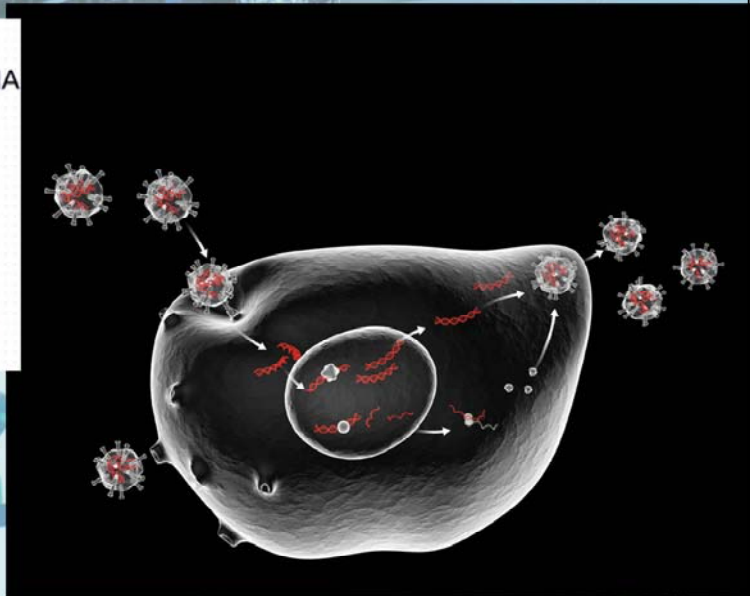
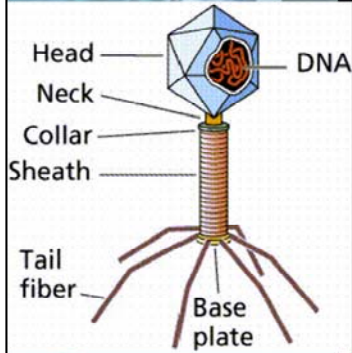


Pl.: betegség rezisztencia

Vírusok ellen: burok fehérje, hibás movement résszel



Zöld biotechnológia alkalmazása



Zöld biotechnológia alkalmazása

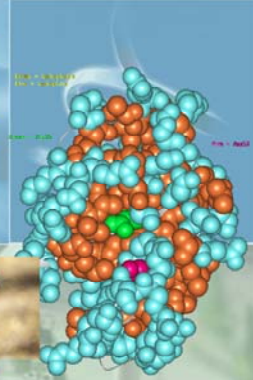


Pl.: betegség rezisztencia

Vírusok ellen: burok fehérje, hibás movement résszel

Baktériumok ellen: csirke lizozim
(pl. almába)

Gombák ellen: kitináz, glukanáz,
fitoalexinek

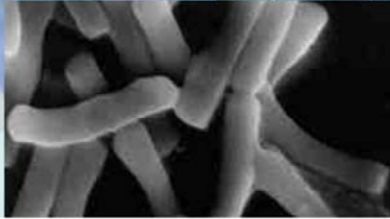


Zöld biotechnológia alkalmazása

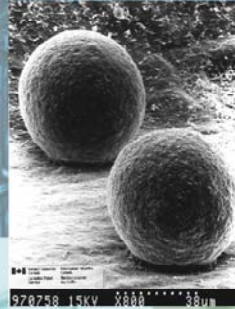


Pl.: inszekticid termelés

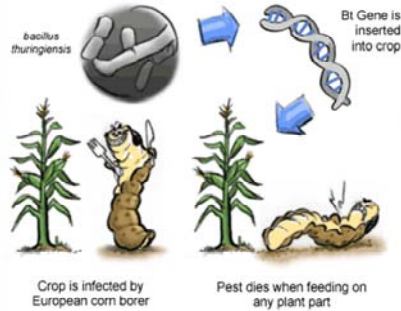
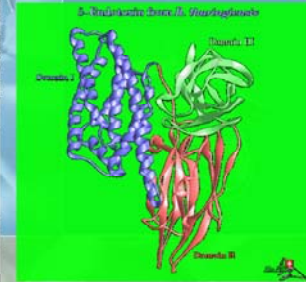
Bacillus thuringiensis:



spórázik



Endotoxint termel

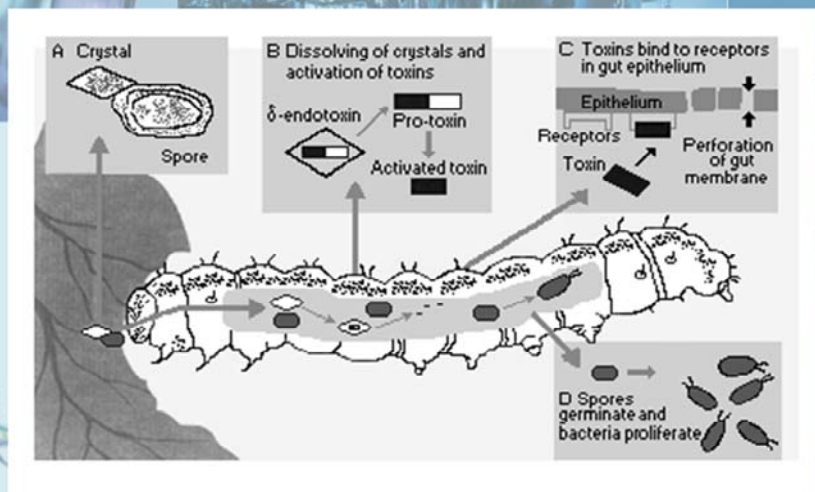


növénybe

Pl.: gyapjaslepke, szúnyoglárva



Bacillus thuringiensis endotoxinjának hatása:



