

# BIOLÓGIA és BIOTECHNOLÓGIA

## 6. rész

Előadó: Ballagi András, c. egyetemi tanár  
Richter Gedeon NyRt. - BME

Írásos segédanyag található a:

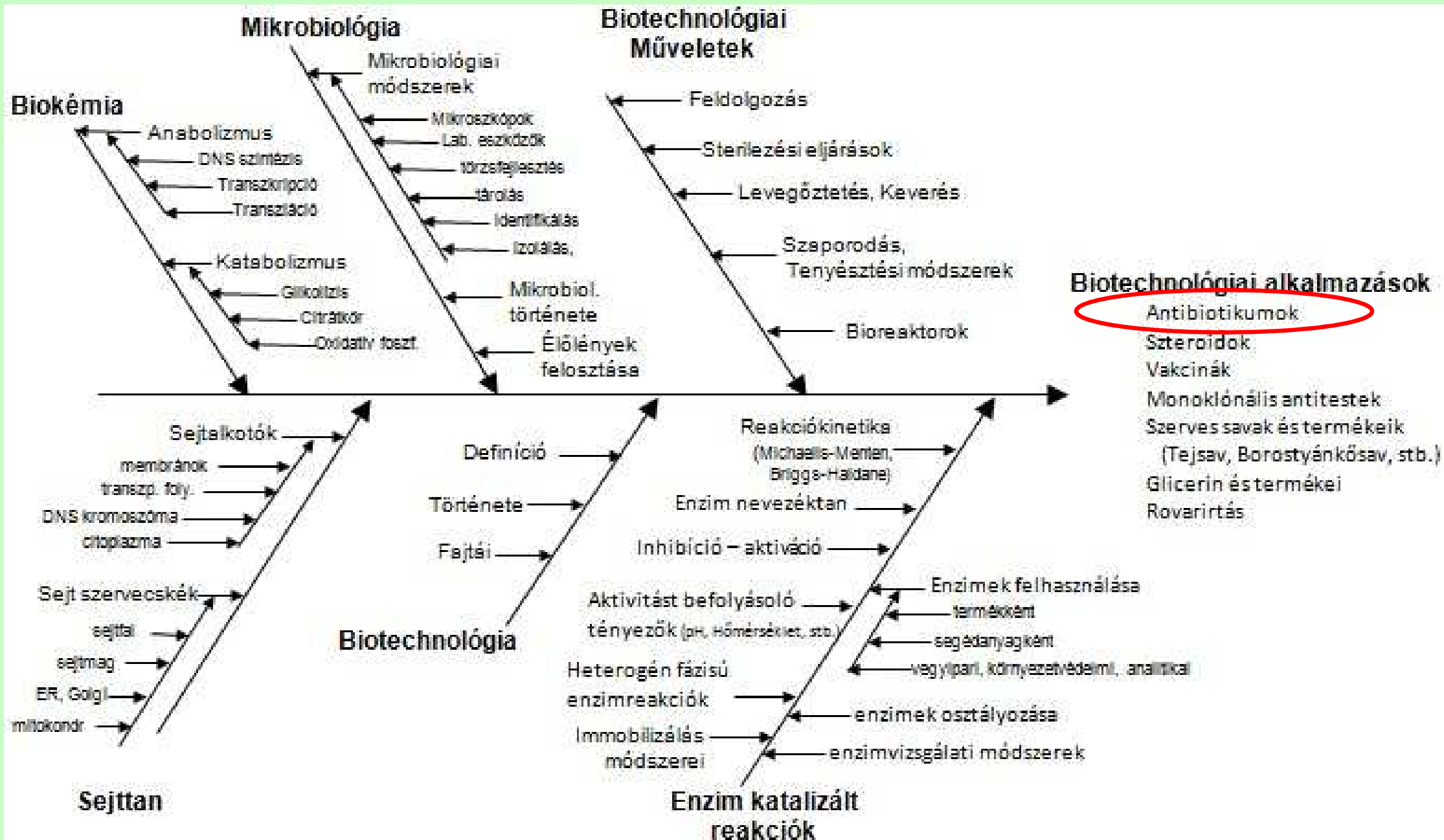
<http://oktatas.ch.bme.hu>

/oktatas /konyvek /mezgaz

/Biol-biotech-vegyész-MSc címen



# A tananyag szerkezete:



# Antibiotikumok

**Az antibiotikumok szelektíven toxikusak. Az eukarióta sejtek alkotóira és molekuláira nem hatnak, így azokat nem befolyásolják.**

**A prokariótákon sokféle hatás létezik. Egyes antibiotikumok a**

<b>a sejtfalat támadják,</b>	<b>a transzkripció enzimeit v. faktorait</b>
<b>a sejt membránt,</b>	<b>a DNS replikáció enzimeit,</b>
<b>a bakteriális riboszómákat,</b>	<b>a bakteriális anyagcsere enzimeket.</b>

**Pl. penicillin, ampicillin, amoxycillin, methycillin**

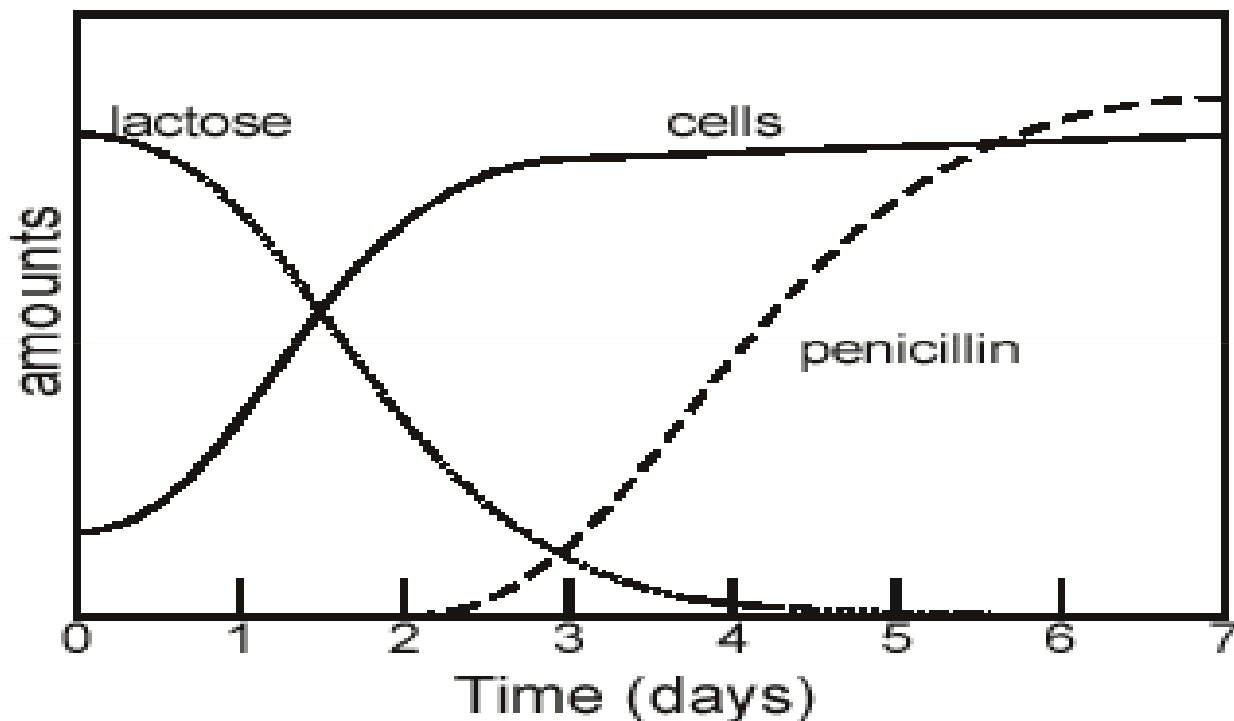
**Inhibálja a peptidoglikán sejtfal szintézisét végző enzimet. Ezáltal sejt lízist idéz elő. (*Bacteriocidal*, azaz baktériumölő hatás)**

**Szűk spektruma van, főleg Gram +-okra hat, Gram – baktériumokon csekély hatás.**



# Penicillin termelés

A penicillint a *Penicillium chrysogenum* fonalas gomba termeli. A termeléshez laktóz, egyéb cukrok és nitrogénforrás kell.



Akárcsak a többi antibiotikum, ez is szekunder metabolit, vagyis legjobban a stationer fázisban termelődik.

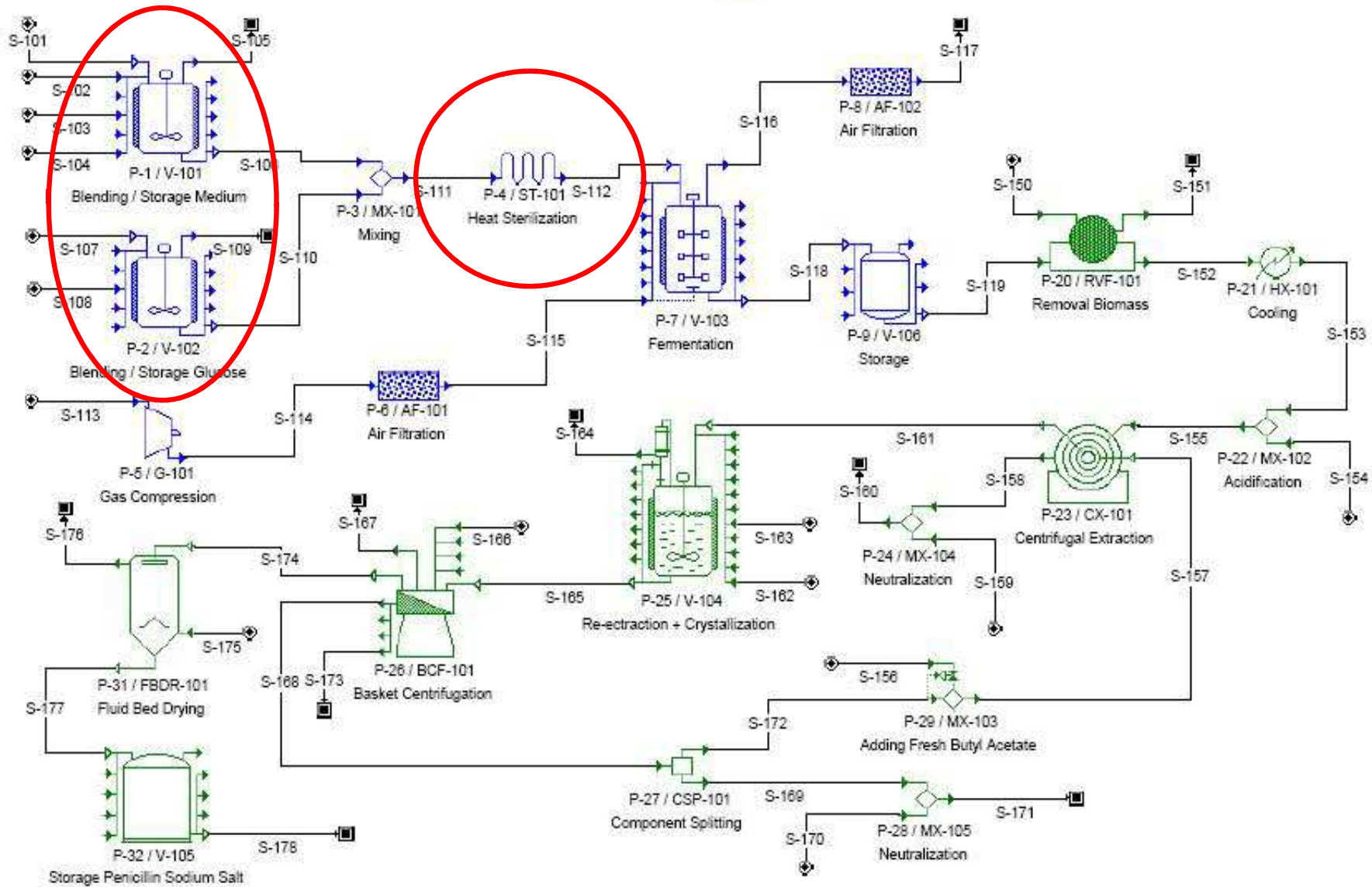
A termelés Kevert Tank Reaktorban (STR fermenter) történik fed-batch eljárás keretében, amely elnyújtja a stationer fázist, növelve a termelés idejét.

A penicillin termelés kezdetben 1 mg/lit. volt, manapság 50 g/lit. is lehet. Törzsfejlesztési módszerekkel további növelés a cél és a COG csökkentése.



