

# FEHÉRJEGYÁR INFRASTRUKTÚRA KIÉPÍTÉSE

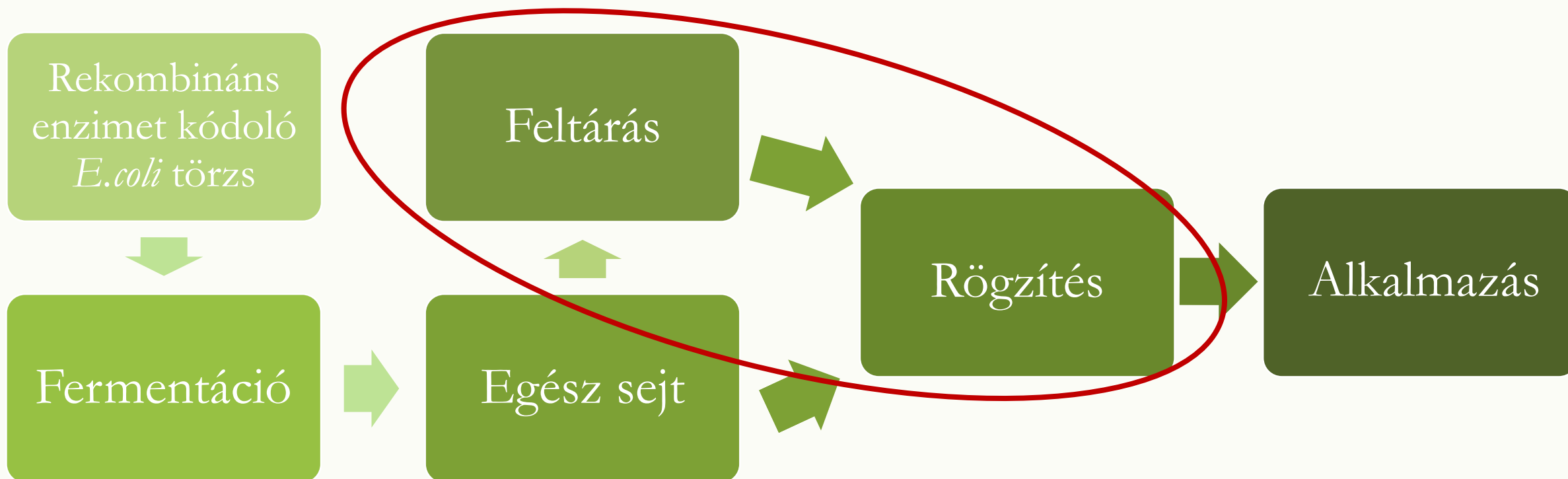
POPPE LÁSZLÓ, MOLNÁR ZSÓFIA, NÉMETH ÁRON,  
IVANICS BALÁZS, TOMPOS ANDRÁS



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

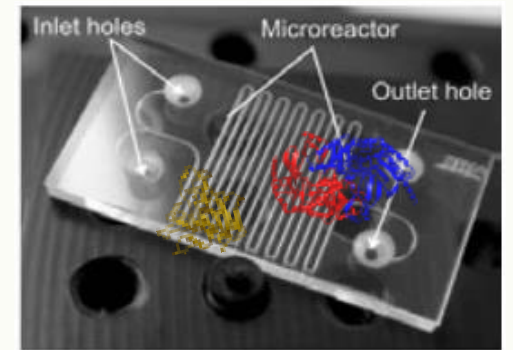
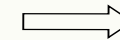
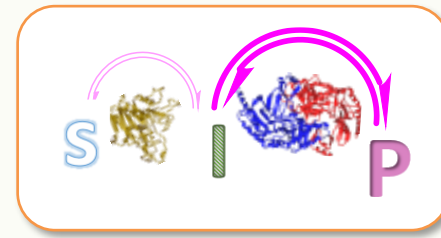
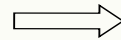
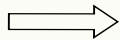
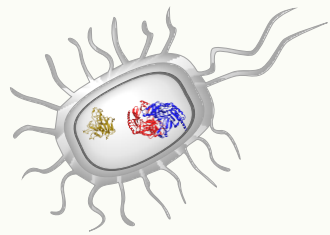
# Félüzemi léptékű fehérjegyár infrastruktúra kiépítése



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Félüzemi léptékű fehérjegyár infrastruktúra felhasználása



