

VEBI BIOMÉRŐKI MŰVELETEK

Műszaki menedzser BSc hallgatók számára

3 + 1 + 0 óra, részvizsga

Előadó: dr. Pécs Miklós egyetemi docens

Elérhetőség: F épület, FE lépcsőház földszint 1

(463-) 40-31

pecs@eik.bme.hu

Írásos segédanyag található a:

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

/oktatas /konyvek /mezgaz /vebimanager

címen



KÖVETELMÉNYEK

ÍRÁSBELI RÉSZVIZSGA

amelyet a vegyipari műveletek részvizsgával együtt kell megírni.

A végső jegy három részjegy átlagolásával alakul ki:

- Vegyipari műveletek számítási ZH
- Vegyipari műveletek vizsga ZH
- Biomérnöki műveletek vizsga ZH



Biotechnológia

Biokémia Mikrobiológia

Mérnöki tudományok

Alkalmazás

A biotechnológia a természettudományok és a műszaki tudományok integrálását jelenti, annak érdekében, hogy organizmusokat, sejteket, vagy azok részeit, illetve molekula analógjait alkalmazzuk a természetben vagy szolgáltatásban (EFB, 1988).



HOL TALÁLKOZHATUNK BIOTECHNOLÓGIÁVAL?



UPSTREAM -DOWNSTREAM

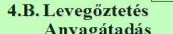
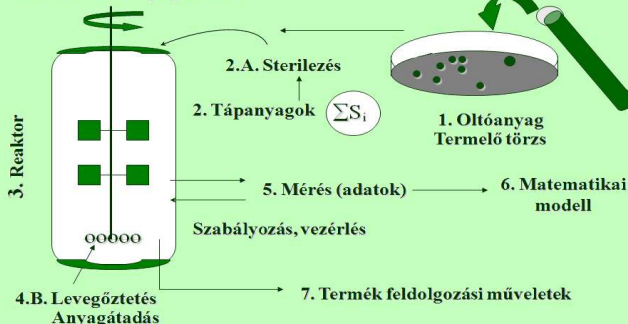
A fermentációs technológiák két egymást követő szakaszra oszthatók:

1. a fermentáció előkészítésétől a szaporítás, a termékképzés végéig terjed az „**UPSTREAM-PROCESSING**”. Ez a fermentáció végéig tart, amikor már rendelkezésünkre áll kész fermentum, amely tartalmazza a kívánt végterméket. Ezt a pontot nevezik a fermentáció „vágásának”.
2. a „vágás” után következik a végtermék izolálása, amelynek során a sok-komponensű fermentumból a tiszta (tisztított) végtermék felhasználásra alkalmas formába kerül. Ezt a feldolgozási műveletsort nevezik „**DOWN-STREAM PROCESSING**”-nek.



Upstream processing

4.A. Keverés (anyagátadás)



DOWNSTREAM PROCESSING

1. Sejtek elválasztása → szilárd-folyadék elválasztás
(1/b Sejtfeltárás: csak akkor, ha a termék intracelluláris)
2. Koncentráció lépés(ek) → a nagyobb mennyiségben jelen lévő szennyezéseket (elsősorban a vizet) választjuk el.
3. Tisztítás → a termék és a szennyező anyagok elválasztása
4. Vég tisztítás (polishing) → a terméket a kereskedelmi forgalomba hozás előírásainak megfelelő tisztaságig tisztítják.



BIOTECHNOLÓGIAI FOLYAMATOK KINETIKÁJA

Kinetika: a folyamatok időbeli lefolyását, azaz sebességét leíró tudomány (lásd: fizika).

A biotechnológiában:

1. Enzimkinetika → az enzimek által katalizált kémiai reakciók sebességével, a befolyásoló tényezőkkel foglalkozik.
2. A mikrobák szaporodását leíró kinetika → a sejtek szaporodását leíró törvényszerűségek.
3. Termékképződési kinetika → azt vizsgálja, hogy egy sejtenyészeten milyen sebességgel termel egy számunkra fontos biokémiai anyagot, terméket.