# A penicillin termelés folyamatábrája

## Tápanyagkészítés és sterilizálás



**A tápoldat szénforrásként és nitrogénforrásként kukorica lekvárt tartalmaz, valamint tiszta glukózt.**

**A szervesetlen sók: magnézium szulfát, kálium foszfát, nátrium nitrát és nyomelemek. Ezek esszenciálisak a gomba anyagcseréjéhez.**

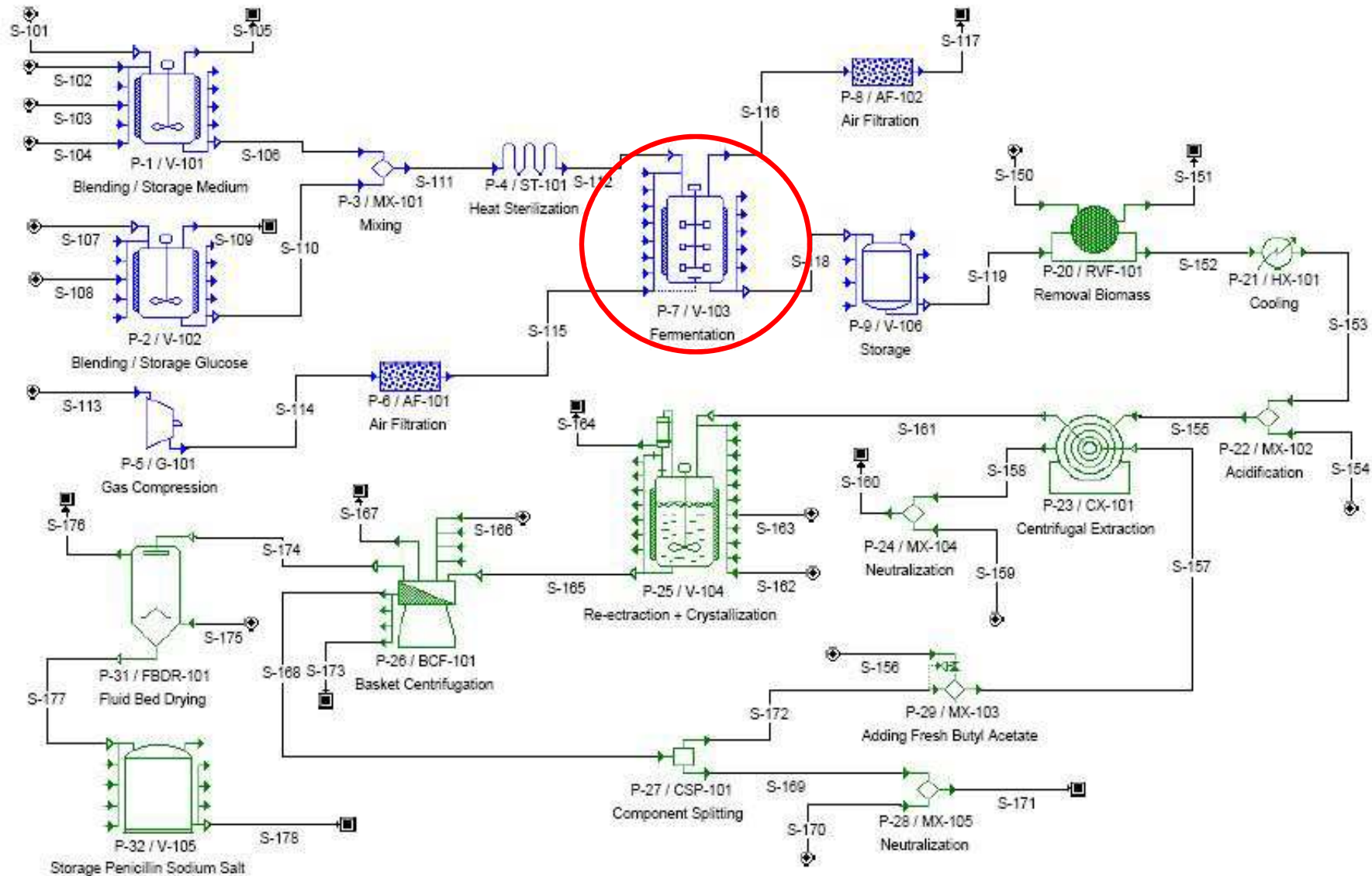


**A tápoldatot magas hőmérsékleten és nyomáson sterilezik, pl. 1,2 bar, 121oC. Magas hőmérséklet és rövid idő használatos, hogy az érzékeny komponensek degradációját meg lehessen akadályozni.**



# A penicillin termelés folyamatábrája

## Tenyésztés



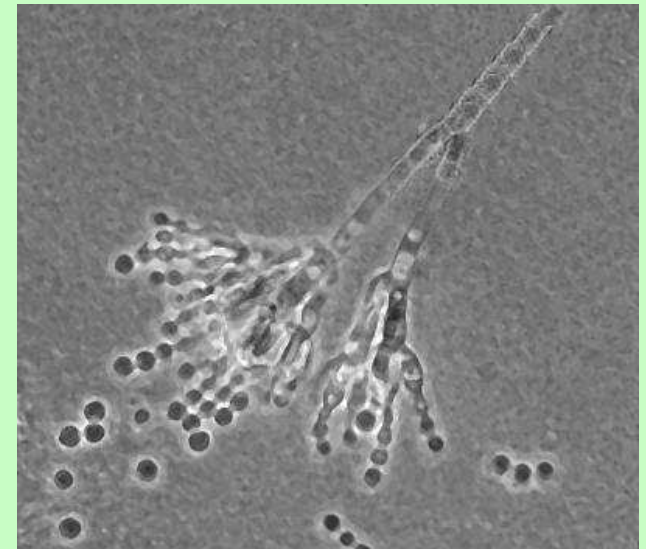
# A termelő gomba tenyésztése

A tenyésztés során a glukózt lassan adagolva táplálják be, mert a magas cukorkoncentráció csökkenti a penicillin termelést.

Tipikus tenyésztési paraméterek:

Hőmérséklet 20-24°C, pH 6.0 és 6.5 között.

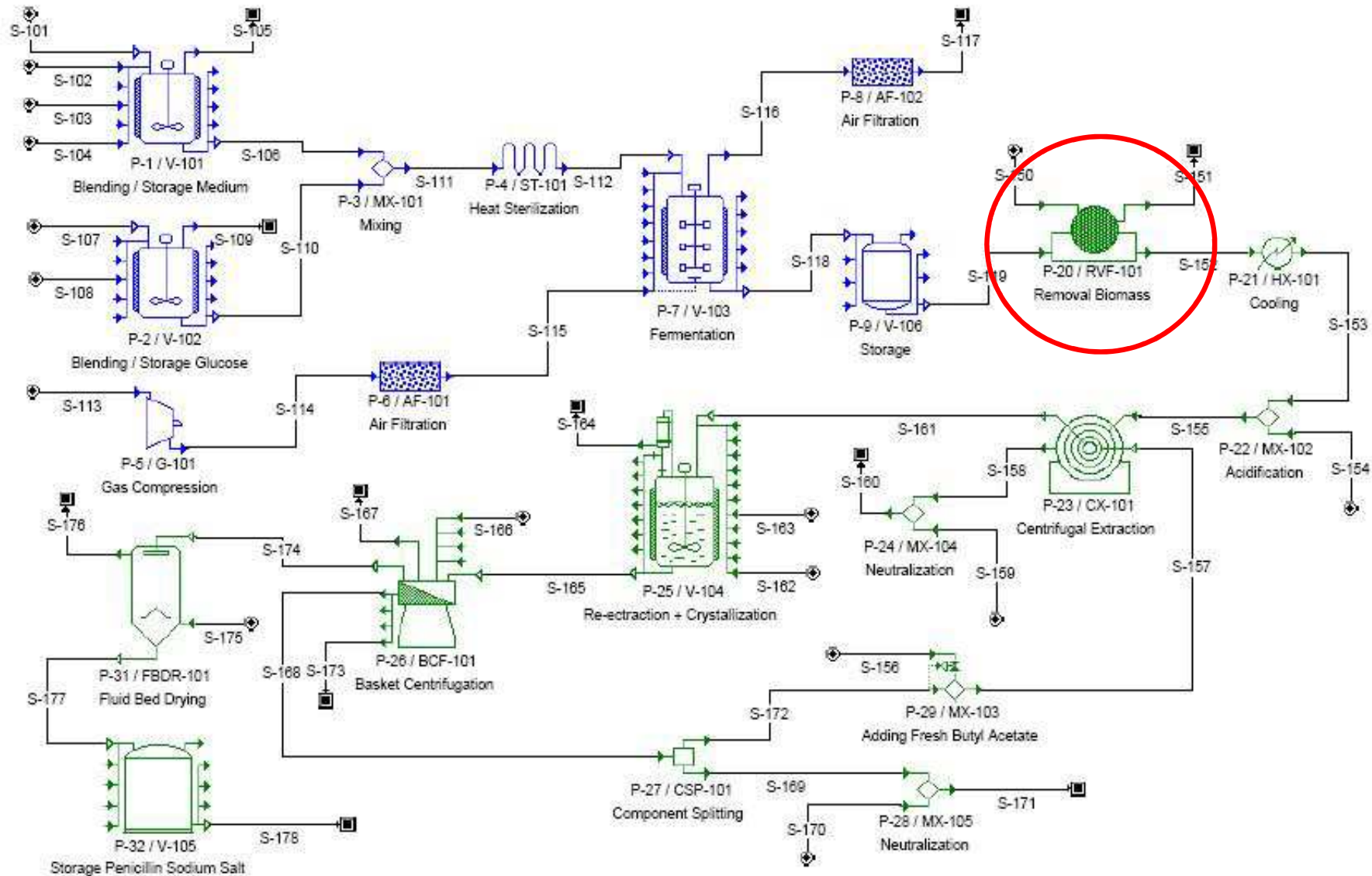
Erős keverés kell a homogén viszonyok eléréséhez.





# A penicillin termelés folyamatábrája

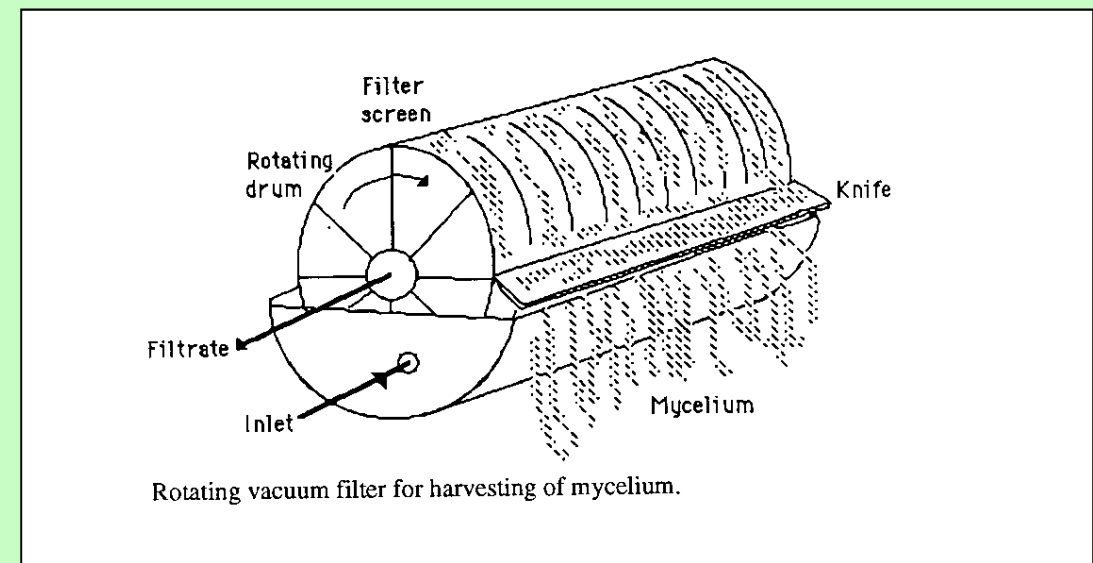
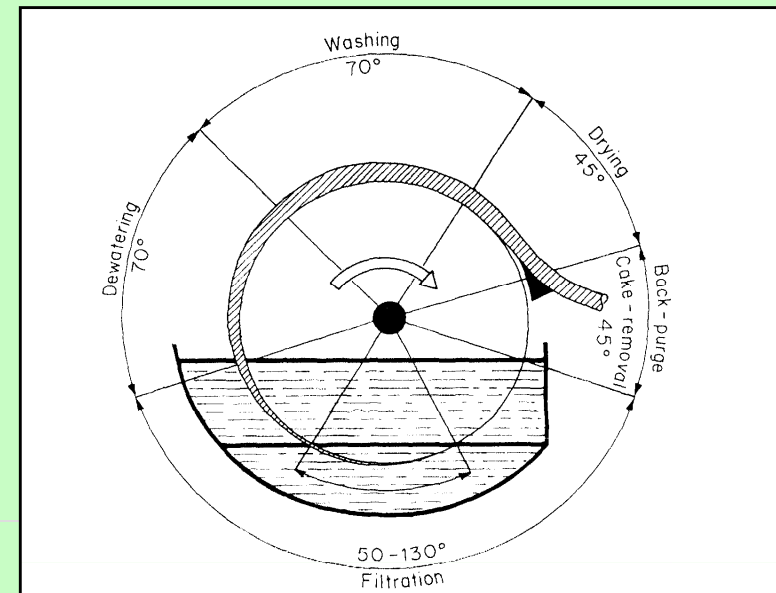
## Sejtelválasztás