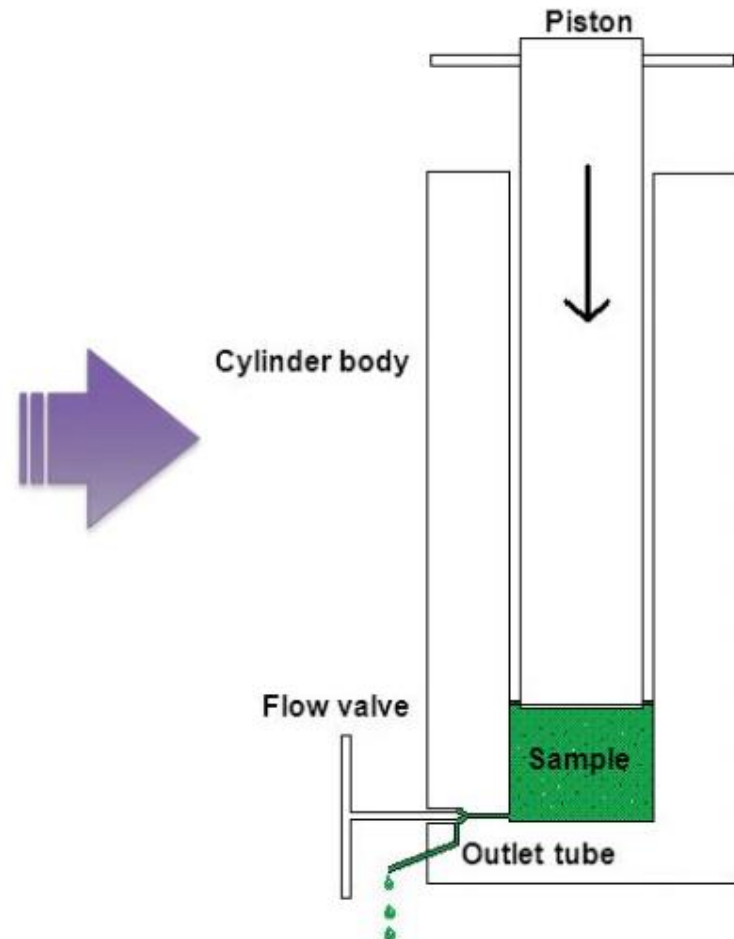
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Sejtfeltárás leggyakoribb módszerei

Módszer	Technika	Elv	Kíméletesség	Költség	Példák
<b>Kémiai</b>	Ozmotikus sokk	Sejtmembrán ozmotikus roncsolása	Enyhe	Olcsó	Vörösvérsejtek feltárása
	Enzimes emésztés	A sejtfal emésztése	Enyhe	Drága	Tojás lizozimmal kezelt <i>Micrococcus lysodeikticus</i>
	Szolubilizálás	Detergensnek oldatba viszik a membránalkotókat	Enyhe	Közepes	<i>E. coli</i> sejtek kezelése epesavakkal
	Lipid oldás	Szerves oldószer szolubilizálja a membránalkotókat	Közepes	Olcsó	Élesztő toluolos feltárása
	Lúgos kezelés	A lipidek lúgos hidrolízise roncsolja a membránt	Durva	Olcsó	
<b>Mechanikus</b>	Homogenizálás (pengés)	Seltroncsolás mozgó pengék által okozott nyírással	Közepes	Közepes	Állati szövetek és sejtek
	Örlés	A sejtek örlése felületek közti dörzsöléssel (homok segédanyag)	Közepes	Olcsó	
	Ultrahang	Sejtroncsolás ultrahanggal létrehozott kavitációval	Durva	Drága	Kismennyiségű sejtsuszpenziók
	Homogenizálás (nyomásesés)	Kis nyíláson gyorsan átpréselt sejtekre kifejtett nyíróerőkkel	Durva	Közepes	Sejtsuszpenziók nagyléptékű sejtfeltárása
	Golyósmalom	Mozgatott (üveg)golyók közti örlés roncsolja a sejteket	Durva	Olcsó	Mikrobiális és növényi sejtek nagyléptékű feltárása

# Nagynyomású sejthomogenizátor működése



- A nagy nyomás alatt álló sejtszuszpenzió hirtelen szűk nyíláson át távozik
- Erős nyíróerők fellépése rövid ideig
- Iparban is előszeretettel alkalmazott eljárás