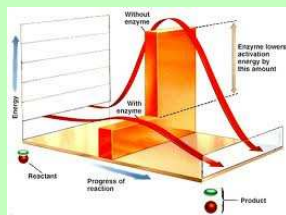


ENZIMKINETIKA

Enzimek = biokatalizátorok

Katalizátor:

- az aktiválási energia csökkentésével meggyorsítja kémiai reakciót.
- Csak termodinamikailag lehetséges reakciót gyorsít
- Az egyensúlyt nem befolyásolja
- Kis mennyiségben is hatékony, mert a reakció után változatlan formába visszaalakul



Anyaguk: fehérje, bonyolult szerkezet (harmad-, negyedleges)

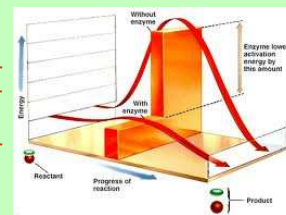


ENZIMKINETIKA

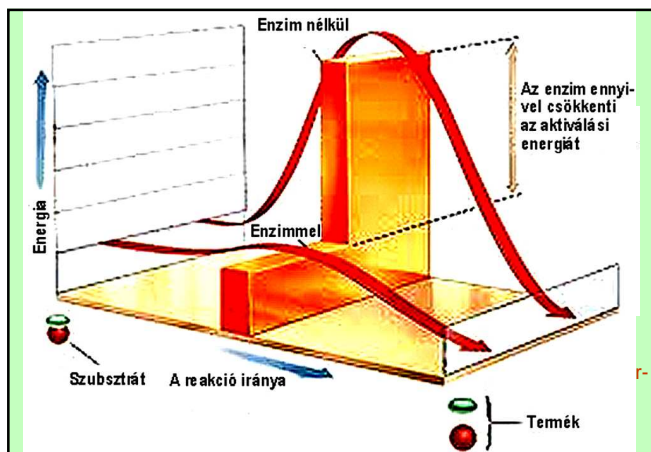
Enzimek = biokatalizátorok

Katalizátor:

- az aktiválási energia csökkentésével meggyorsítja kémiai reakciót.
- Csak termodinamikailag lehetséges reakciót gyorsít
- Az egyensúlyt nem befolyásolja
- Kis mennyiségben is hatékony, mert a reakció után változatlan formába visszaalakul



Anyaguk: fehérje, bonyolult szerkezet (harmad-, negyedleges)



Enzimes reakciók

A reakció általános leírása:



Fogalmak:

Szubsztrát (S): a reakcióban átalakuló molekula.

Termék (P): a reakcióban keletkező molekula.

Koenzim: olyan reakciópartner molekula, amely egyes enzimes reakcióhoz nélkülözhetetlen, a reakcióban részt vesz és maga is átalakul (pl. ATP, NAD, stb.)

Kötőhely, aktív centrum: az enzim felületének az a része, ahol a szubsztrát megkötődik, illetve átalakul.

Egy enzim csak egyféle típusú reakciót katalizál.

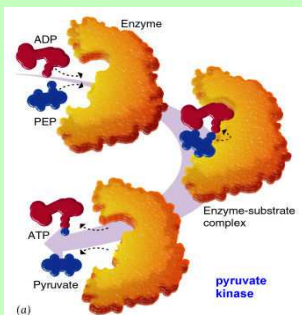


Enzimes reakciók 2.

A kötőhely specifikus: csak bizonyos molekulákat köt meg. A két molekula felülete (alakja, töltése) komplementer módon illeszkedik egymáshoz.

(KULCS - ZÁR)

Az enzim felületét az aminosav oldalláncok adják → egy aminosav eltérése is elronthatja.



Enzimes reakciók 3.

A specifitás szintjei:

Csoportspecifitás: a szubsztrát egy bizonyos funkciós csoportját köti meg és alakítja át, a molekula többi részét nem ismeri fel.

Szubsztrátspecifitás: a teljes molekulát felismeri, csak egyféle szubsztrátot alakít át

Sztereospecifitás: a királis (tükörkép) molekulák között is különbséget tesz, csak az egyik forma reakcióját katalizálja

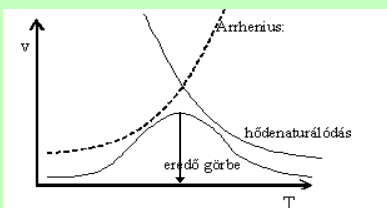
Az enzimes reakció sebessége függ:

- hőmérséklet
- pH
- szubsztrát koncentráció
- enzim koncentráció
- inhibitorok

A hőmérséklet hatása

A reakciósebesség exponenciális kapcsolatban van a hőmérséklettel (Arrhénius), tehát gyorsul a reakció.

Magasabb hőmérsékleten viszont a fehérje denaturálódik, a reakció lassul. A két ellentétes folyamat eredményeként az enzimes reakcióknak van egy optimális hőmérséklete, ahol a reakciósebesség a legnagyobb.

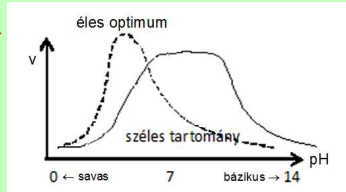


A pH hatása az enzimaktivitásra

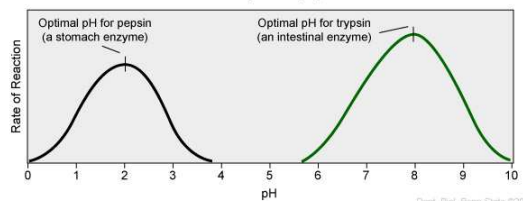
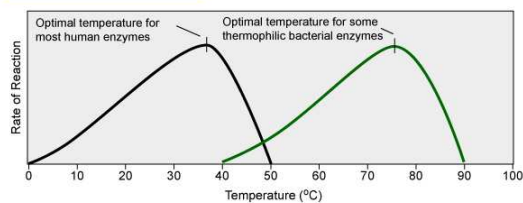
Az aktív centrumban a felületi töltésmintázat komplementer a szubsztrátéval. A pH-változás hatására ez megváltozik – az enzim rosszabbul köti a szubsztrátot – lassul a reakció.

Szélsőséges pH-nál (erősen savas vagy lúgos közegben) tönkremegy (denaturálódik) a fehérje, nulla a reakciósebesség.

Van egy optimális pH érték/tartomány.



Optimal Temperature and pH



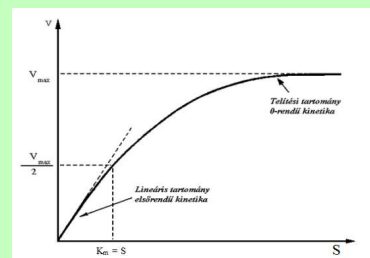
A szubsztrát koncentráció hatása

Ha több a szubsztrát → nagyobb valószínűséggel találkozunk az enzimmel → több alakul át → nagyobb reakciósebesség.

De van ennek egy felső határa → telítés

$$v = \frac{V_{max} (S)}{K_m + (S)}$$

Michaelis-Menten egyenlet

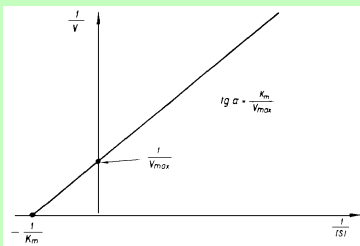


A szubsztrátkoncentráció hatása

A hiperbolikus függvényt nehéz kezelni, ezért lineárizálják (Lineweaver-Burk ábrázolás)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{v_{max}}$$

A tengelymetszetekből és a meredekségből a paraméterek kiszámíthatók.

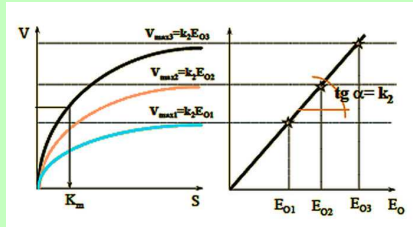


Enzim koncentráció hatása

Lineáris kapcsolat → nx több enzim → nx nagyobb v_{max}

Ha nagy szubsztrátkoncentrációnál mérjük a reakciósebességet, akkor a maximális reakciósebesség (v_{max}) arányos lesz az enzimkoncentrációval:

$$V = V_{max} = k_2 (E)_t$$



ENZIMMODULÁTOROK

Az enzim reakció sebességét befolyásoló kémiai anyagok. Lehetnek:

Inhibitorok: reakciósebességet csökkentő, gátló anyagok

Aktivátorok: reakciósebességet növelő anyagok

Az inhibitorok hatásmechanizmusa eltérő lehet:



← **nem kompetitív inhibitor** (az enzim felületén máshol kötődik)

← **kompetitív inhibitor** (a szubsztrát helyére kötődik)



Kompetitív inhibitorok

Ezek a molekulák szerkezetükben hasonlítanak a szubsztráthoz, és képesek annak helyére bekötődni.

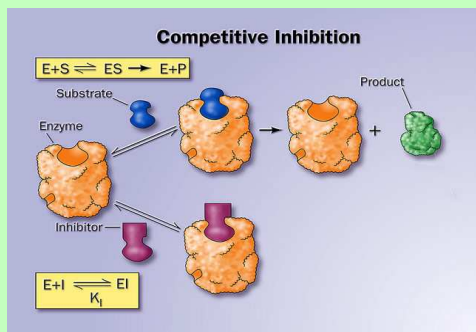
Ezt a vegyületcsoportot **kompetitív inhibitoroknak** nevezzük, mivel az I és S egymással verseng az enzim aktív centrumához történő kapcsolódásban. Ezen belül lehet:

Alternatív szubsztrát: az enzim reakció végbemegey, alternatív termék keletkezik

Valódi (dead end) inhibitor: a szubsztráthoz hasonló szerkezetű molekula, ami bekötődik az enzim aktív centrumába, de a reakció nem játszódik le. Lehet: - reverzibilis, - irreverzibilis

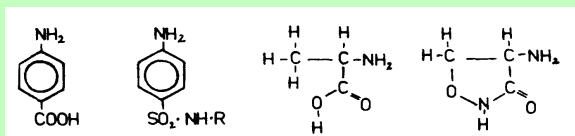


Kompetitív inhibitorok



Kompetitív inhibitorok

A gyógyszerek nagy része kompetitív inhibitorokként hat:



p-amino- benzoesav (metabolit)	sulfonamid (gyógyszer)	alanin (metabolit)	cikloszerin (gyógyszer)
--------------------------------------	---------------------------	-----------------------	----------------------------



A kompetitív inhibíció kinetikája

A sebesség megadásánál figyelembe kell venni az inhibitor koncentrációt (I) és az inhibíciós állandót (K_i) is.

$$v_i = \frac{v_{max}(S)}{K_M \left[\frac{K_I + (I)}{K_I} \right] + (S)}$$

V_{max} értéke nem változik, a K_m növekszik

25

A kompetitív inhibíció kinetikája

A Lineweaver-Burk féle linearizált ábrázolásban az egyenes egyenlete:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{max}} \left[\frac{K_I + (I)}{K_I} \right] \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{v_{max}}$$

1/v_{max} értéke nem változik (közös metszéspont), az 1/K_m csökken

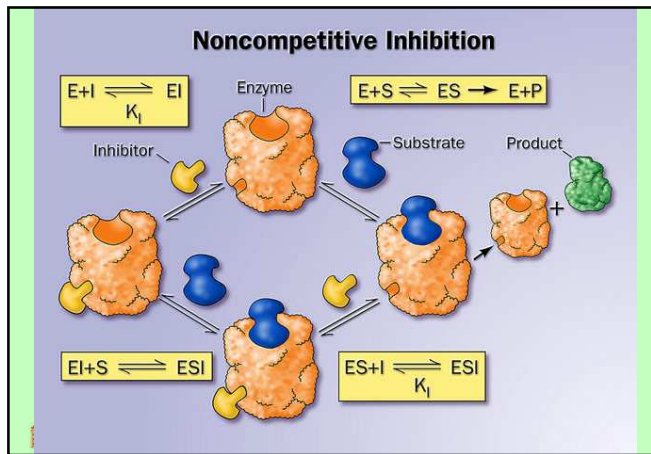
26

Nem-kompetitív inhibíció

Az inhibitor molekula nem hasonlít a szubsztrátra, és nem az aktív centrumba kötődik. Az enzim felületén valahol máshol kapcsolódik, de ezzel nem befolyásolja a szubsztrát bekötődését. Létrejöhethet ESI hármas komplex is.

A második lépést, a termék kialakulását és kilépését gátolja. Megváltoztatja a fehérjemolekula-láncok térszerkezetét → megváltozik az aktív centrum szerkezete → a szubsztrát nem tud elreagálni → a reakció lelassul vagy leáll. „Mérgezi” az enzimet, mintha kevesebb enzim lenne jelen.

27



A nem-kompetitív inhibíció kinetikája

A sebesség megadásánál itt is be kell építeni az inhibitor koncentrációt (I) és az inhibíciós állandót (K_i) is.

$$v_i = \frac{\left[\frac{K_I}{K_I + (I)} \right] v_{max}(S)}{K_M + (S)}$$

V_{max} értéke az inhibitor koncentráció növelésével csökken, a K_m nem változik

29

A nem-kompetitív inhibíció kinetikája

A Lineweaver-Burk féle linearizált ábrázolásban az egyenes egyenlete:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{\left[\frac{K_I}{K_I + (I)} \right] v_{max}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{\left[\frac{K_I}{K_I + (I)} \right] v_{max}}$$

A -1/K_m értéke nem változik (közös metszéspont), az 1/V_{max} növekszik

30