# Sejtelválasztás

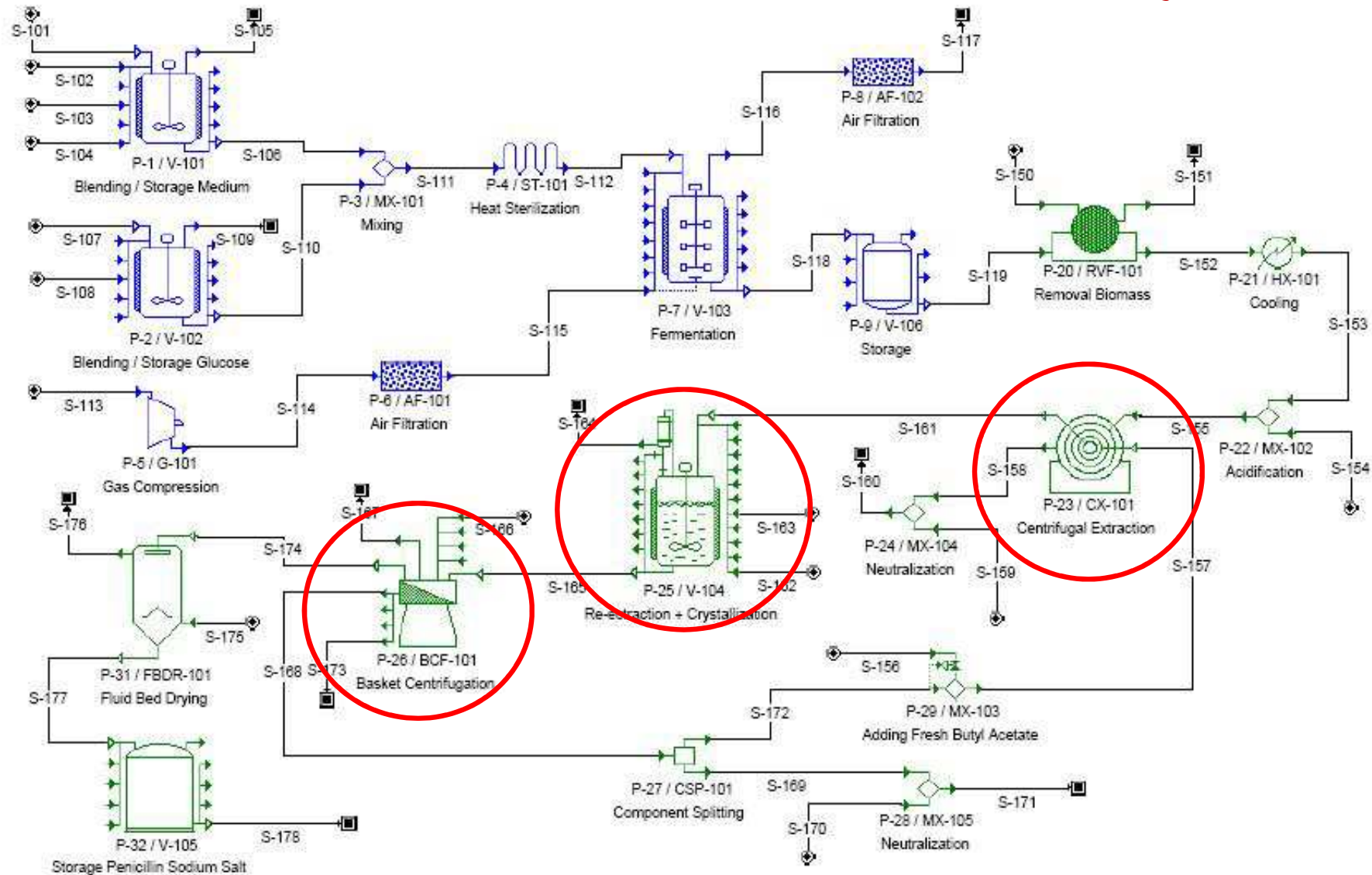
A szűrés elválasztja a gomba micéliumot a felülúszótól, ami a terméket tartalmazza. Forgódobos vákuumszűrőt alkalmaznak folyamatos üzemmódban.

Nem-oxidáló savat pl. foszforsavat alkalmaznak a penicillin aktivitásának megőrzésére. A pH 6 és 6,5 között kell legyen.



# A penicillin termelés folyamatábrája

**Extrakció,  
kristályosítás**



# Penicillin extrakció

A penicillin oldhatóságát amil-acetát v. butil-acetát adagolással növelik. Majd extrahálják kloroformmal, végül éterrel.

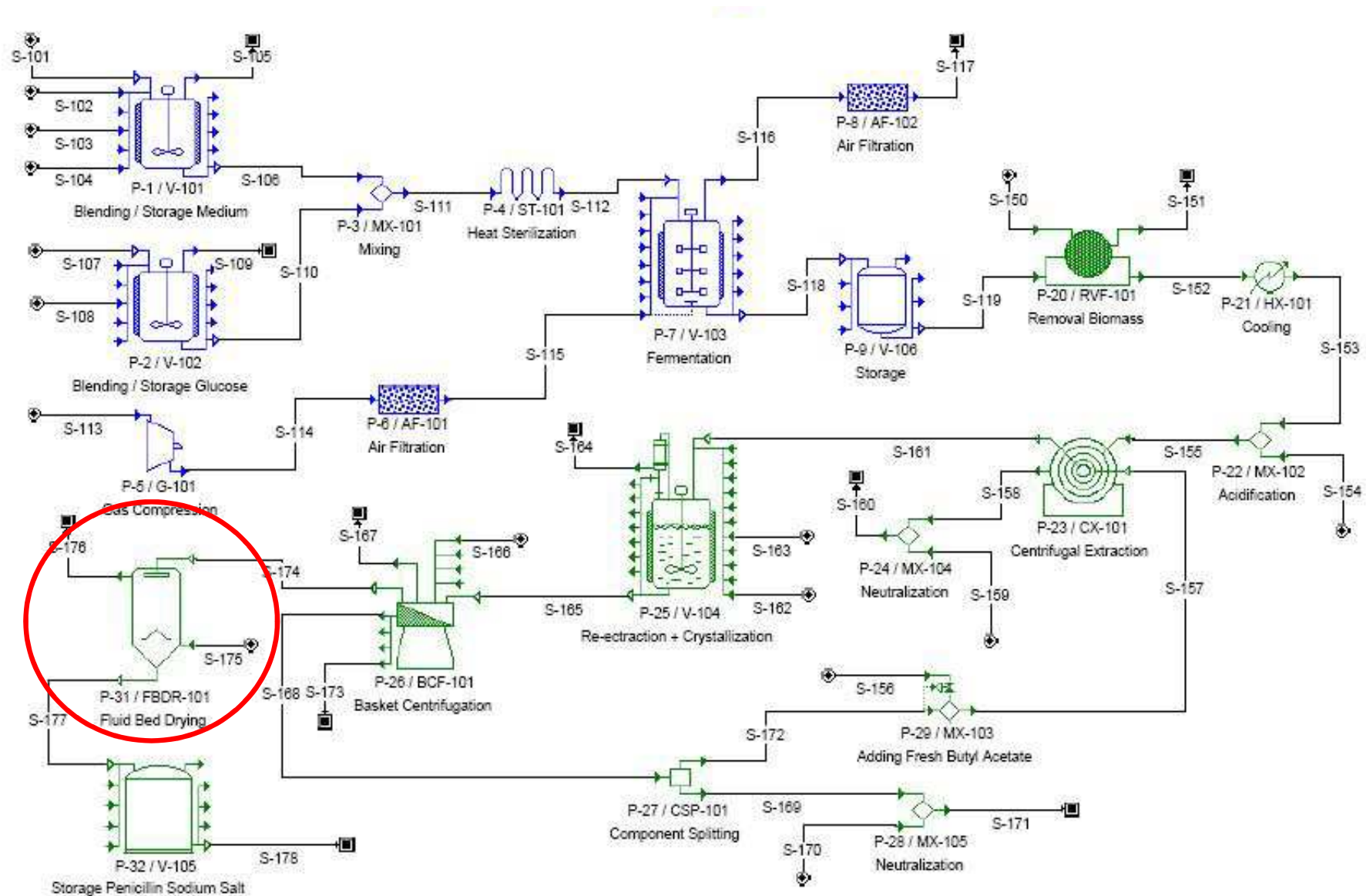
A szennyeződések rendre a másik fázisban maradnak. A tiszta penicillin már nagyon nagy koncentrációban van az éterben, így nátriumbikarbonát adagolás után kikristályosítható nátrium só formájában.

A szilárd fázis eltávolítása kosaras centrifugában történik.



# A penicillin termelés folyamatábrája

## Szárítás

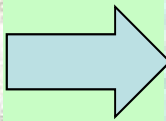


# Penicillin szárítás

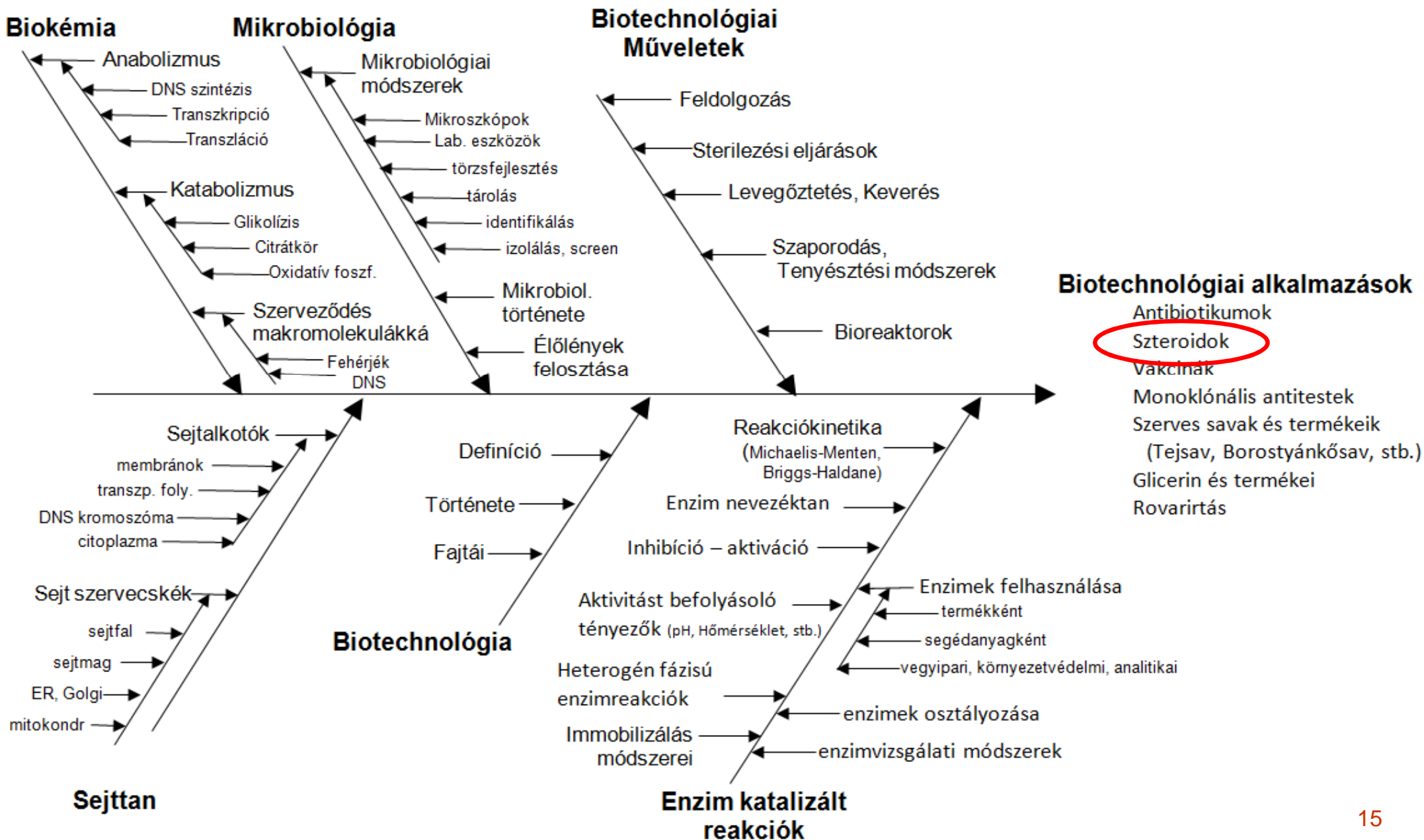
Eltávolítja a maradék nedvességet a jobb eltarthatóság érdekében.

A fluidágyas szárítóban forró gázt áramoltatnak a vákuum készülék aljától, ahol a penicillin por található.

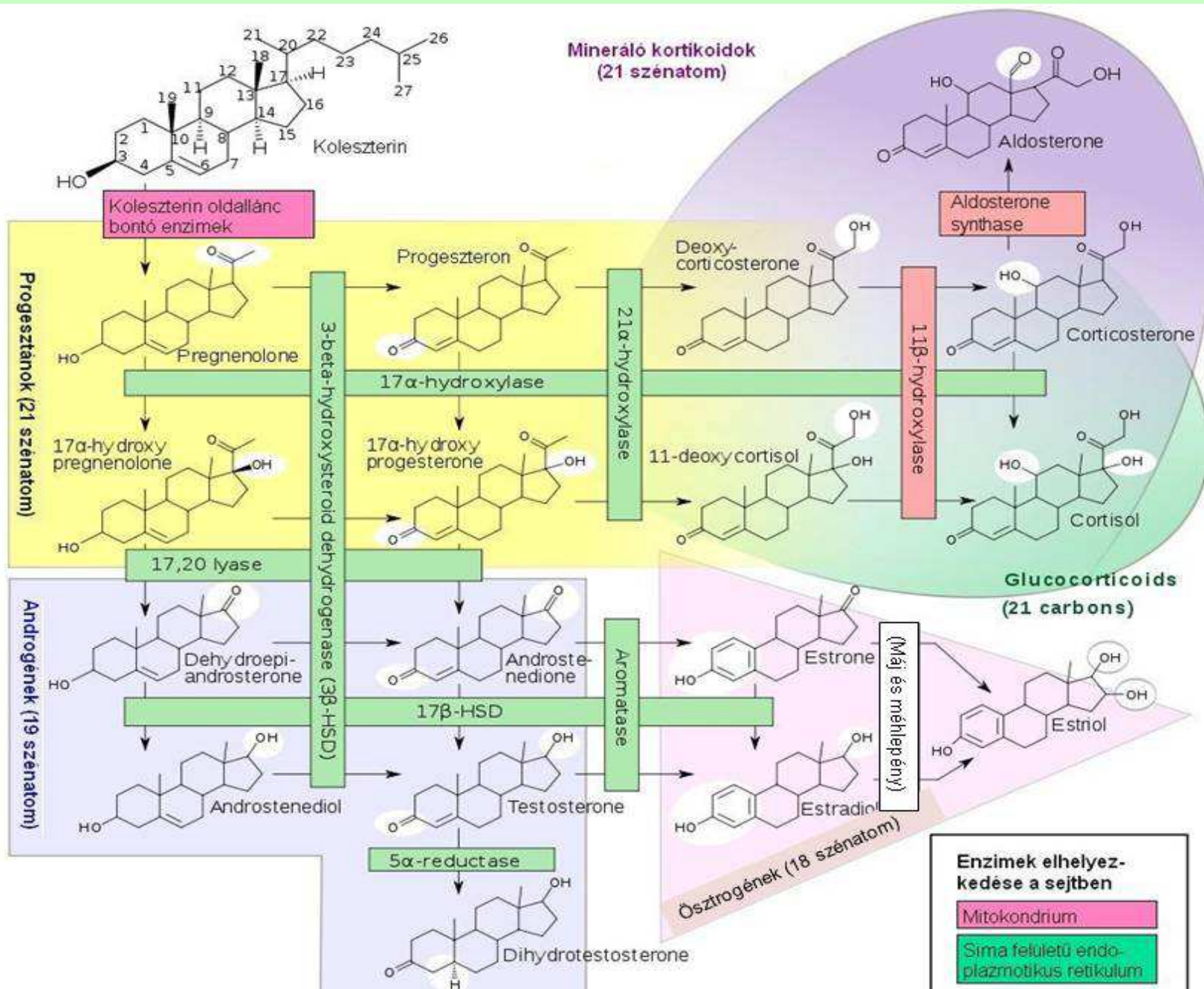
A nedvesség távozik és egy sokkal szárazabb állapot jön létre.



# Itt járunk:



# Szteroidok „családfája” az emberi szervezetben





## Szteroid konverziók

A szteránvázas vegyületek előállítása soklépéses, hosszadalmas folyamat.

Egy-egy lépésben csak egy kis szerkezeti részt változtatnak meg, (sztereo)szelektív átalakításokra van szükség

Érdemes megpróbálni enzimesen. Az iparban kémiai és biológiai lépések váltogatják egymást.

nyugvó sejtömeg  
előállítása

enzimtermelés

konverzió

→ induktor hozzáadása  
(szteroid v. analóg bevitele  
molekula)

→ szubsztrát → termék

Minden konverziós lépéshez külön törzset kell keresni

A szükséges enzimeket nem izolálják, hanem nyugvósejtes tenyészetben használják.



# Technológiai lépések I.

1. Oltás

2. Sejtszaporítás a törzs igényeinek megfelelő tápoldaton.

3. A sejtek elszaporodása és a táptalaj részleges kimerülése után a konverzióhoz szükséges enzimet indukálják - induktor anyagot adagolnak: pl. szteroid szubsztrát, naftol származék.

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



## Technológiai lépések II.

### 4. A szteroid szubsztrát adagolása

Komoly problémát jelent, hogy a szteroidok rosszul oldódnak vízben, ezért azokat különböző technikákkal viszik be a fermentlébe:

A szubsztrátot felveszik oldószerben (pl.: etanol, mert az nem károsítja a tenyészetet), és lassan a fermentorba engedik. A szteroid kikristályosodik a vizes fázisban

vagy:

Olajokkal, tenzidekkel és detergenssekkel megolvasztják a szteroidot (sterilezik), és az olvadt anyag apró cseppekre diszpergálható (emulzió képzés). Lehűtve az apró cseppekből apró szemcsék/kristályok lesznek, nagy fajlagos felülettel.

vagy:

A ciklodextrinek alkalmasak apoláris jellegű molekulák befogadására, így a szteroidokkal is zárványvegyületet képeznek (reverzibilis folyamat). A szabad és kötött molekulák kémiai egyensúlyban vannak.



## Technológiai lépések III.

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

### 5. Feldolgozás

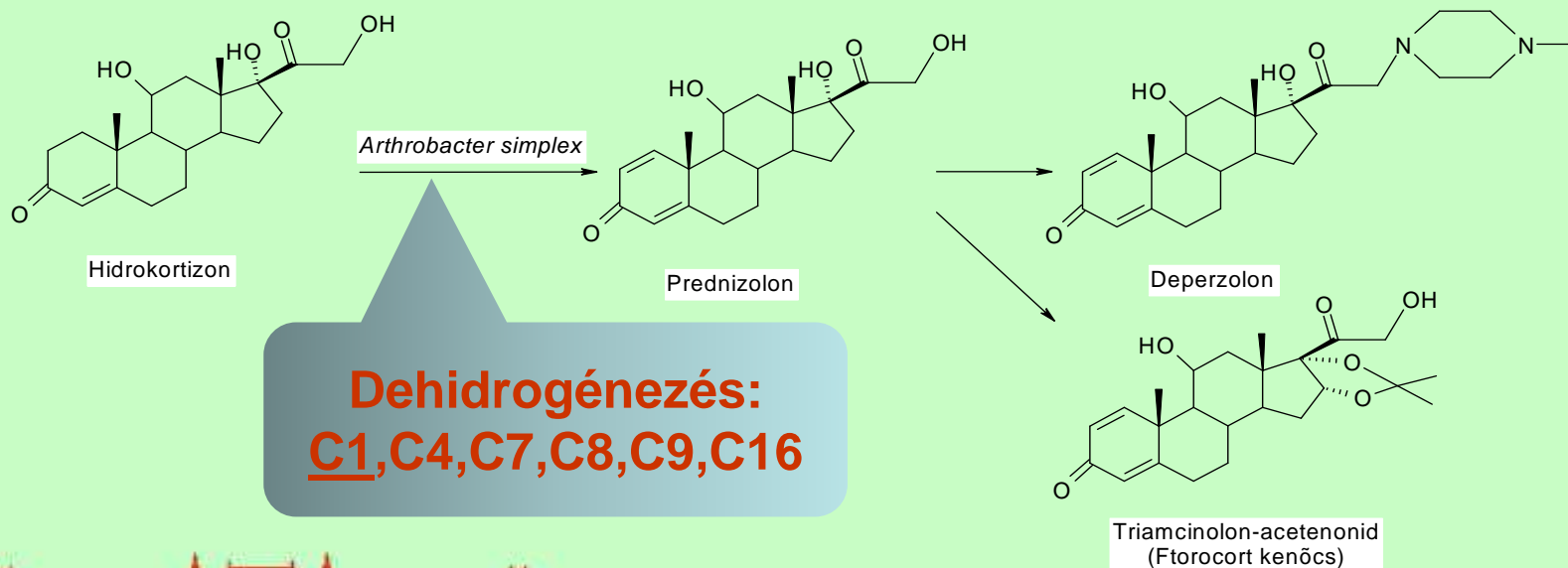
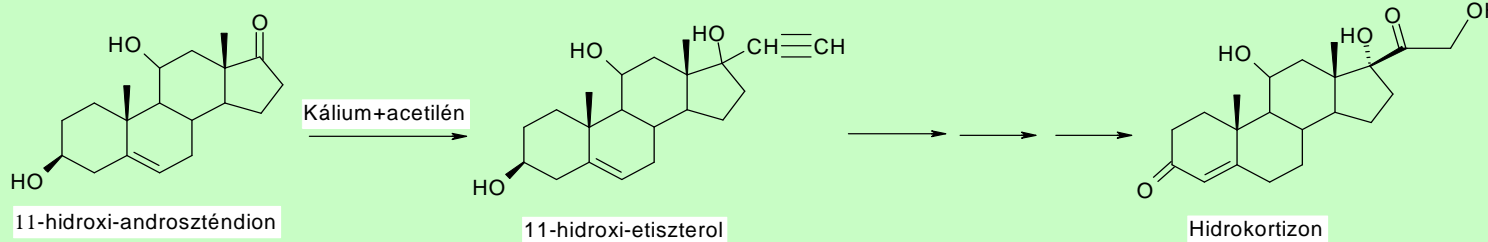
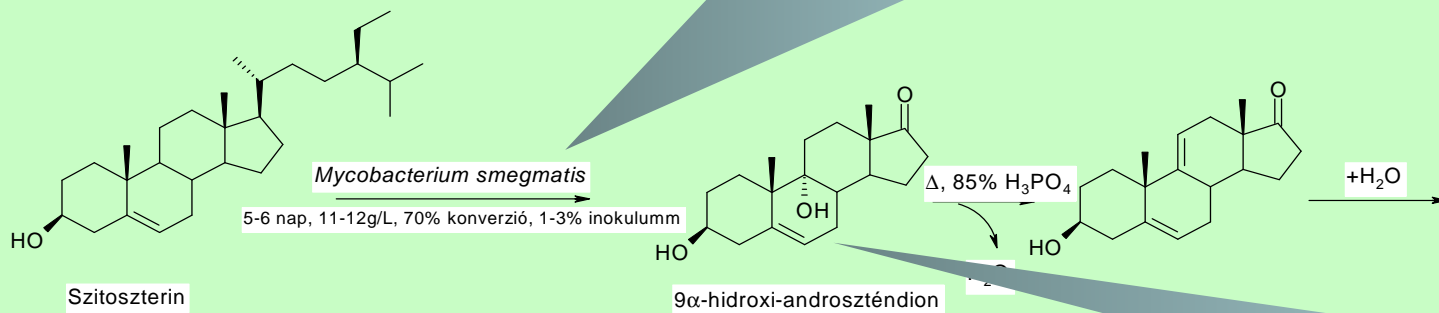
A szteroid egy része oldott, a másik része szilárd fázisban van, ilyenkor rendszerint teljes/totál extrakciót végeznek erősen apoláris oldószerrel (pl. diklór-metán), amely minden apoláris anyagot kiold.