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Nagynyomású folyamatos sejthomogenizátor



- Gyors sejtfeltárás
- Bakteriális és élesztő sejtekhez is jó
- 9 mL-től a néhány L térfogatig kényelmesen alkalmazható
- Hűthető rendszer
- Akár *folyamatos üzemben is* használható



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Választott immobilizációs módszerek

## Egész sejtes szol-gél rögzítés

- Nincs szükség sejtfeltárássra
- Kompozit rögzítési módszer
- Szilika mikrorészecske hordozó
- Szilika szollal történő becsapdázás

DE:

- Kis specifikus aktivitás
- Mellékrakciók (multienzim rendszer)

## Affinitáson alapuló rögzítés

- Sejtfeltáráss szükséges

ELŐNYÖK:

- Nincs szükség az enzim tisztítására
- His-tag és fém-ionok közötti affinitás felelős a szelektivitásért
- Epoxi-csoportokkal kialakított kovalens kötések teszik tartóssá

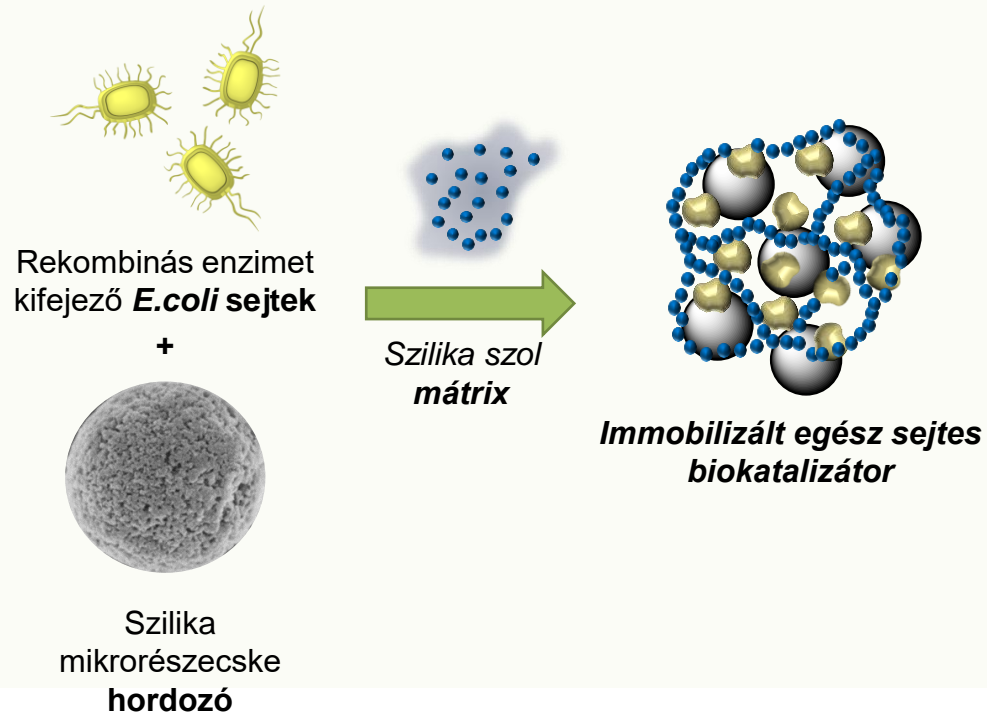


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT



# Egész sejtés szol-gél rögzítés

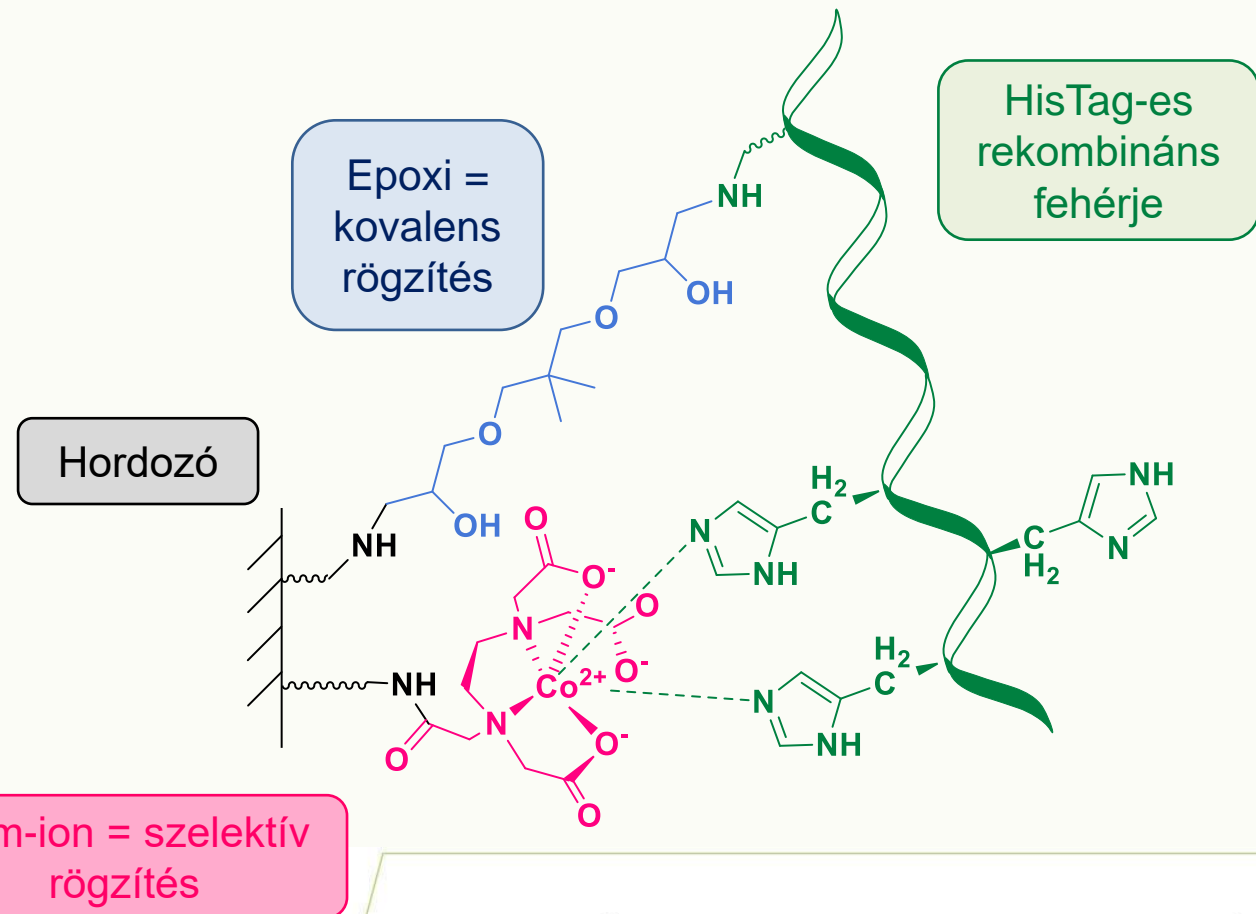


- Egyszerűen kivitelezhető rögzítés, nincs szükség sejteltérésre és enzimmtisztításra
- Sokáig eltartható enzimmészítmény
- Alkalmazható szakaszos és folyamatos módban

