VEBI BIOMÉRÖKI 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

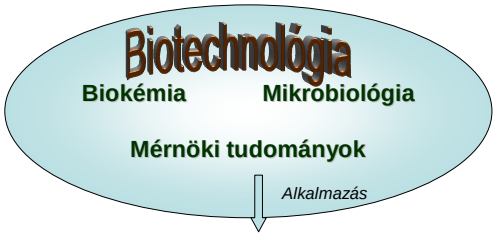
Írásos segédanyag található a:
http://oktatas.ch.bme.hu
/oktatas /konyvek /mezgaz /vebimanager
címen

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



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

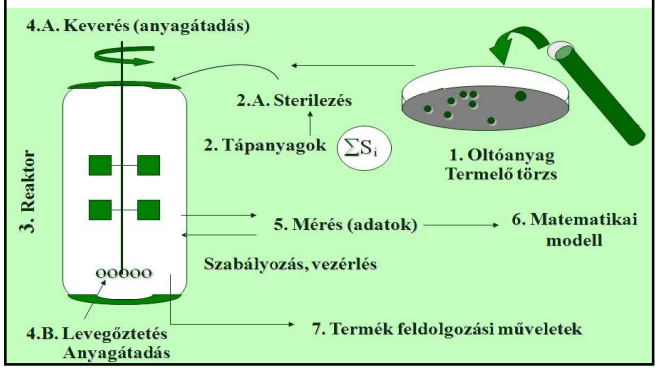
HOL TALÁLKOZHATUNK BIOTECHNOLÓGIÁVAL?

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 fermentlé, 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 fermentléből a tiszta (tisztított) végtermék felhasználásra alkalmas formába kerül. Ezt a feldolgozási műveletsort nevezik „**DOWN-STREAM PROCESSING**”-nek.

Upstream processing



DOWNSTREAM PROCESSING

1. Sejtek elválasztása → szilárd-folyadék elválasztás

(1/b Sejtfeltárás: csak akkor, ha a termék intracelluláris)

2. Koncentráló lépés(ek) → a nagyobb mennyiségben jelen lévő szennyezéseket (elsősorban a vizet) választjuk el.

3. Tisztítás → a termék és a szennyező anyagok elválasztása

4. Végtisztítás (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.

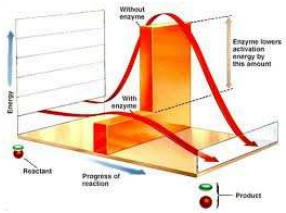
3. Termékképződési kinetika → azt vizsgálja, hogy egy sejttenyészet milyen sebességgel termel egy számunkra fontos biokémiai anyagot, terméket.

ENZIMKINETIKA

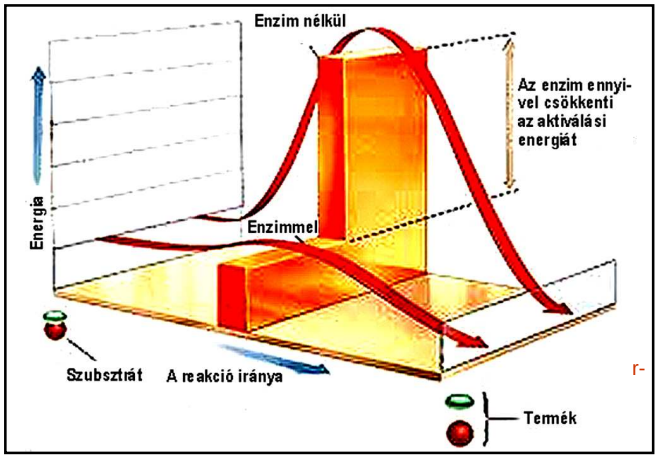
Enzimek = biokatalizátorok

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)



Enzimes reakciók

A reakció általános leírása:

$$E + S \leftrightarrow [ES] \rightarrow E + P$$

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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 11

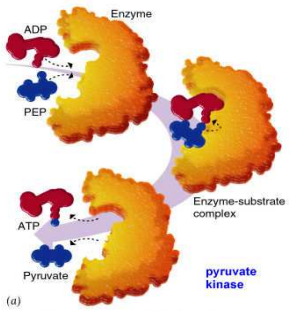
Enzimes reakciók 2.

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 eltérés is elronthatja.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

Enzimes reakciók 3.

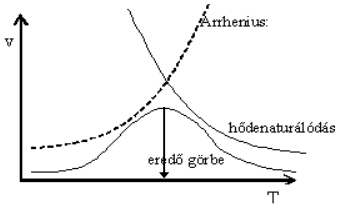
A specifitás szintjei:

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

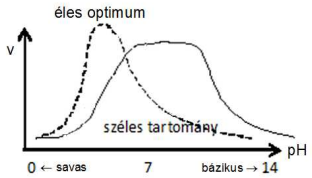
A reakciósebesség exponenciális kapcsolatban van a hőmérséklettel (Arrhénius), tehát gyorsul a reakció.
Magasabb hőmérsékleten viszont a fehérje denaturálódik, a reakció lassul. A két ellentétes folyamat eredőjeként az enzimes reakcióknak van egy optimális hőmérséklete, ahol a reakciósebesség a legnagyobb.

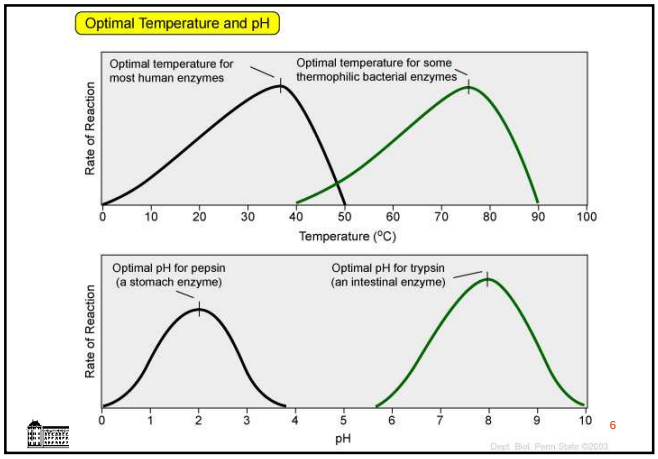


A pH hatása az enzimaktivitásra

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.





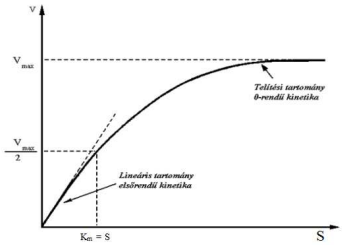
A szubsztrátkoncentráció hatása

Ha több a szubsztrát → nagyobb valószínűséggel találkoznak 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



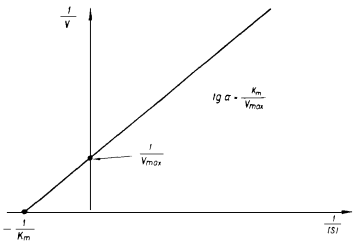
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 17

A szubsztrátkoncentráció hatása

A hiperbolikus függvényt nehéz kezelni, ezért linearizálják (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.



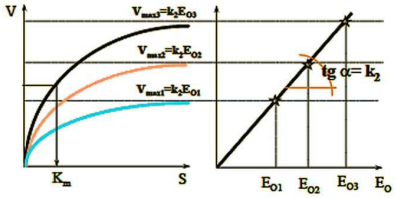
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 18

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:

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



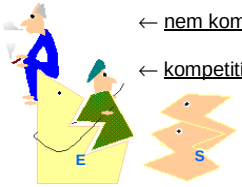
ENZIMMODULÁTOROK

Az enzimes 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

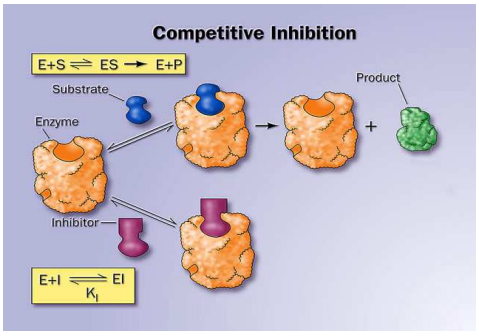
Ezek a molekulák szerkezetükben hasonlítanak a szubsztráthoz, és képesek annak helyére bekötődni.

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

Alternatív szubsztrát: az enzimes reakció végbemegy, alternatív termék keletkezik

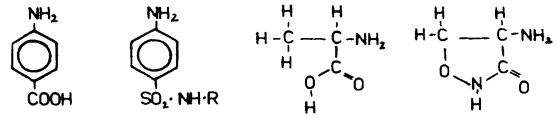
Valódi (dead end) inhibitor: a szubsztráthoz hasonló szerkezetű molekula, ami bekötődik az enzim aktív centrumába, de a reakció nem játszódik le. Lehet: - reverzibilis, - irreverzibilis

Kompetitív inhibitorok



Kompetitív inhibitorok

A gyógyszerek nagy része kompetitív inhibitorként hat:



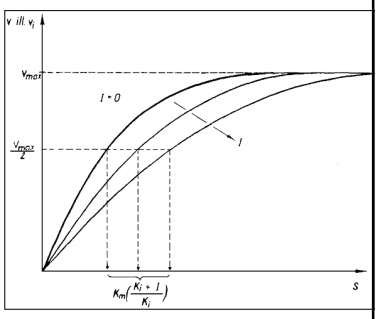
p-amino-benzoesav (metabolit) szulfonamid (gyógyszer) alanin (metabolit) cikloszerin (gyógyszer)

A kompetitív inhibíció kinetikája

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

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

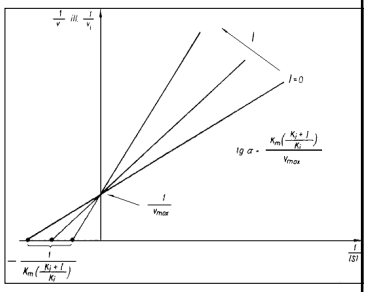
V_{max} értéke nem változik, a K_m növekszik



A kompetitív inhibíció kinetikája

A Lineweaver-Burk féle linearizált ábrázolásban az egyenes egyenlete:

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



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

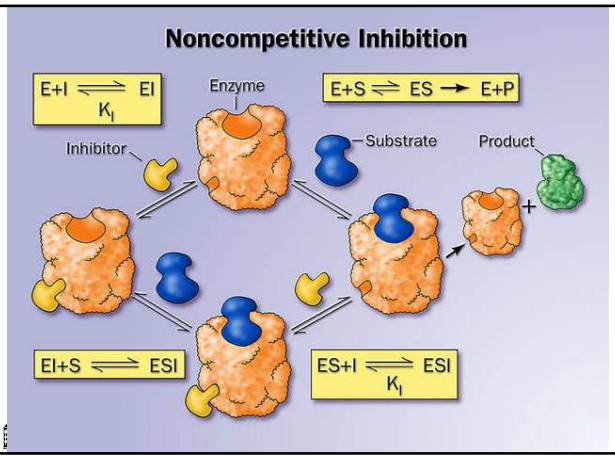
Nem-kompetitív inhibíció

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. Létrejöhet 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.

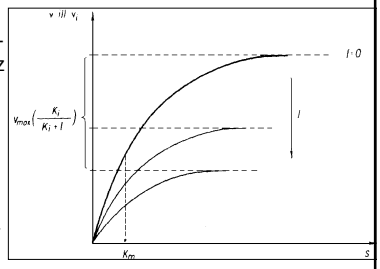


A nem-kompetitív inhibíció kinetikája

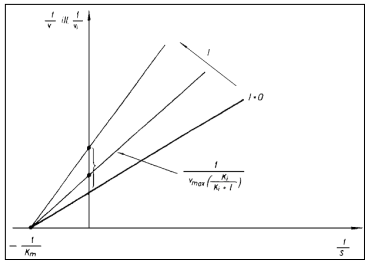
A sebesség megadásánál itt is be kell építeni az inhibitor koncentrációt (I) és az inhibíciós állandót (K_i) is.

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

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



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 metszépont), az $1/V_{max}$ növekszik