Vörös biotechnológia alkalmazása



Antibiotikumok

➔ Sejtfallszintézist gátlók

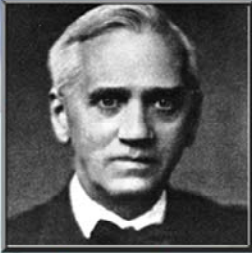
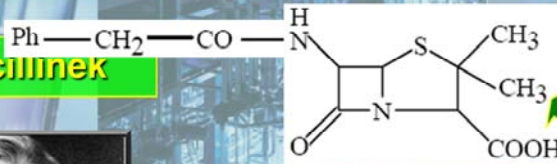
➔ Fehérje szintézist gátlók

➔ Membrán funkciót károsítók

Vörös biotechnológia alkalmazása



Penicillinek



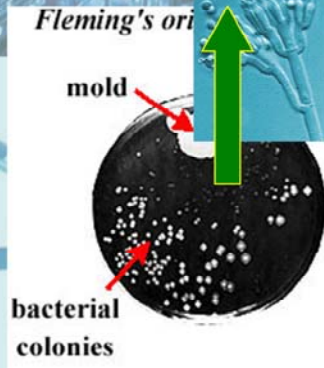
1929

Penicillin G

Fleming's ori

mold

bacterial colonies



Penicillium notatum

Vörös biotechnológia alkalmazása



Penicillinek gyártása:

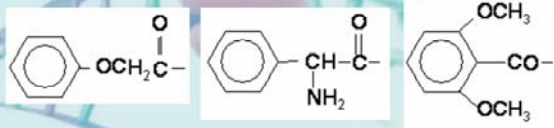
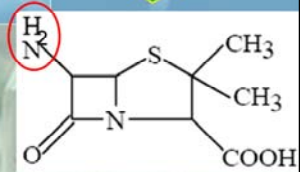
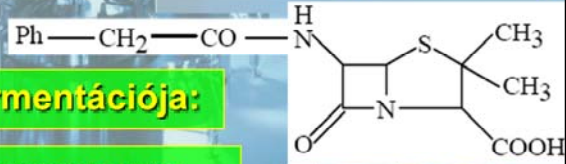
Törzs & technológia optim. után

1. Penicillin G fermentációja:

Penicillium crysogenum

2. Penicillin G hidrolízise
6-APA-vá = prekursor

3. Oldallánc kialakítása
(acilezés)



Vörös biotechnológia alkalmazása



1. Penicillin G fermentációja:

Törzsfejlesztéssel 400x titer növelés 50 év alatt

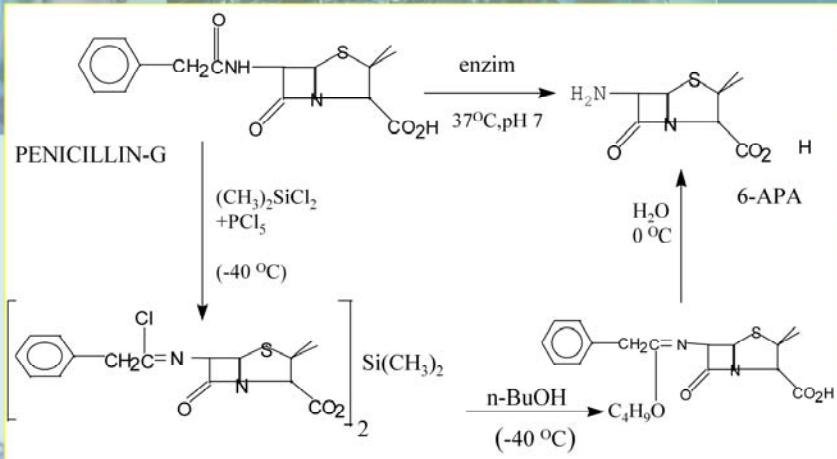
1. klasszikus mutáns szelekcióval
2. a szűk keresztmetszet bővítésével genetikailag

**Rátáplálós technika: tápközegben CSL v. szójaliszt + ásv.a.
rátáp.: szénhydr. (kukorica kem.hidr.)
prekurzor (fenilecet,-fenoxie-s
ammónium-szulfát**

Vörös biotechnológia alkalmazása



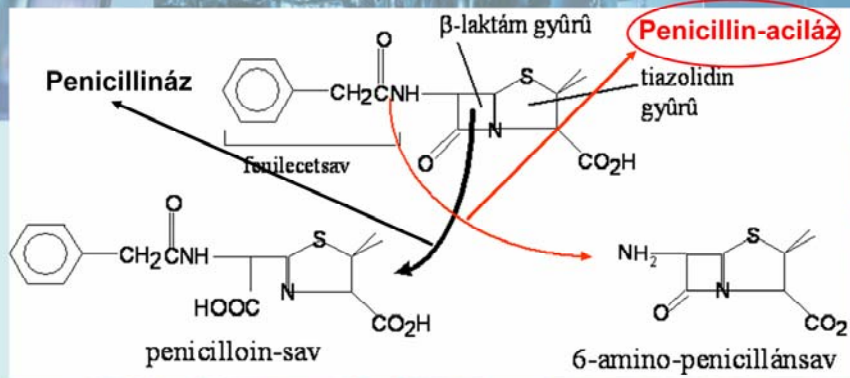
2. Penicillin G hidrolízisei:



Vörös biotechnológia alkalmazása



2. Penicillin G enzimes hidrolízisei:



Vörös biotechnológia alkalmazása



Penicillin G ipari hidrolízise:

Penicillin-aciláz (E.C. 3.5.1.11) – *Escherichia coli*ban van

1. Inaktívált *E.coli* + Penicillin G → lizált sejt + 6-APA

2. Aktív(élő) *E.coli* + Penicillin G → metab.term + 6-APA

3. *E.coli*-ből kinyert E + Penicillin G → 6-APA



Vörös biotechnológia alkalmazása



Penicillin G ipari enzim hidrolízise:

1. Enzim kinyerése:

1. Fermentáció
2. Centrifugálás
3. Reszuszpendálás
4. Kisózás 1. (debrís+NS)
5. Kisózás 2. (E)-> reszuszpendálás
6. Immobilizálás polimer-golyóra

Szubsztrát és termék **inhibíció** (gátlás)!

CSTR helyett csőreaktor

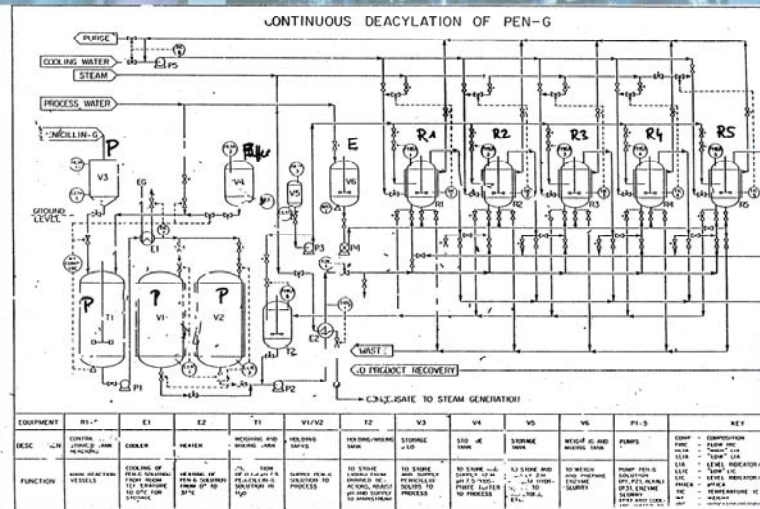
2. Reaktor kaszkáddal
(=sorba kötött folytonos CSTR-ek)
közelítik a csőreaktort

DE: pH szabályzás
fontos, azt nem
lehet
csőreaktorban

Vörös biotechnológia alkalmazása



Penicillin G ipari enzimés hidrolízise:



Feldolgozás:

- Kicsapás
- Szűrés
- Mosás

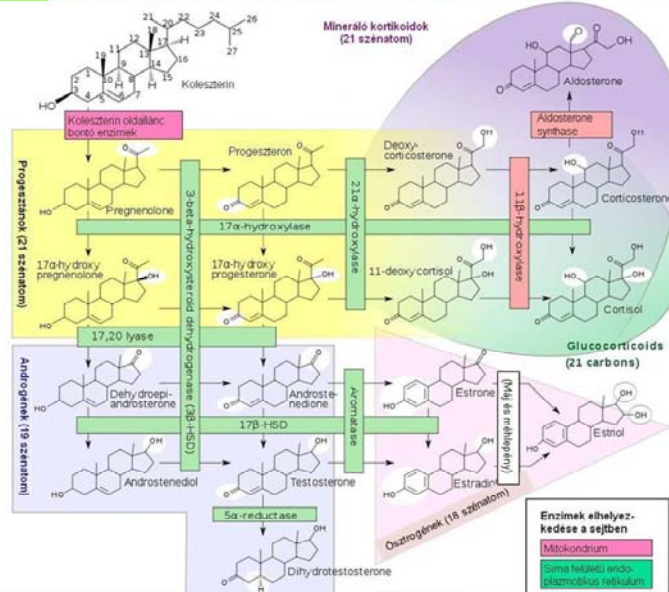
Reverz felhasználás:

Pl.: Ampicillin szintézis

Vörös biotechnológia alkalmazása



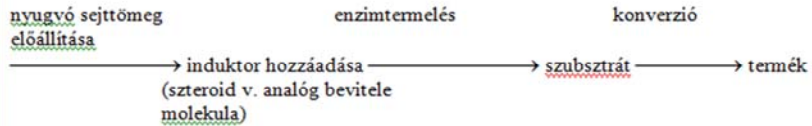
Szteroidok „családfája”





Szteroid konverziók

- A szteránvázis vegyületek előállítása soklépéses, hosszadalmas folyamat.
- Egy-egy lépésben csak egy kis szerkezeti részt változtatnak meg, (sztereo)szelektív átalakításokra van szükség
- Érdeemes megpróbálni enzimesen. Az iparban kémiai és biológiai lépések váltogatják egy-mást.



- Minden konverziós lépéshez külön törzset kell keresni
- A szükséges enzimeket nem izolálják, hanem nyugvósejtes tenyészetben használják.

Vörös biotechnológia alkalmazása



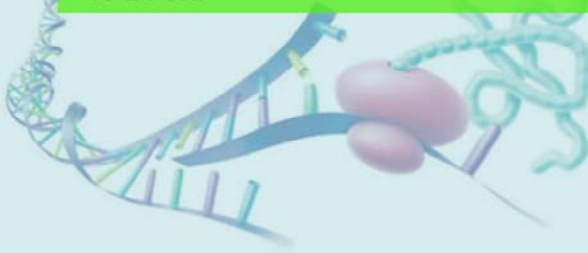
Technológiai lépések I.

1. Oltás

- Sejtszaporítás a törzs igényeinek megfelelő tápoldaton.
- A sejtek elszaporodása és a táptalaj részleges kimerülése után a konverzióhoz szükséges enzimet indukálják - induktor anyagot adagolnak.

(szteroid szubsztrát, naftol származék)

- Az indukció hatékonyságát enzimaktivitás méréssel lehet ellenőrizni.
- 10-24 óra

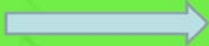




Technológiai lépések II.

2. Szteroid szubsztrát adagolása

- Komoly problémát jelent, hogy a szteroidok rosszul oldódnak vízben, ezért azokat különböző technikákkal viszik be a fermentálébe:
- A szubsztrátot felveszik oldószerben (pl.: etanol, mert az nem nagyon károsítja a tenyészetet), és lassan a fermentorba engedik.



Szteroid kikristályosodik a vizes fázisban

- Olajokkal, tenzidekkel és detergenssekkel megolvasztják a szteroidot (lesterilezik), és az olvadt anyag apró cseppekre diszpergálható (emulzió képzés).



Lehűtve az apró cseppekből apró szemcsék/kristályok lesznek, nagy fajlagos felülettel.



Technológiai lépések III.

- Ciklodextrinek alkalmazása
 - Ciklodextrinek molekulája alkalmas apoláris jellegű molekulák befogadására, így a szteroidokkal is zárványvegyületet képez. (reverzibilis folyamat)
 - Szabad és kötött molekulák kémiai egyensúlyban vannak
- ↓
- Az átalakulás során a szabad szubsztrát molekulák fogynak, a komplexből felszabadulva folyamatosan pótlódnak.
- ↓
- Rosszul oldódó szubsztrát (apró, nagy fajlagos felületű kristályok formájában van jelen)
- ↓
- A mikroba az oldatból felveszi a szubsztrátot, átalakítja, és leadja a terméket. A termék is rosszul oldódó szteroid, koncentrációja gyorsan eléri az oldhatósági határt, és ez is kikristályosodik a fermentléből. → Kristályfermentáció



Technológiai lépések IV.

3. Feldolgozás

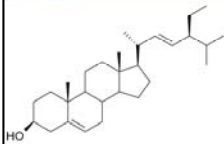
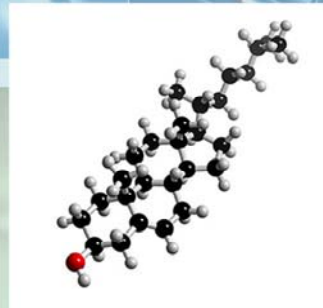
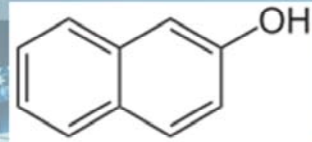
- A szteroid egy része oldott, a másik része szilárd fázisban van, ilyenkor rendszerint teljes/totál extrakciót végeznek erősen apoláris oldószerrel (pl. diklór-metán) ← minden apoláris anyagot kiold
- Az oldószer lehajtása után vegyes anyag marad vissza (pl. szubsztrát, termék és melléktermékek együtt).
- A következő lépésben olyan oldószert alkalmaznak, mely szelektíven old ki egy komponenst = ez a szelektív-, vagy differenciál-extrakció.

Vörös biotechnológia alkalmazása

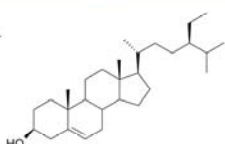


Kiindulási anyagok:

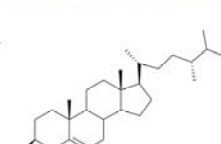
- Növényi: • szitoszterol (szójaolaj, egyes fák anyaga)
 - sztigmaszterol (babfélék)
 - dioszgenin (mexikói növény gyökere)
- Állati: • koleszterin (epeváladék)
- Szintetikus: β -naftol



Sztigmaszterin

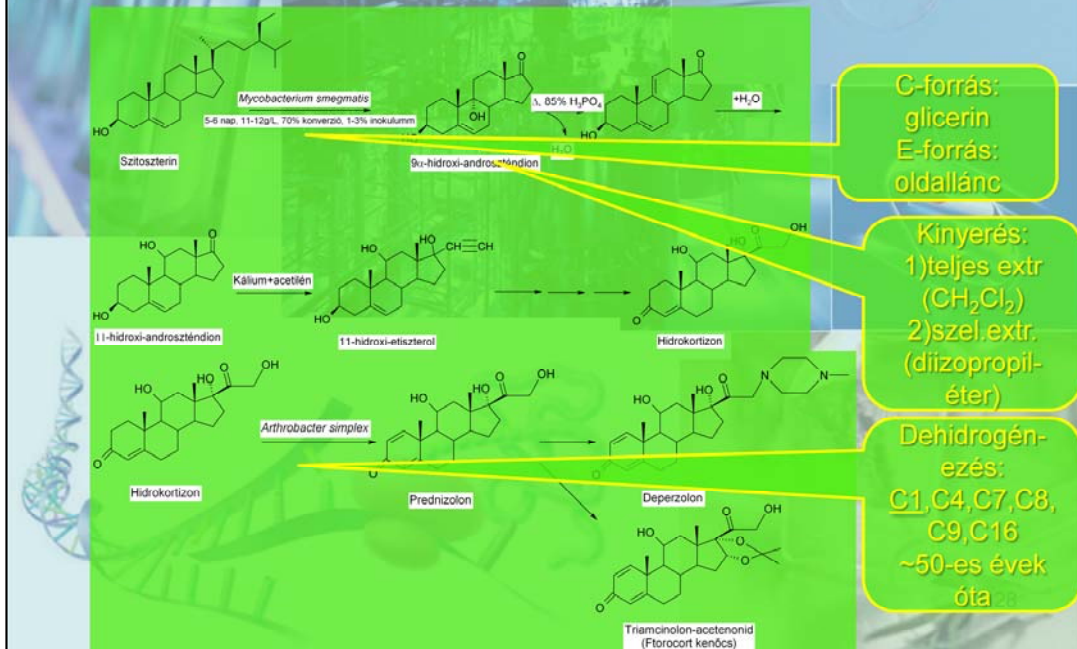


Szitoszterin



Kampezterin

Vörös biotechnológia alkalmazása



A **hidrokortizon előállítás** első lépésében *Mycobacterium smegmatis*-szal a szitoszterin oldalláncát eltávolítják, és a baktérium ugyanazon fermentációban a C₉-re OH csoportot is bevisz (hidroxilez). Az így kapott 9α-hidroxi-androszténdionból kémiai átalakításokkal állítják elő a hidrokortizont (2.1.12. ábra). Ezek első lépése a víz elvonás, majd víz addíció (e kettő következtében az OH csoport átkerül 9-ről a 11-es szénatomra), majd oldallánc kialakítás következik acetylénnel, végül annak módosítása.

2.3.4. ábra: Szitoszterin alapú hidrokortizon (bio)szintézis

A fermentációs lépéshez glicerint adnak szénforrás gyanánt, a szitoszterin oldallánc hasítása pedig – az előbbi példához hasonlóan – az energiát szolgáltatja a sejtek számára. Mivel a szitoszterin kristályos formában van jelen, amelynek felszínéhez a mikrobák oda tapadnak, valamint a termék is kristályos formában keletkezik, látszólag nem történik semmi, pedig a „kristályfermentáció” nyomán értékes átalakításokra kerül sor a szubsztráton.

A fermentációval előállított 9α-hidroxi-AD feldolgozása az AD előállításával analóg módon történik: először teljes extrakcióval kinyerik a maradék szubsztrátot és a keletkezett terméket (diklórmetánnal), majd szelektív extrakcióban elválasztják a kiindulási és termék szteroidokat (diizopropil éterrel a terméket oldják, metanollal a szitoszterin maradékot).

A kinyert 9α-hidroxi-androszténdiont 85%-os foszforsavval főzik víz kilépés érdekében, majd ismét vizet addicionálnak és 11α-hidroxi-androszténdion keletkezik. Erre acetylént addicionálnak, majd az így bevitt oldallánc kezdeményt alakítják tovább, amíg a hidrokortizonhoz jutnak.

Dehidrogénezés: A C-C kötések dehidrogénezésének képessége egy jellegzetes tulajdonsága az aktinobaktériumoknak, köztük is az *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioideis*, *Rhodococcus*, és *Streptomyces* nemzetségek egyes fajainak. Általában a C₁, C₄, C₇, C₈, C₉, és C₁₆ szén és az azt követő szénatom között alakulnak ki a dehidrogénezés miatt kettős kötések az *Actinobacterok* aktivitásának köszönhetően.

A 3-ketoszteroidok mikrobiológiai 1(2) dehidrogénezése (amit az 1950-es évek óta használnak) a prednizolon és prednizteroid gyártás alapja. Így az *Arthrobacter simplex*-et használják a pregnánok, androsztánok, és szterin illetve epesavak származékainak előállítására több évtizede.

A hidrokortizon hatékony gyulladáscsökkentő hatóanyag, de kedvezőtlenül hat a sóháztartásra, ezért a kevesebb mellékhatással rendelkező rokon vegyületeit (pl.: prednizolon) is forgalmazzák. A prednizolont aerob biokonverzióval az *Arthrobacter simplex* (más néven *Nocardioideis simplex*, vagy *Pimelobacter simplex*, propionsav baktérium) állítja elő hidrokortizonból (2.1.13. ábra).

2.3.5. ábra: Hidrokortizon biokonverziója prednizolonná és származékaivá

Fehér biotechnológia alkalmazása



Vegyipari technológiák:

Bioipari technológiák:

**Erélyes körülmények
(magas T°C, p)**

**Enyhe körülmények
(~testhőm., légköri p, sem.pH)**

Nagyobb energia igény

Kisebb energia igény

**Gyakran agresszív
katalizátorok**

**Biokatalizátorok:
sejtek, enzimek->
lebomlik, szelektív(!)**

**Magasabb
környezetterhelés**

**Kisebb
környezetterhelés**

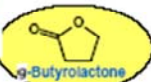
Fehér biotechnológia alkalmazása



A v

pl
1.

**GBL(butirolakton)
oldószer**



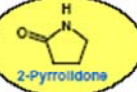
$C_4H_6O_2$, MW = 86.09

**Oldószer
Adhezió
Tinta**



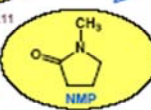
C_4H_8O , MW = 72.11

**Oldószer
Lágyító**

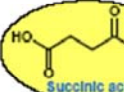


C_4H_7NO , MW = 85.11

Oldószer



C_5H_9NO , MW = 99.13

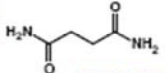


$C_4H_6O_4$, MW = 118.09



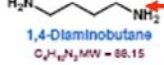
$C_4H_{10}O_2$, MW = 90.12

**Polibutiléntereftalát
(PET alternatíva)**

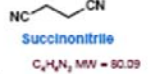


$C_7H_{12}N_2O_2$, MW = 116.12

poliamid



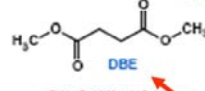
$C_4H_{12}N_2$, MW = 86.15



$C_4H_6N_2$, MW = 80.09



**Tremoplasztikus
Poliészter, biodegradálható**



$C_8H_{16}O_4$, MW = 146.14

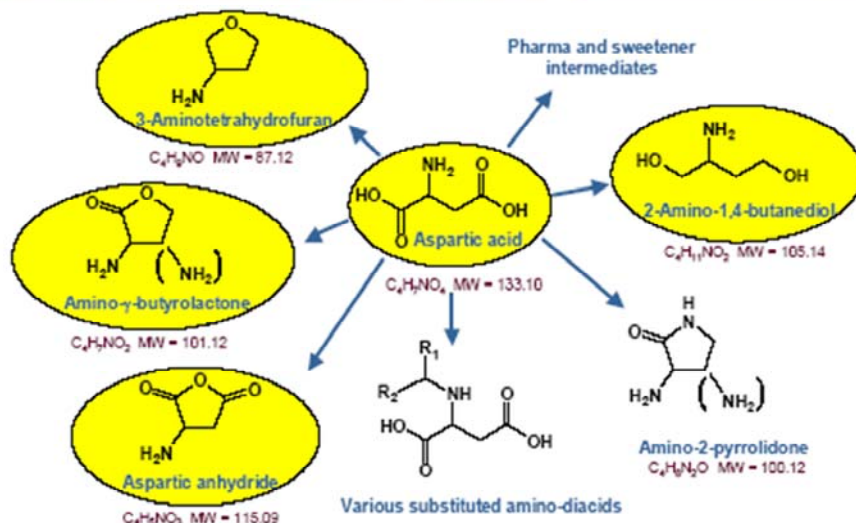
zsírtalanító

Fehér biotechnológia alkalmazása



A v
alk

pl
1.
2.



Fehér biotechnológia alkalmazása

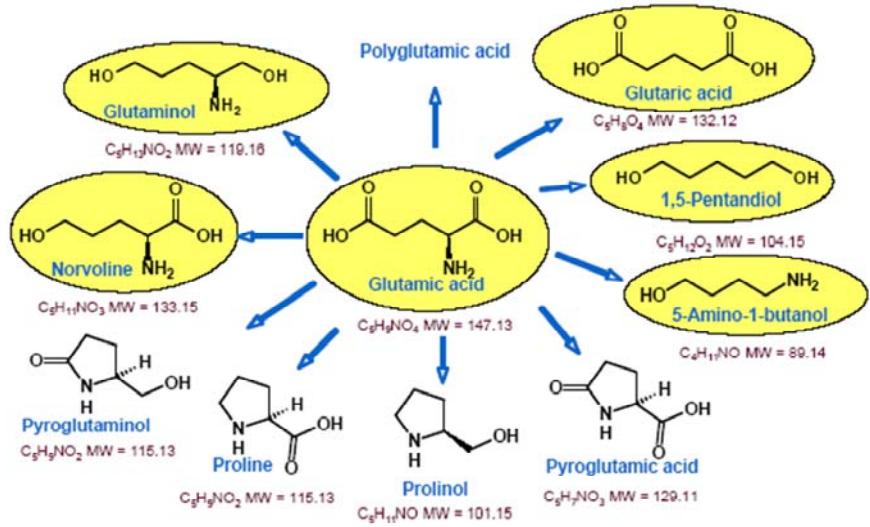


A ve
alko

pl.
1. E

2. A

3. C



Fehér biotechnológia alkalmazása



A ve
alko

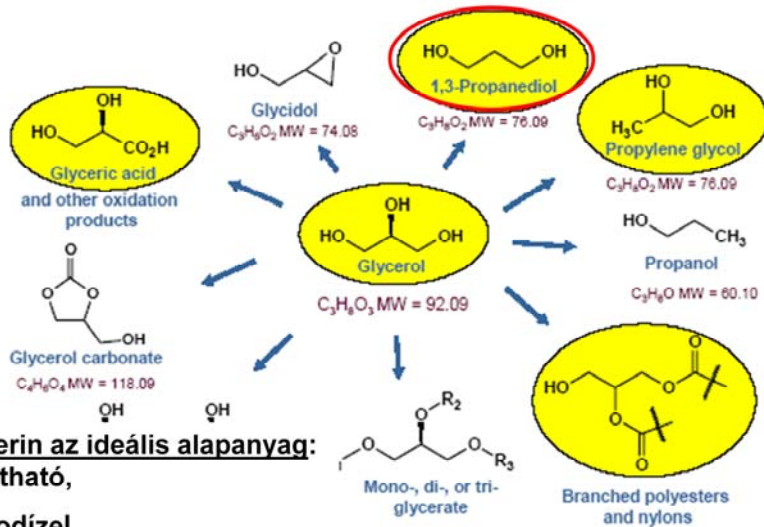
pl.:

1. E

2. A

3. C

4a.



Glicerin az ideális alapanyag:
gyártható,

v. biodízel
melléktermék=megújuló

Platform képző

Fehér biotechnológia alkalmazása



1,3Propándiol

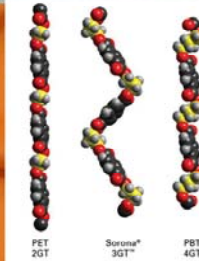
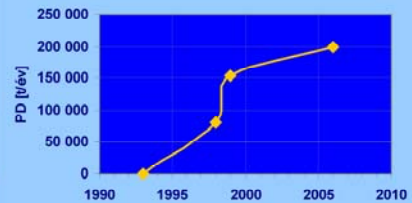
Évi 200.000t, 3/4-e szintetikusán

Növekvő piac

Széleskörű felhasználás:

- Önmagában: oldószer, fagyásgátló
- PoliTrimetilénTereftálsav

1,3-PD termelés



Fehér biotechnológia alkalmazása



1,3Propándiol előállítás

Szintetikusan:

EtO hidroform. (Shell), Acr.kat.hidr.
(Degussa)

Biológiailag (de novo fermentáció)

- Glükóz – glicerín (*S.cerevisiae*)
- Glicerín – 1,3PD (*C.freundlii*)
E.coli



Enzimesen?
előnyök

Fehér biotechnológia alkalmazása



A vegyipar
alkotó mole

pl.:

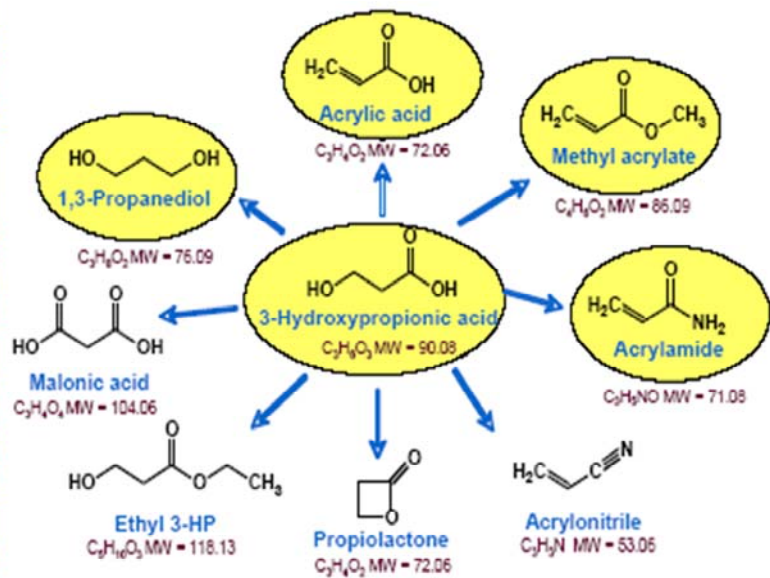
1. Borosty

2. Aszpara

3. Glutami

4a. Gliceril

4b. 3-HP-p





A vegyipar
alkotó me

pl.:

1. Boros

2. Aszpa

3. Gluta

4a. Glice

4b. 3-HP

5. Itakor

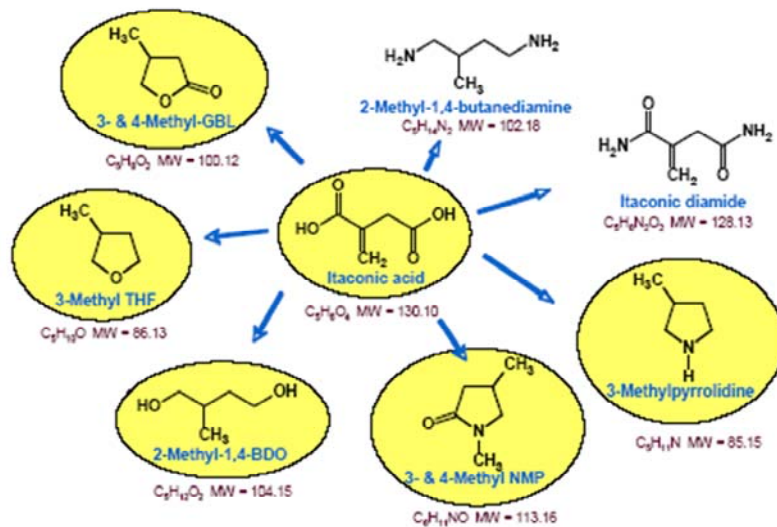
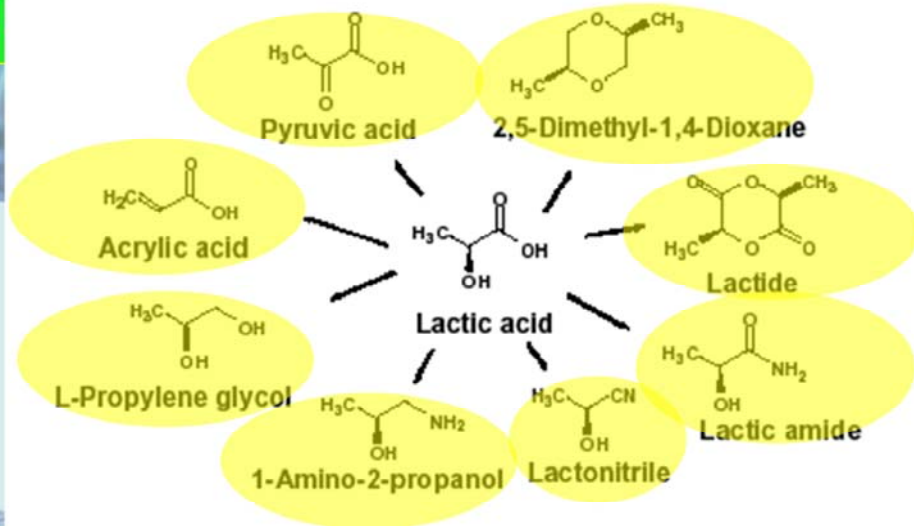


Figure 12- Itaconic Acid Chemistry to Derivatives



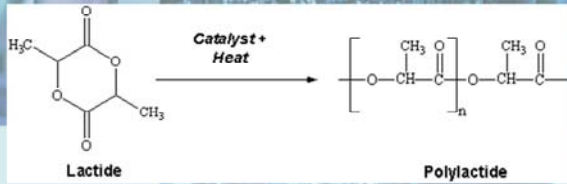
6.



Fehér biotechnológia alkalmazása

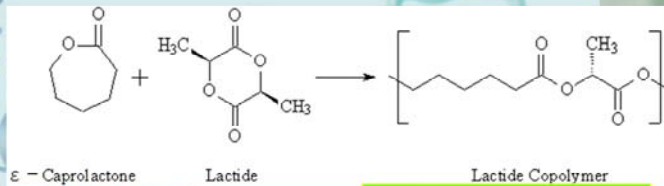


Tejsavsav-PLA



- Biokompatibilis
- Biodegradálható
- Jó meh.tul.

Homopolimer



Heteropolimer

Fehér biotechnológia alkalmazása



Tejsav-előállítás

Kémiai-előállítás:

Biológiai-előállítás:

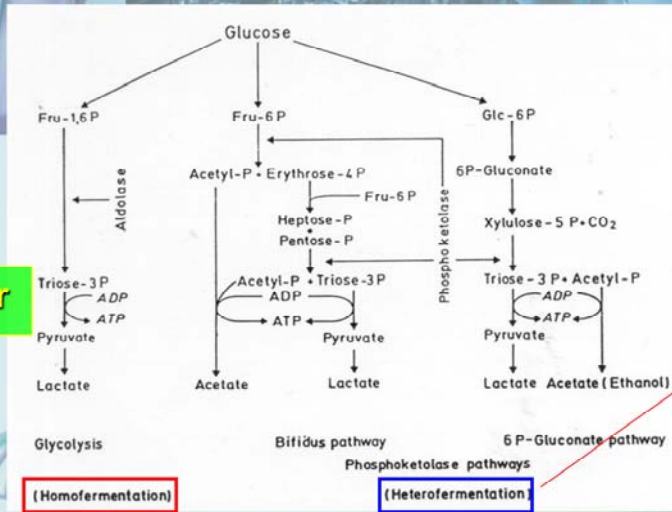
Katalizátor	CaO, NaOH, Ba(OH) ₂	<i>Lactobacillus sp.</i>
Hőmérséklet	200°C	37-55°C
Hozam	45-75%	90-95%
Izomer	Racém elegy	Optikailag tiszta, főleg L-(+) (törzstől függ)



Tejsavsav-előállítás fiziológiája

vegyipar

tejipar



Fehér biotechnológia alkalmazása



Tejsav-fermentáció

1. Alapanyag

Cukor (keményítő, glükóz)

+ fehérje (hidrolizátum)

Növény eredetű=
Megújuló
(gabona-
termelés<->EU)

2. Mikroba:

Lactobacillusok, Bacillusok, Rhizopus sp.



Tejsav-fermentáció

3. Fermentációs rendszer

- szakaszos technika **DE** pH kontroll (5,5-6) – toxikus termék, és pH vált.->meghatározza a downstreamet

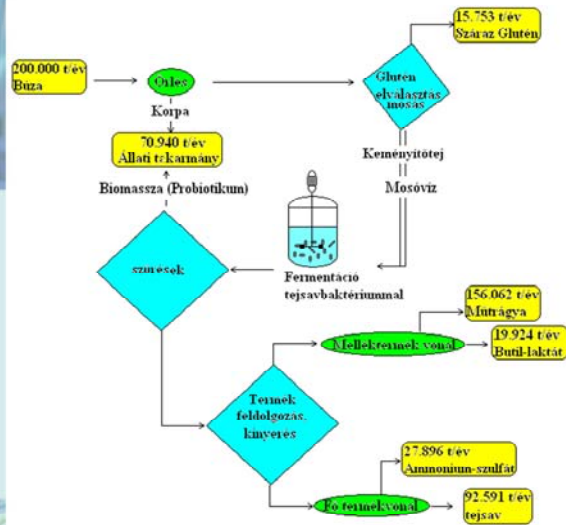
- SSF technika

- Sejtvisszatartásos, ED-vel kombinált=integrált

- Anaerob/fakultatív anaerob törzsek-> enyhe keverés, >42°C, 4-6 nap

- Nincs levegőztetés->olcsóbb, nincs habzás

Fehér biotechnológia alkalmazása



Fehér biotechnológia alkalmazása



Tejsav termék-minőség

Technikai	Világos barna Vas mentes 20-80%	textil ipar, észter gyártás
Élelmiszeripari	színt., szagt. >80%	élelm. adalék
Gyógyszeripari	színt., szagt. >90% LA, <0,1% hamu	higénia, fém-laktátok
Műanyagipari	színt., szagt. >90% LA, <0,01% hamu	Biodegradálható polimer

Fehér biotechnológia alkalmazása



Köszönöm a figyelmet!

**„Úgy látom, hogy lélegzet elállító fejlődésnek leszünk tanúi..., és a biotechnológiai kuttók és cégek lesznek ennek a fejlődésnek a középpontjában.”
(Bill Gates, New York Times (1996.jún.8.))**

**„It might looks that I am doing nothing, but at a celular level I am really quite busy.”
(*Lactobacillus*)**