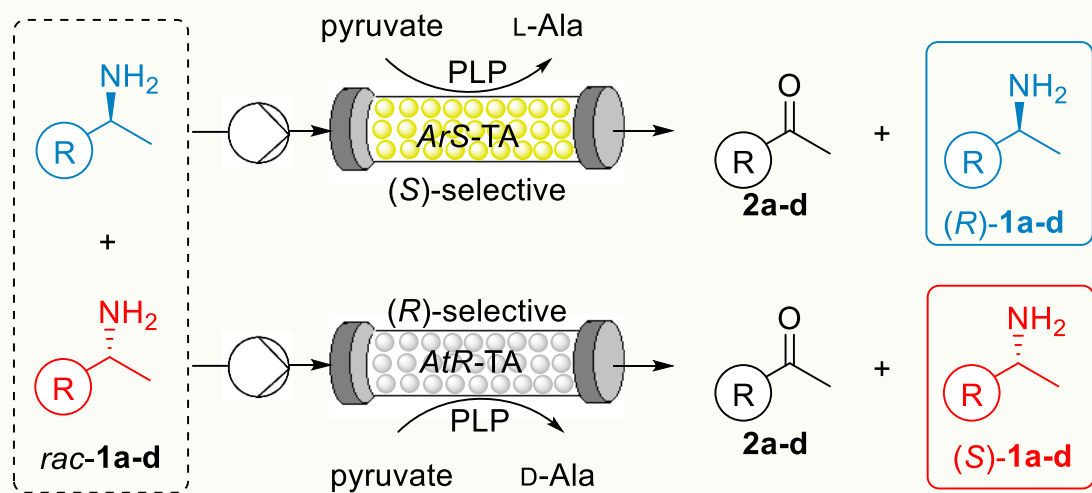


# Affinitáson alapuló kombinált rögzítés

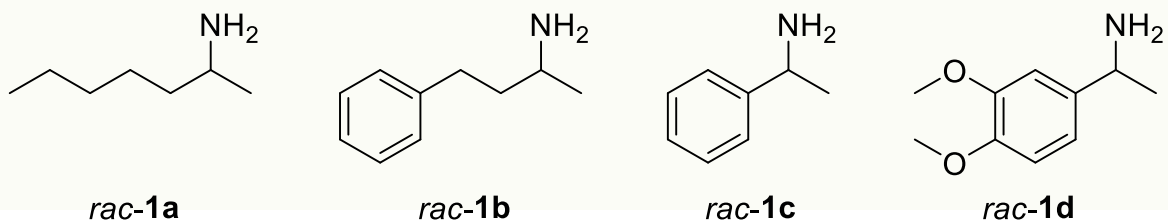
- **Bármilyen hordozón** (mágneses nanorészecske, polimer és szilika mikrorészecskék) **alkalmazható**
- **Szelektivitás:** gyors fémkelátképzés a His-tag jelölt fehérjével
- **Stabil és tartós rögzítés:** epoxiddal képzett kovalens kötéssel
- Alkalmazható szakaszos és folyamatos módban is



# Alkalmazás: Kinetikus rezolválás egész sejtes transzaminázokkal



Entry	TA <sup>a</sup>	1a <sup>b</sup>		1b <sup>b</sup>		1c <sup>b</sup>		1d <sup>b</sup>	
		c (%) <sup>c</sup>	ee (%) <sup>c</sup>	c (%) <sup>c</sup>	ee (%) <sup>c</sup>	c (%) <sup>c</sup>	ee (%) <sup>c</sup>	c (%) <sup>c</sup>	ee (%) <sup>c</sup>
1	ArS-TA	53	98.1 (R)	51	89.6 (R)	44	79.9 (R)	51	>99.8 (R)
2	VfS-TA	50	64.5 (R)	47	66.8 (R)	39	65.0 (R)	13	13.1 (R)
3	CvS-TA <sub>m</sub>	38	39.3 (R)	44	76.2 (R)	17	21.1 (R)	23	26.4 (R)
4	AtR-TA	51	97.0 (S)	48	86.4 (S)	42	72.9 (S)	51	>99.8 (S)
5	ArR-TA	57	99.7 (S)	49	90.4 (S)	35	53.7 (S)	36	50.1 (S)
6	ArR-TA <sub>m</sub>	47	97.5 (S)	33	29.9 (S)	21	27.3 (S)	15	15.5 (S)



Molnár, Z.; Farkas, E.; Lakó, Á.; Erdélyi, B.; Kroutil, W.; Vértessy, B. G.; Paizs, C.; Poppe, L. *Catalysts*, 2019, 9, 438.

## Alkalmazási példa: *Halolamina sediminis* transzamináz

- Az enzim azonosítása bioinformatikai úton
- *Archea* eredetű enzim (extrém halofil)
- Királis aminok előállításában alkalmazható
- Várhatóan stabilabb a prokarióta eredetű transzaminázoknál
- **Szintetikus gén** – expresszió *E. coli* rendszerben



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Alkalmazási példa: *Halolamina sediminis* transzamináz