Az oldószer lehajtása után vegyes anyag marad vissza (pl. maradék szubsztrát, termék és melléktermékek együtt).

A következő lépésben olyan oldószert alkalmaznak, mely szelektíven old ki egy komponenst = ez a szelektív-, vagy differenciál-extrakció.



**C-forrás: glicerín**  
**E-forrás: oldallánc**

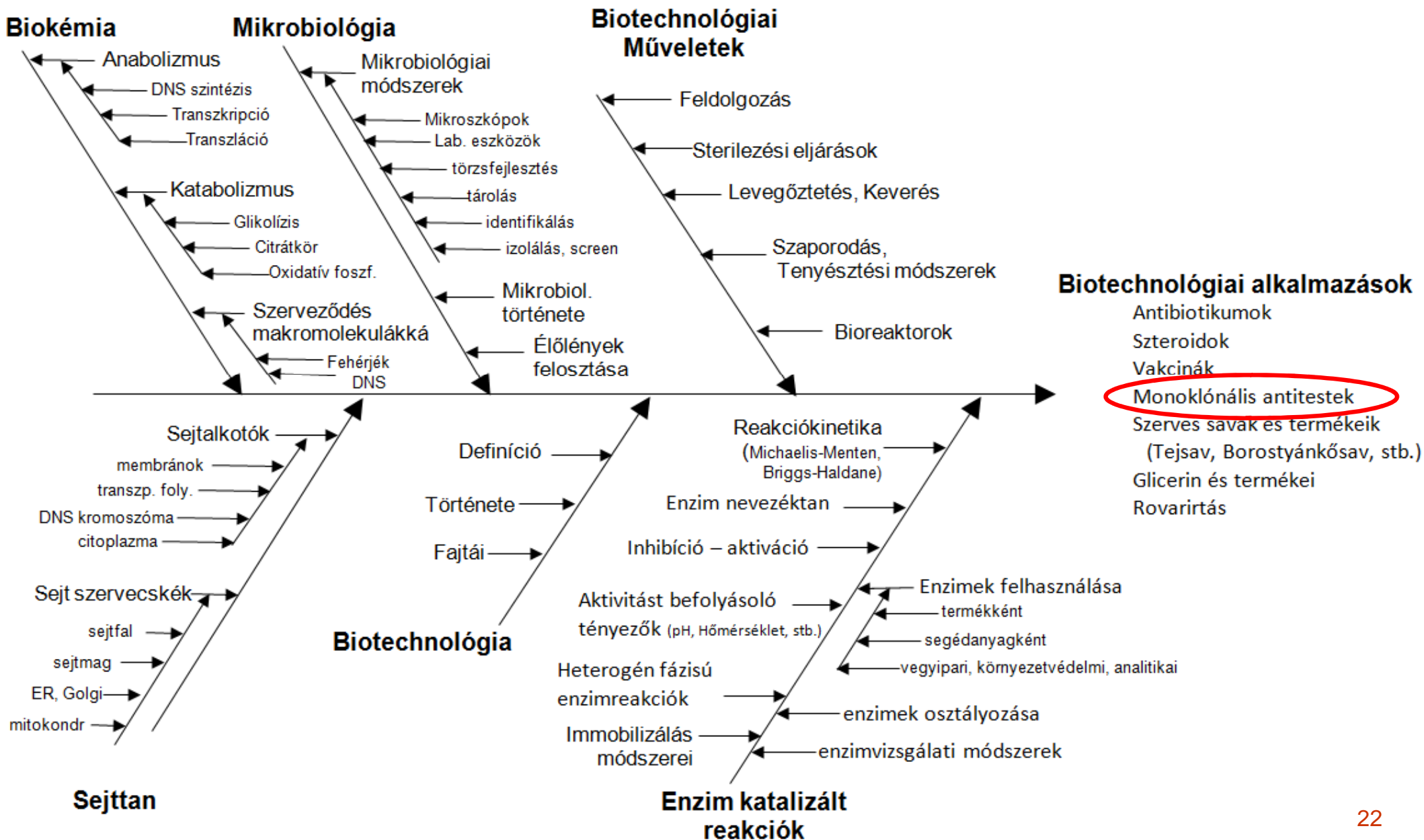


**Dehidrogénezés:**  
**C1,C4,C7,C8,C9,C16**

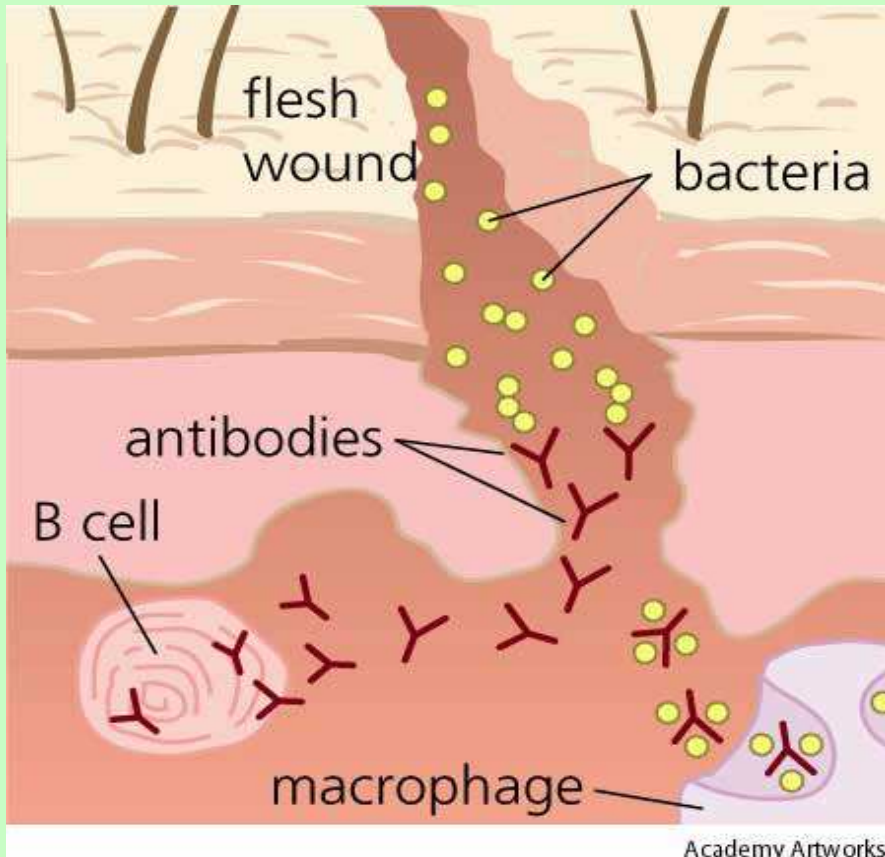
**Kinyerés:**  
**1)teljes extr (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**  
**2)szel.extr. (diizopropil-éter)**



# Itt járunk:



# Az antitestek fiziológias szerepe



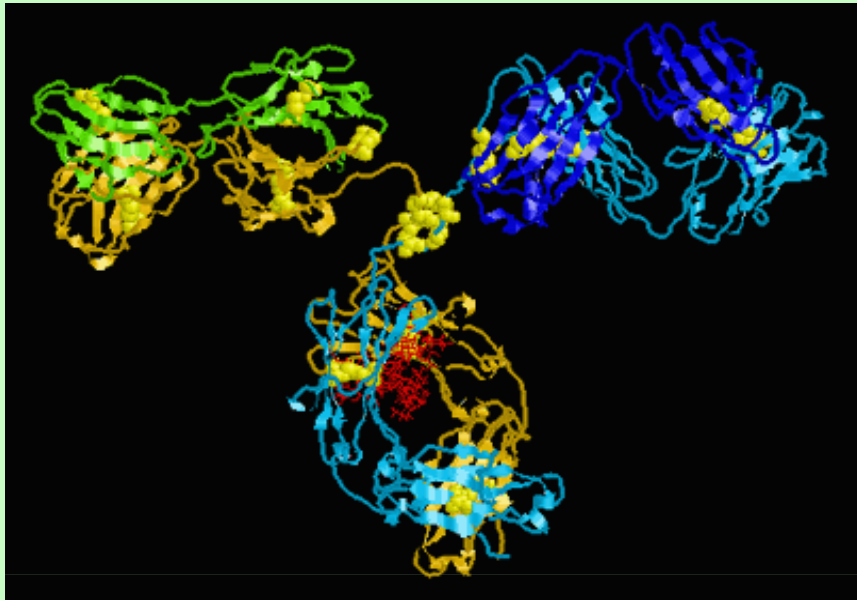
Y alakú fehérje, amely a B limfociták felületén keletkezik és így kerül a vérbe. Magát a folyamatot az antigén (vírus, baktérium, rákos sejt, idegen test, parazita) megjelenése határozza meg.

**Az antitestek nagyon specifikusak!**

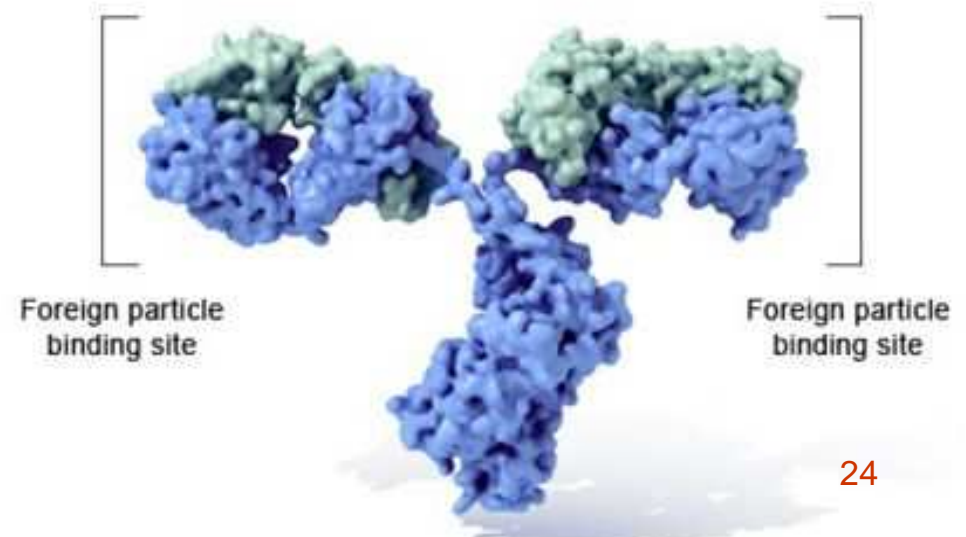
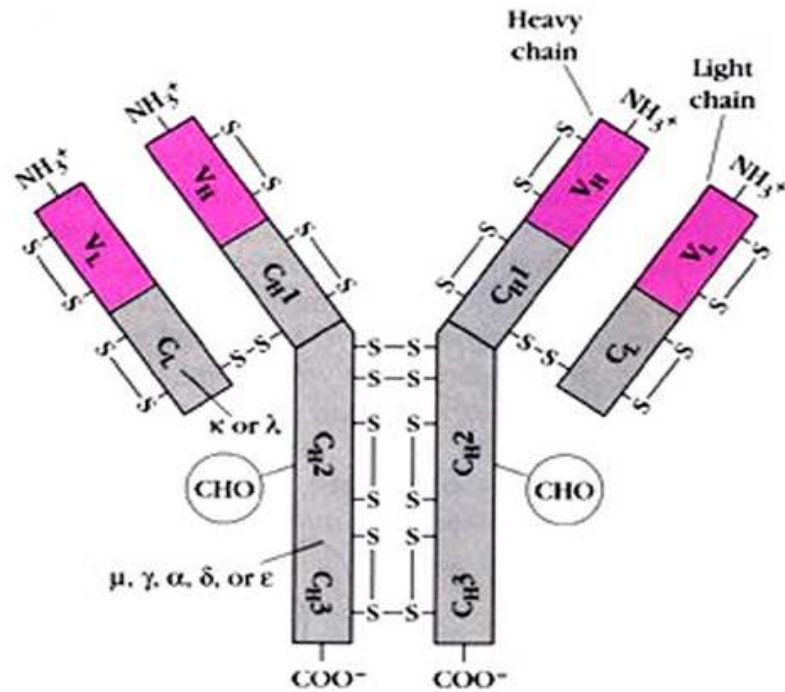
**Amikor pl. egy baktérium bekerül a sebbe, a B limfociták kieresztik az antitesteket, amelyek hatástalanítják a baktériumokat és bejuttatják őket a faló sejtekbe.**



# Az antitestek szerkezete



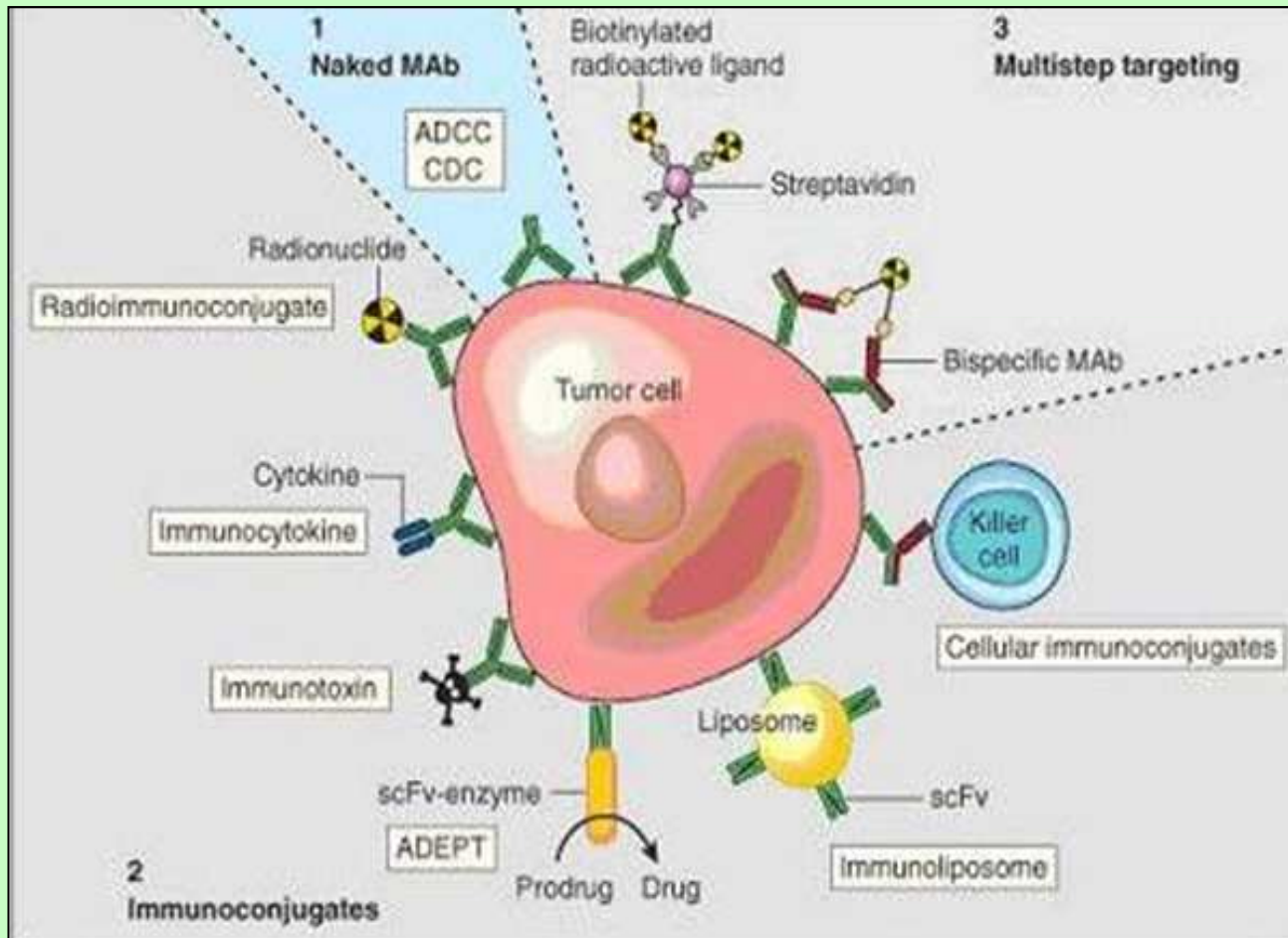
Immunoglobulin G (IgG)





# Mesterségesen előállított antitestek a tumor terápiában

A mesterségesen előállított antitestek un. monoklonálisok (Mab) mert egy sejtvonal termeli őket és ezért egyformák.



**1. Közvetlen Mab hatás**  
pl: Antitest függő, sejt mediált citotoxicitás

**2. Immun konjugátumok**  
pl: Antitest irányított enzim prodrug terápia

**3. Több lépéses célzás**



# Érvek a Mab-al való kezelésekkel kapcsolatban

## Ellene

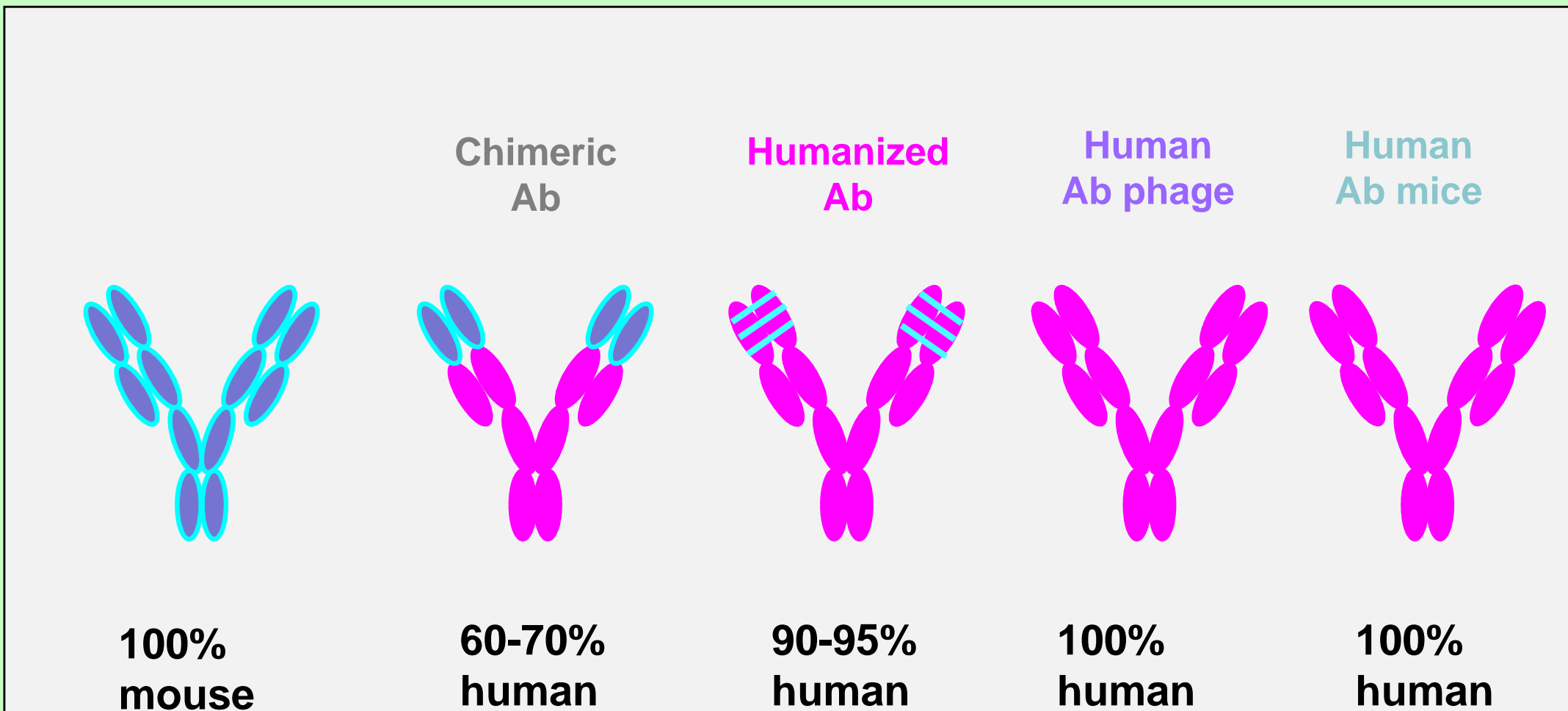
- Szájon át nem adható
- Magas szükséges dózis
- Immunogenicitás
- Gyenge behatolás szilárd tumorokba
- Lehetséges keresztreakciók más szövetekkel
- COG
- Lehetséges vírus fertőzés
- Nehézségek a nagyléptékű termelésben

## Mellete

- Biztonságosság
- Magas szelektivitás
- Erős hatás
- A lehetséges célmolekulák széles választéka



# A Mab-ok történeti fejlődése



# Monoklonális antitestek elnevezésének rendszere

Előtag	cél	forrás	utótag
<i>varies</i>	<b>-o(s)-</b> bone	<b>-u-</b> human	<b>-mab</b>
	<b>-vi(r)-</b> viral	<b>-o-</b> mouse	
	<b>-ba(c)-</b> bacterial	<b>-a-</b> rat	
	<b>-li(m)-</b> immune	<b>-e-</b> hamster	
	<b>-le(s)-</b> infectious lesions	<b>-i-</b> primate	
	<b>-ci(r)-</b> cardiovascular	<b>-xi-</b> chimeric	
	<b>-mu(l)-</b> musculoskeletal	<b>-zu-</b> humanized	
	<b>-ki(n)-</b> interleukin as target	<b>-axo-</b> rat/murine hybrid	
	<b>-co(l)-</b> colonic tumor		
	<b>-me(l)-</b> melanoma		
	<b>-ma(r)-</b> mammary tumor		
	<b>-go(t)-</b> testicular tumor		
	<b>-go(v)-</b> ovarian tumor		
	<b>-pr(o)-</b> prostate tumor		
	<b>-tu(m)-</b> miscellaneous tumor		
	<b>-neu(r)-</b> nervous system		
	<b>-tox(a)-</b> toxin as target		
	<b>-fu(ng)-</b> fungal		

**Abciximab** egy gyakran használt gyógyszer a vérlemezkék összetapadásának megakadályozására.

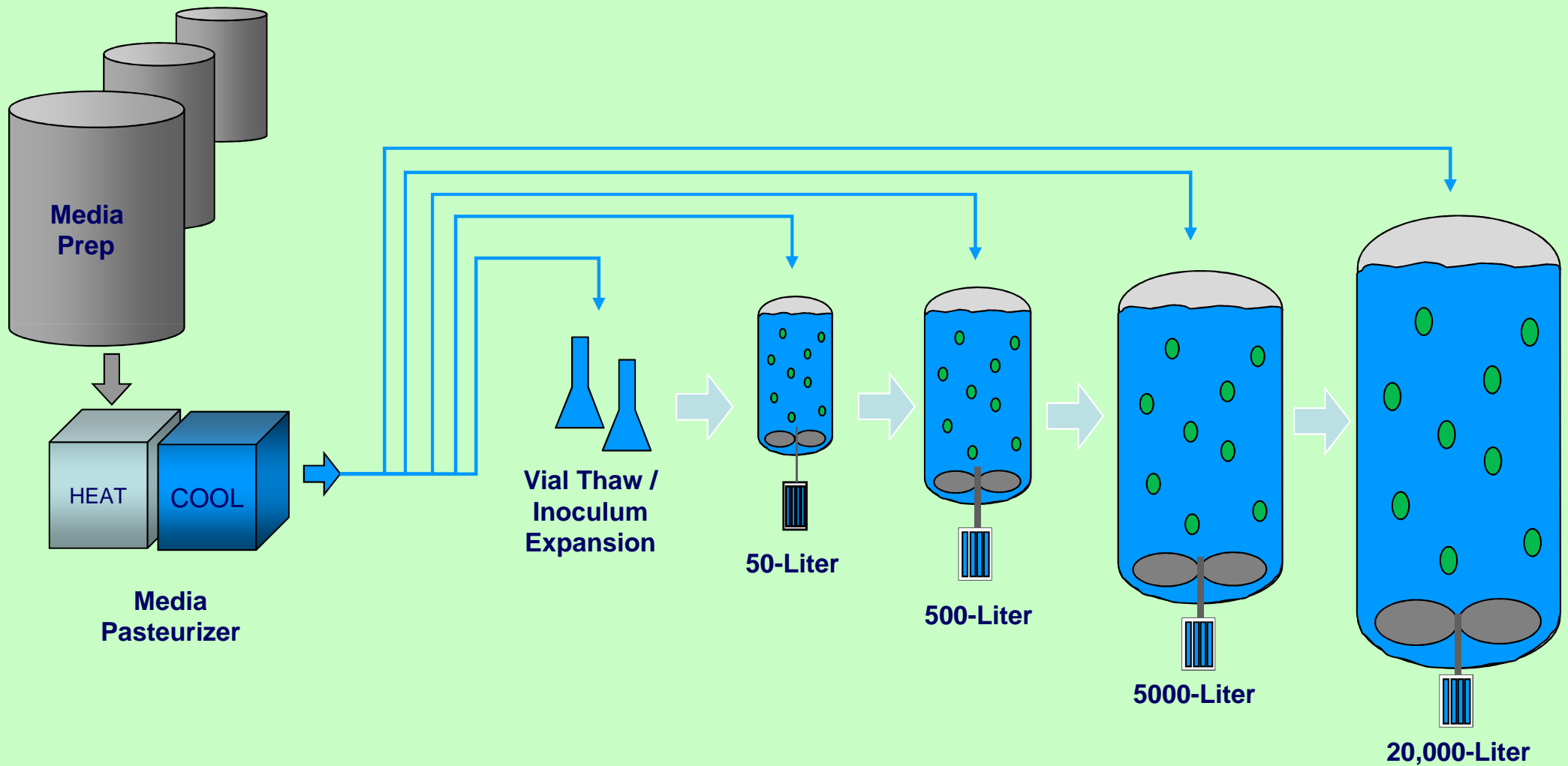
**A szó szétszedhető:**

***ab- + -ci- + -xi- + -mab.***

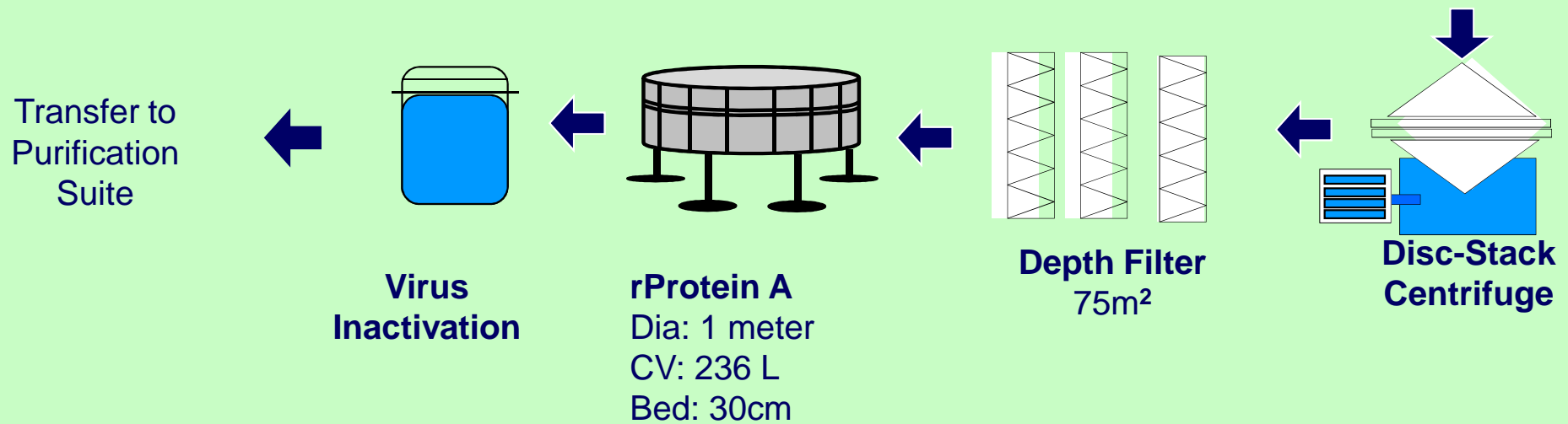
**Vagyis: egy kiméra monoklonális antitest, amelyet valamilyen szív és érrendszeri betegség kezelésében használnak.**



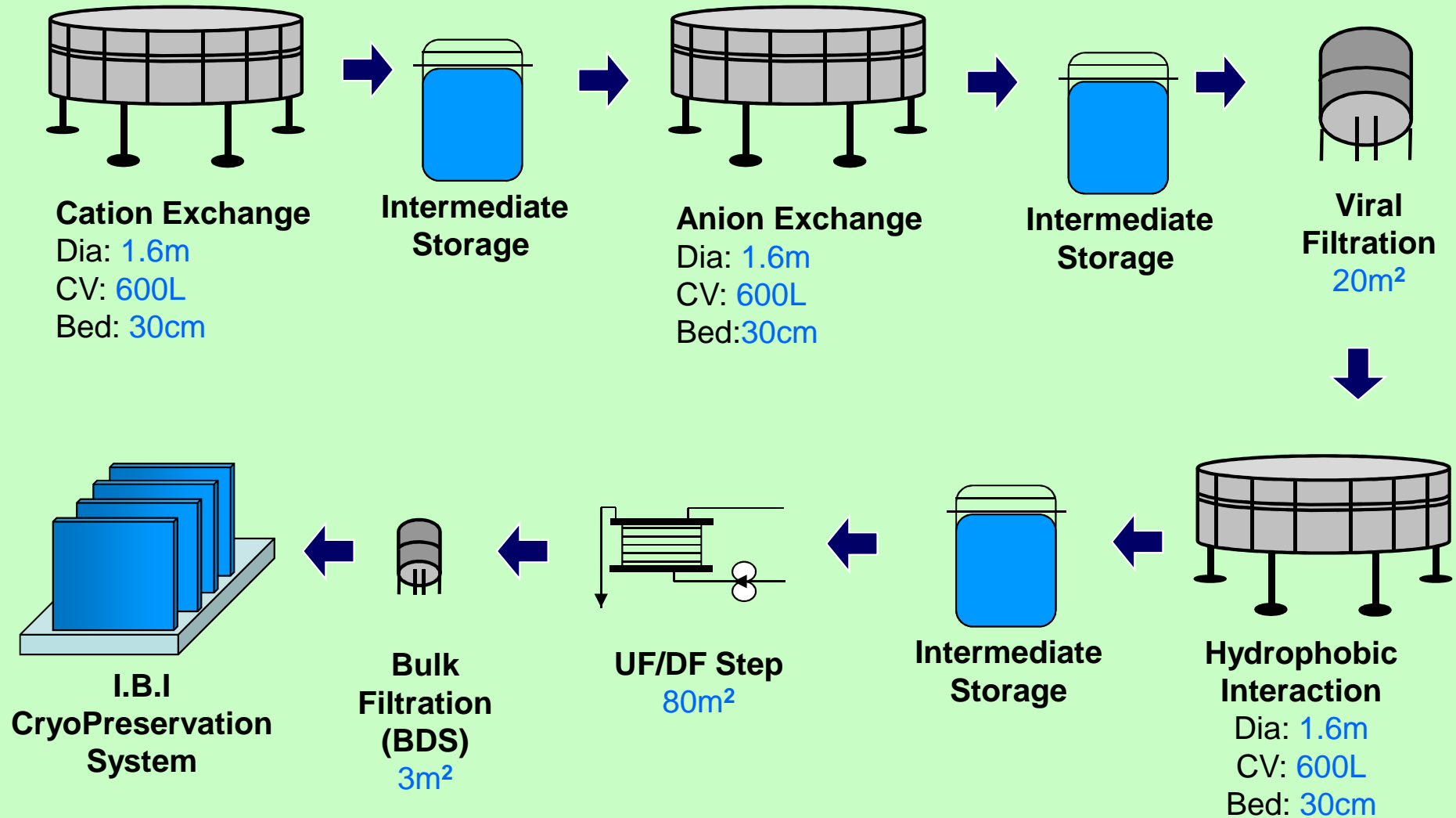
# Monoklonális antitestek termelése - upstream



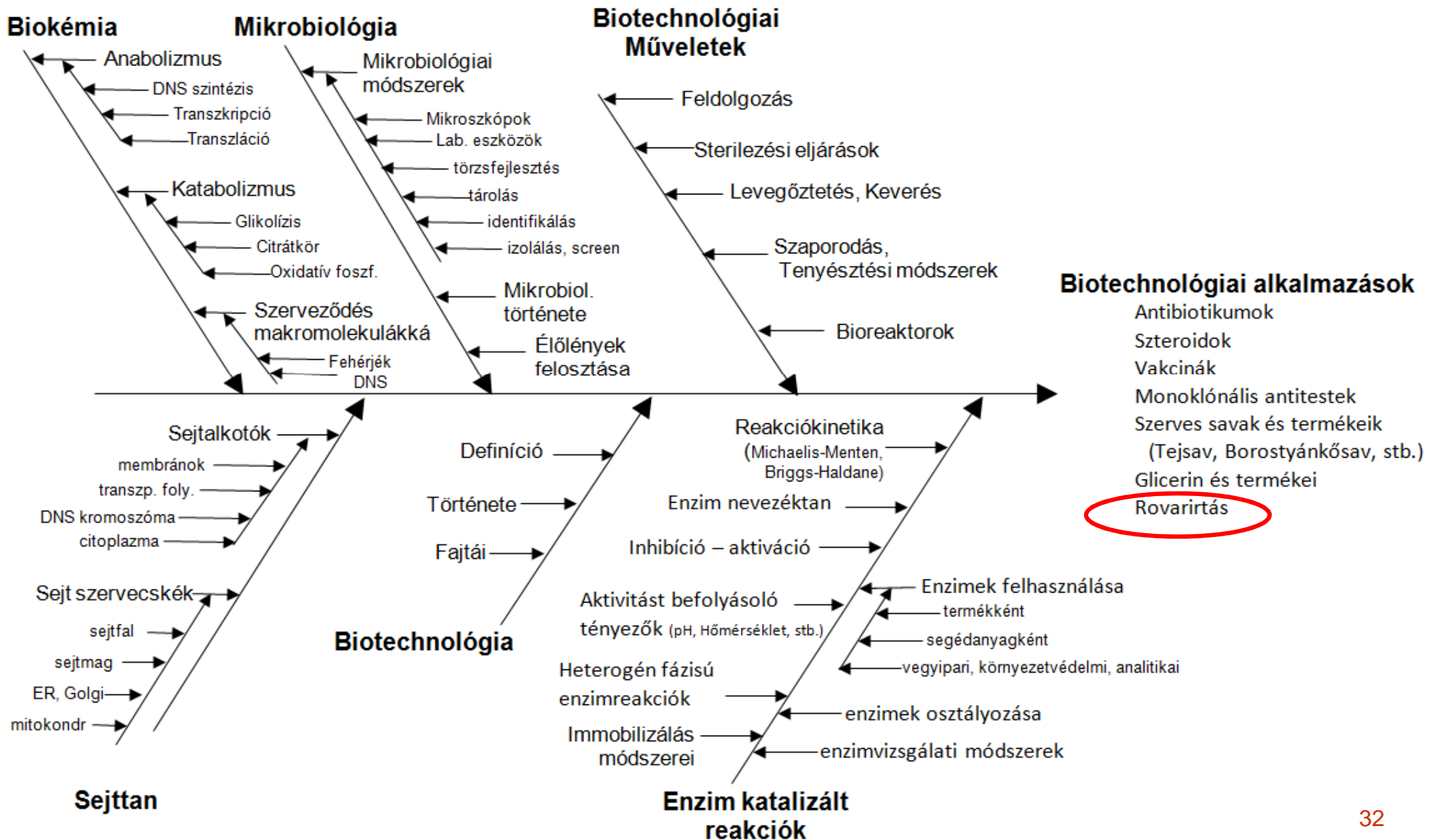
# Monoklonális antitestek termelése - downstream



# Monoklonális antitestek termelése – downstream (folyt.)



# Itt járunk:





# Biológiai rovarirtás – Inszekticid termelés

## *Bacillus thuringiensis*: Spórázik és...

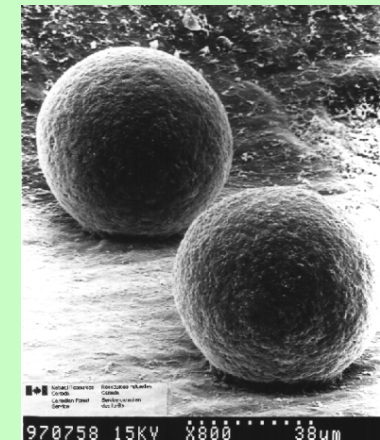
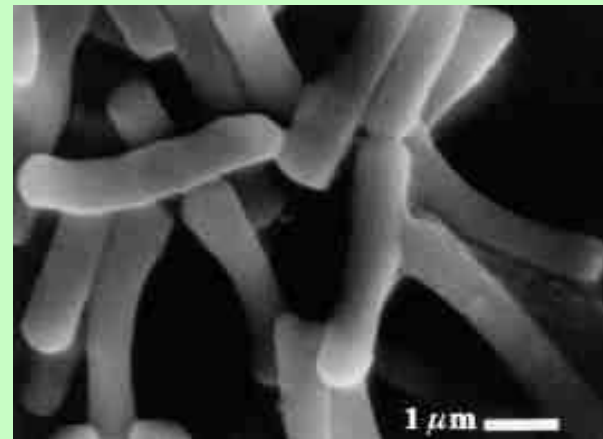
Felfedezése:

1901 Ishiwata Shigetane

Izolálása, leírása:

1911 Ernst Berliner

Termelésbe állítása 1958

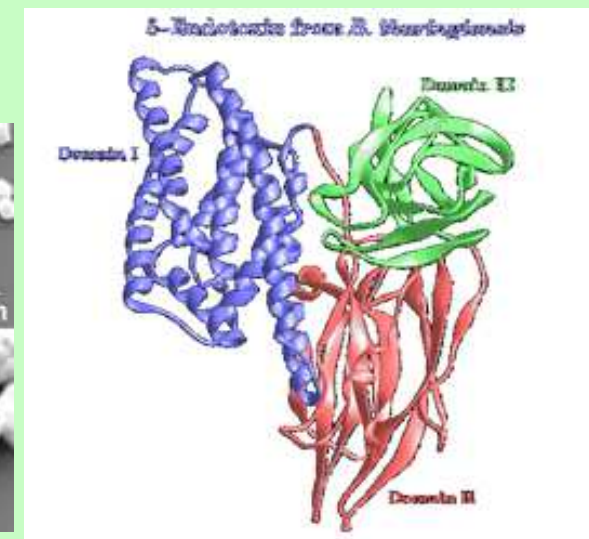
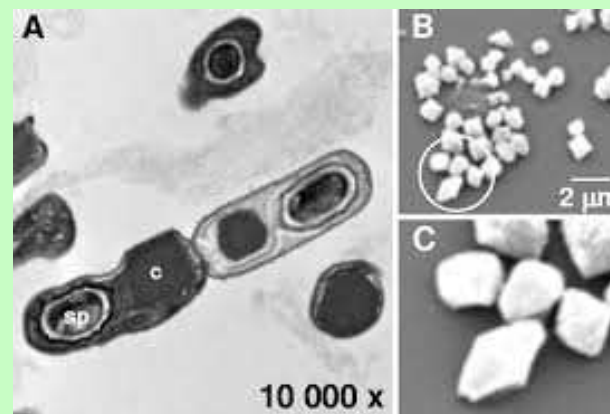


Spórázáskor kristályos

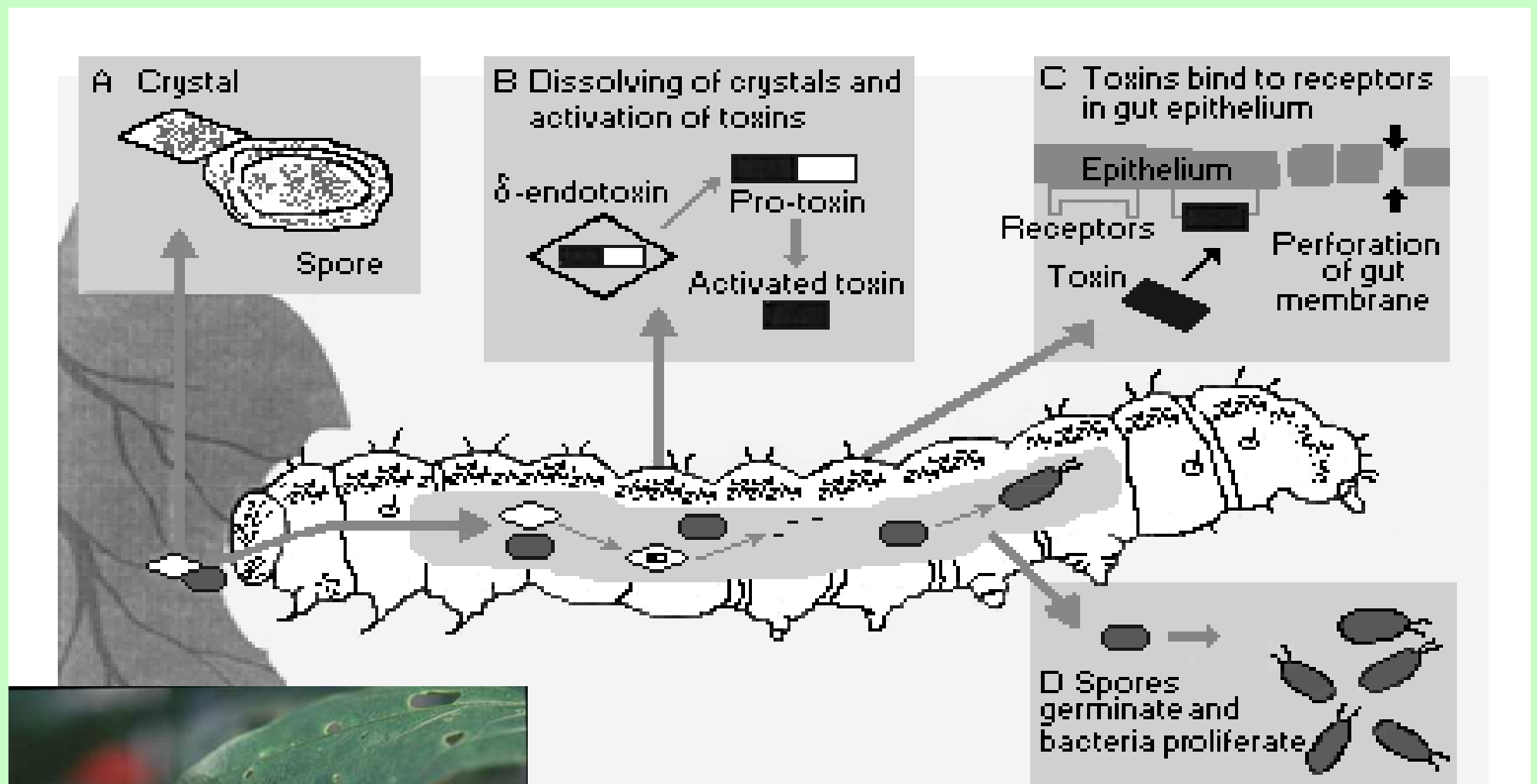
δ-endotoxint termel

(Ez a Cry protein, amelyet a cry gén kódol, plazmidon helyezkedik el.)

... Endotoxint termel



# Hatásmechanizmus – *B. thuringiensis*



**A mérgező hatás mechanizmusa *B. thuringiensis*nél**

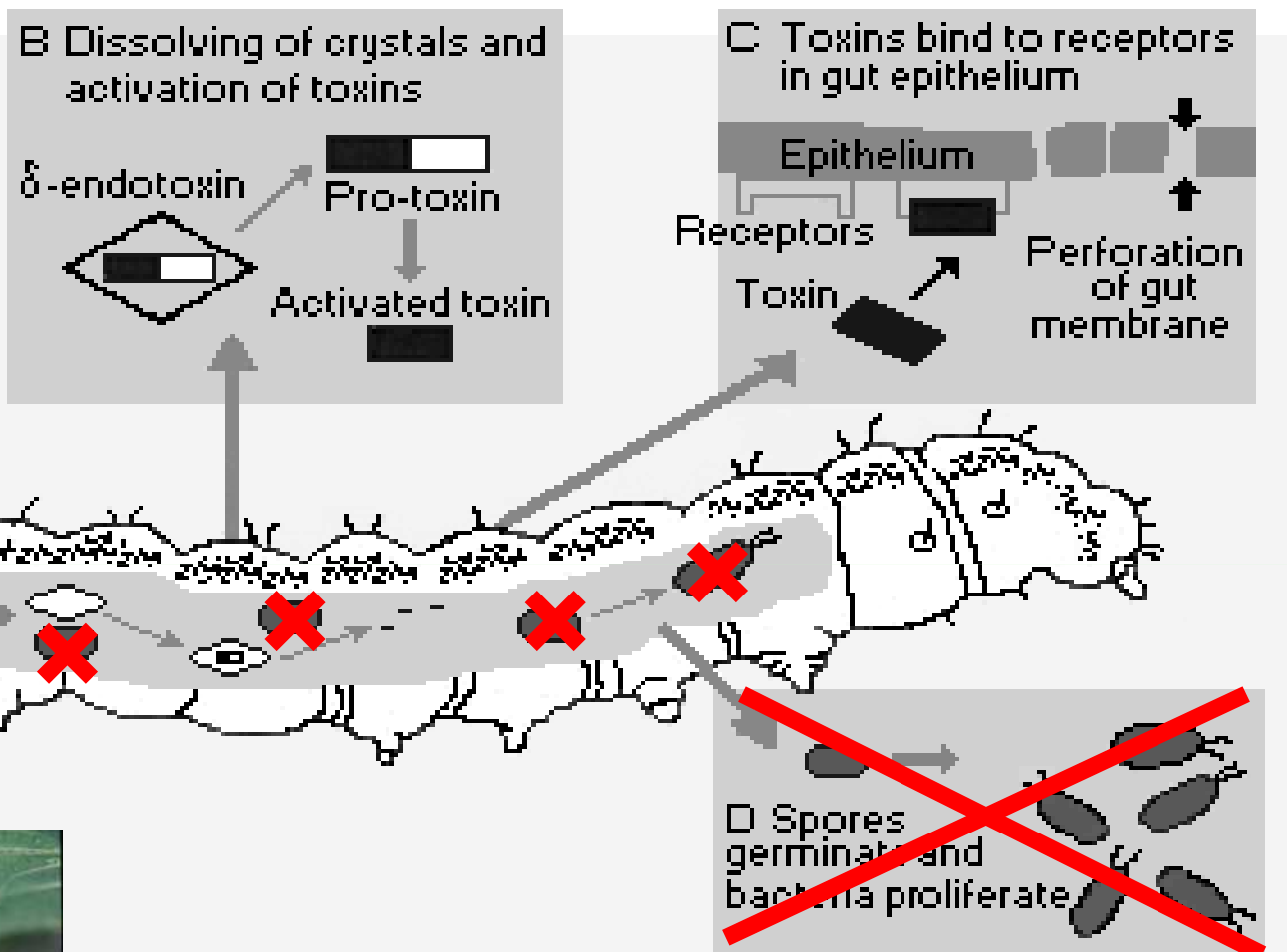
# Hatásmechanizmus – GMO növény



Bt corn



Bt Cotton



Mechanism of toxicity of Bt



# Hatásosság

**1. Bacillus thuringiensis kurstaki.**  
A BT kurstaki törzs csak a lepkéhernyók ellen hatékony toxinokat állít elő. A legnagyobb hatékonysággal (90% fölött) a lombfogyasztó szövőlepke hernyók (pl. gyapjaslepke, amerikai fehér medvelepke, káposztalepke hernyó) ellen működik.

**2. Bacillus thuringiensis tenebrionis.**  
A BT tenebrionis toxinok csak a levélbogarak, és ormányosbogarak lárváira hatnak. (burgonyabogár, szőlő levélsodró stb.)

**3. Bacillus thuringiensis israelensis.** közegészségügyi kártevő mentesítésben, a szúnyoglárvák elleni biológiai védekezésre használják.