## *Halolamina sediminis* S-TA

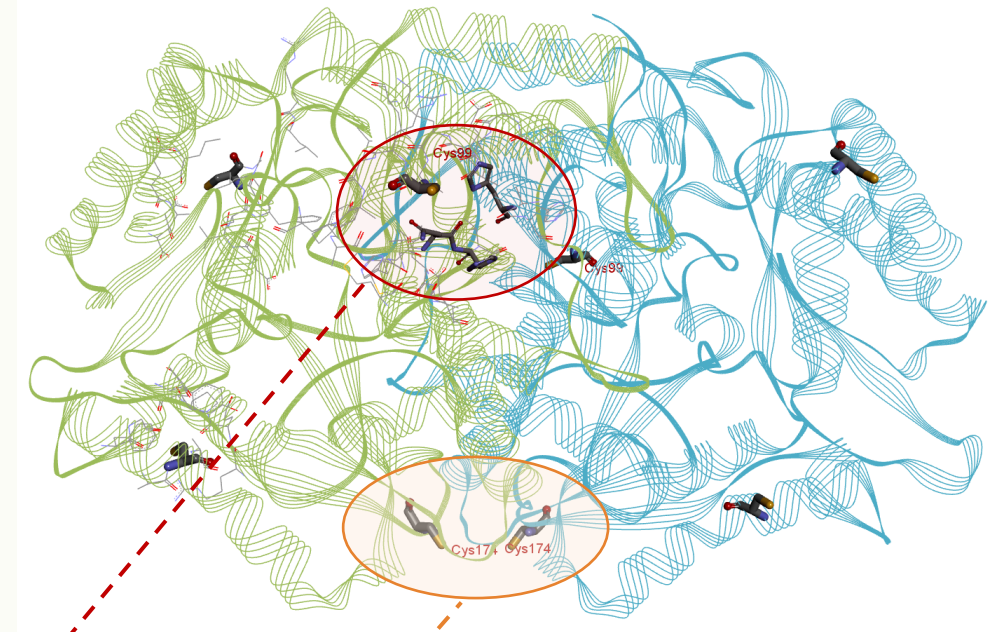
```
>tr|A0A1J0VCU3|A0A1J0VCU3_9EURY Aspartate aminotransferase  
family protein OS=Halolamina sediminis GN=BOX17_02025 PE=4  
SV=1
```

```
MPPSLPALDRAHHLHPFTDFKALGEEGSRVITHAEGVYIHDAEGHRLLDGMAGLWCVNLG  
YGRRELVDAAAEOQLQLPPYNTFFKTTHPPAVGLAEKLSRLAPAHMNHVFFTGSGSEAND  
TVLRMVRRYWALRGKPKWQWVIGRENGYHGSTLAGMSLGGMALMHEQGGPGVPSITHVRQ  
PYWFGEGRDQSPEAFGHASAAAIEERILALGEENVAAFIAEPVQGAGGAIMPPASYWPAV  
KAVLARYDILLVVDEVICGFGRLGEWFGSVLYDLAPDLMPIAKGLSSGYLPIGGVLVGDR  
VADTLIEEGGEFFHGFTYSGHPVCAAVARNLEIMEEAGVVERVRDDLGPYLARRWSELA  
DHPLVGEARSLGLMGALELVDPTTGGFRDRALAVGTLCRDISFASGLVMRSVGD TMIISP  
PLVITHEQIDELVSLAREALDETARRLSGDFAYTLYPQERYE
```

### >Szintetizált gén aminosavszekvenciája

```
MPPSLPALDRAHHLHPFTDFKALGEEGSRVITHAEGVYIHDAEGHRLLDGMAGLWCVNLG  
YGRRELVDAAAEOQLQLPPYNTFFKTTHPPAVGLAEKLSRLAPAHMNHVFFTGSGSEAND  
TVLRMVRRYWALRGKPKWQWVIGRENGYHGSTLAGMSLGGMALMHEQGGPGVPSITHVRQ  
PYWFGEGRDQSPEAFGHASAAAIEERILALGEENVAAFIAEPVQGAGGAIMPPASYWPAV  
KAVLARYDILLVVDEVICGFGRLGEWFGSVLYDLAPDLMPIAKGLSSGYLPIGGVLVGDR  
VADTLIEEGGEFFHGFTYSGHPVCAAVARNLEIMEEAGVVERVRDDLGPYLARRWSELA  
DHPLVGEARSLGLMGALELVDPTTGGFRDRALAVGTLCRDISFASGLVMRSVGD TMIISP  
PLVITHEQIDELVSLAREALDETARRLSGDFAYTLYPQERYE
```

- a HsTA C199S/C405S mutáns az ismert (S)-szelektív transzaminázokkal összevethető aktivitást és szelektivitást mutatott
- a HsTA C199S/C405S mutánsban a további **C99S** és/vagy **C174S** mutáció *jelentősen rontotta a stabilitást és az aktivitást*



**C174S (diszulfid-híd képzés az alegységek között)**  
**C99S (fém-kelát stabilizáció az alegységek között)**

C199S ✓  
C405S ✓



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT