

Fekete Erzsébet – Karaffa Levente

Ipari Biotechnológia

**Lektorálta: Dr. Tóth László osztályvezető (TEVA
Gyógyszergyár ZRt.)**

**Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Biomérnöki Tanszék
2013**

„Nincs külön elméleti tudomány és alkalmazott tudomány. Tudomány létezik és a tudomány alkalmazása; ezek úgy kapcsolódnak össze, mint a fa és annak gyümölcse”

(Louis Pasteur)

Tartalom

1	Bevezetés, történeti áttekintés	5
1.1	Bevezetés:	5
1.2	Történeti áttekintés:	6
2	Ipari fermentációs táptalajok kialakítása	10
2.1	Bevezetés	10
2.2	kémiaiilag definiált tápközeg	10
2.3	kémiaiilag nem definiált (komplex) tápközeg	11
2.3.1	A komplex tápközeg elvi kritériumai	11
2.3.2	Fermentációs szénforrások	12
2.3.3	Fermentációs nitrogénforrások	18
2.3.4	Ásványi anyagok	19
2.3.5	Egyéb táptalaj-kiegészítők	20
2.3.6	A víz szerepe	21
2.3.7	A komplex táptalaj sterilizése	21
3	Mikrobiális alkoholgyártás	23
3.1	Bevezetés	23
3.2	Az alkoholgyártás biológiája	23
3.3	Az alkoholgyártás alapanyagai	26
3.4	alkoholgyártáshoz kapcsolódó törzsfeljesztések	30
3.4.1	Az etanol tűrés javítása	33
3.4.2	Inhibitorokkal szembeni érzékenység csökkentése	34
3.4.3	Hőmérséklet-tűrés	34
3.4.4	Monomerek egyidejű felvétele	35
3.4.5	Cellulóz/hemicellulóz hidrolízis a termelő mikróbával	35
4	Szerves savak mikrobiális előállítás	37
4.1	Bevezetés	37
4.2	A citromsav mikrobiális előállítása	38
4.2.1	Történeti áttekintés	38
4.2.2	A citromsav keletkezésének biokémiája	39
4.2.3	A citromsav gyártás technológiai követelményei	42
4.2.4	A termelő törzsek kialakítása	45
4.2.5	A citromsav gyártási folyamata	46
4.2.6	A citromsav felhasználása	48
4.3	A glükonsav mikrobiális előállítása	48
4.3.1	A glükonsav gyártási folyamata	50
4.4	Az itakonsav mikrobiális előállítása	50
4.5	A tejsav mikrobiális előállítása	52
5	Aminosavak mikrobiális előállítása	54
5.1	Bevezetés	54
5.2	aminosavak gyártása és a termelő törzsek fejlesztése	55
5.3	Az l-glutaminsav mikrobiális előállítása	56
5.3.1	Az L-glutaminsav keletkezésének biokémiája	56
5.3.2	Az L-glutaminsav gyártási folyamata	57
5.4	Az l-lizin mikrobiális előállítása	58
5.4.1	Az L-lizin keletkezésének biokémiája	58
5.4.2	Az L-lizin gyártási folyamata	60
5.5	Az l-treonin mikrobiális előállítása	60
5.5.1	Az L-treonin keletkezésének biokémiája	60
5.5.2	Az L-treonin gyártási folyamata	61
5.6	további aminosavak mikrobiális előállítása	62
5.6.1	L-aszparaginsav	62
5.6.2	Aromás aminosavak	62
6	Mikrobiális poliszacharidok és poliszacharopeptidok	64
6.1	Bevezetés	64
6.2	A dextrán előállítása	64
6.3	A xantán előállítása	65
6.4	Az alginát előállítása	66

6.5	Gomba eredetű bioaktív poliszacharidok és PSP-k	67
7	Terpenoidok és karotinoidok előállítása.....	69
7.1	Bevezetés.....	69
7.2	A terpének kémiája és biokémiája.....	69
7.2.1	Terpenoidok gyakorlati jelentősége	70
7.2.2	Karotinoidok előállítása	72
8	Vitaminok mikrobiális előállítása	77
8.1	Bevezetés.....	77
8.2	A riboflavin (B ₂ -vitamin) előállítása	78
8.3	Nikotinsav és nikotinsav-amidok (nikotinátok; B ₃ -vitamin) előállítása	80
8.4	A cianokobalamin (B ₁₂ -vitamin) előállítása	81
8.5	Az L-aszkorbinsav (C-vitamin) előállítása	84
9	Mikrobiális olajok (SCO) előállítása.....	86
9.1	Bevezetés.....	86
9.2	A zsírsavak kémiája és biokémiája.....	86
9.3	Az SCO előállítás technológiája.....	87
10	Szilárd fázisú fermentációk és termékeik.....	91
10.1	Bevezetés.....	91
10.2	Az SSF alkalmazása	91
10.2.1	SSF bioreaktorok	92
10.2.2	Szerves savak gyártása SSF technológia révén.....	93
10.2.3	Komposztálás.....	95
10.2.4	Szekunder metabolit termelés	95
11	Növényi sejt fermentációk	97
11.1	Bevezetés.....	97
11.2	Növényisejt tenyészetek fermentációs technológiája	98
12	Rovar- és emlőssejt fermentációk	104
12.1	Bevezetés.....	104
12.2	Emlőssejt tenyészetek biológiája.....	105
12.3	Rovarsejt tenyészetek biológiája	109
12.4	Állatisejt tenyészetek fermentációs technológiája.....	111

1 Bevezetés, történeti áttekintés

1.1 BEVEZETÉS:

A világgazdaságban mind nagyobb szerepet betöltő, sok országban húzóágazatnak számító **biotechnológia** a vegyipari, műszaki és (mikro) biológiai ismereteket egyesíti azon célból, hogy valamilyen piacképes terméket állítson elő. Ebben a komplex folyamatban – mely a törzsfeljesztést (esetleg genetikai manipulációkat), a termék kinyerését és tisztítását, a farmakológiai, toxikológiai tesztek elvégzését és tágabb értelemben a piackutatást és az értékesítést is magába foglalja – a fermentációs technikákra (költség vonatkozásában is!) fontos szerep hárul. Fermentációs technikáknak azon ismereteket nevezzük, melyek révén a definiált kémiai és műszaki környezetbe helyezett sejtekkel vagy sejtalkotókkal a kívánt terméket elő tudjuk állítani. Az egyes technikai fogások sorba rendezése, optimalizálása eredményeként születnek meg a fermentációs technológiák; ezek legtöbbször a vállalatok féltve őrzött titkai maradnak.

A **fermentáció** kifejezés a latin "*fervere*" ("égetni") igéből származik, s kezdetben az élesztőgombák gyümölcszírupokban kifejtett cukorlebontó hatására vonatkozott. Mára az eredeti jelentés kiveszett a köztudatból, a szó azonban két tudományterület, a biokémia és az alkalmazott mikrobiológia/biotechnológia terminológiájába is bekerült.

Amikor a glükóz lebontása oxigénmentes (anaerob) körülmények között történik, a képződő redukált koenzimek regenerálódása nem a légzési láncon történik, hanem szerves molekulák redukálása közepette. A biokémiában ezért azon energianyerő folyamatot értjük fermentáció alatt, amelyben az elektron donor és az elektron akceptor is szerves molekula.

Az alkalmazott biotechnológia első állomásai egyszerű, de fontos élelmiszeripari termékek (alkohol, tejsav) előállításai voltak, melyek biokémiailag fermentációnak voltak tekinthetők. Az elnevezés rajtamaradt minden olyan folyamaton, ahol tenyésztett sejtek valamilyen "termék"-et állítanak elő, tekintet nélkül az oxigénhez való viszonyra. Kezdetben a fermentációk fahordókban, vagy tálcákon mentek végbe. A kihozatal emelése hatékonyabb módszerek alkalmazását igényelte, ezért a hordókat célirányosan megtervezett készülékek váltották fel, melyeket **fermentornak** hívnak.

Természetesen – és szerencsére – az emberi találékonyság az ipari biotechnológia területén is könyvtárnyi információt eredményezett, melyek szisztematikus ismertetése meghaladná lehetőségeinket. Reméljük azonban, hogy az alapok elsajátításában és az új ismeretek megszerzésében segítséget tudunk ezzel a jegyzettel nyújtani.

1.2 TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS:

Nem ismeretes olyan történeti korszak vagy helyszín, ahonnan az írott feljegyzések ne tudósítanának a bor és az élesztővel kelesztett kenyér fontos, sokszor kultikus társadalmi szerepéről. A Teremtés Könyve (Genezis) szerint még maga Noé is beleesett a túlzott alkoholfogyasztás erényébe. Mezopotámiából előkerült leletek szerint az ottaniak mézből erjesztett sört ittak, az ókori Egyiptomban pedig valódi sörfőzdék működtek. Mellettük a tejből előállítható élelmiszerfélék (sajt, túró) és az ecet is nagy jelentőséggel bírtak.

A bibliai időktől az újkor hajnaláig túl sok haladás a tudomány ezen területén sem történt. Noha a biotechnológiához közvetlenül nem kapcsolódott, mégis a holland Antonie van Leeuwenhoek felfedezései jelentették a következő mérföldkövet. Saját készítésű, egyetlen lencséből álló mikroszkópjain egy addig teljességgel ismeretlen világ kapuit tárta szélesre.

A XVI. század elején már nagy sörfőzdék működtek szerte Európában (a legrégebb, folyamatosan működő európai sörfőzdék több, mint ezer évesek!). Eleinte fából készültek, térfogatuk elérte az ezer köbmétert. Néhány évtizeddel később már réz tartályokat készítettek, s megtörténtek az első próbálkozások a folyamatok műszeres kontrollálására (1757 - hőmérő; 1801 - hőcserélő). Rendkívül fontos lépés volt az élesztők, mint élőlények szerepének felismerése az erjesztéses folyamatokban; ezek tudományos igényű vizsgálatában a francia Louis Pasteur szerzett elvülhetetlen érdemeket. A XIX. század vége felé a Carlsberg cégnél dolgozó német Hansen megteremtette az élesztők tiszta tenyészetként való fenntartásának és használatának technikai alapjait, mely máig nem változott lényegesen. Kivételt a tradicionális brit "ale"-főzdek jelentenek, ahol mind a mai napig kevert élesztő tenyészetekkel erjesztenek.

Az ecetgyártás hajnalán a bort sekély tálcákban a szabad levegőn hagyták, s az magától megsavanyodott (felszíni, "surface" tenyésztés). Ez természetszerűen vezetett a levegő szerepének felismeréséhez, és egy olyan készülék megalkotásához, melyben a folyadék intenzívebben érintkezhetett a levegővel. Egy tartályt valamilyen inert anyaggal (fával, szénnel, forgácscsal) töltöttek meg, s ennek felszínén a felülről adagolt bor lassacskán végigcsörgedezett. Az inert hordozón helyezkednek el az oxidációt végző baktériumok. Ezek a megalkotójukról elnevezett Frings-féle generátorok világszerte működnek, s mai napig a Föld ecetgyártásának közel harmadát állítják elő.

A többi erjesztéses folyamat ipari kiaknázása sem váratott sokáig magára. Blondeau 1847-ben írta le a tejsavképződés mikrobiológiai alapjait, és alig 40 év múlva már tejsavgyárak működtek Amerikában és Európában egyaránt. Föltétlenül említést érdemelnek az acetone és butanol fermentációk, mert ezeknek a fontos szerves oldószereknek az ipari léptékű előállítása vezetett el a valódi, steril gyártási folyamatok kifejlesztéséhez. Korábban a

fertőzéseket a jó inokulummal (oltóanyaggal, előtenyésztéssel) és a higiéniai rendszabályok gondos betartásával próbálták több-kevesebb sikerrel elkerülni. Itt azonban mind a kezdeti (még aerob), mind a későbbi szakaszban idegen baktériumok szaporodhattak el, mivel a termék nem jelentett az alkoholhoz, tejsavhoz vagy ecetsavhoz hasonló spontán védelmet. Az angol Chaim Weizmann – a későbbi Izrael Állam első elnöke – által kifejlesztett fermentorok nyílásait forró gőzzel, túlnyomás alatt lehetett sterilizálni, lecsökkentve ezzel az idegen mikrobák behatolásának esélyét. Az újszerű fermentációs technológiák révén gyorsan, nagy mennyiségben előállítható szerves oldószereknek robbanószer-alapanyagként komoly szerepe volt Anglia első világháborús győzelmében.

A két világháború közötti időszakra tehető a citromsav, a glükonsav, a glicerol, és a pékélesztő nagyüzemi gyártásának kezdete. Ezen folyamatok egy része kifejezetten aerob volt, s hamar kiderült, gazdag táptalajon a sejtek gyors növekedése oxigén hiányhoz vezet, aminek erjedéssel járó melléktermékek megjelenése, vagyis kihozatal-csökkenés lesz az eredménye. Ezt a táptalaj "gyengítésével" küszöbölték ki, a növekedést tehát a szénforrással, s nem az oxigénnel korlátozták. A szénforrás lassú, folyamatos adagolásával a termelés elnyújtható lett – ez a ráadagolásos vagy "fed-batch" technikának nevezett eljárás lett az alapja világszerte az aerob termelő folyamatoknak az addigi süllyesztett, szakaszos, ("batch") fermentációkkal szemben. Az oxigén ellátás fokozására levegőbefúvató csöveket és kompresszorokat kezdtek használni, s megjelentek a mechanikus keverők is. Az intenzív levegőztetés habképződéshez vezetett, amivel szemben mechanikus habtörőket alkalmaztak. Ezek gyakorlatilag lecentrifugálták a habot, különválasztva benne a folyadékot és a gázt. A sejtek növekedésének mértékét a hőmérséklet erősen befolyásolja, ezért mind pontosabb hőmérőket és hőcserélő rendszereket fejlesztettek ki, s megjelentek az első pH-elektrodák ("off-line", azaz levett minták alapján történő, nem folyamatos) szabályozással.

A II. világháború során – a tudomány egyéb területeihez hasonlóan – az ipari biotechnológia is jelentős fejlődésen ment át. Fleming penicillinről tett akadémikus megállapításai hamarosan a klinikai gyakorlatban is lényegesek lettek – a penicillin révén legyőzhetővé váltak a harctéri sérülések során szerzett, addig végzetes sebfertőzések. Az egymásra sokszor féltékeny brit és amerikai gyárak összefogva próbálták a "csodafegyver" gyártását olcsóbbá tenni, az Egyesült Államokban pedig valóságos népi mozgalommá vált a penészgombák gyűjtése és ellenőrző központokba küldése. A penicillin története kapcsán mindenképpen meg kell említeni a ma DSM néven ismert holland gyógyszergyár kutatóit, akik a német megszállás alatt, a Gestapo orra előtt jutottak el csaknem ugyanoda, ahová a szövetséges országok egyesített erői.

A penicillin előállítása nem egyszerűen aerob folyamat, hanem kifejezetten magas oxigéntenziót igényel. A háború alatti költségeket nem kímélő fejlesztések a fermentorok levegőztetésének műszaki/mechanikai problémáira is sok szempontból megoldást kínáltak. Több száz köbméteres, gőzzel *in situ* sterilizálható és túlnyomás alatt működő bioreaktorok épültek, a levegőbuborékok hatékony porlasztását központi elhelyezésű mechanikus keverők biztosították. A kontroll-műszereket mérőkörök váltották fel, melyeket hamarosan számítógép vezérelt. A másik óriási lépés a modern törzsfelkészítő programok beindulása volt; ez máig a biotechnológia egyik legfontosabb részterülete. Az eredeti *Penicillium notatum* törzs a maiak teljesítményének tízezredrészét tudta előállítani, s ez az arány sok termelésre fogott sejtípus esetében is érvényes. A fejlesztés egyik fontos állomása volt a kísérleti üzemek elterjedése, ahol kisebb költség mellett, de "ipari körülmények" között tesztelhetők az adott törzset.

A penicillin mellett a streptomycin, az erytromicin, a tetraciklinek, a kloramfenikol, számos aminosav, gibberelin, nukleotid és vitamin mikrobiális előállítása is fellendült, s megtörténtek az első biokonverziós kísérletek. A 60-as évek elején sok cég foglalkozott a mikrobiális biomassza élelmezési célokra való felhasználásának lehetőségével ("Single Cell Protein" előállítás). Ennek olcsósága miatt óriási léptékű kihozatalra volt szükség, s ez a fermentor tervezést is előbbre vitte; megjelentek a mechanikus keverő nélküli levegőoszlop-fermentorok, s első ízben történtek próbálkozások folyamatos működésű rendszerek termelésbe állítására. Ezeknél a sterilitás megőrzése jelentett újabb kihívást, amit a szelepek és pumpák folyamatos fertőtlenítésével, valamint – az emberi hiba lehetőségét csökkentendő – minél magasabb szintű automatizálással igyekeztek legyőzni.

A múlt század hetvenes éveiben a laboratóriumok már elterjedten használtak rögzített sejteket illetve enzimeket specifikus reakciók kivitelezésére. Ipari léptékű felhasználásukat az enzimelektrodok és a biokatalitikus szerves szintézisek kifejlesztése, elterjedése hozta magával. Ugyanerre az időszakra tehető a biológiai alapú szennyvíztisztítók használatának kiterjesztése a kén, a nitrogén, a foszfor és más elemek eltávolítására.

A laboratóriumokban végzett első sikeres genetikai manipulációk hamarosan a termelésben is változást hoztak. Lehetővé vált a genetikai anyag átvitele egyik élőlényből a másikba – pl. mikrobiális inzulin vagy interferon termelés – másfelől az adott organizmus genetikai állományát is igény szerint lehetett módosítani. Noha a klasszikus izolálásos és szelekciós törzsfelkészítés jelentősége megmaradt, ezek a lehetőségek új távlatokat nyitottak a biotechnológiában is. A molekuláris biológiai módszerek gyors elterjedése és viszonylagos olcsósága számos új tudományterület (pl. proteomika, metabolomika, bioinformatika, genomika) és ezek részterületeinek világra jöttét eredményezte, melyek eredményei korábban

elképzелhetetlen gyorsasággal kerülnek be az ipari gyakorlatba. A termelésre fogott élőlények és sejttípusok diverzitása látványosan növekszik, a baktériumok, fonalas gombák és élesztők mellett ősbaktériumokat, növényi-, rovar- és állati sejteket is széles körben használnak.

Az ipari biotechnológia talán leginkább költség-és munkaigényes része a hatóanyag fermentléből történő kinyerése és tisztítása. A céltermék mellett sejteket, sejtörmelékeket, tápkomponenseket és a sejtek által termelt sokféle metabolitot is tartalmazó összetett mátrix komoly kihívást jelent analitikai és preparatív szempontból egyaránt. A gyártási folyamat ezen részét, valamint a szennyező anyagok megfelelő kezelését összefoglalóan „**downstream processing**”-nek nevezzük, elkülönítve ezzel az „**upstream processing**” résztől, mely a törzsfeljesztést, táptalaj-optimalizálást, oltóanyag előállítását, és a fermentációs műveletteni lépéseket foglalja magába.

A biotechnológiának négy, egymástól többé-kevésbé elkülönülő alkalmazási területe létezik: az **egészségügy** (az ún. piros biotechnológia), a **mezőgazdaság** (zöld biotechnológia), a széles körűen értelmezett **vegyipar és élelmiszeripar** (fehér vagy ipari biotechnológia) és a **környezetvédelem**. A vizek és vizes rendszerek biotechnológiájára szokták időnként a kék jelzöt alkalmazni. Mint látható, az elkülönülés részleges, hiszen pl. a penicillint (egészségügyi felhasználás), a glutaminsavat (élelmiszeripari felhasználás) és az itakonsavat (vegyipari felhasználás) műszaki-technológiai szempontból hasonló módon, fermentációs úton állítják elő.

Részletesebb definíció szerint a fehér (ipari) biotechnológia anyagok és energia környezetbarát, fenntartható módon történő előállítását jelenti biológiai eljárások révén, az energetika, a vegyipar, az élelmiszeripar, a textilipar, a festék- és bőrgyártás és a papíripar területén. Mindezen területek áttekintésére sajnos nem vállalkozhattunk. Igyekeztünk ezért azokat kiemelni, melyek termékei a mindennapi élet és a gazdasági mutatók szempontjából a leginkább jelentősek.

2 Ipari fermentációs táptalajok kialakítása

2.1 BEVEZETÉS

Mivel a termelésre fogott sejt vagy mikroorganizmus abban a környezetben él és alkot, amelyet a tápfolyadék határoz meg, a fermentációs ipari tápközegek kialakításának elméleti és gyakorlati jelentőségét nem lehet túlbecsülni. A táptalajok megtervezése az egykori, nagyrészt empirikus folyamatból mára szisztematikus tudománnyá lett, noha egy sajátos „úgy érzem, ez kell bele”-faktor kétségtelenül fennmaradt. Ez nem is meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a táptalajok összeállítása során számos, néha egymással ellentétes kívánalomnak kell teljesülnie. A mikroorganizmus/sejt növekedésén túl elő kell segítenie a termék (alapanyag) képződését, olcsónak, folyamatosan beszerezhetőnek és állandó minőségűnek kell lennie, nem szabad megnehezítenie a fermentáció műveletti lépéseit (pl. sterilizálás, levegőztetés), nem szabad akadályoznia (sőt, optimális esetben segítenie kell) a termékkinyerést. A táptalaj egy ipari biotechnológiai folyamat minden lépésére hatással van, részesedésük a teljes termelési költségben 5 % (pl. antitestek, szteroidok, hormonok) és 50 % (pl. bioalkohol) között mozog. Jegyzetünket ezért a tápközeg kialakítás elvi és gyakorlati szempontjainak áttekintésével kezdjük.

2.2 KÉMIAILAG DEFINIÁLT TÁPKÖZEG

A kutatásban elterjedten használt, kémiailag definiált táptalajok (olyan tápközegek, melyekben az összes komponens minősége és mennyisége ismert) a termelési gyakorlatban nagyon ritkán fordulnak elő, mivel beszerzésük és összeállításuk költséges és hosszadalmas, és legtöbbször a sejtnövekedés illetve a hozam szempontjából sem ideálisak. Néhány esetben azonban van rá példa: ha peptid jellegű terméket állítanak elő, a komplex komponens fehérje tartalma megnehezíti az alapanyag kinyerését; ilyenkor a definiált táptalaj reális alternatíva. A kémiailag definiált táptalaj összeállításánál a tenyésztési kívánt (mikro)organizmus elemi összetételének közelítése a vezérlő elv; a tápközegben lévő elemek arányát ez alapján állítják be. Az elemi összetétel azonban faj, sőt tenyésztési körülmény-függő, így meghatározása nem triviális. Valamelyik elsődleges biogén elemet (legtöbbször a szenet vagy a nitrogént) limitáló mennyiségben adják, az összes többi komponenst viszont fölöslegben, így a sejtsűrűséget (az elérhető maximális biomassza koncentrációt) a limitáló szubsztrátum mennyisége fogja meghatározni. A gyorsan hasznosuló glükóz limitálása esetén, aerob baktériumoknál a

szénforrás/maximális száraz sejttömeg aránya 50-55 % körül, gombák és élesztők esetében 35-40 % között alakul. Lassabban hasznosuló szénforrások esetén ez az érték alacsonyabb. A szénforrás hasznosulás mértékének egyik legbiztosabb jellemzője a száraztömegre számított hozamkonstans (a keletkezett száraz sejttömeg és a felhasznált szénforrás aránya).

A kémiailag definiált táptalaj komoly hátránya, hogy növekedést elősegítő vitaminok, kofaktorok, stb. hiányában a biomassza képződés jelentősen lelassul a komplex táptalajhoz képest még gyorsan hasznosuló szén-és nitrogénforrás használata esetén is. A kémhatás állandóságát a nagy puffer kapacitású komplex szerves vegyületek (pl. peptidek, aminosavak) hiányában kis móltömegű vegyületek (pl. foszfátok, karbonátok) illetve külső pH-szabályozás biztosítják. Szeretnénk végezetül megjegyezni, hogy a kémiailag definiált táptalajt sokszor minimál tápközegnek is nevezik, noha a két kifejezés nem teljesen szinoním. Minimál tápközegnek azokat a táptalajokat nevezzük, melyek egy adott sejt vagy (mikro)organizmus növekedéséhez minimálisan szükséges összetevőket tartalmazzák. Az emlőssejt fermentációk során alkalmazott táptalajok pl. jellemzően kémiailag definiált, de nem minimál tápközegek.

2.3 KÉMIAILAG NEM DEFINIÁLT (KOMPLEX) TÁPKÖZEG

Az ipari biotechnológiai folyamatok során túlnyomórészt komplex komponenseket is tartalmazó tápközeget használnak. A legtöbb komplex komponens többféle szerepet is betölt a fermentációs tápközegben (pl. a kukoricalekvár elsődleges nitrogén-, másodlagos nyomelem-, harmadlagos szénforrás).

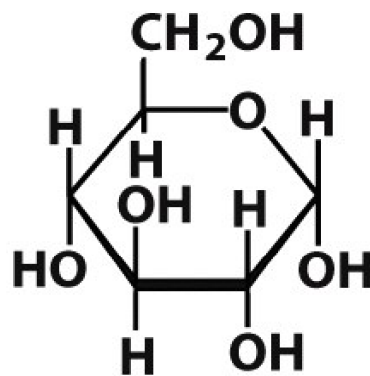
2.3.1 A komplex tápközeg elvi kritériumai

A komplex tápkomponensek kapcsán nem szabad elfelejteni, hogy eredendően nem a fermentációs ipar számára készültek, hanem más iparágak melléktermékei, hulladékai. A laboratóriumi léptékű kutatás-fejlesztés során megszokott, ismert tisztaságú, megbízhatóan és állandóan beszerezhető anyagokkal szemben itt olyan nyersanyagokkal dolgoznak, melyek anyagi minősége jelentős ingadozásokat mutathat szezonálisan vagy akár esetről esetre úgy, hogy ezért a „gyártó” semmiféle felelősséget nem vállal, sőt sokszor minőségi bizonylatot sem ad. A fermentációs technológia sikerének és reprodukálhatóságának viszont éppen az állandóság az egyik előfeltétele. Hogyan lehet ezt az ellentmondást feloldani? Először is, ki kell alakítani egy analitikai háttérlaborot (kisebb üzemekben ezt általában ki szokták szervezni egyetemi tanszékek, szolgáltató laborok felé), ahonnan a komplex komponens legfontosabb összetevőiről és szennyezőiről megbízható információ nyerhető. Másodsorban, alaposan meg

kell ismerni a komplex összetevőket forgalmazó üzemeket és termékeiket. Léteznek olyan publikációk (pl. Trader's guide to fermentation media formulation), melyek számos hasznos információt tartalmaznak fermentációs üzemek részére. A beszerzést diverzifikálni kell, akár a szállítási költségek megnövekedésének árán is. Több beszállóra alapozva az üzem nagyobb biztonsággal működtethető. Végezetül, célszerű többféle komplex szén- és nitrogénforrást alkalmazni ugyanabban a táptalajban, hogy az egyik vagy másik minőségének megváltozása kisebb hatással legyen a fermentáció egészére.

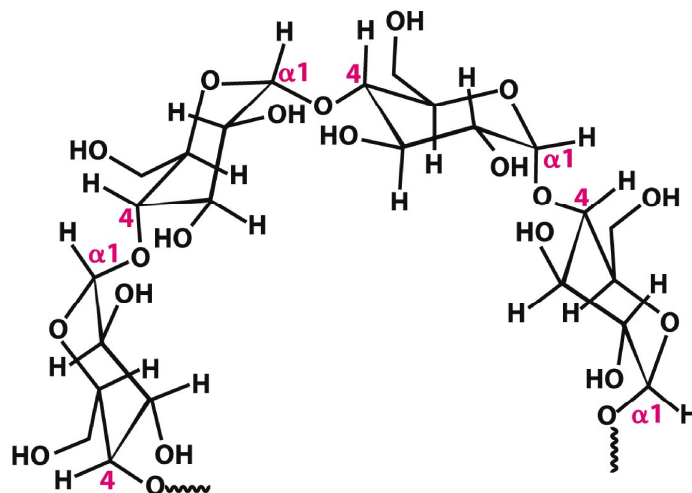
2.3.2 Fermentációs szénforrások

A fermentációs szénforrás legtöbbször szénhidrát, tipikusan glükóz (2. 1. ábra) vagy glükóz tartalmú szacharid. A glükóz laboratóriumi tisztaságú változata drága, így jellemzően a teljes hidrolízisen átesett, olcsó keményítő-variánsokat (dextróz monohidrát és szirup) használják az ipari gyakorlatban.



2. 1. ábra: D-glükóz

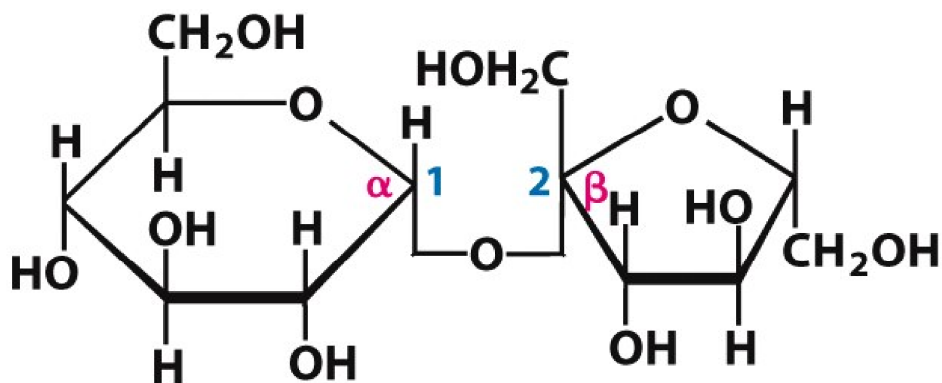
Az enyhébb hidrolízisen átesett keményítő (2. 2. ábra), a dextrin a dextróznál jóval nagyobb méretű molekulákból áll.



2. 2. ábra: keményítő

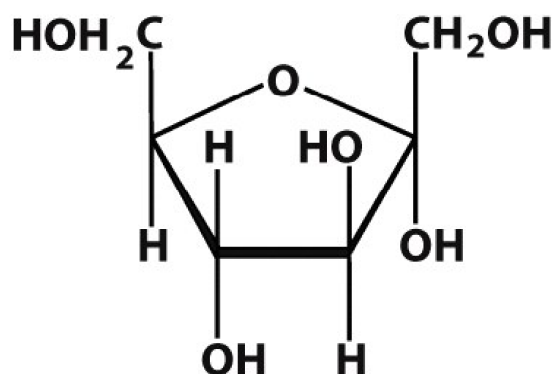
Jellemzően a fermentáció második, termelési (idio-)fázisában alkalmazzák, mivel hasznosulása lassabb, így karbon katabolit repressziós hatása nincs vagy jóval enyhébb a dextróznál, és ez elősegítheti a termékképződést. Vízoldékonysága jóval kisebb a glükóz/dextróznál, ezért ráadagolás révén (tömény oldatként) nem juttatható a reaktorba. A dextrin ezért az induló szénforrások közé tartozik, melyet a tenyészet a gyorsan hasznosuló egyéb szénforrások elfogyását követően kezd el asszimilálni.

A szacharóz (répacukor; α -D-glükopiranozil- β -D-fruktofuranozid, 2. 3. ábra) szintén gyakori szénforrás.



2. 3. ábra: szacharóz

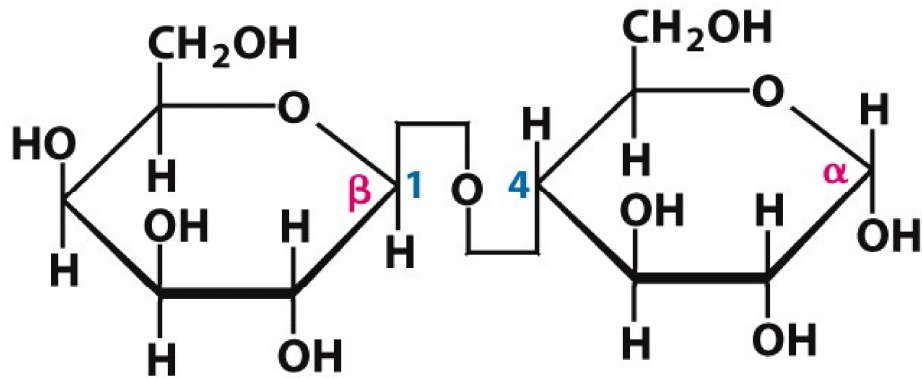
Hasznosulása gyors, hiszen mindkét monomerje, a D-glükóz és a D-fruktóz (2. 4. ábra) is közvetlenül be tud lépni glikolitikus útvonalba.



2. 4. ábra: D-fruktóz

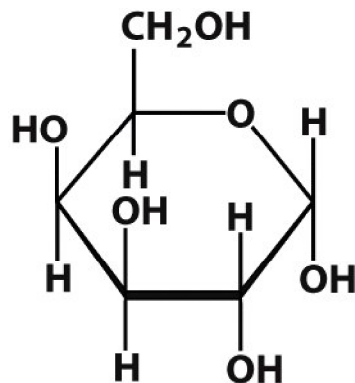
Származhat cukornádból (trópusi-szubtrópusi országok) és cukorrépából (mérsékelt égövi országok). A kétféle forrás közötti különbségeket jegyzetünk „Mikrobiális alkoholgyártás” c. fejezetében elemezzük ki részletesen. A szacharóz legolcsóbb (és legkevésbé tiszta) formája a közismert cukorgyári melléktermék, a melasz, melyben 3-10 % fehérje is található, emiatt a melasz másodlagos nitrogénforrásnak is tekinthető. Néhány esetben (pl. glutaminsav gyártás) ez kifejezetten előnyös, keresett tulajdonság. A melasz előállításának menetét mutatja be a 2. 1. mozgóképfilm elem (<http://www.liquidfeeds.com/molasses/louisiana-cane/>).

A sajtgyártás melléktermékeként évi másfél millió tonna mennyiségben képződő (s emiatt megújuló szénforrásnak tekinthető) laktóz (tejcukor; 1,4-0- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz; 2. 5. ábra) a penicillin gyártás klasszikus szénforrása volt, mivel lassú hasznosulása miatt karbon katabolit derepressziót vált ki a termelő organizmusban, ami az antibiotikum bioszintézis utak aktiválásával jár együtt.



2. 5. ábra: laktóz

A lassú laktóz hasznosulás oka a hidrolízis illetve a D-galaktóz monomer (2. 6. ábra) epimerizációjának időigénye.



2. 6. ábra: D-galaktóz

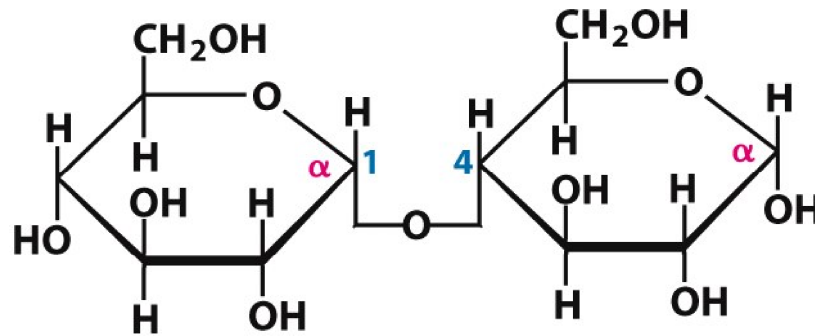
A laktóz kedvező hatását azonban kétféle módon is helyettesíteni lehet. Egyfelől, a fermentációs folyamatszabályozás gyors fejlődésével a ráadagolós (fed-batch) technikák immár technológiai léptékű (> 50 m³) tenyésztés esetén is lehetővé tették a rátáplált glükóz/dextróz/melasz mennyiségének precíz kontrollját. Ha a gyorsan hasznosuló szénforrás koncentrációja a gyártás során nem haladja meg azt az értéket, amely fölött karbon katabolit represszió következik be, kiváltható vele a lassan asszimilálódó szénforrás. A karbon katabolit represszió jelensége ugyanis nem elsősorban a szubsztrátum anyagi minőségétől, hanem a rajta kialakuló növekedési rátától függ; ha egy represszázó szénforrást kis koncentrációban alkalmazunk, a létrejövő alacsony növekedési ráta mellett a karbon represszió nem következik be. Itt szeretnénk megjegyezni, hogy a karbon katabolit represszió szigorúan transzkripciós

szintű folyamat: definíció szerint azt jelenti, hogy a glükóz (és néhány egyéb, gyorsan hasznosuló szénforrás, pl. fruktóz) jelenlétében a lassabban hasznosuló szénforrások lebontásához szükséges enzimeket kódoló gének gátolt (represszált) állapotban vannak. A jelenség molekuláris mechanizmusainak viszonylagos felderítését követően terjesztették ki a fogalmat az anyagcsere más területeire, így a felépítő útvonalakra is (pl. penicillin bioszintézis). Ezen tudományos előrelépések eredményeként vált lehetővé olyan mutáns törzsek létrehozása, melyekben a karbon katabolit represszió kialakulását géntechnológiai úton gátolták. Ezeknek a mutánsoknak nem volt többé szükségük derepresszálo (lassan hasznosuló) szénforrásra, s így a laktóz szénforrás használata egy időre visszaszorult. Ezzel egyidőben (az 1970-es évek második felében) azonban mind jelentősebbé vált a fungális celluláz illetve hemicelluláz enzimek fermentációs úton történő előállítására, melyhez a *Trichoderma reesei* (teleomorf: *Hypocrea jecorina*) fonalas gombát használják. A legjobban termelő *T. reesei* törzsek 100 g/L-t is meghaladó koncentrációban képesek extracelluláris fehérjéket kiválasztani, és ezt a mennyiséget mintegy 90 %-ban cellulázok illetve hemicellulázok teszik ki. A fermentáció során alkalmazott ipari szénforrás a laktóz.

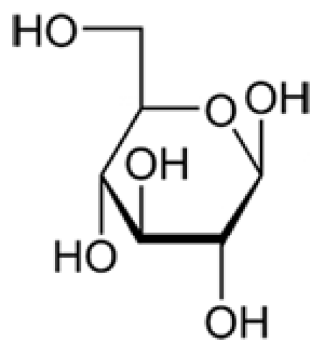
A nagy mennyiségű kiválasztott enzim felkeltette az érdeklődést egyes *T. reesei* celluláz promóterek, mint pl. a cellobiohidroláz I és II gén expresszióját szabályozó *cbh1* és *cbh2* iránt is, mivel elvileg felhasználhatók heterológ fehérjék előállítására is. Heterológ fehérjék a *T. reesei*-ben azonban ipari léptékben, gazdaságosan még nem termeltethetők. A bizonyított okok közé tartozik a termelt fehérjék összerendeződésének és érésének zavarai, valamint a túltermeléshez vezető szénforrás hiánya. Ez utóbbi probléma – kisebb mértékben – a cellulázok és hemicellulázok előállításánál is jelentkezik, mivel a legerősebben indukáló, cellulóz tartalmú, részben vízdékony hidrolizátumok olyan maradványokat tartalmaznak, melyek megnehezítik a keletkezett fehérjék tisztítását. Laboratóriumi körülmények között számos szénforrás (pl. növényi olajok, szoforóz, cellobióz, cellulóz) képes hatékonyan indukálni illetve derepresszálni az érintett gének kifejeződését, de technikai és gazdasági okok miatt ezek ipari léptékben nem alkalmazhatók. Jelenleg ezért, mint említettük, a laktóz az egyetlen, termelői körülmények között is használható szénforrás cellulázok, hemicellulázok és rekombináns fehérjék termeltetésére. A jelenség molekuláris szintű magyarázata nem tartozik könyvünk céljai közé, annyit azonban szeretnénk megjegyezni, hogy a laktóz nem a lassú növekedés eredményezte derepresszálo hatása révén, hanem aktív induktorként vesz részt a celluláz és hemicelluláz gének kifejeződésében.

A fentiekén túl még a maltózt (4-O- α -D-glükopiranozil-D-glükóz; 2. 7. ábra), a mannitolt (mannit, a D-fruktóz poliolja), a szorbitolt (glucitol; a D-glükóz poliolja), a xilózt

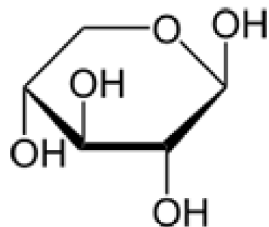
(2. 8. ábra) (facukor) és a glicerolt (propántriol) is használják fermentációs szénforrásként, valamennyit tisztított formában (a legfontosabb polioloak szerkezeti képletét lásd 2. 9. ábrán).



2. 7. ábra: maltóz



D-Glükóz



D-Xilóz

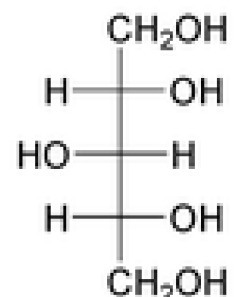
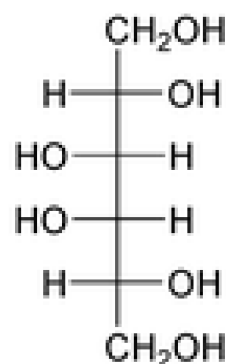
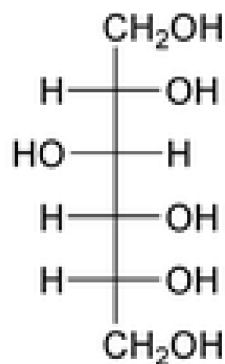
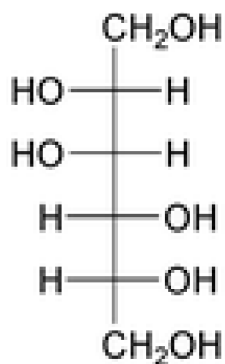
2. 8. ábra: D-xilóz

D-Mannitol

D-Szorbitol

Dulcitol

Xilitol

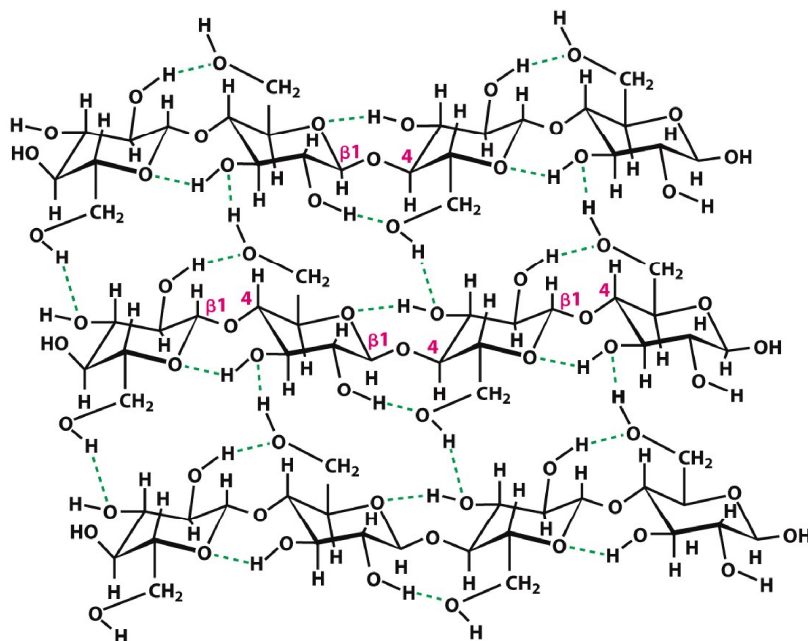


2. 9. ábra: poliol

Néha – kombinált szénforrás és pH-kontroll ágens gyanánt – szerves savakat (pl. ecetsav) is alkalmaznak.

A szénhidrátok után a második leggyakrabban használt fermentációs szénforrás-család a növényi olajoké. Egyaránt használják kiindulási és ráadagolt szubsztrátumnak, sőt olyankor is, ha a sejt közvetlenül nem asszimilálja őket. Az olaj jelenléte ugyanis megvédi a sejtet a mechanikus keverő által okozott nyíróerővel szemben, micellaképzés révén nyomelemeket tehet jobban hozzáférhetővé, és kiválthatja a szintetikus habzásgátlókat, amennyiben azok használata ellenjavallt. Ha pedig ténylegesen szénforrásként hasznosul, akkor számos előnye van a szénhidrátokkal szemben. Legfontosabb az un. energiasűrűség: térfogategységre számítva növényi olajok révén több hasznosítható energiát lehet bevinni a fermentorba, mint a szénhidrátok révén, ami alacsonyabb adagolási rátát és kisebb adagolótartályokat jelent az ipari gyakorlat számára. A másik jelentős előny a növényi olajok asszimilációjának relatív szabályozatlansága. A szénhidrát-lebontáshoz képest a zsírsavak béta-oxidációja kevesebb ponton és kevésbé szigorúan kontrollált; a szénanyagcsere funkcionális központjának számító Krebs-(citromsav-) ciklust a glikolízishez képest gyorsabban fel tudja tölteni acetil-CoA-val. Egy metabolit túltermelése során ez fontos (bár önmagában általában nem elégséges) élettani szempont lehet. A fermentációs gyakorlatban leggyakrabban használt olajtípus a szójaolaj, de előfordul üzemekben a gyapot-, mogyoró-, napraforgó-, pórsáfrány- (*Carthamus tinctorius L.*), hal- és disznóolaj (zsír) is. A szintetikus olajok közül a leggyakrabban használt a metil-oleát.

A természetben legnagyobb mennyiségben előforduló szerves anyag a cellulóz (β -1,4 glükóz; 2. 10. ábra), ami a növényi biomassza átlagosan egyharmadát teszi ki.



2. 10. ábra: cellulóz

Fermentációs technológiai felhasználásának részletei kapcsán könyvünk következő fejezetére utalunk; itt csak annyit jegyeznénk meg, hogy egyelőre nem létezik olyan nagyléptékű ipari technológia, ahol versenyképesen lehetne felhasználni szénforrásként.

2.3.3 Fermentációs nitrogénforrások

Alapvetően háromféle nyers (komplex) nitrogénforrást használ a fermentációs ipar: a mezőgazdasági eredetűt, a söripari melléktermékeket és a hús/halfeldolgozás melléktermékeit. A mezőgazdasági eredetű nitrogénforrások (gabona, szója feldolgozás maradványai), közülük is a szója a leginkább elterjedt. A szójaolaj magokból történő extrakciója után visszamaradó anyag, a szójaliszt mintegy fele fehérje, 30 %-a szénhidrát, de nyomelemek, ásványi anyagok is jelentős mennyiségben vannak benne. Inokulum tenyészetek esetében – ahol a gyors növekedés az egyetlen szempont – elég a szójaliszt-oldatot néhány egyszerű sóval (pl. magnézium-szulfát, kálium-foszfát) kiegészíteni. Hasonló élettani hatása van a gyapotmaglisztnek is, azzal a különbséggel, hogy a benne lévő fehérjék lassabban asszimilálódnak, azaz un. „retard” nitrogénforrásként működnek. Ez a tulajdonságuk az antibiotikum (ezen belül elsősorban penicillin) fermentációknál jelent előnyt. Az antibiotikum fermentációk kezdeti időszakában a kukoricaekvár (a kukoricakeményítő tejsavas extrakciója után visszamaradó, savas karakterű, viszkózus anyag) volt a legelterjedtebb nitrogénforrás, de egyetlen anyagi minősége miatt mára porlasztva szárított változata, a kukoricaekvár por váltotta fel. További komplex nitrogénforrás a földimogyoró és a lenmagliszt (az olaj kivonása utáni maradvány), illetve a búza, rizs és árpa liszt.

A söripar hozzájárulása a fermentációs nitrogénforrásokhoz maga az erjesztés után visszamaradó élesztő, illetve annak szárított-porlasztott változata (élesztőkivonat). Fontos megjegyezni, hogy az élesztőkivonat önmagában nem teljes értékű nitrogénforrás, hanem a növényi eredetű nitrogén kiegészítője; a kiegészítők legfontosabbika a szerves foszfor, illetve különböző mikroanyagok. Az élesztőkivonatot néha a minimál tápközegek egyetlen komplex komponenseként használják (félleg definiált – semi-defined – médium; hibás, de fölöttébb elterjedt elnevezésük még a félszintetikus táptalaj).

A hús- és haltermékek fehérjében roppant gazdagok. A disznóhús-feldolgozás során a csontokat és a szöveteket vízben felforraltják a zsír eltávolítása céljából (időnként a folyamatot proteázokkal segítik elő). A keletkező oldat vizes illetve lipid fázisokra oszlik. A vizes fázist porlasztva szárítva közel 80 %-os fehérjetartalmú port kapunk. Az enzimes/kémiai hidrolízis különböző tisztaságú húspeptonokat eredményez. A halfeldolgozás eredménye mintegy 70 %-

os fehérjetartalmú pepton. A disznó- illetve halhúsból származó fehérjék mintázata eltérő, aminek jelentősége lehet a fermentációs hatékonyság szempontjából.

Az állati peptonok mellett a növényi eredetű (szója, burgonya, farkasbab-) pepton is gyakorta használt nitrogénforrás, alkalmazásukat az állati fehérjék által esetlegesen közvetített TSE/BSE prionfertőzésektől való – sokszor jogos – félelem is elősegíti (TSE = Transmissible Spongiform Encephalopathies, magyarul Átvihető Szivacsos Agyvelőgyulladások, melyek egyik típusa a BSE, a Bovine Spongiform Encephalopathy, magyarul Marhák Szivacsos Agyvelőgyulladása, az un. kergemarhakór).

2.3.4 Ásványi anyagok

A kifejezés alatt nemcsak a fémionokat, de az ionerősséget és kémhatást szabályozó ágenseket, puffer hatású anyagokat, sőt bizonyos prekursorokat (a termék kialakulásához szükséges, abba beépülő vegyületeket) és inhibitorokat is értünk.

A nitrogéntartalmú sók (ammónium-szulfát/nitrát, kálium/nátrium nitrát) a tenyészet nitrogén igényének tekintélyes részét biztosítani tudja, viszont asszimilációjuk megváltoztatja a táptalaj kémhatását (az ammónium felvétele csökkenti, a nitráté inkább növeli). Egy másik fontos ásványi komponens a foszfor, melyet oldható foszfát formájában könnyebben tudnak a sejtek felvenni, mint valamilyen komplex anyagból (pl. élesztőkivonat).

Noha a komplex nyersanyagok, elsősorban a nitrogénforrások számottevő mennyiségű fémiont tartalmaznak, a fermentációs tápközeget mégis általában ki kell egészíteni a nagyobb mennyiségben szükséges sókkal (pl. magnézium, kálium). A fémionok (pl. vas, cink, mangán, réz, kobalt, molibdén) azonban egy komplex komponenseket bőven tartalmazó táptalajban jellemzően olyan mennyiségben vannak jelen, hogy külön nem kell a táptalajhoz adni őket. „Semi-defined” médium esetében azonban a kiindulási táptalaj része kell, hogy legyenek. Ha valamely, a termék előállításában esszenciális enzimről ismert, hogy fém kofaktort igényel, akkor ezt a fémiont általában főlegben szokták adagolni.

Semleges kémhatást igénylő fermentációk esetén a savasodást az ipari termelésben – szemben a laboratóriumi gyakorlattal – nem foszfát sók, hanem kalcium-karbonát révén oldják meg; pH 6 alatt a kalcium-karbonát bomlik, és a karbonát ion megemeli a kémhatást. Az ionerősséget nátrium-kloriddal vagy nátrium-szulfáttal lehet fokozni. Több fontos ipari fermentáció (pl. citromsav) esetén a sejtek növekedését foszfát limitációval fogják vissza. Az oldható foszfátot kalcium ionnal szokták kicsapni. Penicillin és cephalosporin C fermentációk esetén a kéntartalmú antibiotikum bioszintézisének fokozása érdekében fölös mennyiségű

szulfátot tesznek a tápközegbe; ugyanezen elv alapján a klór-tetraciklin vagy a vankomycin fermentáció tápközegébe extra mennyiségű klorid, a B₁₂ fermentációkhoz a folyamat végén cianid iont adagolnak.

2.3.5 Egyéb táptalaj-kiegészítők

Első helyen a habzásgátlókat említjük, mivel ezek számos ponton befolyásolhatják a fermentáció menetét. A habzásgátlók növelik a levegő és a víz határfelületén a felületi feszültséget (magnövelik azt az munkát, ami a hab kialakulásához szükséges) és ezzel elősegítik a buborékok összeolvadását. Korábban növényi olajokat használtak erre a célra, s noha néhány fermentáció (pl. cephalosporin C) esetében ez máig így maradt, a szintetikus habzásgátlók jórészt kiszorították őket. A legelterjedtebb típusaik a poli-propilén glikol (változó polimerszámmal) és a szilikon emulziók. Valamennyi habzásgátlót a fermentáció induló tápközegébe is tesznek még sterilizálás előtt, de sokszor a fermentáció alatt is végig adagolni kell őket. A szintetikus habzásgátlók gyakorlatilag nem metabolizálódnak (így az anyagcserére nincs hatásuk), emiatt nem fogynak el, vagyis költséghatékonyak. A hiányukban fellépő habzás bakteriális fertőzések előidézője lehet. Túlzott alkalmazásuk azonban az oxigéntranszfer csökkenéssel jár együtt (mivel lecsökkentik a folyadék-gáz határfelületet), így a habzásgátlók adagolása szigorúan kontrollált folyamat, része a technológiának.

A növényi olajok rosszul oldódnak a fermentációs tápközeg vizes oldatában, emiatt a lehető legkisebb felületű cseppek formájában vannak jelen, amihez a sejtek nehezen férnek hozzá. A felület növelése érdekében felületaktív anyagokat (pl. Tween, lecitin) alkalmaznak, melyek csökkentik az olaj és a víz határfelületi feszültségét. Az olajcseppek felülete ezáltal drámaian megnövekszik, és a sejtek számára könnyebben hozzáférhetővé válnak.

Noha tápanyagnak nem nevezhetők, a modern ipari biotechnológia fermentációinak egyre gyakrabban használt kiegészítői az enzimek. Az amiláz, celluláz, hemicelluláz vagy proteáz készítmények (tipikusan nyers, tisztítatlan kivonatok) révén a táptalaj polimerkomponenseit még sterilizálás előtt hidrolizálják. Ezzel egyrészt a mikroorganizmus számára könnyebben hozzáférhetővé teszik a szénforrást, másrészt a makromolekulák (részleges) bontása révén a tápfolyadék viszkozitását is csökkentik.

Az ásványi anyag jellegű prekursorokról az előző alpontban tettünk említést. A prekursorok nagyobb része azonban olyan szerves molekulák, melyek építőelemként tudnak részt venni az alapanyag (vagyis a termék) bioszintézisében. Peptid típusú termék esetében aminosavakat, aminosav túltermelés során a bioszintézis kritikus köztéseit (intermedierjeit)

adagoljuk a fermentációhoz. A klasszikus példa azonban az izopenicillin N-t szubsztituáló oldalláncok (pl. fenil-ecetsav, fenoxi-ecetsav) adagolása a fermentáció során.

2.3.6 A víz szerepe

Az ipari fermentációk – kevés kivételtől eltekintve – vizes oldatban mennek végbe. A tápközeg mennyiségileg messze kiemelkedő komponense a víz. Laboratóriumban a kutatók ioncserélt vagy desztillált vizet használnak a fejlesztőmunka során, technológiai léptékben azonban ez aránytalanul nagy költségeket jelentene. Egy fermentációs üzem ezért vagy a kommunális vízhálózatból nyeri vízszükségletét, vagy eleve természetes vizek (tavak, folyók) mellé telepítették, vagy saját fúrt kútjai vannak. Akármelyik esetről legyen szó, a vízben lévő szerves vagy szervetlen szennyezők bekerülnek a fermentálébe, és a léptéknövelések során nehézségeket okozhatnak. A víz minősége (a benne lévő oldott ionok mennyisége-minősége) ezért fontos szempont, különös tekintettel a szezonális ingadozásokra. Citromsav fermentáció esetén a vízben oldott Mn^{2+} ionok eltávolítása fontos része a technológiának.

A víz szempontjából külön kategóriát képez a söripar, ahol a termék 95 %-a víz. A víz minősége része a sörmárkának (pl. az angol 'ale' illetve a pilseni sörök kemény – magas kalcium/magnézium tartalmú – vízből készülnek, míg a barna sörök lágy vízből).

2.3.7 A komplex táptalaj sterilizációja

Sterilizáció során a táptalajt 121 °C hőmérsékletre fűtjük fel, és tartjuk 30-60 percen keresztül. A magas hőmérsékleten a vízben lévő komponensek különféle változásokon mehetnek keresztül, illetve reakcióba is léphetnek egymással. Granuláris anyagok (gabona- és állati lisztfélék) teljesen oldatba kerülhetnek, makromolekulák (proteinek, keményítő) kisebb móltömegű molekulákká degradálódnak, ami szintén a vízdékonyság fokozódásával jár együtt. A fémionok gyakorta reakcióba lépnek a fehérjékkel, komplexeket képeznek velük, és megváltoztatják oldékonyságukat; a szerves foszfátcsoportok leszakadhatnak és csapadékot képezhetnek fémionokkal. A Maillard reakció (melynek során redukáló cukrok és aminosavak reagálnak egymással) a növekedésre gátló hatású amino cukrok keletkezését eredményezheti. Ezt megelőzendő a redukáló cukrokat (pl. glükóz) külön, tömény oldatként sterilizálják és utólag adják a fermentorhoz olyan tápközeg esetén, mely sok aminosavat és ammóniát tartalmaz. A magas fehérjetartalmú tápközégeket sokszor sterilizálás közben is habzásgátlóval kell kezelni. Végezetül, fontos megjegyezni, hogy a mikroorganizmus számára a sterilizált tápközeg lesz a

tényleges környezet; a sterilizálás alatt lejátszódó fizikai/kémiai folyamatok megismerése ezért a technológia végső teljesítménye szempontjából is lényeges.

3 Mikrobiális alkoholgyártás

3.1 BEVEZETÉS

Az emberiség talán legrégebb és legtöbbek által ismert/művelt biológiai technológiája a cukrok alkohollá történő erjesztése. A főleg állati eredetű táplálékot fogyasztó nomádoknak a földműves életformára történt átállással az étkezési szokásaik is alapvetően megváltoztak: a gabonafélék váltak a legfontosabb tápanyagforrássá és ezzel egy időben kialakult a magokban és gyümölcsökben található cukrok alkoholos erjesztésének technikája is. Elterjedésében véletlenszerű események és ezek megfigyelése komoly szerepet játszhatott. A gabonafélék magjainak vízben történő áztatása és puhítása például a könnyebb emésztés és a kellemesebb íz miatt alakulhatott ki, a vízben csíráztatott mag-szuszpenzió pedig spontán élesztő-fertőzés (vagyis leoltás) következtében alkoholos erjedésen mehetett keresztül. Az erjesztett italok a kulináris élvezeten túl higiénias biztonságot is nyújtottak fogyasztóiknak. Mára a sör, a bor és a desztillált alkoholos italok előállítása fejlett műszaki és (mikro)biológiai színvonalat igénylő iparággá vált szerte a világban.

A mikrobiális alkoholgyártásnak azonban vannak egyéb aspektusai is: az etil-alkohol üzemanyag (Henry Ford XIX. század végén gyártott első gépjárműveinek üzemanyaga is un. „farm ethanol” volt, amíg a XX. század elején az akkor még olcsó ásványolaj származék, a petróleum ki nem szorította a piacról), továbbá a vegyipar/gyógyszeripar egyik leggyakrabban használt szerves oldószere és reaktánsa. Mindezek miatt az alkohol az ipari biotechnológia legnagyobb termelési volumennel és piaci értékkel bíró alapanyaga: csak a bioüzemanyag célú alkoholgyártás 2012-ben 85,2 milliárd litert tett ki, ami világszerte közel másfél millió munkahelyet jelentett. A teljes mennyiség több mint 90 %-át az amerikai földrészen, az USA-ban és Brazíliában állítják elő. A kémiai szintézissel, földgázból (etilén) illetve szénből történő, un. szintetikus alkoholgyártás mennyisége elhanyagolható szintre esett vissza; ma a világpiacon lévő ipari alkohol szinte teljes egészében fermentációs biotechnológiai eljárással készül (bioetanol).

3.2 AZ ALKOHOLGYÁRTÁS BIOLÓGIÁJA

Kimagasló (~18 %) alkoholtűrésük miatt az erjesztési technológiák fő szereplői az élesztőgombák, melyek a cukrokat minimális oxigén jelenlétében is képesek hasznosítani. A *Saccharomycetaceae* családba egysejtű, sarjadzással szaporodó, de a tenyésztési körülményektől

függően álmicéliumot képző gombák tartoznak. Ivaros szaporodásuk a vegetatív sejtek összeolvadásával történik. Az idetartozó nemzetségeket spóráik alakja és kialakulása alapján különíthetjük el. A talajtól a melegvérűek bélcsatornájáig mindenütt találkozhatunk velük. Erjesztő képességüket a borászat, a söripar, a szeszipar és a sütőipar hasznosítja, a vegyipar pedig enzimmorrásként alkalmazza; biomassájukat az állattenyésztők takarmányként használják.

A legismertebb élesztőfaj az *Saccharomyces cerevisiae* (synonym: *Candida robusta*). Felsőerjesztésű technológiákban sörélesztőként, számos változatát a borászatban alkalmazzák. A pékélesztő főtömegét is ez a faj alkotja.

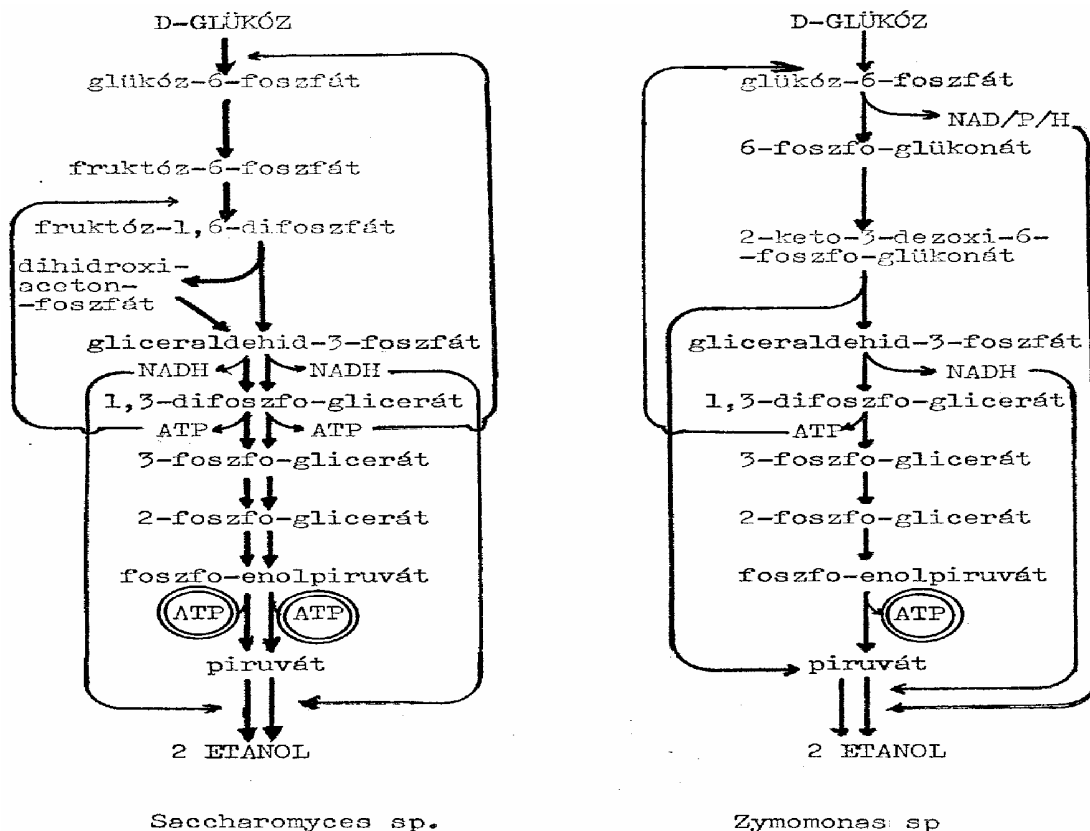
Az élesztők ammóniából és szénhidrátból a sejt felépítéséhez szükséges vegyületek teljes választékát képesek előállítani. A szénhidrát hasznosítását a glikolízis (Embden-Meyerhof-Parnas útvonal, EMP) enzimszere végzi, melynek során a D-glükóz alkohollá alakul. A glikolízis kulcsintermedierjét – a fruktóz-1,6-biszfoszfátot – az ATP szint által szabályozott fruktózfoszfát-1-kináz állítja elő fruktóz-6-foszfátból. A glikolízis végterméke a piruvát, melyet a piruvát dekarboxiláz enzim acetaldehiddé és szén-dioxiddá hasít. Az acetaldehidet az alkohol dehidrogenáz enzim etanollá redukálja a glikolitikus úton keletkezett NADH-k felhasználásával. Az alkohol keletkezése tehát a redukált kofaktorok regenerálásának szükségessége miatt történik. Az élesztősejt növekedéséhez szükséges egyéb vegyületek (aromás aminosavak, nukleotidok, pentózok) képződése a pentóz-foszfát (hexózmonofoszfát, HMP) úthoz kapcsolódva folyik.

A fakultatív anaerob szervezetek szénhidrát anyagcseréjének szabályozására vonatkozó első tudományos megállapítás Pasteur nevéhez kötődik. Kísérleti eredményei áttételesen az oxigén szabályozó szerepére hívták fel a figyelmet. Oxigén jelenlétében az élesztők növekedése jelentősen fokozódik. Megjelennek a légzést szolgáló mitokondriumok, amelyek oxigén hiány esetén újra sorvadásnak indulnak. Az oxidatív foszforilációhoz vezető elektronlánc működése, a légzés fokozódása, a tápközeg (szénhidrát) energiatartalmának gazdaságosabb hasznosítását teszi lehetővé. Oxigén jelenlétében az anaerob anyagcserét kiszolgáló, az alkohol keletkezése szempontjából esszenciális glikolízissel szemben előtérbe kerül a HMP út működése, mely a növekedéshez szükséges építőelemek képződése szempontjából meghatározó jelentőségű. Valójában az élesztők nem tekinthetők anaerob szervezeteknek, mert a növekedésük teljesen oxigénmentes körülmények között leáll, ugyanis nem képesek a sejtmembrán nélkülözhetetlen építőelemeként ismert szterinek (ergoszterin) és bizonyos esszenciális telítetlen zsírsavak szintézisére. Az ipari gyakorlatban ezért csekély levegőt mindig juttatnak a tenyésztő reaktorba, ami az alkoholos erjedés határfokát nem rontja.

Azt, hogy az aerob-anaerob anyagcsere közötti váltást nem közvetlenül az oxigén jelenléte okozza jól demonstrálja a Crabtree által 1929-ben leírt jelenség. A tápközeghez adott

glükóz mennyiségétől függően az élesztő aerob körülmények között is képes az alkoholos erjedés irányába terelni az anyagcserét. Glükóz adagolásakor a citokromok képződése ugyanúgy leáll, mintha oxigén hiányában következne be a gátló hatás. A légzőenzimek kiesése csökkenti a sejt ATP szintjét, ez pedig feloldja az alloszterikusan szabályozott fruktózfoszfát-1-kináz gátoltságát. Ennek az enzimnek a működését az aktuális ATP szint szabályozza. A légzés csökkenése a redukált kofaktorok (NADH, NADPH) feldúsulásához vezet. A NAD⁺ hiány gátolja a piruvát-dehidrogenáz működését, amiből következően a Krebs ciklus leáll. Az ATP szint alakulása a D-glükóz (hexóz) permeáz működésére hatva fokozza a glükóz felvételét. Végeredményben az oxigén jelenléte ellenére is anaerob anyagcserére jellemző egyensúly alakul ki, amely a fokozott glükóz felvétel mellett a növekedés lassú voltában jelentkezik.

Az ipari alkohol gyártásában az élesztő mellett előnyösen használható a *Zymomonas mobilis* anaerob Gram-negatív baktérium is. A *Z. mobilis* az élesztőnél lényegesen nagyobb szénhidrát koncentrációt és etanol tartalmat képes elviselni, és magasabb hőmérsékleten erjeszt. 36 °C-on az elméletileg lehetséges alkohol hozam 97 %-át teljesíti, szemben a *S. cerevisiae* 95 %-os gyakorlati konverziójával. Mivel a szénhidrát lebontás az Entner-Doudoroff úton folyik, az alkohol mellett csak 1 ATP képződik, amiből következően a képződő sejttömeg csekélyebb. A kétféle mechanizmus összehasonlítását a 3. 1. ábra könnyíti meg.



Etanol képződéssel összefüggő ATP szintézis
3.1. ábra: Saccharomyces és Zymomonas etanol szintézise

Az elméletileg lehetséges 51 %-os hexóz-alkohol konverzió melléktermékek képződése miatt nem érhető el (3. 1. táblázat).

Melléktermék	Mennyiség/1 mól D-glükóz
Vajsav	0,21 mmol
Tejsav	1,37 mmol
Ecetsav	15,15 mmol
Hangyasav	0,49 mmol
Borostyánkősav	0,68 mmol
Etanol	129,9 mmol
Butándiol	0,7 mmol
Glicerín	32,3 mmol
Szén-dioxid	148,5 mmol

3.1. táblázat: Az alkoholgyártás melléktermékei

3.3 AZ ALKOHOLGYÁRTÁS ALAPANYAGAI

Az előállított alkohol árának közel 40 %-át teszik ki az alapanyagok költségei, ezzel a technológia egyik legfontosabb komponense. Függetlenül a felhasznált nyersanyag anyagi minőségétől, az első lépés a nyersanyag tisztítása, mechanikai aprítása, vagyis egy viszonylag homogén frakció kialakítása. Ezután következnek a különböző hidrolízis technikák, melyek során egyszerű, fermentálható cukrokhoz jutunk.

A szeszgyártás alapanyaga kezdetben a cukorgyártás melléktermékeként megjelenő melasz volt, melynek hasznosítható komponense a glükóz és fruktóz monomerekből felépülő szacharóz. Noha számos országban a cukorrépa illetve a cukornád szacharóz tartalmát teljes egészében alkohollá alakítják (a világ bioetanol produkciójának 60 %-át eredményezve), a világgazdaság növekvő alkohol igényét ez az alapanyag nem fogja tudni kielégíteni.

Az alkoholgyártás gazdaságosságát vizsgálva össze kell vetnünk a cukorgyártásban hasznosított mezőgazdasági termékek előállításának költségeit és a belőlük nyerhető hasznos termékek mennyiségét.

Egy tonna 73 %-os víztartalmú cukornád átlagosan 769 kg cukortartalmú nádszár esetén 231 kg levél és szárcsúcsi részt tartalmaz. A nádszárból felaprítás után 174 kg szárazanyagot tartalmazó vizes oldatot lehet kipréselni. A visszamaradt növényi maradék száraz súlya 97,4 kg, amelyből elégetve 3,3 kg hamu marad vissza. A víz-oldható frakcióban 122,5 kg fermentálható szénhidrát és 51,9 kg nem fermentálható anyag (19,5 kg nitrogén tartalmú vegyület, 5-6 kg lipid, 13 kg hamu) található.

Egy tonna 81 %-os víztartalmú cukorrépából 515 kg szénhidrátot tartalmazó gyökér illetve 485 kg takarmányként hasznosítható répafej és levél különíthető el. A lefejezett gyökérből 84,8 kg szárazanyag tartalmú, vízdoldható anyag és 26,2 kg szárazmaradékot tartalmazó, takarmányként hasznosítható extrahált gyökérmaradvány képződik. A vízdoldható anyag 66,4 kg fermentálható szénhidrátot és 18,4 kg nem fermentálható maradékot tartalmaz.

Ha ezeket az adatokat az egy hektáron termelhető ipari növény mennyiségével összevetjük (3. 2. táblázat), akkor nyilvánvalóvá válik a cukornád termelésére alkalmas éghajlattal rendelkező államok előnye.

	Termelhető alapanyag (t/ha)		Alkohol hozam (L/ha)	
	Átlagérték	maximális érték	Átlagérték	maximális érték
Cukornád	60	125	4.200	8.750
Cukorrépa	30	56	2.850	5.320
Nyárfa	15	30	2.700	5.400
Kukorica	5	7	1.850	2.590

3.2. táblázat: termőterületre vonatkozó értékek

Ez az előny fokozódik, ha a két alapanyagból nyert melléktermék a nádmelasz és a répamelasz fermentálhatóságát összehasonlítjuk. A cukornád melasz nagyobb cukor, biotin és foszfor tartalma előnyösen befolyásolja az alkoholtermelést.

Az alkoholgyártás egyik régi aspektusa, hogy a mezőgazdasági termelésben jelentkező hullámzásokat pufferként fogja fel. A keményítő tartalmú termékeket (gabonafélék,

burgonya) alkohollá alakítva értékállóan lehet tárolni. Eleinte a keményítő és glükóz gyártás hulladékát hasznosították, később maga a keményítő (a glükóz egységekből felépülő poliszacharid) jelentős része is alkoholként került a piacra. A keményítő monomerjeire bontása savas vagy enzimes hidrolízissel történhet.

A keményítő savas hidrolízise technikailag ugyan könnyen kivitelezhető, de közben az élesztősejt számára toxikus melléktermékek (levulinsav, 5-hidroxi-metil-furfurol, hangyasav) képződnek. A savkoncentráció optimalizálásával és a hőmérséklet megválasztásával javítani lehet a helyzeten, de világszerte mégis az enzimes hidrolízist alkalmazzák, részben az ipari felhasználású enzimek robbanásszerűen növekvő, biotechnológiai úton történő előállításának köszönhetően. Az alábbiakban a legfontosabb enzimeket jellemezzük.

α -amiláz (α -1,4-glukán-4-glukano hidroláz): random hidrolizálja a keményítő α -1,4 kötéseit, de az α -1,6 kötést, sőt az α -1,6 kötés szomszédságában levő α -1,4 kötést már nem. Ezért a reakció termékben jelentős mennyiségben fordulnak elő oligomerek. Az *Aspergillus oryzae* gomba által termelt enzim például keményítóből 4 % glükózt, 56 % maltózt, 28 % maltotriózt és egyéb oligoszacharidot tartalmazó maltóz szirupot készít.

β -amiláz (α -1,4-glukán maltohidroláz): a *Bacillus* baktérium nemzetségben előforduló enzim, amely a keményítő redukáló végéről kezdve maltóz egységeket hasít le. Nem bontja az α -1,6 kötések.

Glükoamiláz: Széles spektrumú, a poliszacharid nem redukáló végétől indulva az 1,3, 1,4 és 1,6 kötések bontja. Főleg gombákban (*Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* fajok) fordul elő. Keményítóből 97 % glükózt, 1,5 % maltózt és kevés egyéb oligoszacharidot tartalmazó elegyet készít. Az α -amiláz jelenléte gyorsítja a reakciót, fokozza az eljárás teljesítményét.

A fenti enzimek keveréke jó hatásfokkal, de az egyes növényfajokból származó keményítőt eltérő sebességgel bontja D-glükózig. A gabonakeményítő például könnyebben bontható, mint a burgonya keményítő. Sok helyen a kukoricát teljes egészében feldolgozzák; az így keletkező termékek (csíraolaj, áztatólé, keményítő, glükóz-szörp, izomeróz, stb.) árában jelentkező gazdasági haszon javítja az alkohol termelői árának alakulását.

Az etanol nagyipari előállításának energiaigénye: cukornádból 18 MJ kg⁻¹ etanol, kukoricából 19,4 MJ kg⁻¹ etanol. Az 1 tonna alapanyagból előállítható etanol mennyiségi viszonyait a 3. 3. táblázat mutatja.

Alapanyag	Előállított alkohol (liter/tonna)
Cukornád	70
Répagyökér	95
Melasz	280
Nyárfa	160
Burgonya	100
Kukorica	370

3.3. táblázat: alapanyagra vonatkozó értékek

Mint látható, a cukornádból nyert etanol 20 %-kal, a kukoricából nyert etanol 50 %-kal drágább, mint a cukoripari melléktermékből, a melaszból származó etanol. A melasz mennyiségét viszont a cukorgyárak (egyre csökkenő) kapacitása határozza meg, így nem meglepő, hogy az ipari szesztermelés tekintélyes hányada ma már a gabonafélék szénhidrát tartalmának hasznosításával történik. Az elmúlt három évtizedben a felhasználható melasz mennyisége folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott, ami a gabonafélék (elsősorban a kukorica) szeszipari alapanyagként történő alkalmazásának további előretörését eredményezte az USA-ban és Európában. A megtermelt gabona így egyre inkább alkoholként hasznosult, ami a XXI. század első éveiben világszerte súlyos zavarokhoz vezetett az élelmiszerpiacokon. Emiatt jegyzetünk írásának időpontjában (2012 vége) az élelmiszerek előállítását (termelői árát) közvetlenül nem befolyásoló ún. második generációs alapanyagok használata került előtérbe.

A XX. század végén kiterjedt kutatómunka indult a gabonafélék lignocellulóz tartalmának hasznosítása céljából. A növényi biomassza ugyanis évente megújuló, óriási mennyiségű energiaforrást jelent, potenciálisan tehát olcsóbb alapanyag a melasznál és a keményítőnél. Három fő komponense a cellulóz (átlagosan 45 %), a hemicellulóz (30 %) és a lignin (25 %).

A cellulóz β -(1,4)-glikozidos kötéssel kapcsolódó cellobióz egységek ismétlődése. Természetes körülmények között ligninnel, hemicellulózzal, keményítővel és fehérjékkel asszociálódva szoros illeszkedésben fordul elő, ezért csak egy bonyolult enzim komplex tudja bontani, mely az élesztőgombákból hiányzik. Kémiai úton erős savakkal hidrolizálható.

A hemicellulóz a cellulóznál könnyebben hidrolizálható, elágazó láncú, hexózokat, pentózokat és uronsavakat tartalmazó heteropolimer. A polimer növényfajokra jellemző arányban tartalmazza a felsorolt szénhidrátokat.

A lignin cinnamon savból képződő (lignolokat: transz-p-kumaril, transz-p-coniferil, transz-p-sinapyl) alkoholokat tartalmazó, aromás alkotórészekből felépülő fenolos karakterű polimer.

Ahhoz, hogy a lignocellulóz erjeszhető legyen, fel kell a monomerjeit szabadítani. Ennek két fő lépése: (a) fizikai vagy kémiai előkezelés a hemicellulóz monomerek felszabadítása céljából, (b) a glükóz monomerek felszabadítása cellulózból savas vagy enzimes hidrolízissel. A lignin monomerjeit egyetlen jelenleg ismert mikroorganizmus sem tudja bontani.

A szénhidrát alapú etanol termelésben alkalmazott *S. cerevisiae* nem képes erjeszteni a pentózokat. Néhány D-xilózt alkohollá fermentáló élesztőféléiről (*Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*) ugyan tudunk, de alkohol érzékenyséjük (40 g/L fölött növekedésük leáll), mikroaerofil voltak és savas pH-val szembeni érzékenyséjük miatt gyakorlati alkalmazhatóságuk kétséges. Élesztőkben a D-xilózt egy NADPH-igényes reduktáz alakítja xilitollá, amit egy NAD⁺-függő dehidrogenáz alakít xilulózzá. Prokariótákban (*E. coli*) egy izomeráz enzim végzi a xilóz-xilulóz átalakítást (ezt az aktivitást hasznosítják az izocukor gyártók). A képződő xilulóz egy kináz segítségével kerül a HMP-útra. Jelen ismereteink szerint természetből izolált „vad típusú” mikroorganizmus nem képes a lignocellulóz gazdasági haszonnal kecsegtető alkoholos erjesztésére. Ez volt az a pont, ahol előbb a hagyományos, mutagenézisen és szűrésen alapuló törzsfeljesztés, majd a rekombináns DNS technológia belépett az egyik legősibb biotechnológiai folyamat fejlesztésébe. A jelenlegi erőfeszítések három mikroba: a *Z. mobilis* és az *E. coli* baktériumok illetve a *S. cerevisiae* élesztő fejlesztésének irányába koncentrálnak.

3.4 ALKOHOLGYÁRTÁSHOZ KAPCSOLÓDÓ TÖRZSFEJLESZTÉSEK

A lignocellulóz alapanyagként történő hasznosítása tehát komoly kívánalmakat támaszt az alkoholt erjesztő mikroorganizmus felé. Az alábbiakban felsoroljuk a legfontosabb szempontokat.

- Széles szubsztrátum hasznosítási képesség.
- Magas etanol termelési képesség kihozatal és termelékenység szempontjából.

- Csekély mértékű melléktermék képződés.
- Magas etanol tűrés.
- Gátlószerekkel szembeni érzéketlenség, illetve nagy tűréshatár.
- Alacsony pH és magas hőmérséklet tűrése.
- A tenyészkörülmények hirtelen megváltozásával szembeni érzéketlenség.
- Szimultán cukorhasznosítás (ne érvényesüljön karbon katabolit repressziós hatás)
- Hemicellulóz és cellulóz hidrolizálási képesség.
- Ismételt felhasználhatóság (az enzimhordozó rögzített formában történő alkalmazhatósága)
- Minimális ráadagolandó tápanyag-igény.
- „Generally Regarded As Safe” (GRAS) státusz (USA FDA)

Mint említettük, a vad típusú *S. cerevisiae* élesztő pentózokat nem fermentál. A géntechnológia eddig három stratégiát próbált ki ennek megváltoztatására, ipari szempontból nézve összességében szerény eredménnyel.

A bakteriális eredetű (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Thermos thermophilus*) xilóz izomeráz élesztősejtbe történt beépítése semmilyen kedvező eredményt nem hozott. Ennek vélhető oka a gomba és a baktériumsejt biokémiai apparátusában fellelhető jelentős különbségek, ami miatt a fehérje érése nem volt tökéletes.

A *Pichia stipitis* élesztő xilóz reduktáz (XYL1) és xilitol dehidrogenáz (XYL2) gén beépítése *S. cerevisiae*-be is csalódást keltő eredményt hozott. 21,7 g xilózból mindössze 1,6 g etanol képződött literenként. A két gén túltermeltetése valamint kromoszómába integrálása sem hozott eredményt. Feltételezték, hogy a HMP-útvonal nem kielégítő aktivitása, s az ebből következő NADPH-hiány áll a probléma hátterében. A HMP-út (pentóz-foszfát ciklus) géneinek túltermeltetése valamelyest növelte a mutáns alkohol kihozatalát, azonban még mindig messze volt a gazdaságilag minimálisan elvárhatótól.

A *S. cerevisiae*-ből származó xilulóz kináz (XKS1) és a *P. stipitis*-ből származó XYL1 és XYL2 gének transzformálásával létrehozott *S. cerevisiae* 1400 pLNH32 törzs képes növekedni egyedüli szénforrásként xilózt tartalmazó táptalajon, alkoholt erjesztő kapacitása pedig az elméleti érték 66 %-át tette ki. Cukor elegyet tartalmazó táptalajon a határfok 90 %-ra fejlődött, viszont az L-arabinózt nem metabolizálta.

Egy másik *Saccharomyces* törzs (1400 pLNH33) több kópiában tartalmazta a fenti három gént. Glükózt és xilózt tartalmazó táptalajon jól növekedett. A gének kromoszómába integrálása a törzs stabilitást javította.

Fentiekből is következően az élesztővel történő alkoholgyártás jelenlegi „frontvonala” az L-arabinóz hasznosítás körül húzódik. Az L-arabinóz anyagcsere génjeit a *Candida aurigiensis*-ből, a xilóz transzporter gént pedig a *P. stipitis*-ből klónozva kísérelték meg növelni a *S. cerevisiae* pentóz hasznosítását. Nem véletlenül használnak gomba eredetű géneket: mára egyértelműen bebizonyosodott, hogy bakteriális lebontó gének nem, vagy csak minimális rátával fejeződnek ki a *S. cerevisiae* törzseiben.

Az élesztő mellett a *Z. mobilis* baktérium törzsfeljesztése is kiemelt figyelmet kapott. Mint korábban említettük, ez a mikroba az Entner-Doudoroff úton hasznosítja a glükózt; 1 mol glükózból 2 mól piruvát képződik, ami 1 csupán mol ATP létrejöttét eredményezi. Ez az alacsony energiatermelés felgyorsítja a metabolizmust. Emelkedik a glikolitikus út és az etanologén enzimek (piruvát dekarboxiláz és alkohol dehidrogenáz) szintje. Az etanol kihozatal eléri az elméleti érték 97 %-át. Ebben az esetben is a szubsztrátum hasznosítási spektrum szélesítése volt a törzsfeljesztés célja.

A xilóz hasznosítás növelése céljából a *Xanthomonas campestris* és a *Klebsiella pneumoniae* baktériumokból származó *xylA* gént a xylóz-izomeráz aktivitásnak a növelése érdekében és a *xylB* gént a xylulóz kináz megjelenítése céljából bejuttatták egy olyan *Z. mobilis* törzsbe, amely ennek előtte nem növekedett egyedüli szénforrásként xilózt tartalmazó táptalajon. A HMP-útvonal enzimeit azonban nem aktiválódottak.

A limitáció megszüntetése céljából *E. coli*-ből kísérelték meg átvinni a *xylA* (xilóz izomeráz) a *xylB* (xylulóz kináz), a *talA* (transzaldoláz) és a *tktA* (transzketoláz) géneket. Az így kapott rekombináns *Z. mobilis* törzsben mind a négy enzim aktivitása kimutatható volt. Egyedüli xylóz szénforráson a törzs az elméleti teljesítmény 86 %-át teljesítette. A szénhidrát elegyből a 95 %-os hatásokkal, savval hidrolizált kukoricaszáron 88 %-os hatásokkal képes alkoholt fermentálni. A transzformált gének kromoszómába integrálása a törzs stabilitását jelentősen fokozta.

Az L-arabinóz hasznosítás fokozása céljából 5 db *E. coli* gént juttattak egy *Z. mobilis* törzsbe. Csupán L-arabinózt tartalmazó táptalajon a törzs 98 %-ra közelítette meg az elméleti értéket, ami glükózt is tartalmazó táptalajon 84 %-ra csökkent. Valamennyi L-arabinóz visszamaradt a táptalajban, mivel a törzs a glükózt preferáltan hasznosította.

Egy másik mutánsba az L-arabinózt és D-xilózt hasznosító géneket, továbbá a HMP-útvonal génjeit transzformálták. Az így nyert *Z. mobilis* törzs D-xilózt és L-arabinózt is jól fermentált, a cukorkeveréket 82-84 %-os elméleti hatásfokkal alakította alkohollá.

A harmadik, alkohol gyártás szempontjából kiemelt jelentőségű mikroorganizmus, az *E. coli* széles szubsztrátum hasznosítási képessége jól ismert. Nem hagyható figyelmen kívül, hogy a többi *Enterobacter*-hez hasonlóan piruvátból etanolon és széndioxidon kívül jelentős mennyiségű egyéb savat (tejsav, acetát, formiát) is előállít. A *Z. mobilis*-ből származó etanologén gének, a *pdc* (piruvát decarboxiláz) és az *adhB* (acetaldehid dehidrogenáz) közös promoterral rendelkezve operonként (PET operon = production of ethanol) építhetők be a kiválasztott gazdába. Az így kapott *E. coli* mutáns alkoholt erjesztő teljesítményét fokozni lehet a szukcinát képződés visszaszorításával, amit az *frd* (fumarát dehidrogenáz) gén deléciójával vittek végbe. Hemicellulózból származó szénhidrátok elegyéből 90 % fölé lehetett emelni a mutáns törzs alkohol kihazatalát.

Az *E. coli* alkoholos erjesztésénél jelentős fejlesztési lehetőség a glicerinné képződés csökkentése is. Glicerinné akkor keletkezik, ha az alkohol-dehidrogenáz helyett az α -glicerinfoszfát-dehidrogenáz enzim regenerálja a redukált kofaktorokat. Az alkohol-dehidrogenáz leállását az okozza, ha a reakciótermékét – az acetaldehidet – keletkezése pillanatában nátrium-szulfittal reagáltatjuk. Ekkor az EMP-úton képződött NADH a dihidroxiaceton-foszfát redukációjára használódik fel. A képződő α -glicerinfoszfátot végül egy foszfatáz alakítja glicerinné. A glicerinné képződésében részt vevő enzimeket kódoló gének deléciójával 40 %-al csökkentették a keletkezett glicerinné mennyiségét és 8 %-al növelték az alkohol mennyiségét. Meg kell azonban jegyezni, hogy a tenyészet növekedési rátája is jelentősen (~ 45 %) visszaesett.

3.4.1 Az etanol tűrés javítása

Az alkohol-érzékenység a membrán lipid tartalmának összetételétől függ. Az ipari gyakorlatban használt *S. cerevisiae* szterol tartalmú membránja 21 % (w/v) etanolt képes eltűrni. A *Z. mobilis* cisz-vaccén-savban gazdag és hopanoidot tartalmazó foszfolipid membránja 12 % etanolt visel el károsodás nélkül. A tűrőképesség nem szűkíthető a fizikai-kémiai paraméterek által kiváltott hatásra. Nem hagyható figyelmen kívül a membránban levő, fontos biológiai szerepet betöltő fehérjék (ATP-áz, szuperoxid dizmutáz, trehalóz szintáz) hatása sem. Ezeknek az aktív működését a jelenlevő etanol különböző mértékben

zavarja, azaz bonyolult módon befolyásolja az etanol tűrés számszerű értékét. Az *E. coli* alkohol tűrését random mutációval növelni lehetett; egy mutáns D-xilózból az elméleti alkohol kihozatal 85 %-át érte el, ami 60 g/L alkoholkoncentrációt (7.5 % v/v) jelentett.

3.4.2 Inhibitorokkal szembeni érzékenység csökkentése

A lignocellulóz monomerekre hidrolizálása magas hőmérsékletet és gyakran kemikáliák jelenlétét igénylő folyamat. Ilyen körülmények között nehezen kontrollálható kémiai reakciók mennek végbe, melyek végtermékei károsak lehetnek az alkoholt termelő mikroorganizmusra. Pentózok degradációja során furfural, hexózok lebontása során hidroximetil-furfural keletkezhet. Az előkezelés során ecetsav és hangyasav szabadulhat fel. A lignin degradációja aldehideket, savakat, lignolokat és egyéb aromás alkoholokat eredményezhet. A káros anyagok hatása sokszor szinergikusan jelentkezik, vagyis együttes hatásuk rosszabb a mikroba szempontjából, mint az egyes inhibitorok hatásainak összege. Az egyik legfontosabb inhibitor a furfural, mely a glikolízis enzimeit gátolja. Hatásának csökkentése technológiai úton történik: furfuril alkohollá redukálva kevésbé káros hatású.

A többi inhibitor hatásának leküzdésére a termelő mikroba fejlesztése maradt a leginkább járható út. A hagyományos adaptációs-szelekciós technika, és a modern géntechnológia egyaránt alkalmazásra került egyik vagy másik inhibitor ellen. A *S. cerevisiae* élesztő furfural érzékenységét hosszas adaptációs eljárással a többszörösére lehetett fokozni. Hasonlóképpen lehetett fokozni a *Z. mobilis* ecetsav tűrését.

Géntechnológiai úton eddig csak a *S. cerevisiae* inhibitor-tűrését sikerült fokozni. Lakkáz génnel transzformált élesztősejtek semleges anyaggá tudták redukálni a koniferil aldehidet, míg a fenilakrilsav dekarboxiláz gén overexpressziója aromás savakkal szembeni toleranciát eredményezett.

3.4.3 Hőmérséklet-tűrés

Az alkoholos erjesztés exoterm folyamat, ezért a fermentorokat – jelentős költséggel – hűteni kell. Egy *Z. mobilis* törzs ezzel szemben ezt nem igényli. Még érdekesebb, hogy ez a törzs egyben alkohol és ozmo-toleráns is egyben. A közelmúltban sikerült azonosítani egy regulátor gént, melyet egymástól eltérő stresszhatások képesek indukálni.

A hőmérséklet-tűrés fokozása a tenyészet általános fiziológiai érzékenységgel függ össze. Az alkohol gyártása nagy térfogatú fermentorokban megy végbe, ahol lokálisan az optimálishoz képest jelentős eltérések lehetnek a kémhatás, a tápanyag koncentráció, a

hőmérséklet, az oldott oxigén szint értékeiben. Üzemzavarok is valós valószínűséggel következnek be. Az ilyen, nehezen számszerűsíthető hatásokkal szembeni ellenálló képesség is fontos szempont a törzsselekción során.

3.4.4 Monomerek egyidejű felvétele

Ideális esetben egy tenyészet az összes tápközegben jelenlévő hexózt és pentózt párhuzamosan transzportálja és alakítja át alkohollá. A valóságban a mikróbák preferáltan hasznosítják a szénforrásokat. A szénváz lebontásának szabályozásakor a legfontosabb szempont az időegység alatt felszabadítható nettó energia mennyisége: a sejt a leggyorsabban hasznosuló szénforrást fogja felvenni és oxidálni, a lassabban hasznosulók lebontásához szükséges enzimek szintézise pedig gátolódik. A jelenséget karbon katabolit szabályozásnak (represszió) nevezzük; szigorúan transzkripciós szintű folyamat. Jellemzően (de nem kizárólag) a glükózzal lehet kiváltani.

Az élesztőkben a karbon repressziót közvetítő *Mig1* gén deléciója esetén a szacharóz hidrolízise (vagyis az invertáz enzim képződése) közel tízszeresre nőtt glükóz jelenlétében a vad típushoz képest, a D-galaktóz felvétel pedig párhuzamosan ment végbe a D-glükóz transzporttal.

3.4.5 Cellulóz/hemicellulóz hidrolízis a termelő mikróbával

Az élesztősejt nem képes cellulózt illetve hemicellulózt hasznosítani, de a *Trichoderma reesei* gomba β -glükozidáz génjével transzformált *S. cerevisiae* kis hatásfokkal ugyan, de alkohollá erjesztette a cellulózt. A legnagyobb sikert ezen a területen azonban egy eddig nem tárgyalt mikróbával, a *Klebsiella oxytoca* baktériummal érték el. Egy rekombináns *K. oxytoca* törzs, melybe a PET-operont transzformálták képes volt alkoholt erjeszteni egy sor cukorból, valamint di-, tri-, és tetraszacharidból is. A tápközeghez cellulázt adagolva a tenyészet 70 %-os elméleti hatásfokkal volt képes cellulózból etanolt termelni.

Az alkoholgyártás egyik fontos célkitűzése a szimultán elcukrosítás (hidrolízis) és fermentáció (SSF) ipari léptékű megvalósítása. Az ebből származó előnyök – pl. a csökkentett számú műveleti lépés és rövidebb fermentációs idő – gazdaságosabb bioetanol termelést tesznek lehetővé. Az SSF technológia a hidrolízist és az etanol fermentációt úgy kombinálhatja, hogy a glükóz koncentrációja alacsonyan maradjon. Mivel a felhalmozódó etanol nem gátolja annyira a celluláz enzimszisztéma működését, mint amennyire a magas

glükóz koncentráció gátolja az etanol termelését, így az SSF lehetőséget teremt a cellulózból történő etanol gyártás teljes konverziójának növelésére.

4 Szerves savak mikrobiális előállítása

4.1 BEVEZETÉS

A mikrobiális (fermentációs) úton előállított egy- illetve többértékű szerves savak (karbonsavak) az ipari biotechnológia legrégebb, mennyiségileg legjelentősebb tömegtermékei közé tartoznak (4. 1. táblázat).

Szerves sav	Éves termelés (t)	Termelő fajok
citromsav	1.600.000	<i>Aspergillus niger</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
glükonsav	80.000	<i>Aspergillus niger</i> <i>Gluconobacter suboxydans</i>
itakonsav	15.000	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus itaconicus</i>
tejsav	50.000	<i>Lactobacillus sps.</i> <i>Lactococcus sps.</i>

4.1. táblázat: karbonsavak

Az anyagcsere során valamennyi élőlény összes sejtípusában keletkeznek szerves savak, melyek jellemzően továbbalakulnak, meghatározott élettani illetve környezeti körülmények mellett viszont felhalmozódhatnak, majd kiválasztódnak. A szerves savak így a sejtek (technológiai) környezetében dúsulnak fel, akár mólos koncentráció értékig.

Szerves savak felhalmozására prokarióta és eukarióta szervezetek egyaránt képesek. Anaerob baktériumokban a szerves savak keletkezése szorosan összefügg a növekedéssel, mivel a szénváz lebontása során keletkező redukált kofaktorok (NADH) kisméretű szerves molekulák redukálása révén regenerálódnak (pl. tejsav, propionsav, vajsav keletkezése). Aerob baktériumokban és gombákban ezzel szemben a karbonsavak felhalmozódása a szénforrás lebontásának tökéletlensége miatt megy végbe (az oxidációs folyamat mintegy „megakad”), emiatt a növekedéshez csak közvetetten kapcsolódik.

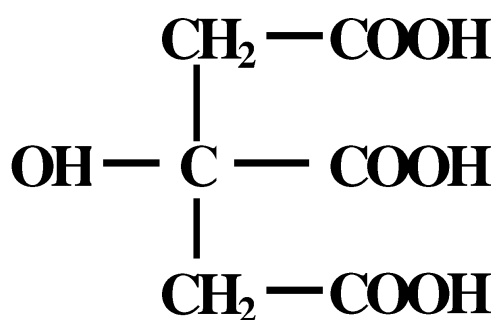
A szerves savak felhasználása sokrétű. Legrégibb, és máig leggyakoribb alkalmazásuk az élelmiszeriparhoz kötődik (ízesítő-és tartósítószer), de természetes kémiai tulajdonságaik és környezetbarát jellegük miatt számos speciális probléma megoldásánál is használják őket

(lásd később, az egyes karbonsavak áttekintésénél). Minden szempontból (elméleti ismeretek szintje, technológiai fejlettség, előállított mennyiség, világpiaci érték) a **citromsav** számít legfontosabb képviselőjüknek.

4.2 A CITROMSAV MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

4.2.1 Történeti áttekintés

A citromsavat (2-hidroxi-propán-1,2,3-trikarbonsav; 4. 1. ábra) kristályos formában először Scheele svéd kémikus állította elő 1784-ban, éretlen citrom terméséből, mely 6-8 % citromsavat is tartalmazhat.



4.1. ábra: citromsav

A gyümölcsből őrléssel vizes szuszpenziót készített, az oldathoz (oltott mész formájában) kalcium ionokat juttatott, az így keletkező kalcium-citrát csapadékot leszűrte, majd kénsavval szabadította fel belőle a szabad savat. A citromsav első kereskedelmi célú előállítása (Anglia, 1860) ugyanezen az elven történt, Szicíliaából importált gyümölcsöt használva alapanyagként. A technológiát hamarosan a többi fejlett európai ország, illetve az USA is átvette, a fejlődést azonban behatárolta a citrom beszerzési ára, melyet egy itáliai kartell hatékonyan ellenőrzött. A kémiai szintézis alacsony hozama miatt nem volt életképes alternatíva, így új, citrom-független biotechnológiai eljárást kellett keresni.

A citromsav – a citromsav-ciklus névadó molekulájaként – szinte minden élő sejtben előfordul. Wehmer osztrák vegyész ugyan már 1893-ban felfedezte, hogy egyes penészgomba fajok képesek a tenyésztésükbe szerves savakat, köztük citromsavat is kiválasztani, a gyakorlati jelentőséget azonban nem tudta kiaknázni. Az első mikrobiális citromsavgyártási szabadalom az amerikai Zahorski (1913), az első fermentációs technológia a szintén amerikai Currie (1923) nevéhez fűződik. Ebben az *Aspergillus niger* penészgomba tenyésztését alkalmazták (a mai napig ez a faj termeli a világon felhasznált citromsav óriási többségét). A micélium-tömeget sekély (10-15 cm), nagy felületű, cukrok és szervesen sók vizes oldatát tartalmazó tálcákon növesztették (felszíni technológia); a steril levegőt (mely oxigén ellátási

és hűtési célokat is szolgál) a tálcák fölött fűjják át. Az eljárást számos ország átvette, és évtizedekig alkalmazta; noha fokozottan munkaigényes, a világ fejletlenebb területein máig fennmaradt technológiai egyszerűsége és olcsósága miatt.

A következő jelentős lépés – a penicillin gyártás eredményeinek nyomdokán haladva – a süllyesztett fermentációs technológia kidolgozása volt 1952-ben. A technológia alapját azon felismerések jelentették, melyek alapvető kapcsolatokat állapítottak meg egyes tápanyag-komponensek (pl. foszfát, nyomelemek – vas, mangán) mennyisége és a citromsav kihozatal között. Az amerikai kutatók (pl. Martin, Perquin, Johnson, Cleland) felfedezésein alapuló technológiákat a nyugat-európai országok, Izrael és Japán is átvette.

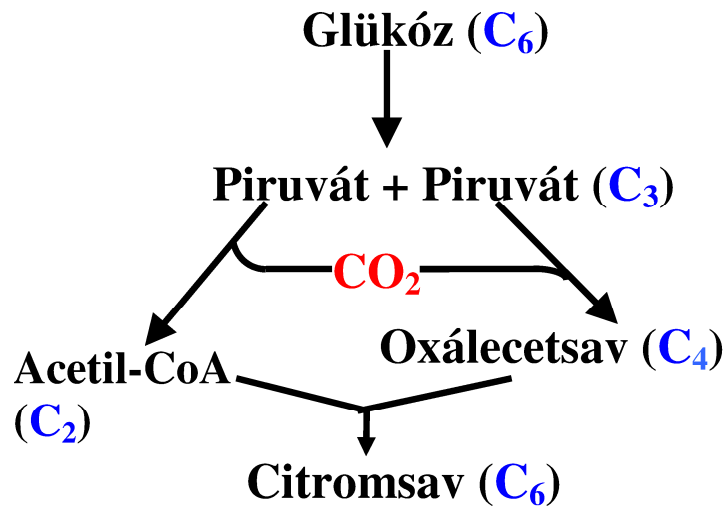
Ma a citromsav gyártás fő fejlődési irányát az alapanyagok árának csökkentése jelenti, ennek megfelelően számos mezőgazdasági hulladék jellegű szénforrás (alma-és szőlőtörköly, sárgarépa-, narancs-, kávé- és ananász maradvány, a szentjánoskenyérfa termésének hüvelye, stb.) alkalmazásáról jelent meg híradás. Az 1973-as olajválságig több élesztőfaj (pl. *Candida lipolytica*) az *A. niger* potenciális alternatívájának tűnt, mivel ezek a technológiák az addig olcsó kőolajat használták szénforrásként, a mai szénhidrogén-árak mellett azonban már nem gazdaságosak. Jelenleg a világon évente mintegy 1.6 millió tonna citromsavat állítanak elő, melynek piaci értéke meghaladja a 2 milliárd US \$-t. Ma már a világ termelési kapacitásának többsége kínai kézben van; Kína után az USA és az EU a két legjelentősebb termelő. A tengerentúli konkurencia miatt az európai és izraeli gyártók szövetségbe tömörülve (ECAMA – the European Citric Acid Manufacturers Association – lásd <http://www.ecama.org/>) védik piacaikat.

4.2.2 A citromsav keletkezésének biokémiája

A kereskedelmi forgalomba kerülő citromsav túlnyomó többségét az *A. niger* fonalas tömlősgomba (*Ascomycetes*) révén állítják elő. Az *Ascomycetes*-ek gyakran, az *Aspergillus* nemzetség tagjai pedig jellemzően alkalmasak a szerves savak túltermelésére. Ennek oka, hogy ezek a fajok jól tolerálják a tápközeg savas kémhatását; pH 3 és 5 közötti értékeken is képesek növekedni, de elviselik az extrém savas (pH 1.5) közeget is. A szerves savak túltermelése és tápközegbe történő kiválasztása tehát szelekciós előnnyel járhat rájuk nézve.

Az *Aspergillus* fajok karbonsav termelése stimulálható, vagyis a termék-kihozatal törzs- és/vagy technológia fejlesztés révén annyira növelhető, hogy pl. a szénforrás-citromsav konverzió ma már csaknem kvantitatív (több, mint 90 % technológiai körülmények között).

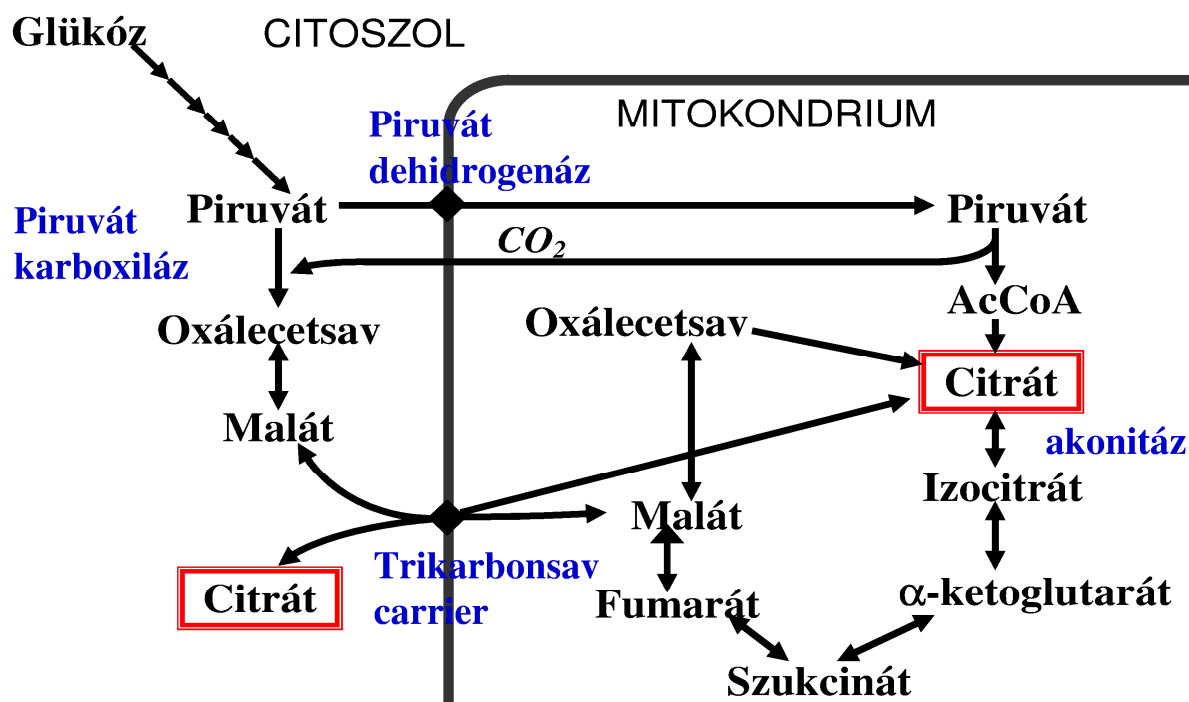
A citromsav keletkezésének első biokémiai útvonala a glikolízis, melynek során 1 mól glükózból 2 mól piruvát jön létre. Ezt követően a két piruvátból a citromsav előanyagai, oxálecetsav és acetyl-CoA keletkeznek. A folyamat központi lépése a **Cleland-Johnson reakció**, vagyis a piruvát \rightarrow acetyl-CoA átalakulás során felszabaduló szén-dioxid megkötése a másik piruvát molekulán, ezáltal pedig az oxálecetsav létrejötte (4. 2. ábra).



4.2. ábra: Cleland-Johnson reakció

A reakció jelentősége nyilvánvaló: ha a citromsav keletkezéséhez szükséges oxálecetsav csak a citromsav-ciklus során jöhetne létre, minden mól oxálecetsav (és citromsav) szintézise 2 mól szén-dioxid keletkezésével járna, vagyis egy hat szénatomos hexóz (pl. glükóz) egyharmada szén-dioxid formájában elveszne. Ez azt jelentené, hogy az elméleti hozam sem haladhatná meg a 66 %-ot. Mivel a tényleges hozamok ennél lényegesen magasabbak (~ 90 %), egy anaplerotikus (feltöltő) reakció meglétét már *de facto* leírása előtt is sejtették.

A szén-dioxid anaplerotikus megkötését a **piruvát karboxiláz** enzim katalizálja. Az enzim eukariótákban jellemzően a mitokondriumban található, de *A. niger*-ben mitokondriális és citoszolikus formája is létezik. Az utóbbi működése miatt az anaplerotikus szén-dioxid megkötés (vagyis az oxálecetsav kialakulás) nagyrészt a citoszolban megy végbe. Az oxálecetsav a szintén citoszolikus malát dehidrogenáz enzim jóvoltából maláttá (almasav) alakul tovább. A reakció NADH-igényét a glikolízis fedezi (ezzel regenerálva a glikolízis során redukálódott kofaktort, és tehermentesítve a légzési láncot). *A. niger*-ben a glikolízis végterméke tehát nem piruvát, hanem **malát** (4. 3. ábra).



4.3. ábra: A trikarbonsav carrier

A citromsav egy biokémiai körfolyamat köztes vegyülete, így logikusnak tűnt, hogy felhalmozódása a továbbalakulás gátlása miatt következik be. A valóságban azonban a citromsav-ciklus összes génje és a róluk átíródó enzimek is hibátlanul működnek túltermelő körülmények között *A. niger*-ben. A felhalmozódást ugyanis más mechanizmus okozza: a legtöbb eukarióta sejt mitokondriumának belső membránjában megtalálható egy trikarbonsav-carrier enzim, mely forgókapuként működik a mitokondrium mátrix és a citoszol között. Működéséhez egy citoszolikus, szerves elleniont (pl. szerves savat) igényel viszonylag magas koncentrációban, emiatt élettani körülmények között tipikusan inaktív. *A. niger*-ben azonban a trikarbonsav carrier ellenionja éppen az a malát, ami glikolitikus végtermék gyanánt feldúsul a citoszolban. A citoszolikus malát felhalmozódás következményeként a trikarbonsav carrier aktiválódik, és mivel affinitása a citrát iránt egy nagyságrenddel nagyobb az aconitáz enziménél (mely a citrát-izocitrát átalakulást katalizálja), gyakorlatilag kiszivattyúzza a citromsavat a mitokondriumból a citoszolba. Mivel a citromsav-ciklus enzimikus lépései jellemzően kis szabadentalpia-változással járnak, a reakciók élettani körülmények között is reverzibilisek. Ennek következtében a ciklus köztesei – melyek az aminosav és nukleotid anyagcserében fontos intermedierek – redukzív úton (a ciklusban visszafelé haladva) is létrejöhetnek, vagyis a gombasejt általános anyagcseréje nem sérül (4. 3. ábra).

A citromsav túltermelés következő biokémiai lépése a citrát exportja a citoszolból. Az intracelluláris koncentráció nem lehet több néhány mM-nál, míg a fermentációs tápközegben a végső koncentráció az 1 M-t is meghaladhatja. Ennek megfelelően a citromsav exportja

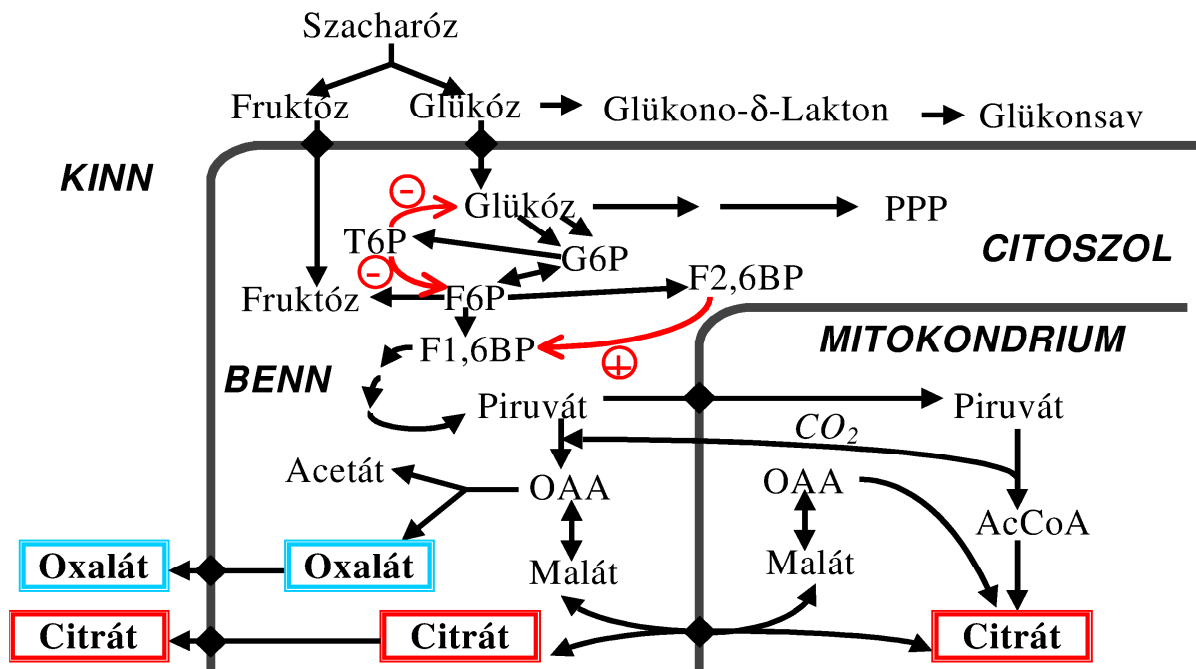
ATP-függő, energiaigényes folyamat. A helyzetet bonyolítja, hogy az *A. niger* a citromsavat szénforrásként hasznosítani tudja, tehát rendelkezik citrát-permeáz enzimekkel. Ezek szubsztrátuma azonban kizárólag a Mn^{2+} ionnal kelált citrát, így Mn^{2+} ion hiányában a citrát permeáz működése egyirányúvá (export) válik. Nem meglepő, hogy az ipari fermentációs technológiák egyik közös és meghatározó eleme a táptalaj teljes Mn^{2+} ion mentessége.

4.2.3 A citromsav gyártás technológiai követelményei

Standard laboratóriumi körülmények között a legjobban termelő *A. niger* törzsek sem képesek citromsavat felhalmozni a táptalajban. A túltermeléshez ugyanis számos speciális technológiai feltételnek kell egyidejűleg teljesülnie.

Az egyik legfontosabb paraméter a szénforrás minősége és mennyisége. Kizárólag gyorsan metabolizálódó szénforrások (glükóz, szacharóz, maltóz, illetve ezeket tartalmazó alapanyagok) alkalmazhatók, és belőlük is sok (~ 10 %) szükséges; 100 g/L koncentráció alatt a termelés visszaesik. Ennek oka egy alacsony affinitású glükóz permeáz enzim, mely csak magas (külső) szubsztrátum koncentráció esetén működik, olyankor azonban „elárasztja” a sejtet glükózzal. Ezzel egyrészt ellensúlyozza a hexokináz enzimre ható, trehalóz-6-foszfát által közvetített gátló hatást, másrészt megnöveli a foszfo-fruktokináz enzimet stimuláló fruktóz 2,6 biszfoszfát molekula intracelluláris koncentrációját, fokozva ezzel a glikolitikus fluxust. A citromsav bioszintézis köztesei így megnövekedett rátával jönnek létre.

A gombatenyészet **kémhatása** szintén meghatározó paraméter; pH 2.5 alatt citromsav nem halmozódik fel. A citromsav három savi disszociációs állandója rendre $pK = 3.1, 4.7$ és 6.4 , ezért puffer-hatású anyagok hiányában a citromsav vizes oldata erősen savas (pH 1.8). Mivel azonban a tápközeg egyes komplex komponensei (pl. cukorrépa-melasz) jelentős mennyiségű aminosavat (pl. glutaminsav) tartalmaznak, pufferhatásuk pH 4-5 között jelentős lehet, emiatt a kívánatos pH 2 körüli érték az ideálisnál lassabban áll be. A savas kémhatás megakadályozza más, melléktermék-jellegű szerves savak (oxálsav, glükonsav) keletkezését (4. 4. ábra).

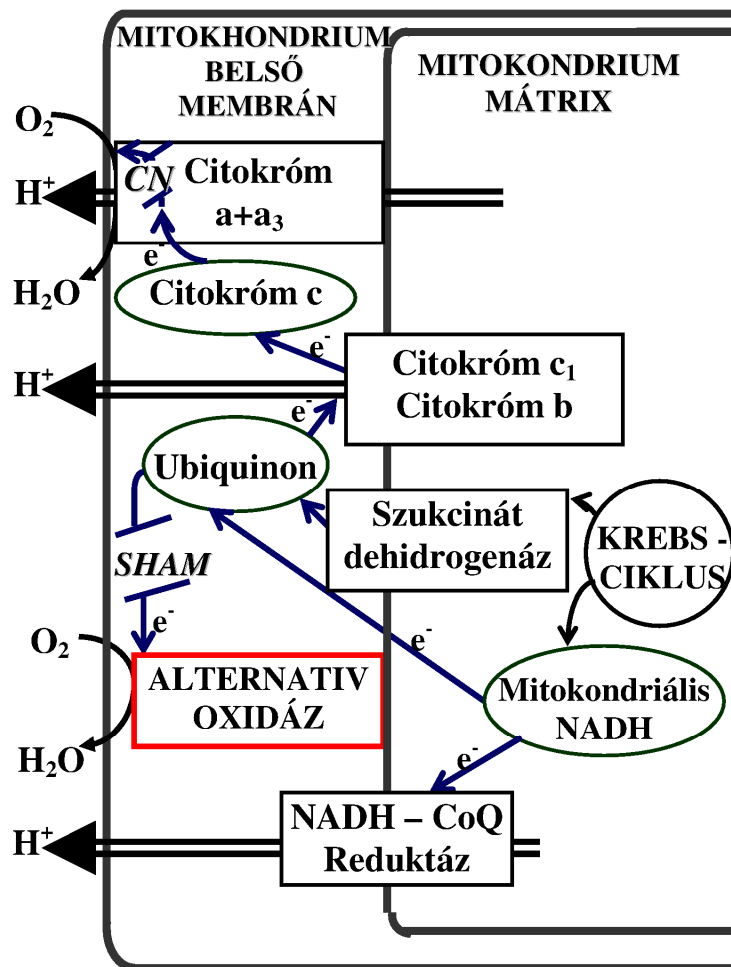


4.4. ábra: szerves savak szintézise gombákban

A glükonsav az extracelluláris glükóz-oxidáz enzim működése révén keletkezik; mivel a magas glükóz koncentráció illetve oldott oxigénszint fokozza működését, a fermentáció első szakaszában elkerülhetetlen veszteséget okoz, pH 3.5 alatt azonban – extracelluláris volta miatt – inaktiválódik. Az oxálsav a fermentáció elején, pH 6 körüli értéken keletkezik az oxálecetsav hidrolízise következtében. Mindkét problémára géntechnológiai úton (a glükóz oxidáz és az oxálecetsav hidroláz enzimeket kódoló gének kiütésével) keresnek megoldást.

Az erősen savas külső kémhatás fenntartása energetikai okok miatt is fontos: termelő körülmények között a szénváz lebontás során 1 mól ATP + 3 mól NADH keletkezik 1 mól glükózból. A NADH-regenerálást a légzési lánc alternatív útja (lásd lentebb) elvégzi, de az ATP felhasználására – bioszintetikus folyamatok hiányában – a sejt csak korlátozottan képes. A sejtmembránban található ATP-áz enzim, melynek feladata a citoszol közel semleges kémhatásának fenntartása, az erősen savas külső kémhatás mellett fokozott működésre kényszerül, így a lebontó anyagcserét mentesíti a felhalmozódó ATP gátló hatása alól.

Az **oldott oxigén** szintet a citromsav fermentáció során jóval magasabb értéken kell tartani, mint amit a gombatenyészet növekedése önmagában indokolna. Ennek oka a cianid-rezisztens, szalicilsav-hidroxiámát érzékeny alternatív terminális oxidázt (AOX) kódoló gén indukciójának szükségességében rejlik (4. 5. ábra); az AOX ugyanis ATP keletkezése nélkül tudja regenerálni (oxidálni) a glikolízis során létrejövő redukált kofaktorokat (NADH).



4.5. ábra: Az alternatív oxidáz

A sejt ATP-hozama ezáltal lecsökken, ami a lebontó anyagcsere ATP-gátlás alóli felszabadulását vonja maga után.

Az AOX-on keresztül történő elektron áramlás szabadentalpia változása tehát nem az ATP molekula kémiai kötéseinek kialakulására, hanem hőtermelésre fordítódik. A citromsav fermentáció ezért komoly hőképződéssel jár együtt; ennek elvezetése (a fermentorok hűtése) a gyártási folyamat költségeinek tekintélyes részét teszi ki. Nem véletlen, hogy a citromsav gyárakat természetes vizek közelébe szokták telepíteni.

A **fémionok** minősége és mennyisége a fermentáció tápfolyadékában szintén kritikus szempont a citromsav gyártás során. Az *A. niger* gomba ugyanazon fémionokat (Fe, Zn, Mn, Cu, Co) igényli növekedéséhez, mint más mikroorganizmusok, de a citromsav túltermeléshez néhányának (Fe^{3+} , Zn^{2+}) csak szuboptimális koncentrációban, míg a Mn^{2+} -nak gyakorlatilag egyáltalán nem szabad jelen lenni a tápközegben (2 $\mu\text{g/L}$ [2 ppb] Mn^{2+} kb. 20 %-al csökkenti a citromsav kihozatalt minden egyéb technológiai paraméter optimális értéke mellett!). Mivel ilyen kis mennyiség a komplex szénforrás révén is bekerülhet a tápközegbe, sterilizés előtt a tápközeget fémion-mentesíteni kell. Ez történhet kationcserével (glükóz szirup szénforrás

használatakor), vagy ferrocianidos kicsapással (cukornád/cukorrépa melasz alkalmazásakor). Alternatív megoldásként alkalmazzák a Cu^{2+} ion adagolást, ami gátolja az *A. niger* Mn^{2+} felvételét, így a fermentációs folyamat magasabb Mn^{2+} koncentrációt is elvisel.

A Mn^{2+} ion hiányának hatása sokrétű. A legfontosabb a citromsav sejtmembránon keresztüli transzportjának egyirányúsítása, de ezen túl a Mn^{2+} hiány a dezoxiribonukleotid-reduktáz enzim aktivitásának csökkentésén keresztül gátolja a DNS-szintézist is, ami csökkent fehérje-szintézishez, ez pedig megemelkedett szabad intracelluláris NH_4^+ szinthez vezet. Az NH_4^+ pedig fokozza a foszfo-fruktokináz enzim, azon keresztül pedig a teljes glikolitikus út aktivitását, ami a citromsav túltermelés egyik feltétele. Végezetül, Mn^{2+} ion hiányában a legtöbb fonalas gomba, így az *A. niger* is erősen vakuolizált, lekerekedett, élesztőszerű morfológiát vesz fel; az ilyen tenyészet fermentlevének reológiai tulajdonságai a kevertetés illetve levegőztetés szempontjából kedvezőbbek a micéliális morfológiához képest.

A további táptalaj komponensek közül kiemelendő a **foszfor** és a **nitrogén** szerepe. Nitrogénforrásként szinte minden nitrogén tartalmú vegyület (ammónia, nitrát, urea) megfelel, amíg nem növelik a táptalaj kémhatását. Cukorrépa melasz szénforrás alkalmazása esetén külön nitrogénforrásra nincs szükség; más szénforrások esetén a nitrogén mennyisége az optimális alatt marad, lassítva ezzel a növekedést. Ugyanez mondható el a foszforról, ami foszfát formájában kerül be a tápközegbe: a gyorsan hasznosuló, nagy mennyiségű szénforrás jelenlétében a túlzott biomassza képződést a többi elsődleges biogén elem mennyiségének szuboptimális értéken tartásával érik el.

4.2.4 A termelő törzsek kialakítása

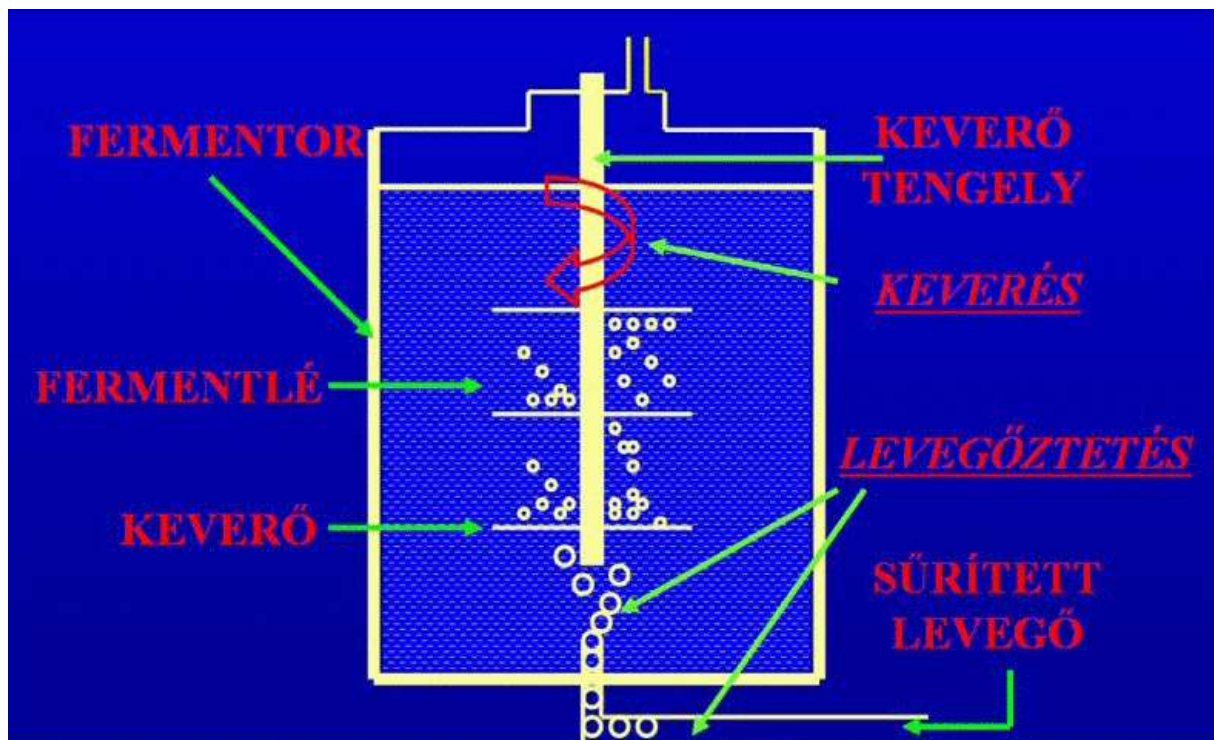
A citromsav termelő ipari törzsek kivétel nélkül hosszas törzsfeljesztés eredményeként jöttek létre; vad típusú *A. niger* törzsek maximum 20 %-os cukor-citromsav konverzióra képesek. A törzsfeljesztő stratégiák célja lehet a nem-hidrolizált poliszacharidokon (pl. keményítő) történő termelés, a keletkező melléktermékek (pl. glükonsav, poliszacharidok, oxálsav) mennyiségének csökkentése, valamint a gyártási folyamat fémionokkal szembeni érzékenységének illetve az oldott oxigén iránti fokozott igényének csökkentése. A törzsfeljesztés eddigi eredményei a hagyományos módszerek (UV, γ -, és röntgen-besugárzás, mutagén kezelések) alkalmazásán alapult. A szelekciót kis térfogatú lombikokban, Petri-csészén, újabban automatizált mikrotiter plate technológiával végzik. A különböző törzsek kedvező tulajdonságai protoplaszt fúzió révén egyesíthetők.

A rekombináns DNS technológián alapuló törzsfejlesztés eredményeiről kevés információ látott napvilágot, noha az *A. niger* genom szekvenciája már 2002 óta ismert (> 13.000 gén, mintegy 34.5 millió bázispár), melynek eredményeként több microarray rendszert is létrehoztak. Egyes gének túltermeltetése illetve deléciója a referencia törzsekhez képest, laboratóriumi léptékben megnövelte a citromsav kihozatalát, de rekombináns gombatörzsek termelői léptékben történő alkalmazása egy alapvetően élelmiszeripari termék esetében számos országban nem engedélyezett, s ez behatárolja az ilyen irányú fejlesztéseket.

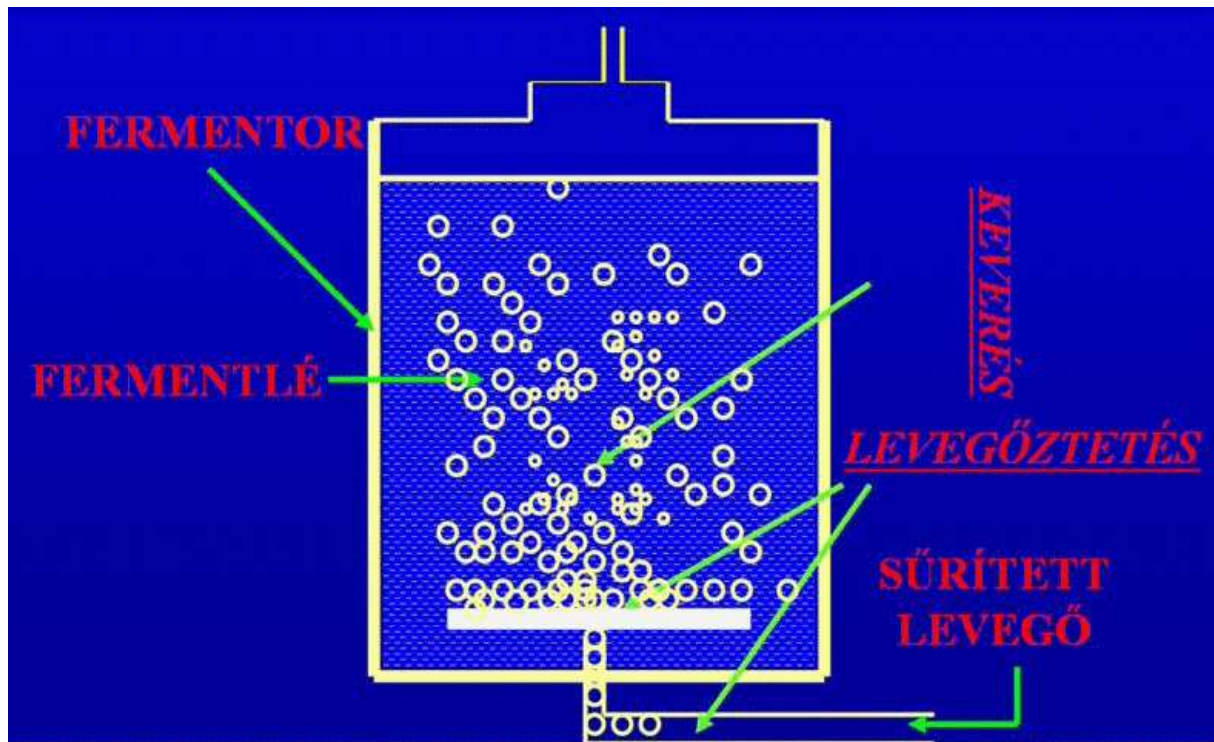
4.2.5 A citromsav gyártási folyamata

Mint említettük, alapvetően kétféle – felszíni és süllyesztett – technológiával történik a citromsav előállítás; harmadikként a Távols-Keleten elterjedt, szilárd fázisú fermentáció („koji”) említhető még (Japánban az összes citromsav ötödét ezzel a tradicionális módszerrel állítják elő). Noha a felszíni technológiát is sokfelé alkalmazzák még, nagyobb hatékonysága miatt csak a süllyesztett, szakaszos (batch) technológiát fogjuk tárgyalni.

A süllyesztett technológia központi egysége a fermentor, mely kétféle: kevert tankreaktor (4. 6. ábra) illetve buborékoltatott oszlopreaktor lehet (4. 7. ábra).



4.6. ábra: Kevert tankreaktor



4.7. ábra: Buborékoltatott oszlopreaktor

A fermentor fala nagy tisztaságú saválló acélból készül, megelőzendő a fémionok oldatba kerülését. A levegőztető és a hűtő kapacitásnak masszívnak kell lennie. Az erőteljes levegőztetés és a komplex táptalaj-komponensek miatt jelentős a habképződés, amit habzágátlókkal és mechanikus habtörővel csökkentenek.

Az inokulum mérete 10-20 % (v/v) közé esik, ezáltal az *A. niger* tenyészet hamar növekedésnek indul. Egy tipikus citromsav fermentáció során (140 g/L kiindulási szacharóz koncentráció mellett) 110-115 g/L citromsavat és 10-12 g/L száraz tömegű biomasszát állítanak elő 10-12 nap alatt. Törzstől függően a hőmérsékletet 30-35 °C között tartják.

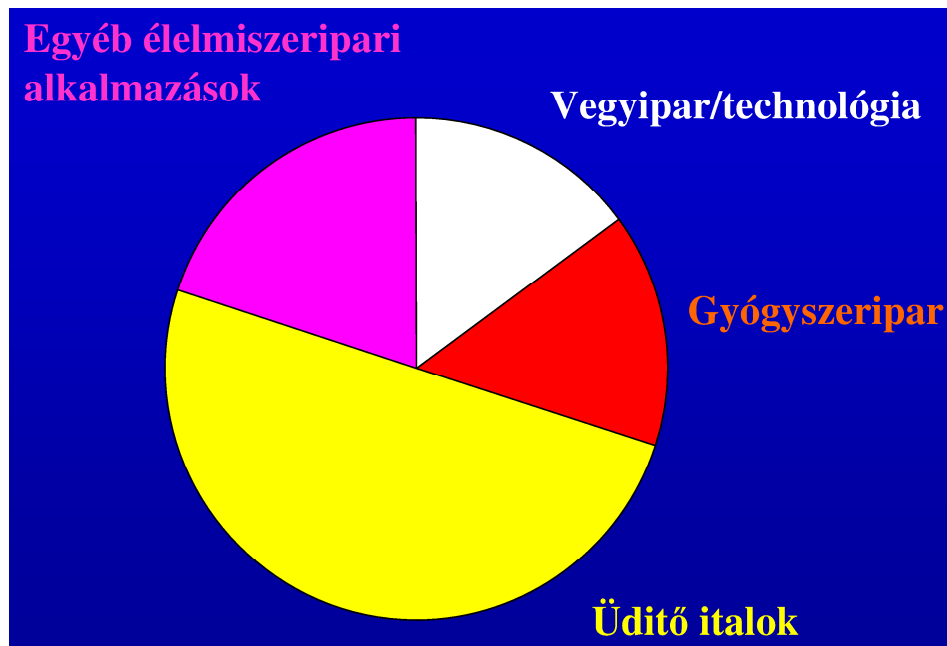
Noha a süllyesztett fermentációs technológia folytonos illetve immobilizált változatát is kifejlesztették, ipari léptékben egyik sem versenyképes a batch tenyésztéssel.

A citromsav kinyerése a fermentléből a szűréssel és a micélium mosásával kezdődik (a gombasejtek fala jelentős mennyiségű feltapadt citromsavat tartalmazhat), majd a sejtmentes fermentléből a citromsavat **kicsapással**, vagy oldószeres **extrakcióval** nyerik ki. Az előbbi esetben a fermentléhez meszet adnak, a keletkező Ca-citrát csapadékot szűrik, majd tömény kénsavval újra oldatba viszik a citromsavat. A keletkező gipszet (CaSO_4) eltávolítják, a citromsav oldatot pedig aktív szénen újra megszűrik, esetleg ioncserélő oszlopon engedik át. A tisztított oldatból a citromsavat vákuum alatt kristályosítják ki. A módszer hátránya, hogy rengeteg mész és kénsav szükséges hozzá, és jelentős mennyiségű gipsz keletkezik (a fentiek tömege a micéliummal és az anyalúggal együtt kb. 16-szorosa a keletkezett citromsavnak!).

Emiatt fejlesztették ki az oldószer-extrakciós eljárást, melynek során a citromsavat valamilyen vízzel nem elegyedő oldószerrel vonják ki a fermentléből. Az extraktánst azonban minden esetben engedélyeztetni kell az illetékes hatóságokkal. A kristályosítás ez esetben is vákuum alatt történik; 36 °C alatt monohidrát, e fölött anhidrát keletkezik.

4.2.6 A citromsav felhasználása

Mint az 4. 8. ábra mutatja, a citromsavat túlnyomórészt az élelmiszeripar hasznosítja, kellemes íze és minimális toxicitása miatt.

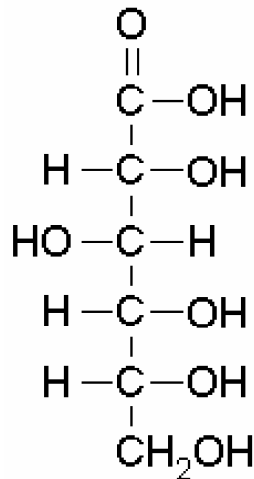


4.8. ábra: A citromsav felhasználása

A gyógyszeripar és a vegyipar fémionok (vas, réz) komplex-képzőjeként alkalmazza; ebből számos alkalmazás (felület-tisztító illetve stabilizáló hatás, puffer). A kalcium ionnal történő komplexképzés okán vérkészítmények stabilizálására, illetve alacsonyabb dermedéspontú beton előállítására is használják.

4.3 A GLÜKONSAV MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

A glükonsav (4. 9. ábra) két-és háromértékű fémionokkal vízdoldható komplexeket képez, aminek révén a fémfelszínek korrózió-mentesítésére használható.



4.9. ábra: A glükonsav szerkezeti képlete

Kedvező toxicitási jellemzői miatt élelmiszerekben és üdítőitalokban is használják kiegészítőként. Legfontosabb alkalmazása azonban a gyógyászat: terápiás vas- és kalcium bevitel során glükonsavat használnák ellen-anionnak. A világon évente mintegy 80 ezer tonnát gyártanak belőle, kizárólag fermentációs (biotechnológiai) úton.

A glükonsav a glükóz oxidációja során keletkezik. A dehidrogénezés első lépésben D-glükono- δ -laktont eredményez, ami a közeg hőmérsékletétől és kémhatásától függő arányban szabad savvá alakulhat (4. 4. ábra). A két reakció kivitelezésére számos gomba és baktérium képes; glükonsav felhalmozódást már a múlt század első harmadában észleltek *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Vibrio* és *Pseudomonas* baktériumfajok, valamint *Aspergillus*, *Penicillium* és *Gliocladium* gombák fermentlevében.

Baktériumokban az extracelluláris D-glükózt a sejtmembránhoz kötött **D-glükóz dehidrogenáz** enzim alakítja glükonsavvá. A külső térből felvett glükonsavat a sejt szénforrásként, a pentóz-foszfát útvonal révén hasznosítja, azonban a pentóz-foszfát út magas (> 15 mM) glükóz koncentráció és erősen savas kémhatás (pH < 3.5) esetén nem működik. Ha a technológia körülményeket ennek megfelelően (magas glükózkoncentráció, erősen savas kémhatás) állítjuk be, a glükonsav feldúsul az extracelluláris térben.

Gombákban a glükonsav kialakulása jellemzően két enzim működését igénylő folyamat. A D-glükózt a fajtól függően extracelluláris illetve sejtfalhoz kötött **glükóz-oxidáz** alakítja D-glükono- δ -laktonná, amit a **laktonáz** hidrolizál glükonsavvá. A második lépés – a külső körülményektől függően – spontán módon is végbemehet.

4.3.1 A glükonsav gyártási folyamata

A folyamat biokémiájának megfelelően a gyártási folyamat is kétféle: bakteriális és fungális lehet. Az előbbi esetben a *Gluconobacter oxidans*, az utóbbi esetben az *Aspergillus niger* a termelő organizmus. Az *A. niger* alapú technológiák jóval elterjedtebbek.

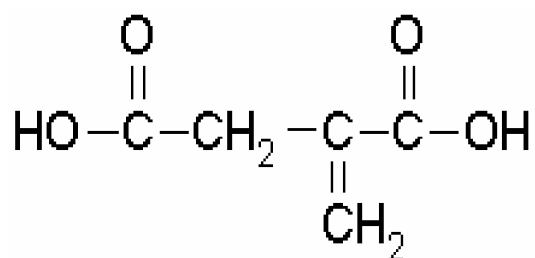
Az első *A. niger* alapú technológiát „**kalcium-glükonát gyártás**”-nak nevezik, mivel a szükséges közel semleges kémhatást kalcium-karbonát adagolásával biztosították (v.ö. *a bakteriális glükonsav gyártás tápközegének savas kémhatásával!*). Az extracelluláris glükóz oxidáz ugyanis savas (pH < 3.5) kémhatású tápközegben inaktiválódik, ezért a pufferolás alapvető jelentőségű. A szénforrás 14-15 % glükóz, ami jellemzően kukoricakeményítőből származik. A folyamat – a glükonsav képződés sztöchiometriájának megfelelően – magas oldott oxigén koncentrációt igényel, amit gyakran a fermentor jelentős (2-3 bar) túlnyomás alá helyezésével biztosítanak. A többi táptalaj-komponenst (foszfor, nitrogén, sók, stb.) limitált mennyiségben adagolják, visszafogva ezáltal a sejtek növekedését.

A kalcium-glükonát gyártás fejlettebb alternatívája a **nátrium-glükonát előállítás**. Ennél a technológiánál a kémhatást NaOH-val tartják közel semleges (pH 6.5) értéken, így a táptalaj glükóz koncentrációja a 35 %-ot (350 g/L, közel 2 M-os glükóz oldat!) is elérheti; ezt a kalcium-glükonát só gyengébb vízdékonysága nem teszi lehetővé. Mindkét esetben a fermentáció közel kvantitatív (< 90 %) hozamot eredményez alig 24 óra alatt.

A glükonsav kinyerése a túltelített oldatból kicsapással történik: kalcium-glükonát esetében hűtéssel, nátrium-glükonát esetében a kémhatás emelésével. A sóból kénsavval szabadítják fel a szabad savat, majd a terméket a folyamat ismétlésével tisztítják. Napjainkban a nátrium-glükonát a fő előállított glükonsav-származék. Mint említettük, a glükonsav és a gyűrűs lakton forma közti egyensúlyt a kémhatás és a hőmérséklet szabályozza, így ezen két paraméter révén a két forma aránya jól befolyásolható.

4.4 AZ ITAKONSAV MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

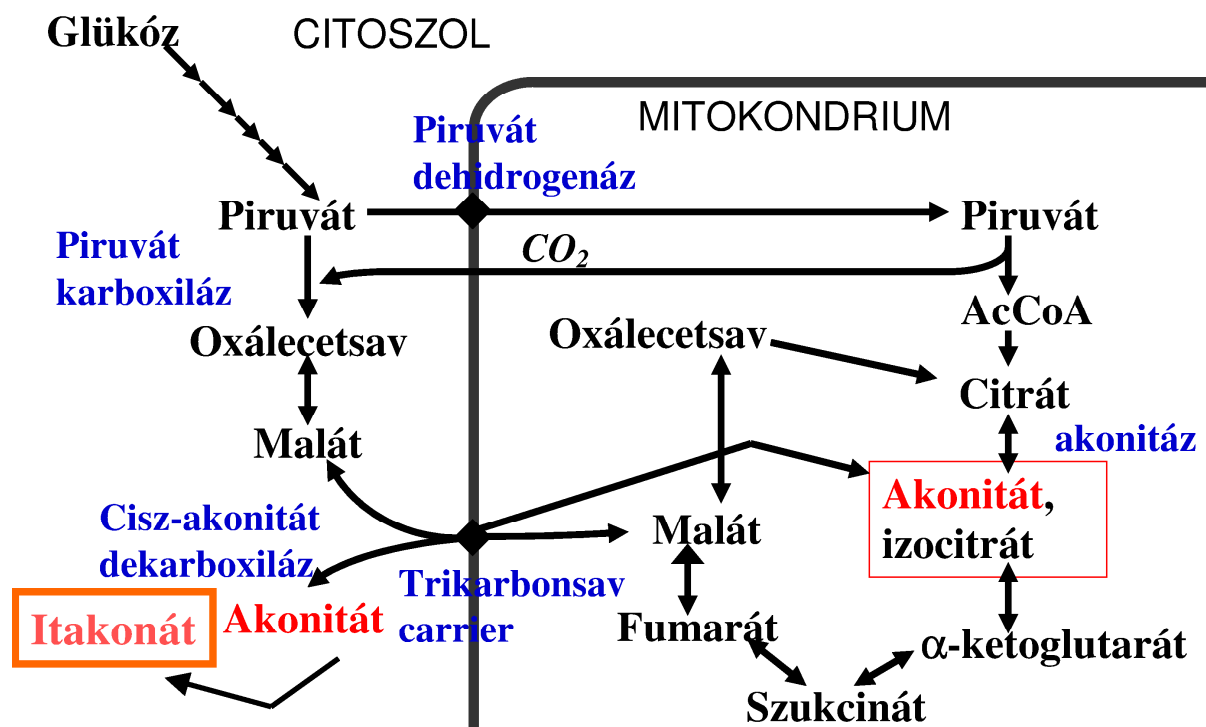
Az itakonsavat (metilén-szukcinát; 4. 10. ábra) az *Aspergillus terreus* gomba állítja elő.



4.10. ábra: Az itakonsav szerkezeti képlete

Enyhén mérgező jellege miatt élelmiszeripari alkalmazása nincs; hidrofil karakterű műanyagok gyártásánál ko-polimerként alkalmazzák.

Az itakonsav képződésének biokémiája hasonló a citromsavéhoz (erőteljes glikolízis, anaplerotikus CO₂-fixálás, melynek eredményeként citoszolikus oxálecetsav, majd malát keletkezik), de egy fontos eltérés akad: a mitokondrium membránban a trikarbonsav carrier nem citrát/malát, hanem *cis*-akónitát/malát elven működik. A *cis*-akónitátot az *A. terreus*-ra specifikus enzim, az akónitát dekarboxiláz alakítja tovább itakonsavvá. A gombasejtből végül egy itakonsav-transzporter exportálja az itakonátot a fermentálébe (4. 11. ábra).



4.11. ábra: Az itakonsav bioszintézise

Az itakonsav gyártás technológiája is hasonló a citromsavéhoz: nagy mennyiségű, gyorsan hasznosuló szénforrás (glükóz szirup, keményítő hidrolizátum, melasz formájában), magas oldott oxigénszint, fémion limitáció, a növekedés foszfát általi visszafogása. Eltérés a Mn²⁺-effektus hiánya, illetve a kémhatás magasabb értéken (~ pH 3) tartása, elkerülendő az itatartarát melléktermék keletkezését. Mivel az *A. terreus* mezofil, a fermentáció hőmérséklete 40 °C körül van. A hozamok megközelítik a citromsav gyártás során elérhető (kb. 85 %).

A kinyerés aktív szén szűrővel és az ezt követő kristályosítással történik, amit a tisztítás érdekében többször megismételnek.

4.5 A TEJSAV MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

A tejsav két izomer, az L (+) és a D (-) formájában, illetve a kettő racém elegyeként (D, L tejsav) fordul elő a természetben. A tejsavat termelő baktériumokat hagyományosan hetero- illetve homofermentatív típusba sorolják. Az utóbbiak a fermentáció során szinte kizárólag tejsavat, míg az előbbiek etanolt, ecetsavat, hangyasavat és szén-dioxidot is termelnek. Ennek oka a glikolitikus út defektje: az aldoláz enzim hiánya miatt a szénváz lebontás eltolódik a pentóz-foszfát út irányába. Mivel a tejsav a glikolitikus út végterméke, a piruvát redukciójával keletkezik, elméletileg 1 mól hexózból 2 mól tejsav jöhet létre. A gyakorlatban ez az arány valamivel kevesebb.

A tejsav baktériumok rendszertana még nem letisztázott. A legfontosabb nemzetség a *Lactobacillus*, melynek kb. 40 homo- és 20 heterofermentatív fajtát ismerjük. Az alkalmazott szénforrás faj-, esetenként törzsfüggő: glükózból, laktózból, maltózból, sőt keményítőből is képesek tejsavat erjeszteni. A legtöbb törzs csak egyik vagy másik izomert képes előállítani, de néhány – racemáz enzim aktivitásának köszönhetően – képes racém elegyet létrehozni, ami veszteséget okozhat. A termelő törzseknek sav-toleránsnak és bakteriofágokkal szemben ellenállónak kell lenniük; ezek a szempontok a törzsfeljesztés során is alapvetőek.

A kereskedelmi forgalomba kerülő tejsavat túlnyomó részben (kb. 70 %) fermentációs úton, kalcium só formájában állítják elő; ez volt az első, ipari léptékben termelt szerves sav (Littleton, USA, 1881). A mai technológiák sem új keletűek: jellemzői a nagy koncentrációjú (kb. 150 g/L) szénforrás, a nitrogén- és/vagy foszfor limitáció a túlzott sejtnövekedés ellen, komplex komponensek alkalmazása a tejsav baktériumokra jellemző vitamin- és aminosav auxotrófiák miatt. A fermentáció magas hőmérsékleten (40-60 °C) megy végbe, nagy térfogatú (~ 100 m³), saválló, enyhén kevertetett tankreaktorokban (a kevertetés a fermentlé homogenizálására szolgál, maga a technológia anaerob!). A kémhatást pH 5.5 – 6.0 között, CaCO₃ adagolásával tartják. A fermentáció időtartama 4-6 nap. A kinyerés szempontjából fontos, hogy a cukor koncentráció minimális legyen a fermentlében.

A tejsav kinyerésének első szakaszában a felhevített kalcium-laktát oldatot szűrik és többször átkristályosítják (a kalcium sóból kénsavval szabadítják fel a tejsavat). A fémionokat hexaciano-ferrátos kezeléssel távolítják el. A terméket végül ioncserélőn választják el, majd betöményítik. Újabban szerves oldószeres (pl. butanol, izopropil-éter) extrakciós eljárásokat is alkalmaznak. A tejsavat a felhasználás függvényében többféle tisztaságban forgalmazzák (4. 2. táblázat).

<u>minőség</u>	<u>tulajdonság</u>	<u>alkalmazás</u>
technikai	világosbarna 20-80 % tejsav	textilipar
élelmiszeripari	színtelen > 80 % tejsav	élelmiszer-adalék, tejipar
gyógyászati	színtelen > 90 % tejsav < 0.1 % hamu	fémion-laktátok, bélrendszer- adalékok
műanyagipari	színtelen < 0.01 % hamu	lakkok, biodegradábilis műanyagok

4.2. táblázat: A tejsav felhasználása

5 Aminosavak mikrobiális előállítása

5.1 BEVEZETÉS

Az aminosavak gyártása az ipari biotechnológia régi és fontos területe. A japán Ikeda 1908-ban ismerte fel, hogy a hazájában tradicionális ételnek számító kelp nagy mennyiségű glutaminsavat tartalmaz. A szójából illetve búzából extrahált glutaminsav Na-sója (monosodium glutamát, MSG) ételízesítőként hamarosan kereskedelmi forgalomba is került. A piaci igények gyors felfutása miatt azonban sokkal hatékonyabb technológiákra volt szükség, amire a mikrobiológia nyújtott lehetőséget. Az első, L-glutaminsav túltermelésre ipari léptékben is alkalmas mikroorganizmust, a talajlakó, Gram-pozitív *Corynebacterium glutamicum*-ot 1957-ben izolálták Japánban, és hamarosan sikeres fermentációs technológiát dolgoztak ki rá. Az MSG-n kívül ma már számos további aminosavat is ipari körülmények között gyártanak (5. 1. táblázat); az előállítás jellemzően fermentációs-mikrobiológiai, de számos esetben a kémiai technológiák is versenyképesek.

Aminosav	Termelő törzs	Titer (g/L)	Hozam (g/100 g cukor)
L-glutaminsav	<i>C. glutamicum</i>	150	60-70
L-lizin	<i>C. glutamicum</i>	170	40-50
L-treonin	<i>E. coli</i>	100	55-60
L-triptofán	<i>C. glutamicum</i>	58	20-25
L-triptofán	<i>E. coli</i>	45	20-25
L-fenilalanin	<i>E. coli</i>	51	20-25
L-arginin	<i>Brevibacterium</i>	36	30-40
L-hisztidin	<i>C. glutamicum</i>	23	15-20
L-izoleucin	<i>E. coli</i>	30	20-30
L-szerin	<i>Metilobacterium</i>	65	30-35
L-valin	<i>C. glutamicum</i>	99	30-40

5.1. táblázat: A legfontosabb biotechnológiai úton gyártott aminosavak

Az aminosavakat döntően négyféle célra használják: (1) élelmiszeripar (ízesítőszer), (2) nagyüzemi állattartás (táplálék kiegészítők), (3) vegyipar (királis vegyületek szintézise), (4) gyógyszeripar (infúziós oldatok, speciális diéták). Az első kategóriába tartozókat az angol név alapján *food-*, a másodikba tartozókat *feed-*aminosavnak nevezzük.

5.2 AMINOSAVAK GYÁRTÁSA ÉS A TERMELŐ TÖRZSEK FEJLESZTÉSE

Az aminosavak piacán három meghatározó termék található, az **L-glutaminsav**, az **L-lizin** és a **D,L-metionin**. Az első kettőt fermentációs úton, a harmadikat kémiai szintézissel állítják elő. Ez utóbbit az teszi lehetővé, hogy az emlősök olyan enzimaktivitásokkal bírnak (D-aminosav oxidáz és transz-amináz), melyek révén a táplálék formájában felvett D-metionint képesek L-formává alakítani. A többi aminosav esetében ez a lehetőség nem adott. Ennek köszönhetően a metionin kémiai szintézissel létrehozott racém elegye is piacképes termék.

A törzsfeljesztés aminosav-túltermelés esetén komoly kihívást jelent, mivel ezeket a vegyületeket (szemben pl. a karbonsavakkal) a mikroorganizmusok természetes körülmények között nem választják ki jelentős mennyiségben. Az aminosavak bioszintézise a legpontosabban szabályozott biokémiai mechanizmusok közé tartozik, a produkciós ráta csak minimálisan haladja meg a sejtek igényeit, az intracelluláris aminosav-koncentráció rendkívül alacsony. Emiatt az aminosav-túltermelő baktériumok anyagcseréjébe számos (akár több tucat) ponton is be kellett avatkozni a ma legjobbnak számító termelési értékek eléréséhez.

A törzsfeljesztés klasszikus módja a random mutagenézis (mutáció véletlenszerű előidézése pl. UV-besugárással, vagy mutagén anyagokkal) és ezt követő szelekció egy specifikus fenotípusra (ami lehet magának az aminosavnak a minél erőteljesebb túltermelése). Az eljárást a mindenkori legjobban termelő törzsekkel újra és újra megismételve – mely természetesen hosszú ideig, akár évtizedekig is eltarthat – extrém magas termelési értékeket érhetünk el. Noha a random mutagenézisen alapuló törzsfeljesztésnek köszönhetjük a világon ma gyártott ipari biotechnológiai termékek jelentős részét, az eljárás komoly elvi hibája, hogy a szükségeseken kívül nemkívánatos mutációk is létrejönnek a genomban, és ezek száma a törzsfeljesztési program hosszával arányosan nő. Idővel olyan mutációk is szükségszerűen kialakulnak, melyek a baktériumok növekedési és/vagy cukor-lebontási sebességet lassítják. Ezek meghosszabbítják a fermentációt és így a termelési költségek szintjén visszaveszik azt az előnyt, amit a magasabb specifikus produkciós ráta eredményez.

A fenti problémát a géntechnológia és a genom-programok elterjedése oldotta meg. Ma már megszokott gyakorlat a termelő törzs genomszekvenciáját összehasonlítani egy vad típusú (referencia) törzsével, és csak a valóban szükséges mutációkat kialakítani. Az eljárást a törzs újraépítésének (re-building) vagy újratervezésének (re-designing) nevezik. Egy másik elterjedt genomikai módszer a törzsfeljesztés során a transzkriptom analízis, melynek révén különböző törzsek expressziós profiljainak különbségei hasonlíthatók össze.

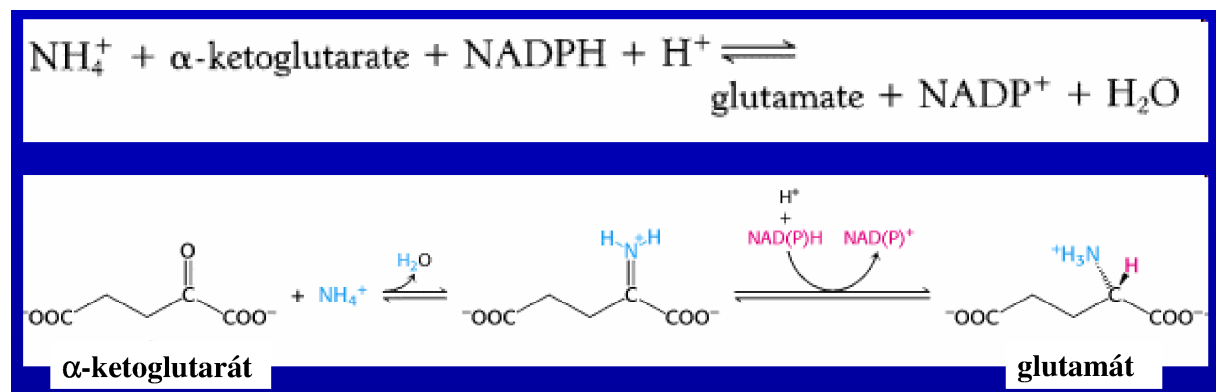
A törzsfejlesztési technikák talán leggyorsabban terjedő típusa a metabolikus fluxus analízis, melynek révén mennyiségileg jellemezhető az egyes anyagcsere utakon keresztül áramló szénváz mennyisége. Segítségével azonosíthatók a „csöpögések”, vagyis azok a sejten belüli reakciók, melyek révén a szénforrás nem a kívánt irányba alakul. A biokémiai reakciók ismeretében, géntechnológia módszerekkel a „csöpögést” eredményező enzimeket kódoló géneket el lehet csendesíteni, ki lehet ütni.

5.3 AZ L-GLUTAMINSAV MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

Az L-glutaminsav máig az aminosav-piac, sőt az ipari biotechnológiai termékek egyik legfontosabb képviselője. Piacának mérete mintegy 1.300.000 t/év, és a „nagy piac – olcsó termék” elv alapján ez a legolcsóbb aminosav (2-3 US \$ / kg). Az összes gyártástechnológia a *C. glutamicum*-ot alkalmazza.

5.3.1 Az L-glutaminsav keletkezésének biokémiája

A glutaminsav keletkezésének biokémiai útvonala jól ismert: a glikolitikus út és a pentóz-foszfát ciklus táplálják a citromsav-ciklust, melynek ötszénatomos közteséből, az α -ketoglutársavból a **glutaminsav dehidrogenáz** enzim katalizálta redukzív aminálási reakció során keletkezik a glutaminsav (5. 1. ábra).



5.1. ábra: A glutaminsav bioszintézise

A citromsav-ciklus glutaminsav kiáramlás miatti „meglékelése” következtében a feltöltő (anaplerotikus) reakciók működése esszenciális. Baktériumokban két anaplerotikus reakciót katalizáló enzimet ismerünk: a **piruvát karboxiláz** és a **foszfo-enol-piruvát karboxiláz** egyaránt oxálcetsavat hoz létre három szénatomos molekulákból, szén-dioxid beépítésével. A különböző fajokban jellemzően csak az egyik vagy a másik enzim szokott előfordulni, de

C. glutamicum-ban mindkettő jelen van, ami jelentős feltöltő kapacitást, és ezzel párhuzamosan glutaminsav-termelő képességet eredményez.

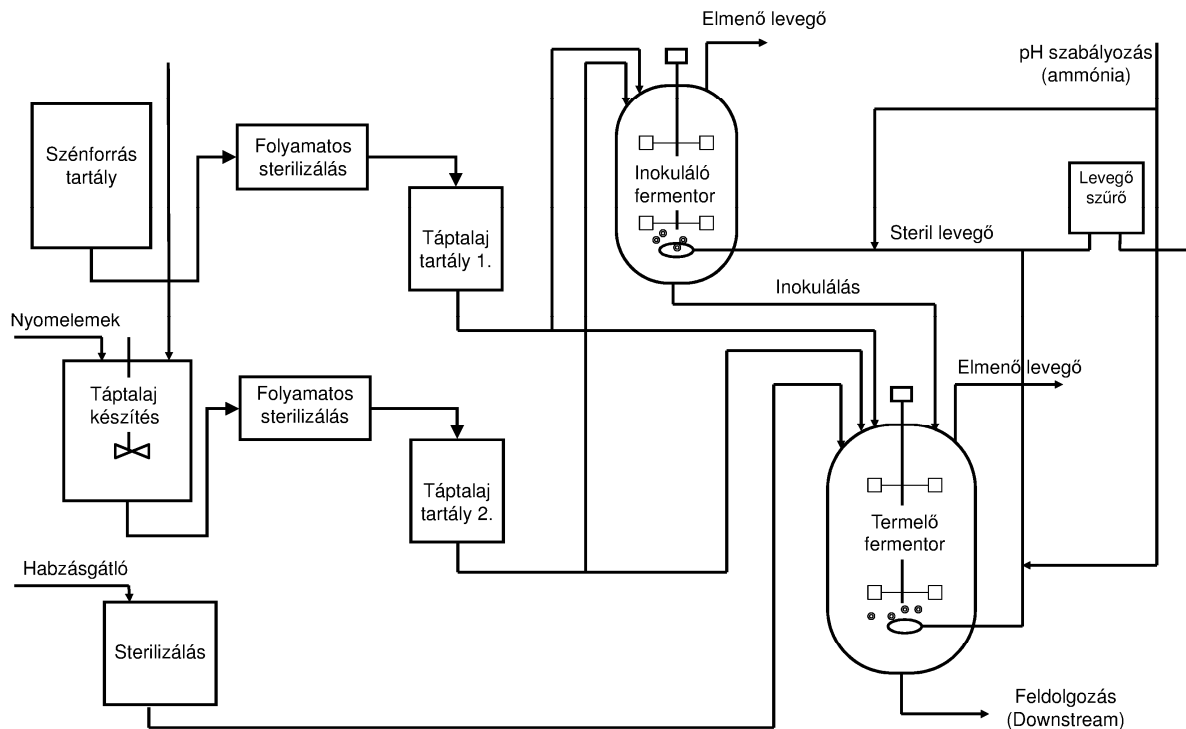
A glutaminsav túltermelés egyik központi lépése az aminosav exportja a fermentlébe. Noha évtizedek óta ismert, hogy a sejtmembrán és/vagy a sejtfal gyengítésével a glutaminsav kiáramlás felgyorsítható, ennek mechanizmusát mégsem ismerjük teljes mélységében. Az nyilvánvaló, hogy a jelenséget nem lehet pusztán fizikai okokkal magyarázni, hiszen súlyos membránkárosodás esetén más metabolitok és ionok is távoznának, ami a sejt pusztulásához vezetne. Ebből viszont az következik, hogy a *C. glutamicum* rendelkezik egy specifikus **L-glutamát transzporterrel**, melynek membránbeli helyzete a leadás szempontjából előnyösen változik meg a kezelések hatására. A legrégebbi ilyen módszer a biotin limitáció: néhány $\mu\text{g/L}$ koncentráció alatt az acetyl-CoA karboxiláz enzim – melynek a biotin kofaktora – nem működik megfelelően, így a zsírsav szintézis lelassul. A membrán foszfolipid tartalma a felére csökken, a telítetlen / telített zsírsavak relatív aránya viszont a duplájára nő. Ez a megváltozott membrán-összetétel kedvező környezetet nyújt a transzporternek, ami az export fokozódását eredményezi. Ugyanezt a hatást érhetjük el oleinsav- vagy glicerol-auxotróf mutánsokkal, továbbá felületaktív anyagokkal (pl. Tween 40) történő kezeléssel; ezen utóbbiak szintén az acetyl-CoA karboxiláz komplex szétválasztását eredményezik. A sejtfal penicillinnel vagy lizozim enzimmel történő gyengítése szintén fokozott L-glutamát kiáramlást eredményez.

Az L-glutaminsav túltermelés harmadik biokémiai komponense az **α -ketoglutársav dehidrogenáz** enzim aktivitásának jelentős (az eredeti érték tizedére történő) csökkenése termelői körülmények (biotin limitáció) között. Az enzim és a glutaminsav dehidrogenáz közös szubsztrátuma az α -ketoglutársav, így a Krebs-ciklus felé irányuló csökkent aktivitás értelemszerűen az L-glutaminsav túltermelést fokozza.

5.3.2 Az L-glutaminsav gyártási folyamata

Az L-glutamát előállítás nagyléptékű, több száz m^3 térfogatú aerob tankreaktorokban történik. A folyamat szabályozása több ponton is kritikus: ha a **DO-szint** túl magas, akkor α -ketoglutársav, ha túl alacsony, akkor tejsav melléktermék halmozódik fel. Az **ammónia** a cukor-glutaminsav konverzió egyik reaktánsa, magas koncentrációban azonban gátolja a növekedést, így adagolása a fermentáció során folytonosan, alacsony egyensúlyi koncentráció mellett történik. Másik fontos szerepe a sóképzés; az L-glutamát ammónium só formájában lesz jelen a fermentlében. A *C. glutamicum* érzékeny a táptalaj hőmérsékletére ($T=30\text{ }^\circ\text{C}$) illetve kémhatására (pH 7.8 – 8) is.

A termelési (idio-) fázist Tween 40 adagolással indítják. A fermentáció 4-5 napig tart, utána a sejteket szeparálják, a sejtmentes fermentlevet pedig anioncserélő gyantára engedik. Az L-glutamát anionok megkötődnek, az ammónia felszabadul (desztillációval visszanyerik, és újra hasznosítják). Az L-glutamátot NaOH-val eluálják, ami egyfelől regenerálja a gyantát, másfelől közvetlenül MSG kialakulásához vezet (5. 2. ábra).

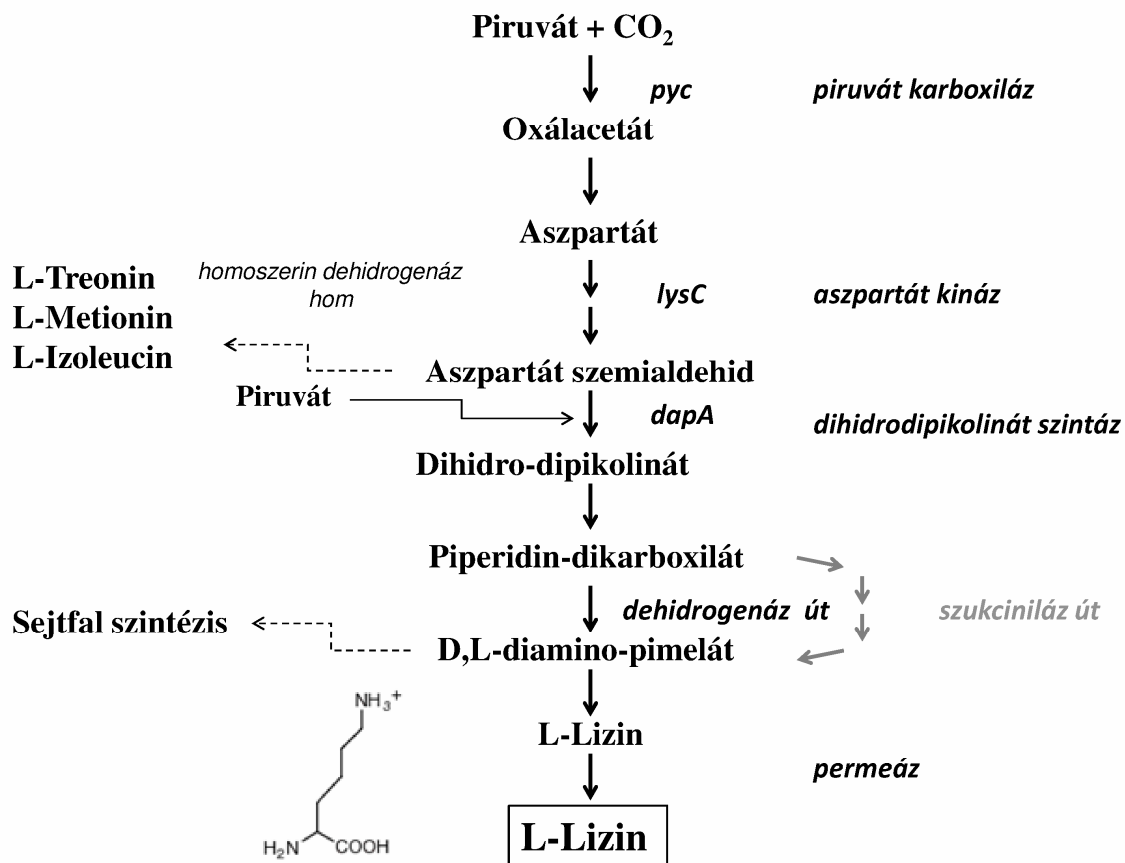


5.2. ábra: Az MSG gyártásdiagramja

5.4 AZ L-LIZIN MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

5.4.1 Az L-lizin keletkezésének biokémiája

Az L-lizint is kizárólag *C. glutamicum* révén, fermentációs úton állítják elő. A lizin bioszintézis soklépéses, a szénváz piruvátból és oxálcetsavból származik (5. 3. ábra). A *C. glutamicum* egyik érdekes tulajdonsága, hogy lizin szintézise a piperidein 2,6 dikarboxiláz szintjén kétfelé ágazik (5. 3. ábra).



5.3. ábra A lizin bioszintézise

A kétféle útvonal közti fluxus-megoszlást az elérhető ammónia koncentrációja szabályozza: a dehidrogenáz enzim ammóniával szembeni affinitása alacsony ($K_m = 28 \text{ mM}$), így ez az út csak a fermentáció első szakaszában, magas ammónia koncentrációnál aktív. A termelői fázisban (az ammónia szint csökkenésekor) a szukciniláz enzimmel jellemezhető útvonal a domináns. Ha azonban bármelyik utat inaktíválják, a végső L-lizin kihozatal kevesebb, mint felére esik vissza.

Sok más metabolit túltermeléshez hasonlóan az L-lizin esetében is kritikus lépésnek számít a sejtből történő kilépés (export). A *C. glutamicum* rendelkezik egy specifikus L-lizin transzporterrel (*LysE*), melynek természetes szerepe az intracellulárisan feldúsuló L-lizin eltávolítása a sejtből. A talajlakó *C. glutamicum* képes a peptideket felvenni és hidrolizálni, azonban más baktérium fajoktól eltérően az L-lizin lebontására (illetve szénforrásként történő hasznosítására) nem képes. A transzporter így egyfajta biztonsági szelepként működik: ha az intracelluláris L-lizin koncentráció túl magasra emelkedik, kiengedi a sejtből a fölösleget. A mechanizmus annyira specifikus, hogy a *LysE*-hiányos *C. glutamicum* mutánst fölös L-lizin adagolással el lehet pusztítani! A transzporter túltermeltetése viszont az L-lizin képződés jelentős fokozódásával jár együtt, így a törzsfejlesztés egyik alapvető stratégiája lett.

5.4.2 Az L-lizin gyártási folyamata

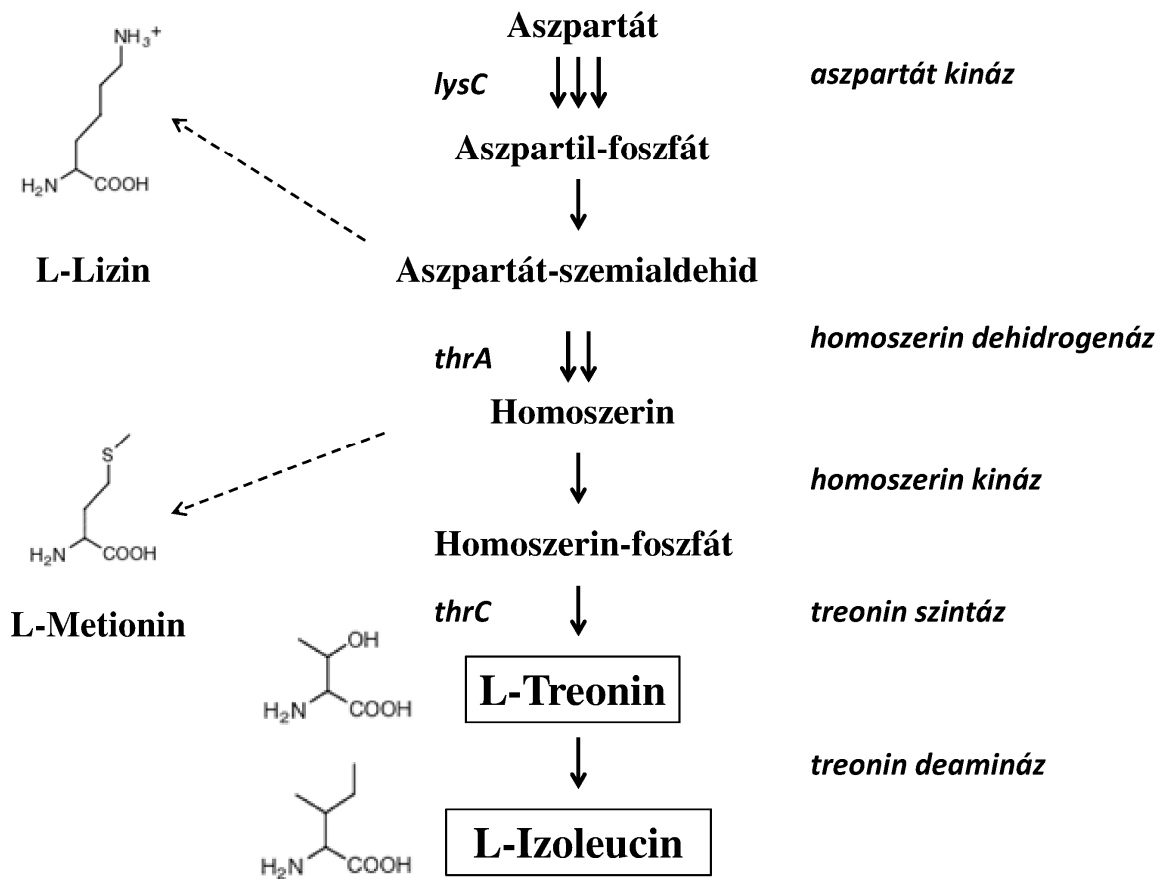
Az L-lizint nagyléptékű (> 100 m³), aerob, ráadagolásos (fed-batch) fermentáció révén állítják elő. A szénforrás biokémiai értelemben glükóz, amit a sejt komplex formában kap meg. Korábban a melasz volt a leggyakoribb glükóz-hordozó, de szezonálisan ingadozó minősége és változó elérhetősége miatt a tendencia a kémiaiailag definiáltabb keményítő hidrolizátumok felé mutat (ennek az is oka lehet, hogy a világ L-lizin gyártásának közel fele az USA-ban történik, ahol a kukoricakeményítő könnyen beszerezhető alapanyagának számít). A termelő törzsek sokféle auxotrófiája miatt kukoricalekvárt is tesznek a fermentlébe, ezzel lényegében minden növekedéshez szükséges vitamint és kofaktort biztosítani lehet. A pozitív töltésű L-lizin ellenionjaként szulfátot (ammónium-szulfát formájában) adagolnak a fermentléhez. A képződő termék tehát **lizin-szulfát**. A végső koncentráció a 170 g/L értéket is elérheti, közel 50 %-os konverzió (cukor/aminosav) mellett.

A lizin kinyerésére többféle eljárás használatos. A legmagasabb tisztaságú terméket anioncserélő gyantán való ioncsere révén, a szulfát hidrokloridra cserélésével, bepárlással és kristályosítással érik el. Alacsonyabb fokú L-lizin-tartalom igénye esetén az ioncsérés lépés kimarad, a szűrt fermentlevet párolják, majd granulálják. A kereskedelmi forgalomba kerülő L-lizint tápanyag-kiegészítőként alkalmazzák az állattartó gazdaságok. A világpiac mérete mintegy 700.000 t/év; ennek megfelelően az L-lizin az egyik legolcsóbb aminosav (4-7 US \$ / kg); ára jelentős évenkénti fluktuációt mutat.

5.5 AZ L-TREONIN MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

5.5.1 Az L-treonin keletkezésének biokémiája

Az L-treonin az aminosavak **aszparaginsav-család**jába tartozik, az L-metioninnel, az L-lizinnel és az L-izoleucinnal együtt. A négy aminosav bioszintézise átfed egymással, ami közös szabályozási pontok meglétét eredményezi. Legfontosabb ezek közül az **aszparaginsav kináz** enzim, mely az aszpartát-szemialdehid köztest hozza létre (5. 4. ábra).



5.4. ábra: A threonin bioszintézise

Az L-treonint ipari léptékben előállító *E. coli* baktériumban az aszparaginsav kináz három izoenzime ismert, melyeket rendre az L-treonin, az L-lizin és az L-metionin gátol, vagyis az enzim működését akkor is magas szinten lehet tartani, ha az L-treonin túltermelődik. Az L-treonint létrehozó enzimek operonba rendeződnek (*thrABC*), amit egy klasszikus attenuációs mechanizmus szabályoz. Az átíródó polipeptidek 11 db aminosavból felépülő vezető szekvenciája 8 db L-treonint (és 3 db L-izoleucint) tartalmaz. Ha az L-treonin mennyisége a sejtben kevés, a vezető szekvencia nem tud kialakulni. Hiánya olyan szignál, ami azonnal sokszorosára növeli az operon átíródásának mértékét. A *thrABC* operon állandó és erős kifejeződése az ipari törzsfeljesztő programok számára is elsőszámú célpontnak számít. Egy másik stratégia az L-izoleucin keletkezését igyekszik meggátolni, mivel ennek a bioszintézisnek az L-treonin az egyik köztese (5. 4. ábra).

5.5.2 Az L-treonin gyártási folyamata

Mint említettük, az L-treonint az *E. coli* mutáns törzseivel állítják elő. A szénforrás a gyorsan hasznosuló glükóz vagy szacharóz; mivel az *E. coli* K-12 jelű törzse (mely az ipari termelő törzsek kiindulópontja volt) nem tudja a szacharózt hasznosítani, az ehhez szükséges

enzimeket kódoló operont más *E. coli* törzsekből vitték át a termelői változatokba. A táptalaj sókat és kis mennyiségű komplex összetevőt (pl. élesztőkivonat) tartalmaz. A nitrogénforrás ammónia vagy ammónium-hidroxid; adagolása folyamatos, és a tápközeg pH-értéke vezérli. A fermentáció kb. 3 napig tart, a termék végső koncentrációja meghaladhatja a 100 g/L-t, 60 %-os konverzió (cukor/aminosav, g/g) mellett. Az L-treonin kinyerése kristályosítással történik, és viszonylag egyszerű, hatékony folyamat, mivel a vízdékonysága alacsony, melléktermékek pedig a fermentáció során csak minimális mértékben keletkeznek. Felhasználása hasonló az L-lizinéhez. Az L-treonin piaci mérete alapján a „nagy hármas” (L-glutaminsav, L-lizin és a kémiai úton gyártott, ezért jegyzetünkben külön nem tárgyalt D,L-metionin) után a negyedik legfontosabb aminosav (kb. 50.000 t/év). Magyarország egyetlen aminosav-előállító üzeme, a Debrecen vonzáskörzetében, Kaba és Nádudvar között található, német többségi tulajdonú Evonik-AgroFerm Rt. is L-treonint gyárt.

5.6 TOVÁBBI AMINOSAVAK MIKROBIÁLIS ELŐÁLLÍTÁSA

5.6.1 L-aszparaginsav

Noha az L-aszparaginsavat a gyógyszeripar is hasznosítja, valódi piaci jelentőségét (kb. 15.000 t/év) az élelmiszer- és üdítőitalgyártás során elterjedten használt mesterséges ízesítőszer, az **aszpartám** jelenti. Az aszpartám L-aszparaginsavból és L-fenilalaninból álló dipeptid, alacsony kalóriatartalmú, a glükóznál viszont sokkal édesebb.

Noha fermentációs előállítása is létezik, az aszparaginsavat enzimes **biokonverzióval**, fumarát és ammónia kondenzációjával állítják elő. A felhasznált enzim az immobilizált *E. coli* **aszpartáz**. Mivel a konverzió végén az aszpartáz visszanyerhető, a folyamat hatékonysága rendkívül jó. Az immobilizáció eredményeként az oldatban kifejezetten labilis enzim évekig stabil marad. Egy másik módszer szerint a teljes sejteket immobilizálják, de előtte hő-sokknak teszik ki őket, ami a hőérzékeny fumaráz enzimet eliminálja. Ezen módszer alkalmazásakor a fumarát → malát átalakulás miatt bekövetkező fumársav veszteséggel sem kell számolni. A gyártás folyamatos hűtést igényel, mivel a kondenzációs reakció exoterm (6 kcal/mól). A végterméket ismételt kristályosítással szabadítják meg a szennyeződésektől.

5.6.2 Aromás aminosavak

Az **L-triptofán** az egyik ledrágább aminosav, piacának mérete kicsi (kb. 1.000 t/év), de tápanyag-kiegészítőként nagy jövőt jósolnak neki. *E. coli*, *C. glutamicum* és *Bacillus*

subtilis törzsekkel is kidolgozták rá fermentációs technológiát, mellettük pedig előanyagokból (indol + szerin) történő enzimatisz szintézise is létezik. Ezen utóbbi eljáráshoz triptofán szintetáz túltermelő *E. coli* törzseket használnak. Az indolt a petrokkémiai ipar állítja elő olcsón, az L-szerin a cukorgyártás melléktermékeként melaszból szintén viszonylag olcsón kinyerhető. A fermentáció során az indol + szerin kondenzáció közel kvantitatív konverziót eredményez, a végtermék pedig nagy tisztaságú.

Az **L-fenilalanin** előállítása *E. coli* vagy *C. glutamicum* mutáns törzseivel történik. A törzsfeljesztési programok közös stratégiája a tirozin-auxotrófia, melynek bioszintézise nagy részben közös az L-fenilalaninnal. A gyártás kifinomult fermentációs technológiát igényel: a toxikus ecetsav felhalmozódás és a túlzott CO₂-keletkezés elkerülése érdekében az oldott glükóz és DO-szinteket egyaránt szűk tartományban kell tartani. A sejtek növekedését L-tirozinnal limitálják, ezért ezen táptalaj-komponens kiindulási mennyisége is kritikus, mivel lényegében meghatározza a fermentáció során elérhető biomassza koncentrációt, ami viszont a specifikus oxigén illetve glükóz fogyási rátát befolyásolja.

Mint említettük, az L-fenilalanin az aszpartám egyik komponense, ennek megfelelően piacának mérete hasonló az L-aszparaginsavéhoz (kb. 15.000 t/év).

6 Mikrobiális poliszacharidok és poliszacharopeptidek

6.1 BEVEZETÉS

Az élőlények, köztük a mikroorganizmusok általános és jellemző tulajdonsága, hogy szénforrásban gazdag tenyészkörülmények között tartalék tápanyagokat halmoznak fel intracellulárisan vagy a sejten kívüli térben, amit szénforrás-hiány esetén hasznosítani tudnak. A tartalék tápanyag kémiaiilag poliszacharid és/vagy olaj jellegű. A poliszacharidokat sokféle iparág hasznosítja, alapvetően ugyanazon tulajdonságuk miatt: növelik a viszkozitást, vagyis megváltoztatják az oldatok **reológiai tulajdonságait**. A poliszacharidok egy része töltéssel nem rendelkezik, más típusaik viszont savas karakterű szubsztituenseik miatt elektrolitként viselkednek.

Noha előállításukat és felhasználásukat tekintve sem tartoznak az ipari biotechnológia termékei közé, mégis említést érdemel, hogy számos gombafajból sikerült izolálni olyan bioaktív poliszacharidokat és poliszacharopeptideket (PSP), melyek bizonyítottan **rákellenes** illetve **immunrendszert befolyásoló** hatásúak. A fejezet végén röviden ezen vegyületeket is áttekintjük.

6.2 A DEXTRÁN ELŐÁLLÍTÁSA

A dextrán D-glükóz molekulákból felépülő poliszacharid. Az egyes monomerek közti kötések változóak ($\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 4$, $\alpha 1 \rightarrow 6$), és a termelő baktérium fajra jellemzőek. Számos baktérium faj képes dextránt előállítani; legismertebb a *Leuconostoc mesenteroides* Gram-pozitív, mozgásképtelen, nem-spórázó, fakultatív anaerob baktérium, melyet eredetileg a cukorgyártás világszerte elterjedt kártevőjeként ismertek. A szacharózból nyálkás tokot létrehozó baktérium tokanyaga azonban a múlt század ötvenes éveiben önálló biotechnológiai termék lett.

A dextránt szacharózból, fermentációs technológiával állítják elő, az *L. mesenteroides* extracelluláris **dextrán-szacharáz** aktivitását kihasználva. Az enzim a szacharózt hidrolizálja, a felszabaduló a D-glükóz komponenseket polimerizálja, emellett szabad D-fruktózt hagy a fermentáléban. A képződött polimert a fermentációt követően szerves oldószerrel kicsapják, exo- illetve endo-dextranáz enzimekkel „méretre vágják”, amivel egyben meghatározzák fizikai tulajdonságaikat is. A leggyakoribb dextrán típusok 1.000, 40.000, 60.000 és 70.000 móltömegűek.

kötés kialakulásához az UDP→UMP átalakulás biztosítja az energiát), majd a lánc nukleotid-difoszfáttal aktivált glükóz, mannóz, glükuronsav és mannóz révén pentaszachariddá érik. Ezt követően a lánc leválik a hordozó lipidről, ami új láncot épít fel, és kapcsol az előző pentaszacharidhoz.

A gyártás aerob fermentációs technológiával történik; batch és fed-batch technológiák egyaránt sikerrel működnek. Mint a legtöbb poliszacharidnál, a xantán esetében is a legfőbb problémát (és termelési költséget) a fermentálé viszkozitásának növekedése jelenti; a reaktort az erőteljes kevertetés miatt fokozottan hűteni is kell. Az egyes *X. campestris* törzsek az alapvázban megegyező, de a szubsztituensek számát tekintve eltérő végterméket hoznak létre; a xantán pontos szerkezetének a fermentáció, a kinyerés és a felhasználás szempontjából is jelentősége van. A tápközeg magas szén-, de limitáló nitrogén koncentráció mellett folyik. A keletkezett polimer kinyerése alkoholos kicsapással történik. Piacának mérete kb. 50.000 t/év. Felhasználása alapvetően élelmiszeripari jellegű: gélképző, stabilizáló és viszkozitás-növelő adalékanyagként 1967 óta használják, de számos további ipari alkalmazása (pl. vízfestékek, kozmetikumok, gyógyszerek gyártása) ismert.

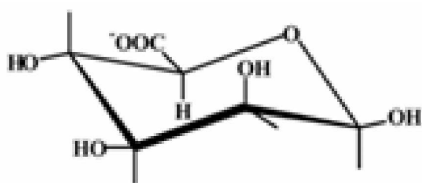
6.4 AZ ALGINÁT ELŐÁLLÍTÁSA

Az alginát egy anionos, lineáris, kétkomponensű polimer; a D-mannuronsav és az L-guluronsav alkotja (6. 2. ábra).

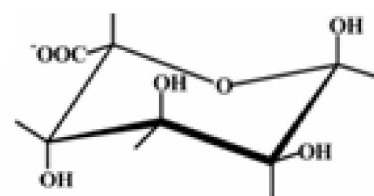
...MMMMM...

...GGGGG...

....GMGMGM...



M: β-D-mannuronsav



G: α-L-guluronsav

6.2. ábra: alginát

Tengeri algák (*Laminaria*, *Macrocystis*, *Ascophyllum* sps.) és baktériumok (*Pseudomonas*, *Azotobacter* sps.) állítják elő. A törzsek instabilitása miatt a bakteriális alginát gyártás csak az elmúlt néhány évben kezdődött el ipari léptékben. A fermentációs technológia során alkalmazott táptalajban a szén : nitrogén arány magas, vagyis a baktériumtenyészet növekedését a nitrogénforrással limitálják.

Az alginát legfontosabb tulajdonsága a **vízszívó képesség**: saját tömegének 250-300-szorosát képes abszorbeálni. Elterjedten használják a papír- és textilgyártás során, vízálló termékek komponenseként, fogászati kezeléseknél helyettesítő anyagként, protézisekben, az élelmiszeriparban levesek és koktélok sűrítésére. Jól ismert vegyipari/biokémiai alkalmazása az alginátnak az enzimek és sejtek **immobilizálása**. Ilyenkor a sejteket/enzim-preparátumot egy kalcium ionot tartalmazó sóoldattal elegyítik, és az elegyet alginát oldatba öntik. A Ca^{2+} ionok és az alginát karboxil csoportjai révén a poliszacharid láncok keresztkötéseket hoznak létre és gél állapotba kerülnek, rögzítve magukban a sejteket/enzimeket.

Az alginát egyik fontos és az alkalmazás szempontjából is jelentős tulajdonsága, hogy a két felépítő monomer aránya döntően megváltoztathatja a polimer karakterét. A magas D-mannuronsav arány elasztikus, míg a magas L-guluronsav arány erős, rigid gélt eredményez. Ehhez adódik még a bakteriális alginát azon jellemzője, hogy a D-mannuronsav monomerhez változó arányban ecetsav szubsztituensek kötődhetnek, ami szintén hatással van a polimer jellemzőire.

6.5 GOMBA EREDETŰ BIOAKTÍV POLISZACHARIDOK ÉS PSP-K

A *Basidiomycota* gombák törzsének (Phylum) talán legismertebb nemzetségét alkotják a csiperke gombák (*Agaricus* sps.). Két fajuk (*A. blazei*, *A. bisporus*) termőtestéből is olyan vízdékony poliszacharidokat (változó szerkezetű béta-glükánokat) sikerült izolálni, melyek ellen-aktivitást mutatnak egyes tumorsejt típusokkal szemben. Hasonló felfedezéseket tettek más bazídiumosgomba nemzetségek (*Amanita* sp., *Agrocybe* sp., *Auricularia* sp.) esetén is. Általánosságban elmondható, hogy számos gomba eredetű poliszacharid és PSP-preparátum a távol-keleti gyógyászatban a tumorelles terápia kiegészítőjeként ismert, és legálisan is beszerezhető a gyógyszertárakban (6. 1. táblázat).

Gombafaj	Szacharid/PSP	Biológiai hatás
<i>Coriolus versicolor</i>	PSP	Tumor- és vírusellenes, gyökfogó
<i>Flammulina velutipes</i>	(1→3)-β-D-glükán	Tumorellenes, immunrendszerstimuláló
<i>Ganoderma lucidum</i>	Poliszacharid	Tumorellenes, gyökfogó
<i>Tricholoma lobayense</i>	Heteroglükán, PSP	Tumorellenes, immunrendszerstimuláló, gyökfogó
<i>Volvariella volvacea</i>	(1→3)-β-D-glükán	Tumorellenes, gyökfogó

6.1. táblázat: Poliszacharidok orvosi alkalmazásai

A szerek hatásmechanizmusa ma még csupán felületesen, a jelenségek leírásának szintjén ismert, ezért túltermeltetésről illetve a túltermelést elősegítő/lehetővé tevő gyártástechnológiáról ezen készítmények esetében nem beszélhetünk.

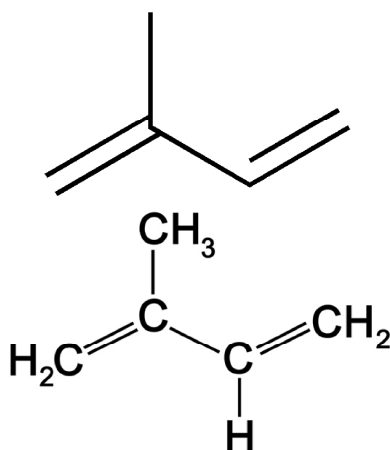
7 Terpenoidok és karotinoidok előállítása

7.1 BEVEZETÉS

A **terpének** a természetes szerves vegyületek egyik legnagyobb és legváltozatosabb halmazát alkotják, az ismert élőlények minden csoportjában (ösbaktériumok, eubaktériumok, gombák, növények, állatok) megtalálhatók. Legismertebb formáik a növényi gyanták és az un. esszenciális („tipikus, jellemző”) növényi olajok. Gyakorlati felhasználása is elsősorban a növényi eredetű terpéneknek ismert (ételízesítők, étrend-kiegészítők, alternatív gyógyászat, parfümök). Szemben a növényi terpének sokszor évszázadokra visszanyúló alkalmazásával, a mikrobiális eredetű, biotechnológiai jelentőségű terpének csak az elmúlt néhány évtizedben jelentek meg a piacokon.

7.2 A TERPÉNEK KÉMIAJA ÉS BIOKÉMIAJA

A terpének kémiai szerkezetének alapja az **izoprén** (2-metil-1,3-butadién; 7. 1. ábra).



7.1. ábra: Az izoprén szerkezeti képlete

Ha az izoprén egységek alkotta terpéneken kémiai módosulás következik be (metilcsoport áthelyeződése ill. eltávolítása, oxidáció, stb.), az így keletkezett vegyületeket **terpenoidok**nak (izoprenoidoknak) nevezzük. Az izoprén egységek kötődhetnek egymáshoz lineárisan illetve gyűrűs struktúrát alkotva. A terpének és a terpenoidok csoportosításának alapja az izoprén (C_5H_8) építőelemek száma; az un. C5-szabály értelmében a vegyületekben lévő szénatomok száma alapesetben az öt többszöröse. Ennek megfelelően léteznek hemi-terpének (egyetlen képviselőjük maga az izoprén) és hemi-terpenoidok (pl. prenol, izo-valeriánsav), továbbá mono-, szeszkvi-, di-, szeszter- és triterpének/terpenoidok (vagyis rendre 2, 3, 4, 5 és 6 izoprén egységből felépülő vegyületek), továbbá 8 izoprénből felépülő tetraterpenoidok

/terpének is. Ezen utóbbi, 40 szénatomos vegyületek a **karotinoidok**. A természetben előfordulnak ennél magasabb izoprén-számú terpének/terpenoidok is.

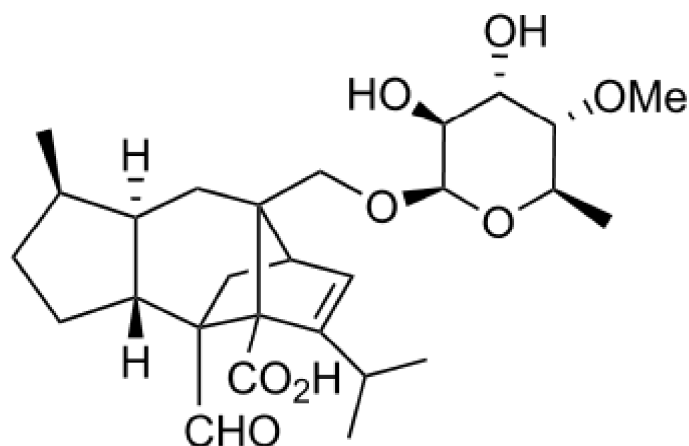
A terpének/terpenoidok bioszintézisében nem az izoprén molekula, hanem aktivált formája, az izopentenil pirofoszfát (IPP) vesz részt. Az IPP két különböző: a mevalonsavas (7. 1. interaktív animáció; http://www.qwiki.com/q/Mevalonate_pathway) és az ettől független, ezért nem-mevalonsavasnak nevezett (7. 2. és 7. 3. interaktív animációk; http://www.qwiki.com/q/Mevalonate_pathway illetve http://en.wikipedia.org/wiki/File:Non-mevalonate_pathway.svg) útvonalakon jöhet létre. Állatokban és gombákban kizárólagosan a mevalonsavas útvonal fordul elő, állati egysejtűekben (*Protozoa*), baktériumokban és növényekben viszont mindkettőre van példa. Kialakulása után az IPP az IPP-izomeráz enzim révén reverzibilisen dimetilallil-pirofoszfáttá (DMAPP) izomerizálódik, és ezzel kialakul az a két köztes molekula, melyek kondenzációs reakciói az összes terpenoid alapváz kialakulásáért felelősek. A DMAPP + IPP kondenzáció geranil-pirofoszfátot (C₁₀) eredményez, mely a monoterpének/terpenoidok alapmolekulája. További IPP-k csatlakozásával farnezil-pirofoszfát (C₁₅) illetve geranilgeranil-pirofoszfát (C₂₀) jön létre, melyekből – további kondenzációval – karotinoidok (C₄₀) is kialakulhatnak. Előanyagként a terpenoidok számos további vegyület bioszintézisében vehetnek részt (pl. szteroidok, szterolok), illetve az **(izo)preniláció**nak nevezett folyamat során fehérjékhez is kötődhetnek, segítve ezzel a sejtmembránhoz rögzülésüket.

7.2.1 Terpenoidok gyakorlati jelentősége

A kereskedelmi forgalomban kapható terpenoidok óriási többsége növényi eredetű. Mivel a növényi sejtek ipari biotechnológiai alkalmazását az 11. fejezetben taglaljuk, itt most csupán a mikrobiális (elsősorban fungális) eredetű terpenoidokról esik szó.

A gombaellenes (**antifungális**) terpenoidok az antibiotikumok fontos típusát alkotják. Szisztémás gombafertőzések tipikusan az immunrendszert legyengítő kezelések (kemoterápia, csontvelő-és szervátültetés, stb.) után alakulnak ki, és gyakran végzetesnek bizonyulnak. A gombák eukarióta jellegéből kifolyólag nehéz rajtuk olyan támadáspontot találni, mely nem jár együtt az egyébként is legyengült szervezet további károsodásával.

A **szordarinok** a legrégebben ismert, gombák által szintetizált antifungális terpenoid család. Szerkezetileg háromgyűrűs diterpén-glikozidok (7. 2. ábra).



7.2. ábra: A szordarin szerkezeti képlete

Számos képviselőjük ismert, ezek egy része csak mérsékelten hatásos, de egyik, 1998-ban izolált változatuk számos humán patogén gombafaj (pl. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*) ellen specifikus gátlást mutatott (kontroll eukarióta – jellemzően nyúl retikulocita – sejtekkel szemben viszont hatástalan volt). Hatásmechanizmusuk szerint a szordarinok fehérjeszintézis gátlók, jelenlétükben a translációs elongációs faktor-2 nem tud leválni a riboszómáról. A gátló mechanizmus tehát alapvetően eltér a legtöbb ismert antifungális antibiotikumétól, melyek tipikusan a gombák sejtmembránjában megtalálható, más eukarióta sejtekből viszont hiányzó ergosterolhoz kötődnek (pl. poliének – amphotericin B, nisztatin, natamicin), vagy annak bioszintézisét gátolják (pl. azolok, allil-aminok). Több szordarin-típusnak is leírták már a kémiai totálszintézisét, és számos kémiai módosítást is elvégeztek az alapmolekulákon. Az így létrejött új félszintetikus alcsaládok legfontosabbik tagja az aza-szordarinok.

Szteroid-jellegű antifungális antibiotikumokat számos, egymástól taxonómiailag távol álló gombafajból (*Geotrichum*, *Aspergillus*, *Favolaschia*, *Neospartorya*, stb.) sikerült izolálni. Hatásmechanizmusukat tekintve a szteroid bioszintézissel interferálnak.

A **β -D-glükán szintetáz gátló** antifungális terpenoidok (pl. ergokonin, aszkoszterozid, arundifungin, enfumafungin) egyik jellemzője, hogy nem a szteroid bioszintézist gátolják. *Candida* és *Aspergillus* fajok ellen is hatásosak.

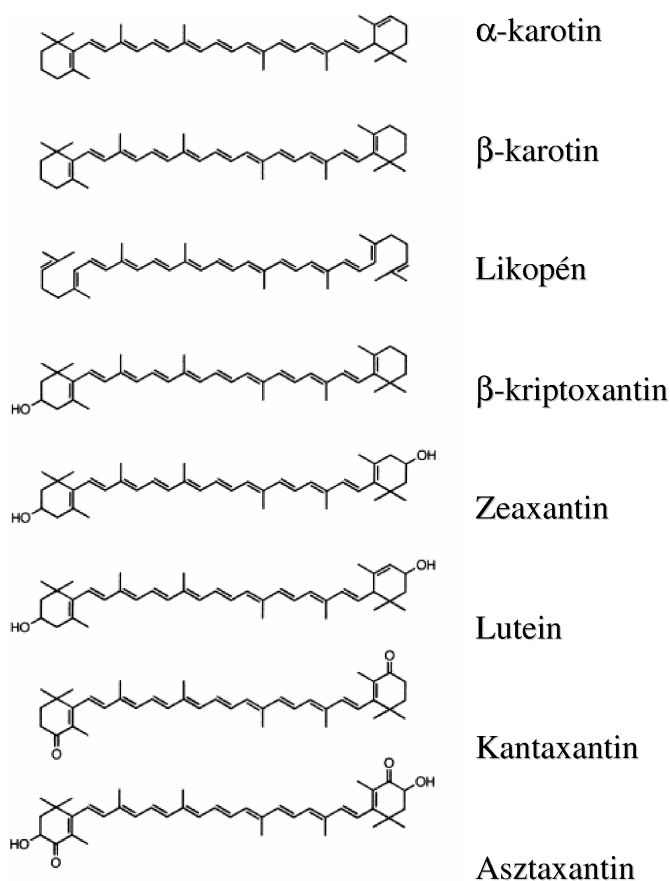
Az **antibakteriális terpenoidok** első képviselője az 1951-ben izolált **pleuromutilin** volt, amit számos további változat izolálása illetve származék előállítására követett. Elsősorban Gram-pozitív baktériumok és mikoplazmák ellen hatásos (a riboszóma peptidil-transzferáz helyére kötődik, ezáltal gátolja a fehérje szintézist).

A **klerocidin** egy szeszkviterpén típusú, a bakteriális DNS-giráz enzimet gátló, Gram-negatív fajok ellen hatásos antibiotikum.

A fentieken túl még számos egyéb bioaktív terpenoidot ismerünk. Vannak közöttük **antivirális** szerek (pl. az influenza ellenes sztachiflin), **antitumor** hatásúak, melyek tipikusan az angiogenezist (a tumorsejtek vérellátását biztosító új véredények kialakítását) gátolják (pl. fumagillin), illetve **immunrendszert stabilizáló** hatóanyagok. Mivel a terpenoidok a szteroid bioszintézis előanyagai, több szerkezeti analógjuk hatékony gátlószere a koleszterin szintézis kulcsenzimeinek, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktáznak illetve a HMG-CoA szintetáznak.

7.2.2 Karotinoidok előállítása

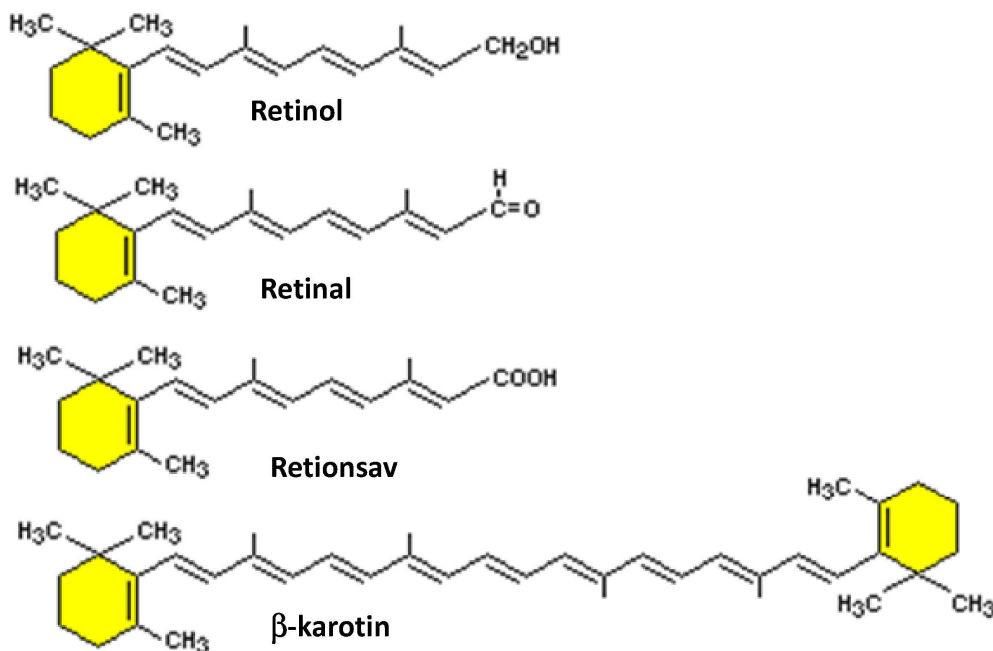
A karotinoidok közé több mint 600 természetes vegyület tartozik. Szerkezetüket tekintve két csoportjuk létezik: a **karotinok** és a **xantofilok**. Előbbiek szénhidrogének, vagyis szén illetve hidrogén atomokon kívül mást nem tartalmaznak, az utóbbiakban oxigén is található (7. 3. ábra).



7.3. ábra: Karotinok szerkezeti képlete

A csoport névadó vegyülete a karotin, mely a sárgarépa (*Daucus carota*) és sok más zöldség/gyümölcs jellegzetes színét adja. Több (α -, β -, γ - és δ) formája ismert; a β -karotin

molekula mindkét végén béta-jonon gyűrű (az ún. béta-gyűrű) található, melynek lebontása során retinal, az A-vitamin egyik formája jön létre (7. 4. ábra).



7.4. ábra: A-vitamin típusok szerkezeti képlete

Az α -karotin molekulának csak az egyik végén található béta-jonon gyűrű, ezért „A-vitamin aktivitása” (A-vitamin formákat létrehozó képessége) kisebb a β -izomerénél.

A karotinoidokat az élelmiszer- és kozmetikai ipar használja. Számos élelmiszer piaci értékének fontos része a jellegzetes szín, amit karotinoidok okoznak (pl. a lazachúsban az asztaxantin, paradicsomban a likopén). Biotechnológiai szempontból legfontosabb típusaikat a 7. 1. táblázat mutatja be.

Termelő faj	Karotinoid	Alkalmazás
<i>Dunaliella salina</i> (alga) <i>Blakeslea trispora</i> (gomba) <i>Sphingomonas sp.</i> (baktérium)	β -karotin	táplálék-kiegészítő (A-vitamin előanyag)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (élesztő) <i>Haematococcus pluvialis</i> (alga)	asztaxantin	Emberi táplálék-kiegészítő (antioxidáns), Takarmány-kiegészítő
<i>Pandalus borealis</i> (tengeri rák)		(haltenyésztés)
<i>Blakeslea trispora</i> (gomba)	likopén	antioxidáns

7.1. táblázat: A legfontosabb karotinoidok

A piacra kerülő **β -karotin** (7. 3. ábra) túlnyomó többségét (kb. 85 %) kémiai úton állítják elő; a két legfontosabb termelő vállalat a holland DSM és a német BASF. A fennmaradó részt biotechnológiai eljárásokkal, baktérium, gomba illetve alga fajok révén termelik.

A *Mucorales* rendbe tartozó járomspórás gombák (pl. *Blakeslea trispora*) β -karotin tartalma a tenyésztési körülményekkel befolyásolható: az un. **kémiai stimuláció** során β -jonon gyűrűt tartalmazó vegyületeket (szerkezeti analógokat) adagolnak a tenyészetbe, és ez β -karotin túltermelésre készíti a sejteket. A fény általi stimuláció (**fotoindukció**) során a karotin bioszintézis génei fokozott mértékben fejeződnek ki, azonban a hatás specifikus a gomba életciklusának meghatározott szakaszaira (jellemzően a növekedés befejeződése és a vegetatív spórák kialakulása közötti időszakra), és a megvilágító fény spektrumára is (csak a kék fény hatásos). Az ellentétes párosodási típusú gombatörzsek jelenléte a tenyészetben szintén fokozza a karotin képződést (**párosodási típus-stimuláció**). A hatást trisporoid típusú, a β -karotinhoz hasonló szerkezetű feromonok váltják ki, melyekkel fokozott termelés érhető el akkor is, ha csak egyféle párosodási típust tartalmazó tenyészetbe adagoljuk őket. Ezt az indukció-típust un. interszexuális heterokarion képzéssel is ki lehet váltani, vagyis olyan törzs létrehozásával, melynek micéliumában mindkét párosodási típus sejtmagja jelen van.

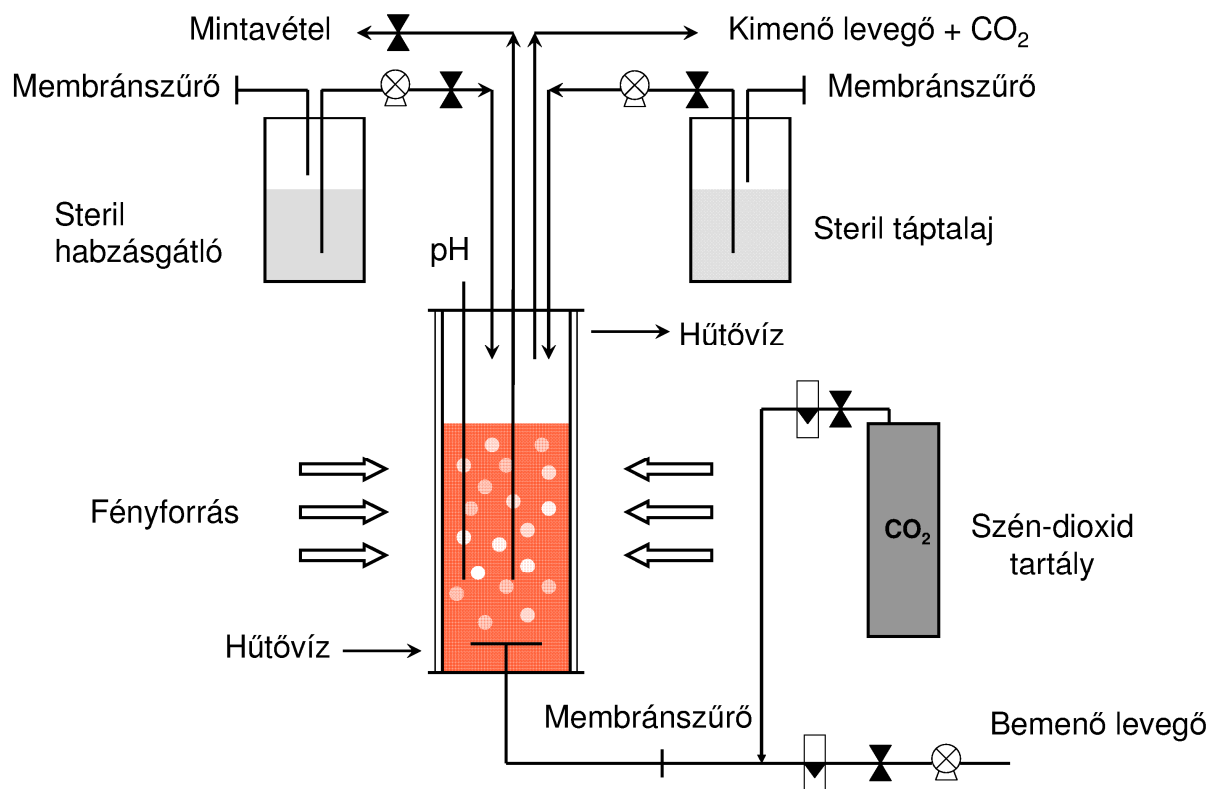
Ipari biotechnológiai szempontból a *Blakeslea sps.* a legjelentősebb β -karotin termelő. A törzsfeljesztés során kialakított variánsok mindkét párosodási típus sejtmagját tartalmazzák, és fokozottan érzékenyek a kémiai aktivátorokra. A fermentációs táptalaj szénhidrogéneket, szénhidrátokat és növényi olajokat is tartalmaz. A legjobban termelő törzsek fermentlevéből kb. 3 g karotin nyerhető ki literenként.

Az **asztaxantin** (7. 3. ábra) a xantofillok közé tartozik; a rózsaszínű állatok (lazac, flamingó, rákok) színét ez a karotinoid okozza. Kémiaiilag a β -karotinból keletkezik oxigén tartalmú funkciós csoportoknak (keto-, hidroxí-) a β -jonon gyűrűbe történő beépülése révén. Az asztaxantin nem tud A-vitaminná (retinollá) alakulni, kedvező élettani hatása antioxidáns és gyökfogó tulajdonságában keresendő. Piacának mérete mintegy 200 millió US\$, kereskedelmi ára kb. 6.000 US\$ / kg. Kémiaiilag könnyen előállítható, de ez az eljárás sztereoiszomerek elegyét eredményezi (az asztaxantinnek két királis központja van és három sztereoiszomer változata létezik). Sok fogyasztó emiatt tudatosan a biológiai illetve biotechnológiai úton előállított terméket preferálja. A termék piacát elsősorban a hal (lazac), rák, húsbaromfi és tojás-termelő üzemek jelentik, de emberi táplálék-kiegészítőként is

alkalmazzák. Érdekes, hogy noha mennyiségileg elhanyagolható, az asztaxantin adalék a lazachús előállítás költségeinek ötödét teszi ki!

Biológiai úton tengeri planktonokból (*Euphausia pacifica*, *E. superba*) és kisméretű rákokból (pl. *Pandalus borealis*) nyerik ki. A termék trigliceridek és asztaxantin folyékony elegye.

A leghatékonyabb biotechnológiai eljárás a *Haematococcus pluvialis* algát hasznosítja. A sejteket klasszikus, kétfázisú fermentáció során először bőséges tápanyag ellátottság mellett nagy sejtsűrűség eléréséig növesztik, majd a második fázisban szén-, nitrogén- és foszfor limitált körülmények között, bőséges (nap)fény expozíció mellett tenyésztik. A tápanyag hiánya stresszválaszt indukál, melynek következménye asztaxantin felhalmozódás lesz. A leszűrt sejtekből szerves oldószerekkel (aceton, majd metanol) extrahálják ki a végterméket (7. 5. ábra).



7.5. ábra: Az astaxanthin gyártás folyamatábrája

Az asztaxantin legrégebbi fermentációs előállítása a *Xanthophyllomyces dendrorhous* (régebbi nevén *Phaffia rhodozyma*) élesztőgomba fajjal történik. A *Blakeslea* fajok β -karotin termelésénél leírt fotoindukció az asztaxantin gyártásánál nem működik, sőt a túlzott megvilágítás még csökkenti is a karotinoid felhalmozódás mértékét. Meghatározott stresszhatások esetén (pl. nitrogén illetve foszfor limitáció, alkohol adagolás, reaktív oxigén formák) azonban a bioszintézis mértéke fokozódik. Az asztaxantin részt vesz a gombasejtek oxidatív

stressz elleni védekezésében, és ez a hatás átadódik az asztaxantin-tartalmú biomasszával táplált állatokra is. A jelenlegi maximális ipari léptékű termelési érték (kb. 300 µg/g élesztőtömeg) kevés ahhoz, hogy piaci értelemben vetélytársa legyen a kémiai szintézisnek. A biotechnológiai eljárásban rejlő potenciál azonban kiemelkedő: optimalizált laboratóriumi körülmények között, hemicellulóz hidrolizátumokat illetve cukornád-szuszpenziót tartalmazó komplex táptalajon a *Xanthophyllomyces* élesztőtörzsek a fenti értéknél közel két nagyságrenddel több asztaxantint termeltek (~ 10 mg/g élesztőtömeg). A technológia léptékének növelése folyamatban van.

A **likopin** (7. 3. ábra) az egészséges táplálkozás egyik felkapott ágense lett az elmúlt években. Nevét a paradicsom (*Solanum lycopersicum*) jellemző színanyagaként kapta. A likopin a β-karotin bioszintézisének utolsó köztese; a β-karotin gyűrűképzéssel (ciklizáció) keletkezik belőle. A likopinnek A-vitamin aktivitása ebből következően nincs (béta-gyűrű hiányában nem képződhet belőle A-vitamin), antioxidáns aktivitása viszont jelentős. Hatását erősíti, hogy a szervezetben képes felhalmozódni. Elsősorban növényekből nyerik ki (*Momordica cochinchinensis*, paradicsom, görögdinnye, grape-fruit, papaya). Fermentációs biotechnológiai úton bármely eddig említett mikroorganizmust lehet likopén termelésre használni; a technológia legfontosabb eleme a cikláz enzimaktivitás gátlása.

Végezetül érdemes megemlíteni, hogy az elmúlt években ígéretes laboratóriumi eredmények láttak napvilágot heterológ karotinoid termeléssel kapcsolatban, *Saccharomyces* és *Candida sp.* élesztő illetve *E. coli* és *Erwinia sp.* baktérium platformokat alkalmazva (7. 6. ábra – http://openwetware.org/wiki/Image:Beta_carotene_strains.jpg). A stratégia előnye, hogy olyan mikroorganizmusokat használhatunk fel a termelésre, amelyek ipari fermentációja már jól ismert és relatíve olcsó.

8 Vitaminok mikrobiális előállítása

8.1 BEVEZETÉS

Definíció szerint a vitaminok olyan szerves molekulák, melyeket az emlősök (köztük az ember) nem tudnak előállítani, viszont kis mennyiségben nélkülözhetetlenek az élethez. Nem tartoznak ide pl. az esszenciális aminosavak és zsírsavak (ezekből viszonylag nagyobb mennyiségre van a szervezetnek szüksége), a nyomelemek (mivel nem szerves molekulák) és az egészségre hasznos étrend-kiegészítők sem (mivel nem esszenciálisak). A vitamin definíció a fogadó szervezetnek is függvénye: pl. az aszkorbinsav az ember szempontjából vitamin (C-vitamin), sok más, az aszkorbinsavat előállítani tudó élőlény szempontjából viszont nem. Mivel a vitaminokat nem kémiai szerkezetük, hanem biológiai hatásuk alapján csoportosítjuk, egy adott vitamin több, egymáshoz hasonló (de nem megegyező), egymásba átalakulni tudó vegyületet is jelenthet; ezeket *vitamerek*nek nevezzük. A fentieket figyelembe véve jelenleg 13 emlős (humán) vitamint különböztetünk meg (8. 1. táblázat); közülük négy **zsírdékony** (A-, D-, E-, K-vitamin), kilenc pedig **vízoldékony** (a nyolcféle B-vitamin és a C-vitamin).

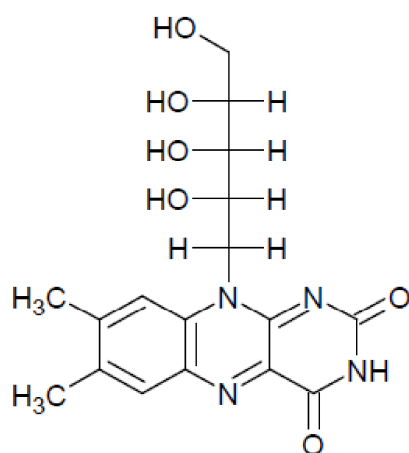
Generikus név	Vitamerek kémiai nevei	Előállítás módja	Termelt mennyiség
A-vitamin	retinol, retinal, β -karotin	kémiai, extrakciós, biotechnológiai	~ 3.000 t/év
B ₁ -vitamin	tiamin	kémiai	~ 5.000 t/év
B ₂ -vitamin	riboflavin	biotechnológiai	~ 7.000 t/év
B ₃ -vitamin	niacin (nikotinsav), niacinamid (nikotinsav-amid)	kevert (kémiai és biológiai lépések)	~ 40.000 t/év
B ₅ -vitamin	pantoténsav	kevert (kémiai és biológiai lépések)	~ 10.000 t/év
B ₆ -vitamin	piridoxin, piridoxamin, piridoxál	kémiai	~ 3.000 t/év
B ₇ -vitamin	biotin	kémiai	~ 40 t/év
B ₉ -vitamin	fólsav	kémiai	~ 500 t/év
B ₁₂ -vitamin	metil-, hidroxí-, adenzin-, ciano-kobalamin	biotechnológiai	~ 35 t/év
C-vitamin	L-aszkorbinsav	kevert (kémiai és biológiai lépések)	~ 80.000 t/év
D-vitamin	kalciferol	kémiai, extrakciós	~ 6.000 t/év
E-vitamin	α -tokoferol, tokotrienol	kémiai, extrakciós	~ 30.000 t/év
K-vitamin	fillokinon (K ₁ -vitamin), menakinon (K ₂ -vitamin)	kémiai, extrakciós	~ 5 t/év ~ 500 t/év

8.1. táblázat: humán vitaminok

Többségüket ipari körülmények között, biotechnológiai és/vagy kémiai úton állítják elő. Az éves termelés a néhány száz t/évtől (B₁₂-vitamin) a 80.000 t/évig (C-vitamin) terjed (8. 1. táblázat). Az A-vitamin biotechnológiai úton történő előállítását tankönyvünk 7. fejezetében tárgyaltuk.

8.2 A RIBOFLAVIN (B₂-VITAMIN) ELŐÁLLÍTÁSA

A szilárd formában sárga színű riboflavin (8. 1. ábra; *flavus* = sárga latinul) a flavin mononukleotid (FMN) és a flavin adenin dinukleotid (FAD) koenzimek előanyaga, melyek elektronhordozóként alapvető szerepet játszanak a sejtek anyagcseréjében.

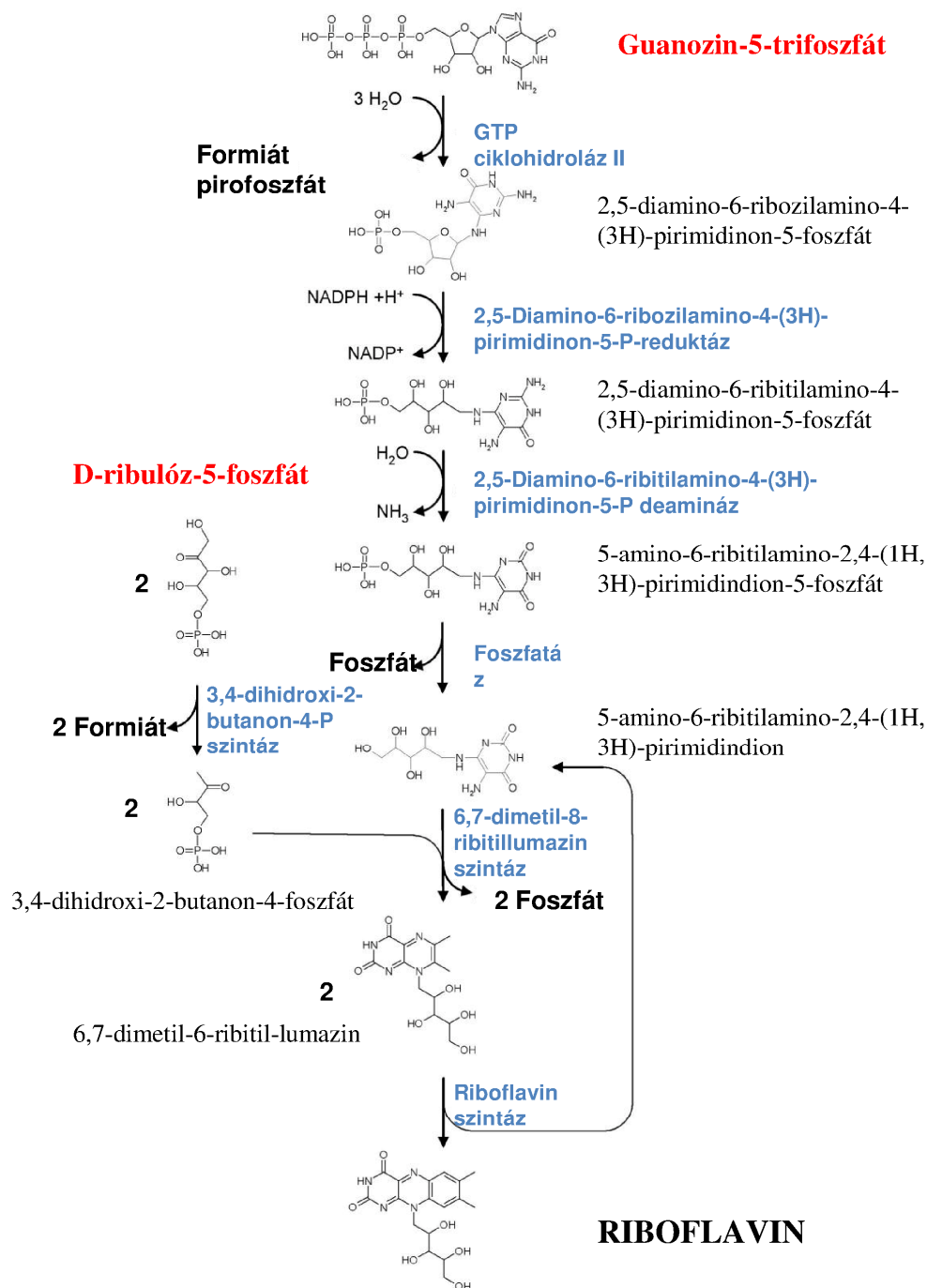


8.1. ábra: A riboflavin szerkezeti képlete

Magasabb rendű eukarióta szervezetek nem tudják előállítani. Hiányában bőr- és izomgyengeség, immun- és idegrendszeri zavarok alakulhatnak ki. A riboflavint elsősorban (mintegy 70 % arányban) takarmányozási, másodsorban élelmezési és gyógyászati célokból gyártják. Mivel a szervezetbe került fölös mennyiség a vizelettel kiürül, egészségügyi kockázat nélkül adható étrend-kiegészítőként, sőt számos országban ételszínezékként (E 101) is alkalmazzák.

A riboflavin gyártás jó példája a biotechnológia vegyiparon belüli térhódításának. A XX. század első felében kizárólag kémiai úton állították elő, majd évtizedekig a biológiai és kémiai eljárás egymás mellett, váltakozó dominanciával létezett. Ma riboflavint kizárólag biotechnológia úton gyártanak; a fő termelők a svájci Hoffman-La Roche, a német BASF, az amerikai ADM és a japán Takeda. Az előállított mennyiség kb. 7.000 t/év. A biológiai előállítás során fonalas gombákat (*Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*), élesztőket (*Candida flaueri*, *Candida famata*) és baktériumokat (*Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*) egyaránt alkalmaztak. Ma ipari léptékben csak a *B. subtilis* és az *A. gossypii* alapú biotechnológia működik, és valószínűsíthető, hogy a sokkal jobb produktivitás miatt

hamarosan az *A. gossypii* lesz az egyetlen ipari léptékben használt termelő organizmus. Az növényi patogén *A. gossypii* gombatorzset 1926-ban izolálták, mint olyan természetes túltermelőt, amely kb. 100 mg /g száraztömeg riboflavint volt képes előállítani. A random mutagenézisen alapuló időszakot követően az elmúlt 20 évben a molekuláris biológiai módszerek széles tárháza (irányított transzformáció, transzpozon-függő mutagenézis, stb.) nyílt meg a törzsfeljesztéssel foglalkozók előtt. A gomba genom szekvenciája ismert és publikus, így nem meglepő, hogy a bioszintézis összes enzime és az őket kódoló gének is ismertek (8. 2. ábra).



8.2. ábra: A riboflavin bioszintézise

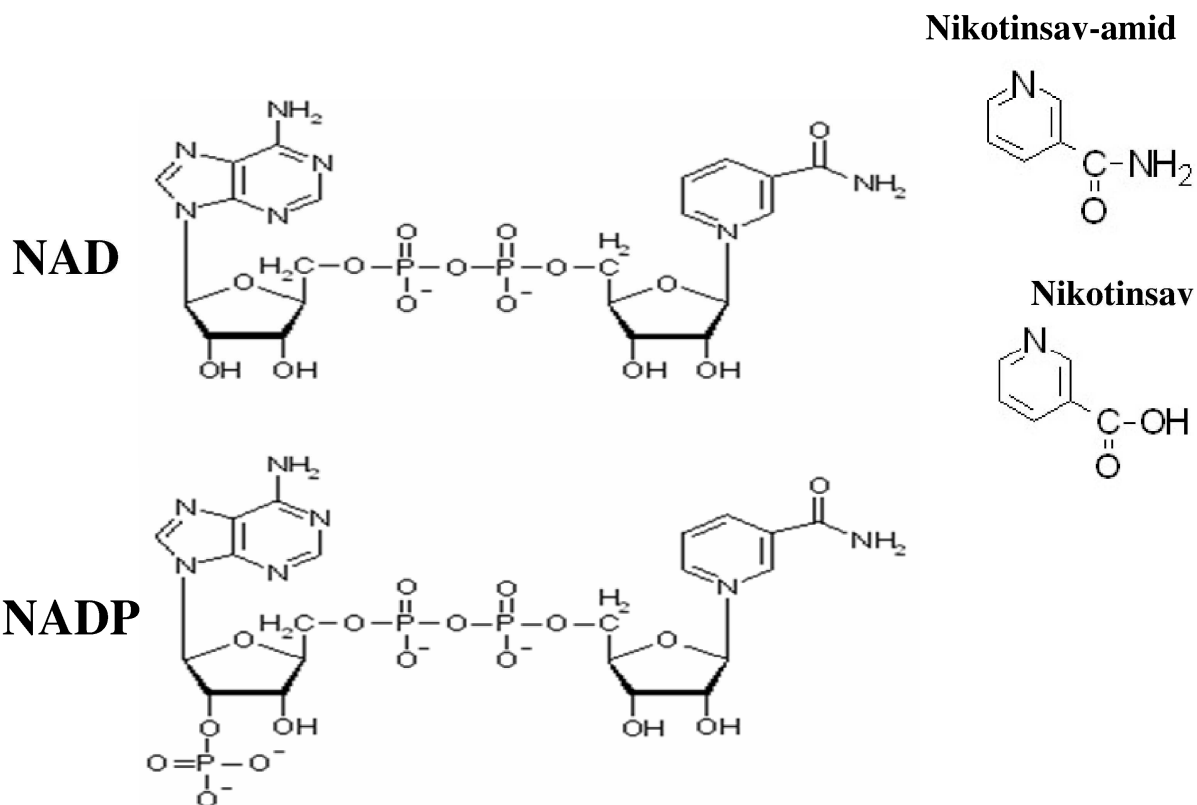
Az aerob, süllyesztett *A. gossypii* fermentáció során növényi olajat, továbbá melaszt használnak szénforrásként. A növényi olaj használatát elősegíti, hogy a gomba erőteljes extracelluláris lipáz aktivitással rendelkezik, így a trigliceridekből gyorsan szabad zsírsavakat tud felszabadítani, melyeket a gomba könnyen fel tud venni. A keletkező riboflavin jelentős része sejten belül marad, ezért a fermentáció végén a tenyészetet felmelegítik, elősegítve a sejtek lízisét és a riboflavin felszabadulását. A visszahűtés lassan történik, így a riboflavin ki tud kristályosodni a fermentlében. A kristályokat a fermentlétől dekantálással választják el. A kristályokat ezután savas közegben újra oldatba viszik, felmelegítik, majd visszahűtik, amivel jelentős tisztulást érnek el. Noha a termelő törzseket géntechnológiai úton alakították ki, csak homológ gének vannak jelen magasabb kópiaszámban, így a sejtmaradványok ellenére a termék felhasználható takarmányozási célokra.

8.3 NIKOTINSAV ÉS NIKOTINSAV-AMIDOK (NIKOTINÁTOK; B₃-VITAMIN) ELŐÁLLÍTÁSA

Ez a vegyület-csoport jó példa a vitamerek fogalmára: több, hatásukat tekintve hasonló, szerkezetileg egymásból levezethető molekulát is B₃-vitaminnak nevezünk. Két legfontosabb képviselőjük a nikotinsav (piridin-3-karbonsav) és a nikotinsavamid. Mindkét vegyület *in vivo* NAD⁺/NADH- illetve NADP⁺/NADPH-vá alakulhat, így lényegében a sejtek anyagcseréjének minden aspektusához kapcsolódhatnak. Hiányukban a pellagra nevű betegség lép fel, mely bőrfelszíni sebekkel, vérzéssel, hasmenéssel, demenciával jellemezhető és kezelés hiányában halálos is lehet. A B₃- viszonylag nagy mennyiségben gyártott vitamin (a fő termelők a svájci Lonza, illetve a német Degussa és BASF), mivel humán gyógyászati felhasználása mellett főleg takarmány-javítóként használják a nagyüzemi állattartás során.

A nikotinsav gyártás alapanyaga az 5-etil-2-metilpiridin és a 3-cianopiridin. Az utóbbit a *Rhodococcus rhodochrous* baktérium (illetve a belőle izolált nitriláz enzim) szinte sztöchiometrikus arányban képes nikotinsavvá konvertálni. Nikotinsav-amidot ugyancsak 3-cianopiridinből, a nitril hidratáz révén, víz belépésével nyerhetünk. Az enzim túltermeltetése (melyhez a leggyakoribb platform szintén a *R. rhodochrous* baktérium) azt eredményezi, hogy 1 L vízben feloldott 1.230 g 3-cianopiridinből 1.460 g nikotinamid kristályt nyerhető, melléktermék keletkezése nélkül.

A nikotinsav-amid két, élettani szempontból is alapvetően fontos származéka a nikotinsavamid-adenin dinukleotid (NAD) és ennek foszforilált formája, a NADP (8. 3. ábra).



8.3. ábra: Nikotinátok szerkezeti képlete

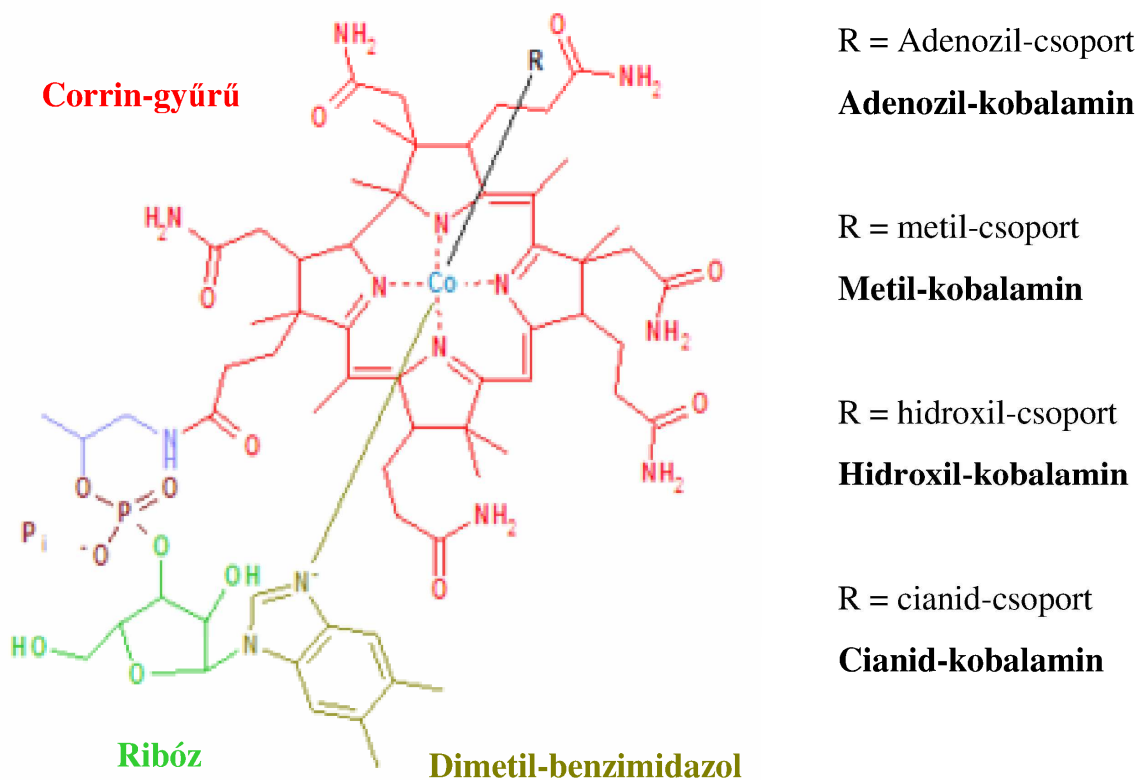
Mindkettő az analitikai kémia és a molekuláris biológia elterjedten használt finomvegyszere, továbbá a ketoreduktázt/alkohol dehidrogenázt alkalmazó biokatalitikus eljárásokban is nagy mennyiségben alkalmazzák őket. Régebbi módszer szerint élesztő (pl. *Saccharomyces cerevisiae*) sejtjeiből extrakcióval nyerik ki, de a korszerűbb biotechnológiai eljárások révén lehetőség nyílt a fermentációs gyártásra is. Ennek során a két kiindulási vegyületet (nikotinsav-amid és adenin) *Corynebacterium ammoniagenes* baktérium tenyésztéséhez adagolják. Az optimalizált technológia eredményeként a sejtek néhány g/L-es koncentrációban halmozzák fel a NAD^+ -ot a fermentációban. A redukált formák (NADH / NADPH) kialakulása kémiai valamint enzimes reakció eredményeként egyaránt történhet; az utóbbi esetben bakteriális illetve fungális eredetű dehidrogenázokat használnak.

8.4 A CIANOKOBALAMIN (B_{12} -VITAMIN) ELŐÁLLÍTÁSA

A B_{12} -vitamin két Nobel-díjjal is kitüntetett története az 1920-as években kezdődött, amikor az amerikai George Whipple megfigyelte, majd pár évvel később a szintén amerikai Minot és Murphy bebizonyította, hogy az addig gyógyíthatatlannak hitt betegség, a vészes vérszegénység (anaemia perniciosa) nyers májat extrém (300-400 g/nap) mennyiségben tartalmazó diétával kezelhető (orvosi Nobel-díj, 1934). A májban lévő vészes vérszegénység-

ellenes hatóanyagot azonban csak a II. világháború utáni években sikerült izolálni az amerikai Merck illetve a brit Glaxo gyógyszergyárak kutatóinak. A vöröses színű kristályos anyagot B₁₂-vitaminnak nevezték el. Később további származékokat izoláltak, majd a brit Dorothy Mary Hodgin vezette csoportnak sikerült a teljes molekulaszervezetet is meghatározni (kémiai Nobel-díj, 1964). Az 1970-es évek elejére a B₁₂-vitamin kémiai totálszintézisét is elvégezték.

A B₁₂-vitamin elnevezést – helytelenül – az összes kobalamin típusú (vagyis kobalt iont tartalmazó vitamer hatású) vegyületre használni szokták. Definíció szerint azonban a B₁₂-vitamin neve ciano-kobalamin, ami az ipari előállítás végterméke. A biológia szintézis során hidroxil-kobalamin, metil-kobalamin és adenzil-kobalamin (B₁₂-koenzim) jöhet létre, vagyis a sejtekben ezek a kobalamin-formák fordulnak elő. Ismerünk un. pseudo-B₁₂-vitaminokat is, melyek szerkezetüket tekintve hasonlóak a kobalaminokhoz, a klinikai gyakorlatban használt immunokémiai kimutatás során is pozitív reakciót adnak, biológiai hatásuk azonban nincs. Az egyes származékok pontos szerkezetét, illetve a köztük lévő különbséget a 8. 4. ábra mutatja.



8.4. ábra: Kobalaminok szerkezeti képlete

A B₁₂-vitamint csak néhány *Eu-* illetve *Archaea* baktérium képes előállítani; az állatok és a protisták a táplálékkal veszik fel, míg a növények és gombák anyagcseréje jelen tudásunk szerint B₁₂-független. Az állatok és az ember esetében két enzim: a metilmalonil CoA mutáz és a metionin szintáz működéséhez szükséges. Az adenzil-kobalamin függő metilmalonil CoA mutáz működésének hiánya a propionyl-CoA lebontását függeszti fel, melynek két

súlyos következménye is van: egyfelől a metilmalonil-CoA feldúsul, emiatt szubsztrátuma lesz egy hidroláz enzimnek, mely lehasítja róla -CoA csoportot, a szabad metilmalonilsav pedig a sejten belül acidózist okoz. Másfelől, a propionyl-CoA intracelluláris koncentrációja is megemelkedik, így szubsztrátumává válik a citrát szintáznak, mely ennek megfelelően oxálecetsavval kondenzálja. Az így keletkező 2-metil-citrát pedig sejtméreg, az akonitáz enzim gátlószere.

A metionin szintáz metil-kobalamin függő enzim, szerepe a homocisztein metilezése, melyhez metildonorként 5-metil-tetrahidrofolátot használ. B₁₂-vitamin hiányában az enzim aktivitása lecsökken, az 5-metil-tetrahidrofolát koncentrációja megnő, ezzel párhuzamosan a szabad tetrahidrofolát szint leesik. Ennek következtében a DNS-szintézis károsul (metilfolát-csapda). A metionin szintáz enzimaktivitás hiányában lép fel a megaloblasztikus anémia nevű betegség. További súlyos következmény lehet a homocisztein koncentráció megemelkedése, mely kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához vezethet (ezek tünetegyüttesét nevezik vészes vérszegénységnek, ami egy autoimmun betegség, mely a B₁₂-vitamin bélből történő felszívódásának elmaradását eredményezi). Említést érdemel, hogy maga a metionin szintézis jellemzően nem esik vissza B₁₂-vitamin hiányában, mivel a B₁₂-független betain-homocisztein metiltransferáz enzim át tudja venni a metionin szintáz szerepét.

Mivel a B₁₂-vitamin bonyolult szerkezetét több, mint 70 lépéses kémiai szintézissel lehet csak létrehozni, nem meglepő, hogy a vegyület gyártása kizárólag biotechnológiai úton, baktériumok (*Propionibacterium* és *Pseudomonas* nemzetségek egyes fajai) révén történik.

A B₁₂-vitamin bioszintézise alapvetően kétféleképpen: oxigéntől független és oxigén függő módon mehet végbe; a jelenség a bioszintézisre képes baktériumfajok anyagcseréjét tükrözi. Az egyik jelentős ipari termelő, a *Propionibacterium freudenreichii* mikroaerofil, ezért a B₁₂-vitamin gyártásához közel anaerob körülményeket kell számára teremteni. A B₁₂-vitamin molekula egyik része, a dimetil-benzimidazol gyűrű (DMBI) bioszintézise viszont oxigénigényes, ezért a fermentációs folyamat két részre osztható. Az első 3 nap során anaerob körülményeket biztosítanak, ez alatt a B₁₂-vitamin DMBI-nélküli része, az ún. kobamid váz jön létre. A következő 1-3 nap során enyhe levegőztetés mellett a tenyészet kialakítja a DMBI-csoportot és a kobamidhez kapcsolja. A kémhatást mindvégig semleges értéken kell tartani, amit megnehezít a bioszintézis során keletkező, nagy mennyiségű propionsav. A másik, ipari felhasználás szempontjából jelentős organizmus, a *Pseudomonas denitrificans* viszont aerob, így a fermentáció végig oxigén jelenlétében történik. Időtartama rövidebb a *Propionibacterium*-alapú fermentációnál (2-3 nap); a kémhatás pH 7 körül tartása itt is fontos technológiai szempont.

Mivel a teljes bioszintézis sok lépésből áll, ezért időben is hosszú folyamat, sokszor építőelemeket (pl. kobalt ionok, glicin, δ -aminolevulánsav, de akár komplett DMBI) juttatnak a tápközegbe, felgyorsítva ezzel a gyártás menetét. A legmagasabb ismert termelési érték 300 mg/L fermentlé körül van (vessük ezt össze a mikrobiális karbonsavak, enzimek, aminosavak > 150 g/L-t meghaladó végső titerével!).

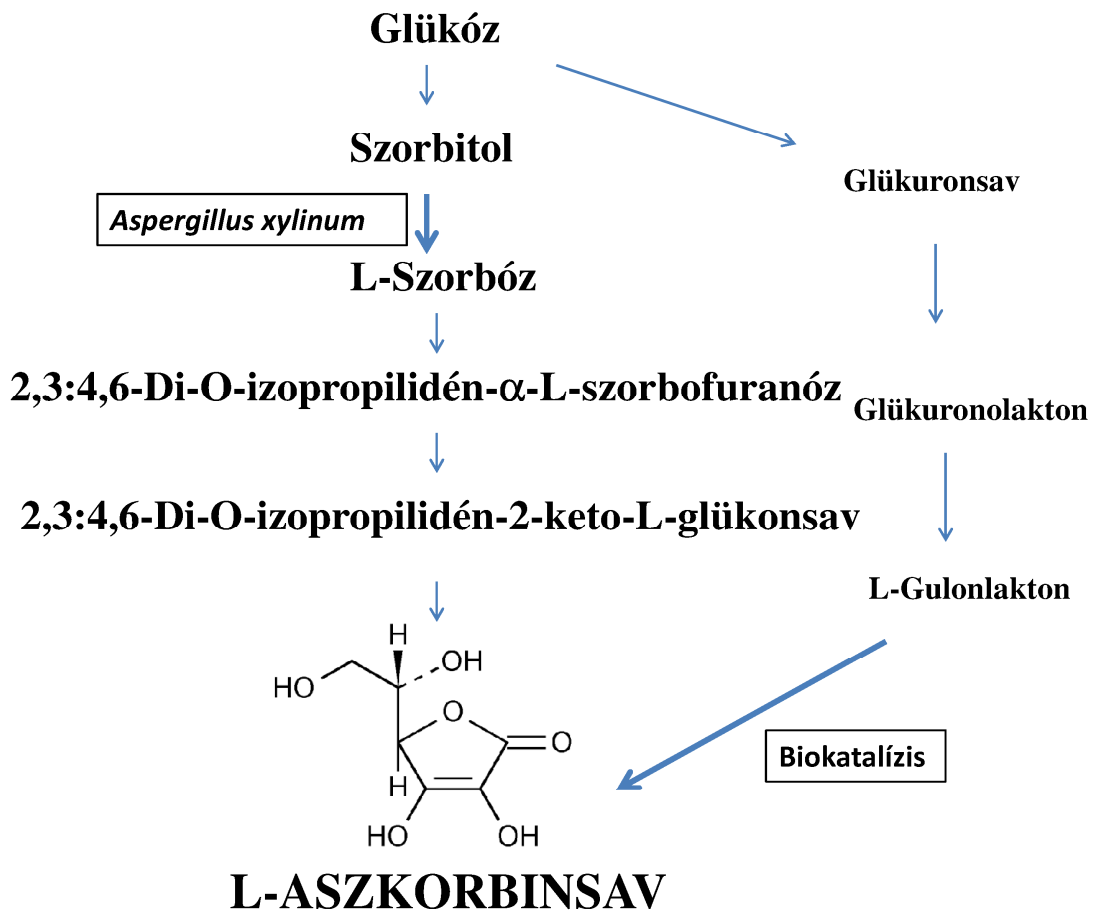
A B₁₂-vitamin kinyerésének első lépése a teljes fermentlé felforralása 80-120 °C-ra; ez a hőmérséklet egyrészt inaktiválja a baktériumokat, másrészt roncsolja is a sejteket, ezzel az intracelluláris végtermék hozzáférhetővé válik. A forró szuszpenzióhoz cianid ionokat vagy tio-cianátot (rodanid) adagolnak. A cianid csoport erősebben kötődik a B₁₂-molekula vázához a többi ismert szubsztituensnél (adenozil-, metil-, hidroxil-), így a vegyület stabilitása megnő. A fermentlevet közvetlenül, vagy cink-hidroxidos kezelést követően leszűrik, majd a B₁₂-vitamint tanninsav vagy krezol (metil-fenol) adagolása révén kicsapják és csapadékot szűrik. Az így kapott végtermék kb. 80 %-os tisztaságú és állati takarmányként használható. További szerves extrakciós és/vagy ioncserés tisztítási lépéseket követően a B₁₂-vitamin emberi felhasználásra is alkalmassá válik.

Noha jelenleg Magyarországon nem folyik B₁₂-vitamin előállítás, meg szeretnénk említeni, hogy a budapesti Richter Gedeon Vegyészeti Gyár NyRt. (akkori nevén: Kőbányai Gyógyszerárugyár) az 1950-as évek végétől közel 40 éven át jelentős világpiaci szereplőnek számított a B₁₂-vitamin gyártása terén, köszönhetően a soroksári szennyvíztisztító iszapjából izolált, kobalamin-függő metanogén őss-(*Archaea*-) baktériumokat (pl. *Methanobacter omelianski*) magas arányban tartalmazó baktérium-konzorciumra épülő, félfolyamatos gyártástechnológiának.

8.5 AZ L-ASZKORBINSAV (C-VITAMIN) ELŐÁLLÍTÁSA

Az aszkorbinsavat (8. 5. ábra) Szent-Györgyi Albert szegedi pirosparikából, 1928-ban izolálta. Mivel reverzibilisen dehidro-L-aszkorbinsavvá képes oxidálódni, a két vegyület a sejtben redox párt képez. Élettani hatásának alapja számos enzim, köztük a vastartalmú dioxygenázok és a réztartalmú mono-oxigenázok stimulálása. Az aszkorbinsav klasszikus hiánytünete, a skorbut is ezen enzimek lecsökkent aktivitásával, majd a kollagén bioszintézis visszaesésével/leállításával magyarázható. Az aszkorbinsav a fentiekén túl védi a szervezetet a reaktív oxigénformák és a karcinogén nitroso-aminok kialakulásától, és alapvető szerepe van a vas felvételében is. Mivel toxicitása minimális, az élelmiszer- illetve gyógyszeripar jelentős piacot (> 600 M US\$) jelent a gyártóknak, mely évente kb. 3-4 százalékkal növekszik.

Az aszkorbinsavat négy szerves kémiai és egy mikrobiológiai-transzformációs lépés kombinációjával állítják elő, melyeket együtt Reichstein-szintézisnek hívunk (8. 5. ábra).



8.5. ábra: Az aszkorbinsav és a Reichstein-szintézis

A folyamat D-glükózból indul ki: az egyes szénatomon redukció, az ötös és hatos szénatomokon oxidáció történik, a kettes, hármas és négyes szénatomok kiralitása változatlan marad (2-keto-L-gulonsav). Az utolsó lépés a 2-keto-L-gulonsav γ -lakton gyűrűvé záródása víz kilépése mellett. A biotechnológiai lépés jelentősége a folyamat harmadik köztesének (L-szorbóz) kialakításában van; a sztereospecifikus katalízist csak enzimes úton lehet végrehajtani. Az D-szorbitol \rightarrow L-szorbóz biotranszformációt az *Acetobacter xylinum* baktériumfaj hajtja végre, nagy térfogatú aerob fermentáció során.

Noha a Reichstein-szintézist 1935-ben szabadalmaztatták, az L-aszkorbinsavat ipari léptékben a mai napig ezzel az eljárással állítják elő. Néhány, a *Chlorella* nemzetségbe tartozó mikroalga faj képes D-glükózból közvetlenül L-aszkorbinsavat előállítani, de a termékhozam alacsony értéke miatt az eljárás nem versenyképes a Reichstein-szintézissel. A kémiai lépések számának csökkentése is életképes stratégia; az egyik ilyen megoldás a 2-keto-L-gulonsav biotechnológiai előállítása L-szorbózból, *Bacillus megatherium* illetve *Pseudogluconobacter saccharoetogenes* baktériumfajok biokonverziós aktivitását felhasználva.

9 Mikrobiális olajok (SCO) előállítása

9.1 BEVEZETÉS

A **glicerolipidek** (a glicerol zsírsav-észterei) és a **glicero-fosfolipidek** (ahol az egyik észterező zsírsav helyén foszfát található, melyhez jellemzően egy további molekula kötődik) alapvetően fontos alkotórészei az élő sejteknek. Baktériumokban az észterező zsírsav kémiai sokféle: alifás, aliciklusos, aromás, továbbá telített és változó mértékben telítetlen, ezen utóbbin belül *cis*- illetve *trans*-szerkezetű kettős kötést tartalmazó is lehet (*cis*-kötésről akkor beszélünk, amikor a kettős kötésben részt vevő szénatomokhoz kötődő hidrogénatomok a kettős kötés azonos, *trans*-kötésről pedig, ha az ellentétes oldalán vannak). Az eukarióta sejtek azonban csak egyenes láncú, *cis*-kettős kötést tartalmazó zsírsavat tudnak szintetizálni, az ettől eltérő szerkezetű zsírsav-lipidek nem részei az anyagcserének. Értelemszerűen az emberi fogyasztásra és állati takarmányozásra iparilag előállított zsírsav-lipidek („olajok”) mind eukarióta eredetűek.

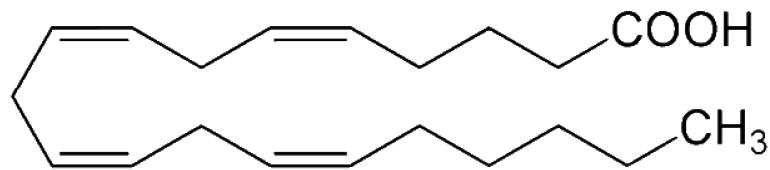
A baktériumok tartalék tápanyagként jellemzően poliszacharidokat hoznak létre (pl. dextrán, xantán, alginát – lásd 9. fejezet), zsírsavaik pedig fosfolipidek alkotóiként vannak jelen a sejtekben. Az eukarióta mikroorganizmusok egy csoportja ezzel szemben képes nagy mennyiségű **triacil-glicerolt** intracelluláris tartalék tápanyagként felhalmozni. Néhány faj a felhalmozásban extrém, a sejtömeg 75 %-át kitevő értéket érhet el; ezeket **olajtermelők**nek nevezzük.

9.2 A ZSÍRSAVAK KÉMIÁJA ÉS BIOKÉMIÁJA

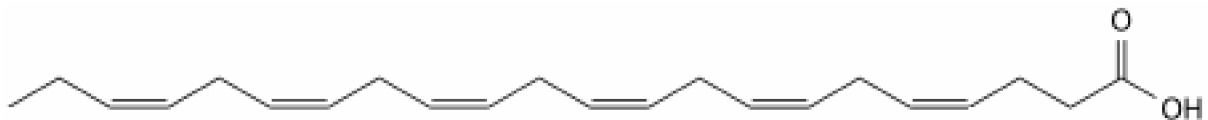
A zsírsavak és általában a lipidek nevezéktana a szerves/biokémia sok félreértésre okot adó területe. A triviális illetve szisztematikus nevek mellett egyre inkább tért hódít az un. numerikus megnevezés, ahol két, kettősponttal elválasztott szám (C:D) közül az első a zsírsav szénláncában lévő szénatomok (**C**arbon), a második a kettős kötések (**D**ouble bond) számát mutatja (pl. 18:3). Mivel ez az elnevezés nem teljesen specifikus, sokszor egy „ ω -x” jelzést is megadnak hozzá, ami az utolsó kettős kötés helyét jelzi a láncvégi metilcsoporttól számolva (ennek szénatomját hívjuk ω -szénatomnak). Az eukarióta zsírsav-lipidek szénláncában a kettős kötések majdnem mindig három szénatomonként követik egymást, ami másképpen fogalmazva azt jelenti, hogy a kettős kötésben lévő egységeket (-CH=CH-) egy metilén csoport (-CH₂-) választja el. Ebből következik, hogy elég az utolsó kettős kötés pozícióját

megadni, mivel abból a többi helyzete meghatározható. Minél hosszabb egy zsírsav, és minél kevesebb kettős kötést tartalmaz, a belőle kialakuló lipid annál magasabb olvadáspontú, vagyis annál rigidebb. Az állati eredetű, szobahőmérsékleten szilárd **zsírok** esetén hosszú, telített zsírsavak észterezik a glicerolt, a növényi eredetű, szobahőmérsékleten folyékony **olajokban** az átlagosan rövidebb zsírsavakban számos kettős kötés fordul elő; ezeket **többszörösen telítetlen zsírsavaknak** nevezzük.

A zsírsavak a sejtben túlnyomórészt a tartalék-tápanyagként szolgáló **triacil-glicerol** illetve a biológiai membránok alapvázát alkotó **glicero-fosfolipid** formájában fordulnak elő. A tároló/védő illetve strukturális funkció mellett harmadik fontos élettani szerepük, hogy kiinduló molekulái néhány speciális, a **jelátvitelben** szerepet játszó lipidnek (pl. leukotriének prosztaglandinok). Ezek a lipidek fehérjékhez, receptorokhoz képesek kötődni, s ezzel olyan sejtszintű folyamatokat szabályoznak, melyeknek komoly fejlődéstani illetve egészségügyi vonatkozásai lehetnek (pl. idegrendszer érési folyamatai). Az idegszövet fosfolipidjeiben az arachidonsav (20:4 ω -6; ARA; 9. 1. ábra) és a dokozahehexánsav (22:6 ω -3; DHA; 9. 2. ábra) a két leggyakoribb többszörösen telítetlen zsírsav; az anyatej is relatíve nagy mennyiségben tartalmazza őket.



9.1. ábra: arachidonsav



9.2. ábra: dokozahehexánsav

9.3 AZ SCO ELŐÁLLÍTÁS TECHNOLÓGIÁJA

Noha a mikrobiális olajok potenciális ipari jelentőségét régen felismerték, sőt a II. világháború alatt Németországban próbálkoztak is nép-élelmezési célú olaj-előállítással a nehezen beszerezhető növényi olajok alternatívájaként, az ipari biotechnológia valós piaccal bíró termékei közé csak az elmúlt 30 évben kerültek be. A mikrobiális proteingyártás (Single Cell Protein, SCP) analógiájára **SCO**-nak (**S**ingle **C**ell **O**il) nevezett termékcsalád az előállítás (fermentáció) költségei miatt ugyanis alaphelyzetben versenyképtelen a növényi és állati (hal) olajokkal. A fermentációhoz növényi eredetű szénforrást használnak, vagyis cukortartalmú

növényt (pl. cukorrépa) kell termesztetni ahhoz, hogy a belőle kinyert cukrot kb. 20 %-os konverzióval, drága műszaki környezetben olajjá alakíthassuk. Ugyanekkora szántóföldön olajtartalmú növényt (pl. napraforgó) természetve ezt az olaj-mennyiséget sokkal olcsóbban előállíthatjuk. A szénforrásként szén-dioxidot, energiaforrásként pedig (nap)fényt használó fotoszintetizáló szervezetek (pl. mikroszkópikus fototróf algák) SCO-termelésben történő felhasználása is zsákutcának bizonyult, elsősorban az alacsony elérhető biomassza miatt. Az utóbbi évek látványos sikerei alapvetően annak köszönhetőek, hogy az SCO-gyártók speciális, prémiumkategóriás piacokat céloztak meg. Nem általánosságban olajat, hanem kémiaiilag definiált, más (nem-mikrobiális) forrásból nehezen beszerezhető, de valós piaccal rendelkező, ezért drága zsírsav-formát próbálnak meg az érintett biotechnológiai vállalatok előállítani és eladni. Ha azonban egy adott lipidet növényi vagy állati forrásból is elő tudnak állítani, az kiszorítja a piacról a mikrobiális ekvivalenst, mint történt a γ -linolénsavban (GLA; 18:3 ω -6) gazdag (kb. 20 %) jávaolajjal („Oil of Javanicus”), amit a *Mucor circinelloides* járomspórás gombával állítottak elő fermentációs úton 1985-1990 között Angliában, és amit az ekcéma kezelésére, illetve a menstruáció előtti tünetek enyhítésére használtak. A kerti borágó (*Borago officinalis*) olaja azonban még ennél is magasabb (25-28 %) arányban tartalmazza a GLA-t, és ez – a növény termesztésének nehézségei ellenére – gazdaságtalanná tette a mikrobiális előállítását.

A fentiek ellenére mégis léteznek ipari léptékben, fermentációs biotechnológiai úton gyártott SCO-k: az **ARA**-ban illetve a **DHA**-ban gazdag olajok. Mindkettő hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsav; a **mesterséges anyatej** fontos kiegészítő komponenseként használják őket világszerte. Növények jelen tudásunk szerint nem tudják őket szintetizálni (18-nál hosszabb szénatomszámú zsírsavak a növényekben elvétele, a DHA pedig egyáltalán nem fordul elő), a halmáj-olaj pedig mindig tartalmaz olyan egyéb zsírsavakat is, amelyek csecsemő-tápszerbe nem kerülhetnek be. A tengeri halak májában egyre gyakrabban kimutatható nehézfém-akkumulációk újabb érvet jelentenek a biotechnológiai előállítás mellett. Az SCO-termékek különösen érzékeny felhasználási területe miatt a közvélemény előtt sűrűn hangsúlyozzák: az összes SCO-technológia hagyományos úton fejlesztett törzseket használ, rekombináns mikroorganizmusokat (GMO) nem. A termékek piaca évről évre jelentősen növekszik, és elmondható, hogy jelenleg inkább a kínálat, mint a kereslet limitál.

Az **ARA-gazdag SCO**-t a *Mortierella alpina* fonalas gombával állítják elő. Noha Japánban illetve Kínában is gyártják, az amerikai Martek Biosciences és partnere, a holland DSM biztosítja a világpiac 95 %-át.

Az előállítás technológiai szempontból viszonylag egyszerű: nagyméretű (50-100 m³) kevert tankreaktorban a minél magasabb sejtkoncentráció (50-60 g/L) elérése a cél, amihez gyorsan hasznosuló szén- és nitrogénforrást és komplex táptalaj-komponenseket használnak. A szokatlanul magas sejtkoncentráció a kevertetést és a levegőztetést jelentősen megnehezíti. A technológia során ezért arra törekszenek, hogy a gomba a termelői fázisban élesztőszerű, lekerekedett morfológiát mutasson – enyhítve ezzel az oxigén ellátás nehézségeit – noha ez a forma bizonyítottan kevesebb olajat képes raktározni, mint a fonalas.

A fermentációnak két fázisa van: az elsőben a sejtek a nitrogénforrás kimerüléséig gyorsan növekszenek. A második (olajtermelő) fázisban a sejtek növekedési üteme lelassul, de a táptalajban jelenlévő szénforrást (glükóz) továbbra is felveszik, és sejtosztódás hiányában intracelluláris olajokká konvertálják, mint tartalék tápanyagot. Az átalakítás kiinduló pontja a citromsav-ciklus leállása: a mitokondriumból egy trikarbonsav-carrier enzim (lásd 10. fejezet) viszi ki a citromsavat a citoszolba, ahol az **ATP:citrát liáz** enzim révén oxálecetsavvá és acetyl-CoA-vá alakul. Az oxálecetsav maláttá redukálódik (ezzel aktívan tartva a trikarbonsav-carriert, lásd 10. fejezet), a malát pedig a **malát enzim** működése révén piruváttá és széndioxiddá alakul, NADPH-keletkezés mellett. Az **acetyl-CoA** és a redukáló ágens **NADPH** a zsírsav bioszintézis két kulcseleme: hiányukban a zsírsavak nem tudnának felépülni. Ennek megfelelően az olajtermelő eukarióták közös jellemzője az ATP:citrát liáz enzim megléte.

A fermentáció befejeztével a fermentlevet felmelegítik (**Pasteurizálás**), inaktíválva ezzel a termelő gombát és megakadályozva az esetleges (bakteriális) fertőzést. A fermentlevet szeparálják, a biomasszát **porlasztva szárítással** tárják fel, az olajokat hexánnal extrahálják a porszemek felületéről. Mivel a végtermékek egyik legfontosabb jellemzője a telítetlenség, fokozottan hajlamosak az oxidációra, ami viszont lerontja minőségüket. Emiatt a feldolgozás időtartamát a minimumra kell csökkenteni, a biomasszát és az extrahált olajat oxigénmentes körülmények között (pl. nitrogéngáz alatt) és alacsony hőmérsékleten tárolják. A kész olajhoz antioxidánst (E-vitamin) adnak az oxidáció elkerülése céljából.

A **DHA-gazdag SCO**-t két heterotróf (fényt nem igénylő), eukarióta tengeri algafajjal, a *Cryptocodinium cohnii*-val és egy *Schizochytrium* fajjal állítják elő (a halak májába egyébként valószínűleg ezen algák tömeges fogyasztása révén kerül be a DHA). Csecsemőtápszerbe jellemzően a *C. cohnii*-val előállított DHA-olaj kerül, míg a *Schizochytrium*-alapú technológia inkább felnőtt ételmezési célokat szolgál. A gyártó a Martek Biosciences, mely a világpiacot gyakorlatilag egymaga látja el (a kereskedelmi forgalomban kapható SCO-k mintegy 95 %-a „Martek-olaj”). A technológiák egyetlen szokatlan eleme, hogy a tengeri algát érthető módon sós (magas NaCl-tartalmú) vízben kell tenyészteni. A kloridion azonban

a termelői fermentorok acélfalát gyorsan korrodálja (az ipari biotechnológiában gyakori, S 31600 minőségű saválló acéllemezek jellemzően 1.000 ppm Cl⁻ koncentrációt tudnak elviselni károsodás nélkül, mely huszada a tengervíz átlagos klorid tartalmának!). A súlyos költség-növekedéssel fenyegető probléma elhárítására olyan algatörzset szelektáltak ki, mely alacsony kloridion koncentráció mellett is képes növekedni és termelni.

10 Szilárd fázisú fermentációk és termékeik

10.1 BEVEZETÉS

A fermentáció folyamata során mikroorganizmusok és sejtek saját, másik élőlényből származó, esetleg ember által tervezett (mesterséges) szerves vegyületeket állítanak elő olyan mennyiségben, hogy az ipari léptékű hasznosítást tegyen lehetővé. Az előállítás jellemzően nagyméretű, tápfolyadékkal feltöltött acéltartályokban történik, melyekben a (túl) termeléshez szükséges fizikai és kémiai körülmények biztosítva vannak. A tenyésztés e típusát folyékony vagy süllyesztett (batch, submerged) fermentációnak nevezzük. Amikor a mikroorganizmusok / sejtek szilárd felületen növekszenek, szilárd fázisú fermentációról (solid state fermentation, SSF) beszélünk. Az SSF tradicionálisan távol-keleti technológia; legismertebb típusa a koji, amely tulajdonképpen az *Aspergillus oryzae* gomba japán neve, de használják azon az SSF-ekre is, melyekben a gomba biológiai ágensként részt vesz (pl. saké előállítása). Mára az SSF világszerte elterjedt, olcsó, környezetbarát és energiatakarékos módja lett értékes mikrobiális vegyületek (pl. szekunder metabolitok) előállításának. Hátránya, hogy nem lehet olyan szintű biológiai/műszaki kontrollt gyakorolni fölötte, mint a batch fermentációk esetében, így az egyébként is számos buktatót tartalmazó léptéknövelés tovább nehezül. Az SSF ezért inkább hasznos kiegészítője, mintsem alternatívája a süllyesztett fermentációs eljárásokra épülő, termelői léptékű ipari biotechnológiának, annak ellenére, hogy az utóbbi 20 évben ez a terület is jelentős fejlődésen ment keresztül.

10.2 AZ SSF ALKALMAZÁSA

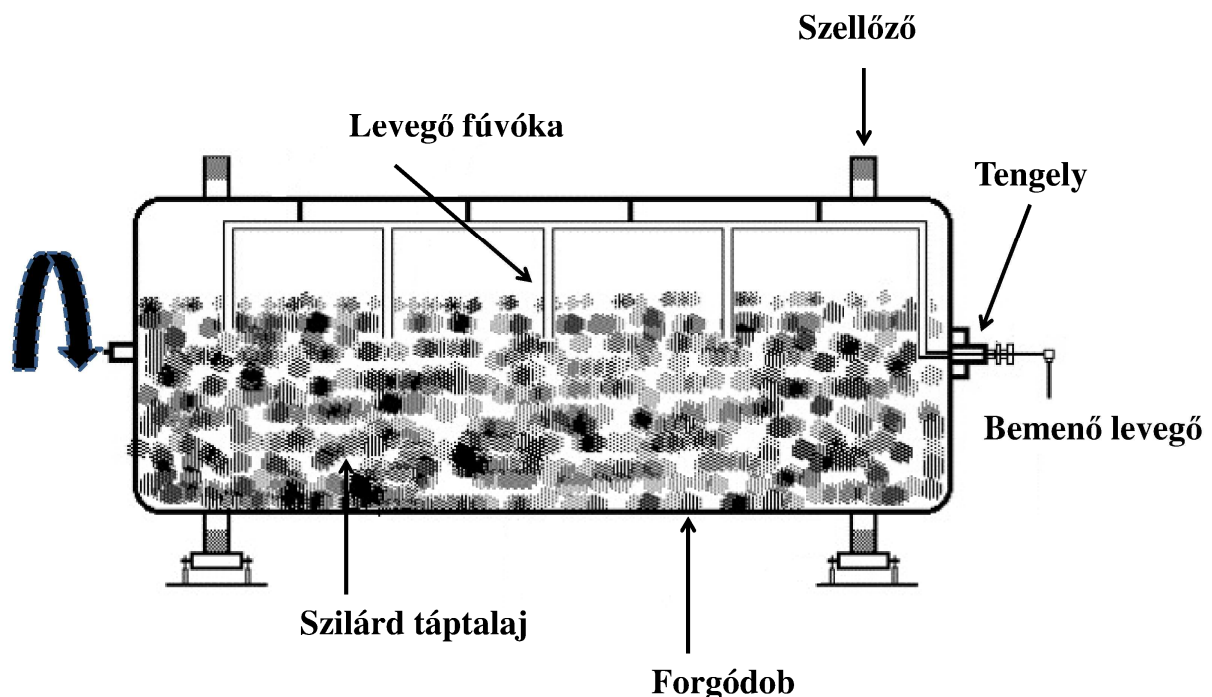
A tipikus SSF-alapanyag mezőgazdasági (manióka-, kávé-, búza-, alma-, cukornád-, cukorrépa-, kukorica-, stb.) eredetű, tisztításon-finomításon át nem esett, lignocellulóz jellegű hulladék, az SSF révén tenyésztett mikroorganizmus pedig jellemzően (de nem kizárólag) fonalas gombafaj. A penészgombák elterjedt alkalmazása az SSF-technológiákban összefügg azzal, hogy a fonalas morfológia gyakran megnehezíti (megdrágítja) a batch tenyésztést (pl. tápközeg viszkozitásának megnövelése, növekedés a fermentor belső felületén). A gombák természetes körülmények között sokszor nedves, szilárd, szerves felületen növekednek, így az SSF esetükben közelebb áll az evolúció során kialakult optimális élettérhez. Ami pedig a fermentációs szubsztrátumot illeti: becslések szerint csak Észak-Amerikában 150 millió tonna

lignocellulóz keletkezik évente, melynek túlnyomó része hulladék, s amely olcsó, megújuló, bőséges tápanyagot jelent az SSF számára.

10.2.1 SSF bioreaktorok

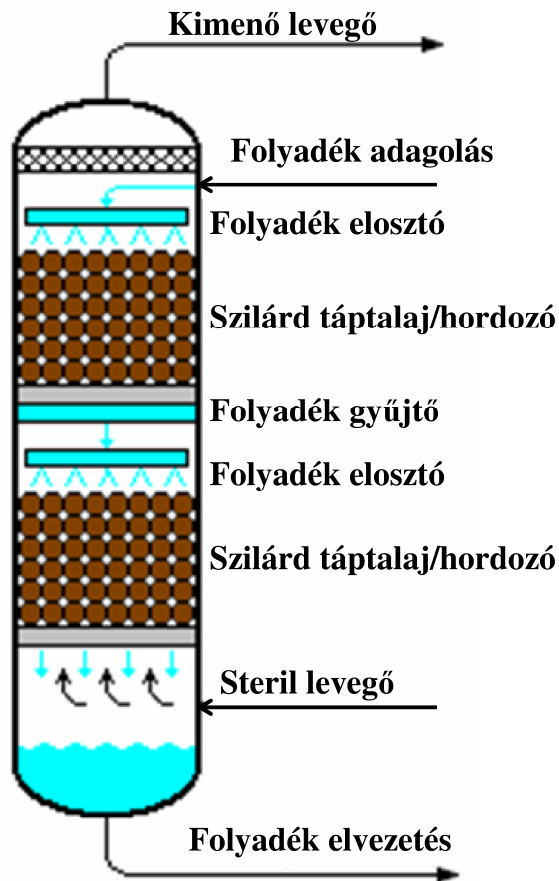
Alapvetően háromféle SSF-reaktorípust különböztetünk meg: tálcákat, forgódobos reaktorokat (rotating drum reactor) és szilárd hordozóval feltöltött ágy-reaktorokat (packed bed reactor); méretüket tekintve mindhárom számos nagyságrendekben létezik. A tálca nem teszi lehetővé a mechanikus keverést és a spontántól intenzívebb levegőztetést, ezért a szilárd tápközeg maximális vastagsága korlátozott. Eredetileg *A. oryzae* fermentációk (koji) során alkalmazták; a tradicionális távol-keleti konyha néhány fermentált alapanyagának előállításán túl nincsen gyakorlati jelentősége.

A forgódobos reaktorokban a táptalaj átmozgatását alapvetően kétféle módon: a teljes reaktor forgatásával, illetve beépített keverőkkel végezhetik. Mindkét esetben az átmozgatás folytonos és szakaszos lehet. A forgódobos reaktorok hatékonyabb levegőztetést és általában véve homogénebb körülményeket biztosítanak a szilárd szubsztrátumon növekvő tenyészet számára (10. 1. ábra).



10.1.ábra: A forgódobos reaktor felépítése

Az ágy-reaktorok (10. 2. ábra) henger alakúak, faluk üvegből, acélból és műanyagból készülhet.



10. 2. ábra: Az ágyreaktor felépítése

A mesterségesen magas nedvességtartalmú levegőt alulról vezetik be a készülékbe a szilárd hordozón keresztül. A legfőbb probléma ezzel az SSF-reaktor típussal a hő nehézkes elvezetése, viszont előnyösen használható olyan termékek előállítására, melyek végtermék gátlást idéznek elő. A végtermék ugyanis a reaktor függőleges pozíciója miatt a gravitációnak köszönhetően lényegében lecsorog annak aljára, így fizikailag távol kerül a termelő sejttől ill. rögzített enzimtől.

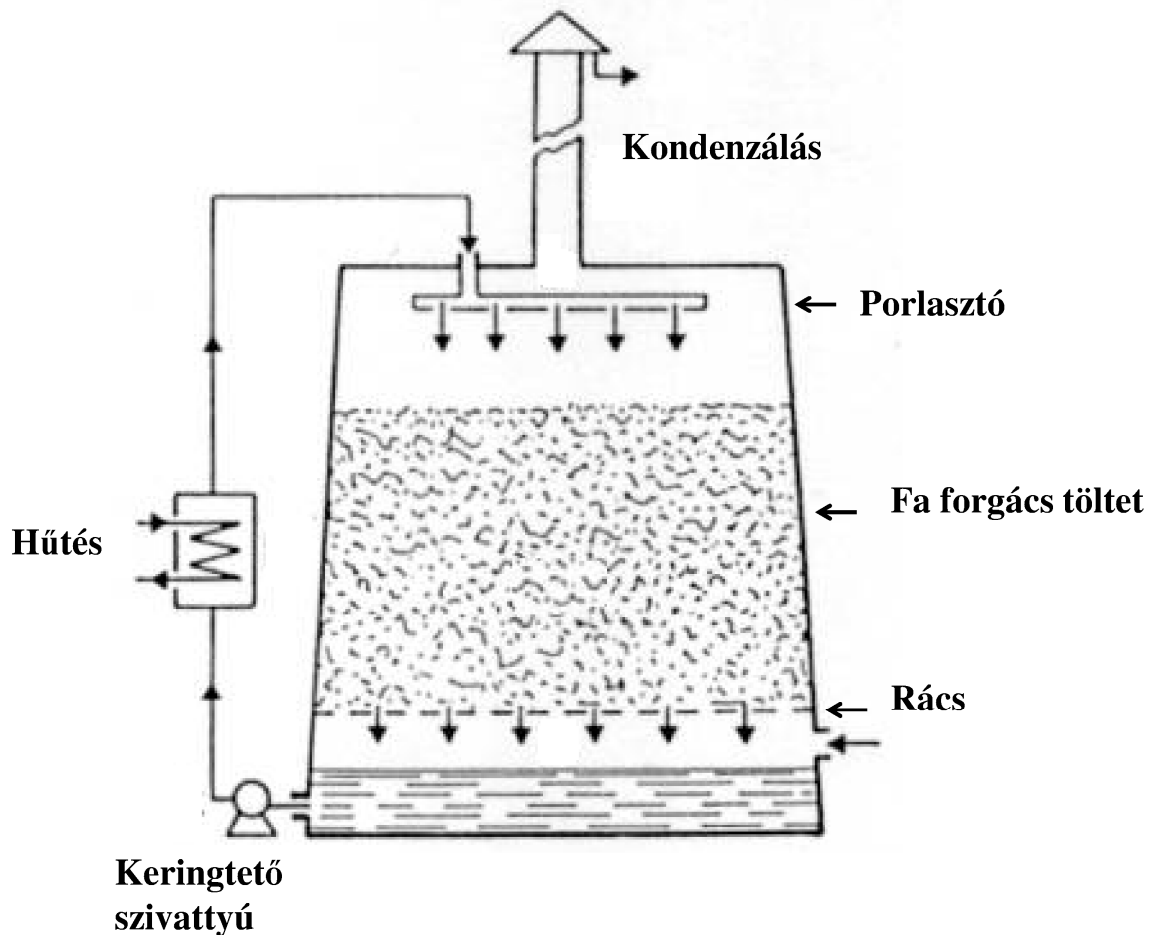
10.2.2 Szerves savak gyártása SSF technológia révén

Napjainkban a citromsav gyártása ipari léptékben kizárólag süllyesztett fermentációs technológia révén történik (lásd 4. fejezet), de rendszeresen olvashatók a szakirodalomban olyan közlemények, melyek valamilyen lignocellulóz tartalmú mezőgazdasági hulladék ezen irányú hasznosításáról szólnak. A növényi hulladékot benedvesítik, majd hővel kezelik, így csökkentik le a későbbi bakteriális fertőzés lehetőségét. Az *Aspergillus niger* gomba spóráit ezt követően oltják rá a szilárd felszínre. Gazdasági szempontból is említésre méltó különbség a süllyesztett illetve SSF gyártás között, hogy az utóbbi érzéketlen a fémionok, köztük a Mn^{2+} jelenlétére (lásd 4. fejezet), így előzetes eltávolításuk nem szükséges. A gyártás során a N-

forrást kívülről adagolják a rendszerhez; hasznosulása az SSF kémhatásának csökkenéséhez vezet, ami előnyös a citromsav bioszintézis szempontjából.

A citromsav mellett számos további szerves savat (pl. fumársav, tejsav, glükonsav) is lehet SSF révén gyártani, legjelentősebb SSF-alkalmazása azonban az ecetsavnak van.

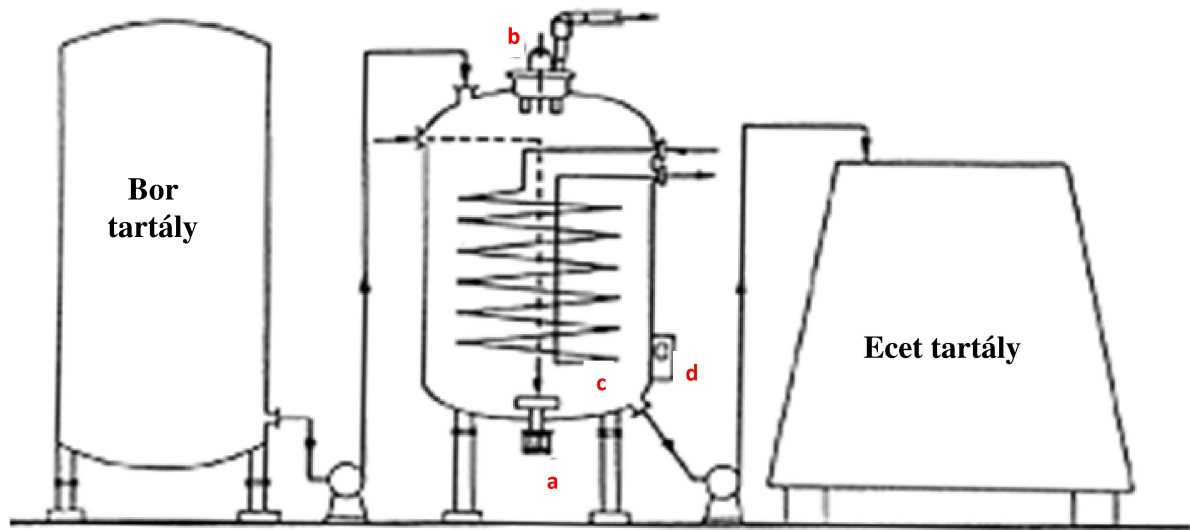
Az ecetgyártás hajnalán a bort sekély tálcákban a szabad levegőn hagyták, amíg az meg nem savanyodott (Orleans-módszer). Ez természetszerűen vezetett a levegő szerepének felismeréséhez, és egy olyan készülék megalkotásához, melyben a folyadék intenzívebben érintkezhetett a levegővel. Egy tartályt valamilyen inert anyaggal (fával, szénnel, forgácssal) töltenek meg, s ennek felszínén a felülről adagolt bor lassacskán végigcsörgedezik. A hordozón helyezkednek el az oxidációt végző baktériumok. Ezek a megalkotójukról Frings-generátornak nevezett készülékek sokféle működnek, s mai napig a világ ecetsavgyártásának mintegy harmadát állítják elő (10. 3. ábra).



10. 3. ábra: A Frings generátor felépítése

Továbbfejlesztett változataiban a (jellemzően gyenge minőségű) bort lesterilizik, és "jó ecet"-tel leoltják. A kémhatás így eleve savas lesz, ami a bakteriális fertőzések ellen nyújt természetes védelmet. A levegőztetést mechanikus vagy elektronikus fűjtatókkal lehet még

intenzívebbé tenni. Meg kell azonban jegyezni, hogy ma az ecetsav mennyiségének többségét is sülyesztett fermentációval állítják elő (Frings-acetátor; 10. 4. ábra).



Acetátor

- a: levegőztető**
- b: habzásgátló**
- c: hűtő**
- d: alkohol szint mérő**

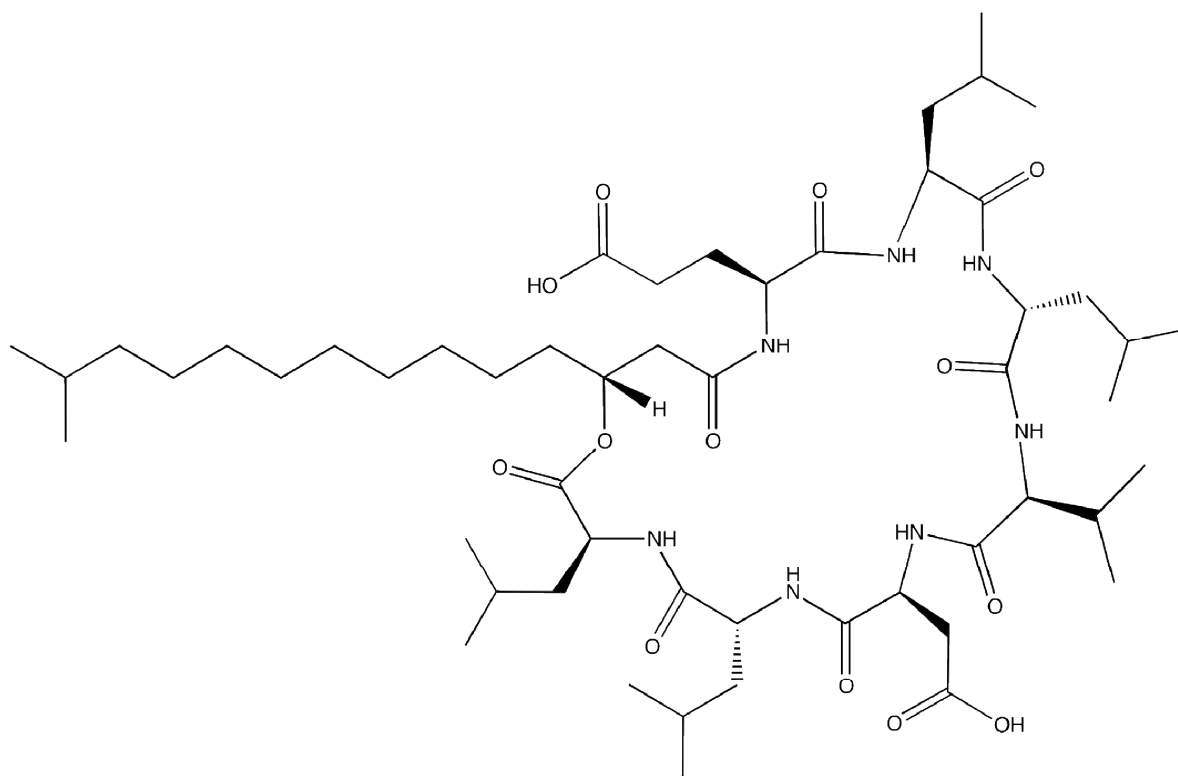
10. 4. ábra: A Frings acetátor felépítése

10.2.3 Komposztálás

A közismert komposztálás lényegében SSF-nak tekinthető, azzal a különbséggel, hogy a termék maga az átalakított tápanyag. A komposztálás általában szabályozatlan módon megy végbe, az egyre inkább elterjedő „biogazdálkodás” során azonban kontrollált folyamattá alakult, ahol a hőmérsékletet, a nedvességtartalmat és a szubsztrátum szén/nitrogén arányát is műszeresen követik. A nedvességtartalom 55-70 % közötti, a nitrogéntartalom jellemzően 2 %, míg a C/N arány 17:1 körüli érték, bár a paraméterek erősen szubsztrátum függőek.

10.2.4 Szekunder metabolit termelés

Szinte minden szekunder metabolitot (köztük számos antibiotikumot) elő lehet állítani SSF technológia révén is, de egyik sem versenyképes a sülyesztett fermentációs eljárással. A *Bacillus subtilis* baktérium bizonyos törzsei által termelt, surfactin nevű felületaktív anyag (10. 5. ábra) esetében ígéretes próbálkozások történnek az SSF léptéknövelésére, melynek révén a drága tápfolyadék kiváltható lenne.



10. 5. ábra: A surfactin szerkezeti képlete

A *Claviceps* gombafajok (pl. *C. purpurea*) által termelt un. ergot-alkaloidok esetében szignifikánsan magasabb specifikus termelési értékeket értek el SSF technológiával, mint süllyesztett eljárással, melynek egyik oka a kémiai habzásátlók használatának elmaradása. Mint szinte minden más esetben, itt is a léptéknövelés állítja az alapvető nehézséget az SSF technológia ipari léptékű elterjedése elé.

11 Növényi sejt fermentációk

11.1 BEVEZETÉS

Noha a biotechnológiai ipar máig túlnyomórészt mikrobiális (fungális, bakteriális) ágenseket alkalmaz piacképes termékek előállítására, az un. magasabb rendű eukarióta sejtek (növények, állatok) egyre gyakrabban válnak fejlesztések és rájuk épülő gyártási folyamatok főszereplőivé. Az állati (emlős, rovar) sejtek biotechnológiáját jegyzetünk utolsó fejezetében tárgyaljuk.

Ebben a fejezetben a növényi sejtek és szövetek fermentációjának alapjairól lesz szó. Fontos megjegyezni, hogy ez a témakör nem azonos a mezőgazdasági biotechnológiával, ami a termesztett növények terméshozamának és minőségének fokozását, a termelésben és/vagy a forgalmazás során hasznos új tulajdonságok kialakítását foglalja magába. Oda tartoznak a keresztezések több ezer éves technikái, a növényi szövettenyésztés (melynek révén rövid idő alatt nagyszámú azonos egyedet lehet létrehozni – pl. dísznövénytermesztés), és az un. genetikailag módosított (GM) növények kialakítása is, melynek tipikus célja a növény életképességének fokozása (pl. kártevőkkel, környezeti hatásokkal szemben). A növényi sejt fermentációk ezzel szemben az ipari biotechnológia legáltalánosabb célját követve olyan természetes eredetű vegyületek, vagy biológiailag aktív, elsősorban gyógyászati szempontból fontos anyagok gyártására szolgálnak, melyeket más platformok révén nem, vagy csak drágábban lehet előállítani (11. 1. táblázat). Noha a Földön előforduló növények becsült fajszáma kisebb, mint állatoké vagy a mikroorganizmusoké, a jelenleg ismert mintegy 150.000 természetes eredetű szekunder metabolit (SM) többsége (~ 80 %) növényi eredetű. A legjelentősebb két SM-csoport, a terpenoidok és a karotenoidok biotechnológiáját könyvünk 7. fejezetében külön tárgyaljuk.

Termelő növény	Termelt alapanyag	Felhasználás
<i>Papaver somniferum</i>	codein, morfin	fájdalomcsillapító
<i>Chinchona sp.</i>	kinin	malária-ellenes szer
<i>Chinchona sp.</i>	scopolamin	muszkarin-receptor gátló (anti-kolinerg)
<i>Atropa belladonna</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Mandragora officinarum</i>	athropin	muszkarin-receptor gátló (anti-kolinerg)
<i>Digitalis sp.</i>	diosgenin, digoxin	kardio-aktiváló szer
<i>Catharanthus roseus</i>	vincristin, vinblastin	rákellenes szer (mitózis-gátló)
<i>Taxus brevifolia</i>	paclitaxel (taxol)	rákellenes szer (mitózis-gátló)
<i>Camptotheca acuminata</i>	camptothecin	rákellenes szer (topoizomeráz-I gátló)
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	pyrethrin	pesticid (rovarellenes szer)

11. 1. táblázat: növényi szekunder metabolitok

11.2 NÖVÉNYISEJT TENYÉSZETEK FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIÁJA

Bármilyen növényisejt tenyészetet kívánunk termelésre használni, az alapvető kérdést mindig fel kell tenni: elvileg olcsóbb lesz-e az eljárás a hagyományosnál, azaz a teljes növény termőföldi előállításánál és a hasznos, biológiailag aktív vegyületek biomasszából történő kivonásánál? Ha a válasz igen, meg kell próbálni minél magasabb termelékenységet (g termék x liter fermentlé⁻¹ x idő⁻¹) elérni, melynek első lépése az alkalmas növényfaj kiválasztása.

A növény és a belőle készített sejtszuszpenzió termelékenysége között sokszor nincs egyenes arányosság, ezért a teszt-vizsgálatokat a **kallusz tenyészetek** (differenciálatlan növényi sejtömeg) szintjén érdemes elvégezni. A kiválasztás másik módja lehet a szelekció, melynek során különböző növények sejttenyészeit olyan külső körülmények közé helyezik, melyek a magas termelékenységű típusoknak kedveznek.

Amennyiben a vad típusú növény nem termel elegendő alapanyagot, lehetőség nyílik molekuláris biológia módszerekkel növelni a kihozatait. A növényi sejt transzformációjának talán legismertebb eljárása az *Agrobacterium tumefaciens* (új nevén: ***Rhizobium radiobacter***)

nevű talajlakó, növényi kórokozó baktériummal történő génbevitel. Ez a baktérium fizikai sérülések helyén behatol a növényekbe, és egy speciális plazmid (tumor-inducing plasmid, pTi) révén DNS-fragmentet juttat a genomba, mely a sejtosztódás felpörgetése révén tumort alakít ki a növényben (gyökérgolyva). Amennyiben a pTi plazmidon a tumort kiváltó DNS-szakaszt az expresszálni kívánt lókusza/génre illetve génekre cserélik, nagy hatékonyságú, természetes genetikai transzformációs rendszert kapunk (11. 1. nem-interaktív animáció – http://www.youtube.com/watch?v=L7qnY_GqytM&NR=1&feature=endscreen). Sajnos az eljárás a legtöbb egyszikű növény (pl. gabonafélék, fűfélék) esetében csak kis hatékonysággal működik. Egy másik transzformációs eljárás (az ún. **közvetlen génbevitel**) során apró arany vagy wolfrám partikulumokat a bejuttatni kívánt DNS-sel vonnak be, és vákuum alatt szó szerint belelövik a sejtbe anélkül, hogy a sejtet protoplasztálni (azaz sejtfa-mentesíteni) kellene (11. 2. nem-interaktív animáció – <http://www.youtube.com/watch?v=E9jTVCnkHi4>). A növényi géntechnológia révén ma már bioszintetikus útvonalak egyes részei is átvihetők egy-egy megfelelő platform-növénybe, és a terméket abban tudjuk termeltetni (pl. indol alkaloidok – triptamin, ajmalicin, szerpentin – előállítás). Noha ezek alapján joggal merülhet fel a rekombináns fehérjék (pl. gyógyászati célú antitestek) növényi sejtekkel történő termeltetése az állati sejtes technológia alternatívájaként, ennek komoly akadálya van: a legtöbb növényi sejtvonálnak nincs GRAS (Generally Recognized as Safe) státusza a terápiás célú fehérjék előállítására, ami nagyon jelentős többletkiadást jelent a technológia kialakítása során. Ettől függetlenül laboratóriumi léptékben számos állati (humán) fehérjét tudnak növényi sejtekkel termeltetni (pl. inzulin), és arra is van bizonyítékunk, hogy a növények protein-glikozilációs potenciálja általában megfelelő minőségű és sebességű (lásd Rovar-és emlőssejt fermentációk c. fejezet).

A növényisejt tenyésztés kialakításának első lépéseként levágunk egy darabot a növény valamely részéből, óvatosan lesterilezzük a felszínét, és szilárd táptalajon növesztjük, amíg un. kallusz nem nő ki belőle. A kalluszt levágjuk és növekedési hormonokat tartalmazó szilárd táptalajra tesszük át. A növekedési hormonok ilyen esetben szabályozatlanul hatnak minden sejtre, és korlátlan növekedést váltanak ki. A kalluszt kisebb részekre vágva és tápfolyadékba (pl. rázatott lombik) helyezve folytonosan növekvő sejt-szuszpenziót kapunk. A növényi sejtek totipotenciája (teljes értékűsége) miatt bármelyik növényi szervből kiindulhatunk, genetikailag ugyanazon sejteket kapjuk. A kallusz képes teljes növényé (akár több száz példánnyá) is differenciálódni (regenerálódni) – ez az ipari mikroszaporítás alapja.

A táptalaj optimalizálása növényi sejtek esetében komplikált, mivel több generációs időnek is el kell telni a fenotípus megjelenéséig. A táptalaj összetettebb, mint a mikrobiális

tenyészetek esetében; szén-, nitrogén-és foszfor- kén, kálium és kalcium forráson túl mindig tartalmaznia kell növényi növekedési hormonokat (auxinok, citokininek – lásd lentebb) is. A nátrium és a klorid ion nem esszenciális, de sok táptalaj-receptben előfordul. A nitrogénforrás jellemzően nitrát, de ammónium + nitrát vegyes nitrogénforrás is előfordul a szakirodalomban. A jól ismert kémhatás-effektusok (ammónia asszimiláció csökkenéssel, nitrát asszimiláció pH emelkedéssel jár) a növényisejt tenyészetekben is megfigyelhetők. A táptalaj puffer kapacitását foszfát ionok biztosítják. A mikroelemek minősége és mennyisége hasonló egy mikrobiális fermentációhoz, de a sejtnövekedést fokozó jodid iont szinte minden receptúra tartalmazza. A vasat komplexben (pl. EDTA-só) adják. Noha a növények természetes közegükben minden, növekedéshez szükséges vitamint képesek maguk előállítani, számos irodalmi adat található a tiamin, piridoxin, nikotinsav, folsav, pantoténsav, biotin, mio-inozitol, stb. szükségességéről egyik vagy másik növényi sejt vonal esetén; más sejt vonalak esetében azonban ezekről nincs említés, így elmondható, hogy a vitaminigény nem általános. A leggyakoribb szénforrás a szacharóz (2-3 % mennyiségben). Sok növényi sejt vonal a szacharózt gyorsan felveszi, majd sejten belül keményítővé alakítja, és akár napokig élni tud ezen a tartalék tápanyagon. Más növényi sejtek azonban extracellulárisan hidrolizálják a szacharózt, és előbb a glükózt, majd a fruktózt hasznosítják. Mindezekről függetlenül a legtöbb ismert növényi sejt vonalat teljesen definiált táptalajban is lehet tenyészteni.

A növényisejt fermentációk kritikus komponensei a növekedési hormonok. Az auxin család legismertebb tagjai az indol-ecetsav és az indol-3-pyruvát, de hátrányuk, hogy stabilitásuk gyenge; a fermentáció során ráadagolással juttatják a tápközegbe. A kiindulási táptalajba inkább a naftalin-ecetsav és a 2,4-dikloro-fenoxiacetsavat tesznek. A jellemző auxin koncentráció 1 ppm (1 mg/L). A citokinin-család legismertebb tagjai a teatin, a kinetin és a 6-benzilamino purin. A sejttenyészet növekedésének első szakaszában esszenciálisak, 1-50 µM koncentrációban.

A legtöbb növényi alapanyag SM-jellegű és intracelluláris. Keletkezésük kinetikájára ugyanaz érvényes, mint a mikrobiális tenyészetekre: a fermentáció első részében, a gyors növekedés fázisában (trofofázis) minimális a termékképződés, míg a második szakaszban (idiofázis) a növekedés leállásával párhuzamosan beindul az alapanyag (termék) szintézise. A két szakaszhoz általában különböző táptalajok tartoznak. A növényi sejtek fermentációja – hasonlóan más élőlényekéhez – batch, fed-batch és folytonos jellegű lehet, de általában csak az első kettőt alkalmazzák technológiai léptékben. A ráadagolással (fed-batch) tenyésztés komoly előnye, hogy esetében a fenn említett kétféle táptalaj közötti váltás lépésenként

történhet. A növényi sejt fermentáció a mikrobiálishoz képest lassú (2-6 hét), emiatt az inokulum mérete nagy (10-20 %), a léptéknövelés pedig sok lépésből áll, mivel az egymás után következő reaktorok térfogata között 5-10 szerez különbség van csupán. A növényi sejtek specifikus légzési aktivitása irodalmi adatok alapján $0.2 - 3.6 \text{ mmol O}_2 \text{ órá}^{-1} \text{ g}^{-1}$, ami nagyjából megegyezik a pékésztő idevágó értékével, de nagyságrendekkel alacsonyabb az aerob baktériumokénál. Emiatt több liter térfogatú rázatott lombikokat is sikerrel használnak növényi sejt tenyésztésre, mivel oxigén limitáció csak elvétve lép fel.

A növényi sejtek generációs ideje 1-3 nap közé esik, maximális specifikus növekedési rátájuk $<0.05 \text{ h}^{-1}$, fenntartási (maintenance) rátájuk $\sim 0.0075 \text{ h}^{-1}$. A lassú növekedés miatt a tenyészetek fokozottan érzékenyek a mikrobiális fertőzésre. A növekedési görbe hasonló a mikroorganizmusokéhoz, vagyis lag-, növekedési- és stationer fázisokra osztható. A reaktorban a tenyészetek sokszor sejtaggregátumok formájában vannak jelen (ez analóg a fungális pelletekkel), melyek akár a cm-es mérettartományt is elérhetik, sőt időnként még differenciálódhatnak is. A lassú növekedés ellenére a maximális sejtsűrűség összevethető a mikrobiális tenyészetekben mérhetővel: 10-20 g száraz sejtanyag / liter fermentlé az átlagos, de jóval 100 g/L fölötti értéket is elértek már. A tenyésztési hőmérséklet viszonylag alacsony ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$), az optimum-tartomány pedig kifejezetten szűk – több növényi sejt vonal $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ fölött elpusztul. A kiindulási (sterilizálás előtti) kémhatás jellemzően enyhén savas (pH 5.5 - 5.8), ami a sejt növekedés során, egy kezdeti pH csökkenés után (kb. pH 4.5 - 4.7-ig) semleges irányába mozdul el.

A növényi sejtek növekedési képessége önmagában nem függ a fény jelenlététől, de fényben illetve sötétben más-más anyagcsere utak működnek bennük, ami a termékképződést is befolyásolhatja. Kutatási célból (fotoszintézis!) létrehoztak fotoautotróf növényi sejt vonalakat is, de technológiai léptékben a fény egyenletes biztosítása költséges, ráadásul az állandó, intenzív fény pigment képződéshez, és ezzel párhuzamosan az SM bioszintézis leállításához vezethet. A növényi sejt vonalak egyik kellemetlen jellemzője, hogy viszonylag hamar elvesztik a mesterségesen kialakított előnyös tulajdonságaikat (instabilitás); fenntartásuk – mely jellemzően fagyasztással történik – ezért kritikus eleme a technológiának. Az életképességet általában fluoreszcens festéseken (pl. fluorescein diacetát, trifenil-tetrazolium klorid, Evan's blue, stb.) alapuló mikroszkópiával ellenőrzik – ezek a festések az élő és a holt sejt membránjának transzport-tulajdonságai közti különbségeken alapulnak.

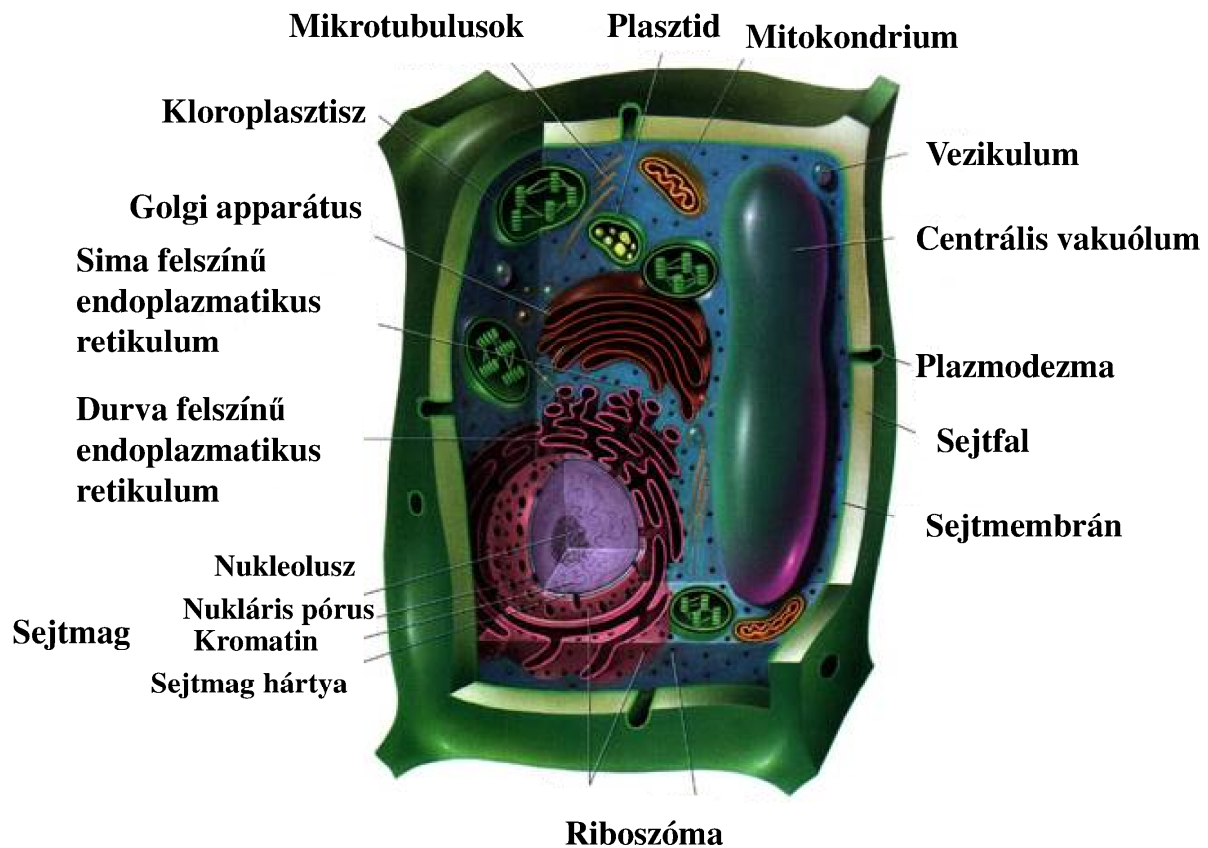
A növényi biotechnológiában elterjedten használják a rögzített sejt eljárás; ennek alapvető oka a már említett viszonylag alacsony oxigénigény. Számos mátrix-típusról vannak kedvező visszajelzések; leggyakoribb a kalcium-alginát és a poliészter alapú mátrix.

Mivel a legtöbb növényisejt fermentációs termék a sejten belül marad, a termelési gyakorlatban az egyik legfontosabb szempont a szekréció, vagyis a létrejött alapanyag exportjának elősegítése a sejtől a tápfolyadékba. A leggyakoribb módszer a sejtek fermentáció végén történő permeabilizálása szerves oldószerekkel (pl. dimetil-szulfoxid) vagy detergensekkel. Újabban sokszor egy tápfolyadéktól eltérő fázist (szilárd hordozót vagy nem-elegyedő folyadékot) adnak a tenyészethez, amelyek a keletkezett alapanyagot mintegy kivonják a fermentléből. Ez az eljárás sokszor a sejtek termelékenységét is megnöveli, mivel így lecsökken a bioszintézis végtermékének *in situ* koncentrációja, ami növeli a bioszintetikus enzimek aktivitását.

Számos növényi SM élettani szerepét tekintve a sejt védekező mechanizmusainak részét képezi. Bakteriális, fungális vagy rovar kártevők ellen a növény speciális vegyületek szintézisével védekezik; ezek a vegyületek az egészséges növényi szövetben nincsenek jelen. A hatás kiváltásához nem szükséges a tényleges kórokozó, csak tenyészetének sejtmentes felülúszója, illetve bizonyos benne lévő vegyületek. Ezt a jelenséget hívjuk **elicitálásnak**; a sejt által termelt hatóanyag mennyisége akár a százszorosára is növelhető az eljárással.

Az elicitor hatás abiotikus is lehet, pl. UV-sugárzás vagy nehézfémek (pl. réz, higany). A biotikus elicitor a patogén sejtfalának számos vegyülete (pl. kitin, kitozán, peptidoglikán, arachidonsav), a patogén által kiválasztott extracelluláris enzimek (pl. celluláz, ribonukleáz, pektináz), antibiotikumok, cukor-alkoholok. A megfelelő elicitor kiválasztása nem egyszerű, mivel a növényisejt tenyészetek legfeljebb nemzetség (genus) szinten mutatnak hasonlóságot ezen a területen, család szinten már nem. Az elicitort a tenyészet késői növekedési fázisában szokták adagolni, mivel ebben a szakaszban a legerősebb a növények SM-termelő potenciálja, hasonlóan a mikrobiális SM termelés kinetikájához.

A növényisejt tenyésztésre használt fermentor-típusok közül régebben az air-lift volt a leginkább elterjedt, mivel a növényi sejtek nyíróerő-tűrését jócskán alulbecsülték. Ennek oka a növényi sejtek mikroorganizmusokhoz képest nagy mérete és jelentős (akár a sejtterfogat 95 %-át kitevő) vakuólum tartalma volt (11. 1. ábra).



11. 1. ábra: A növényi általános felépítése

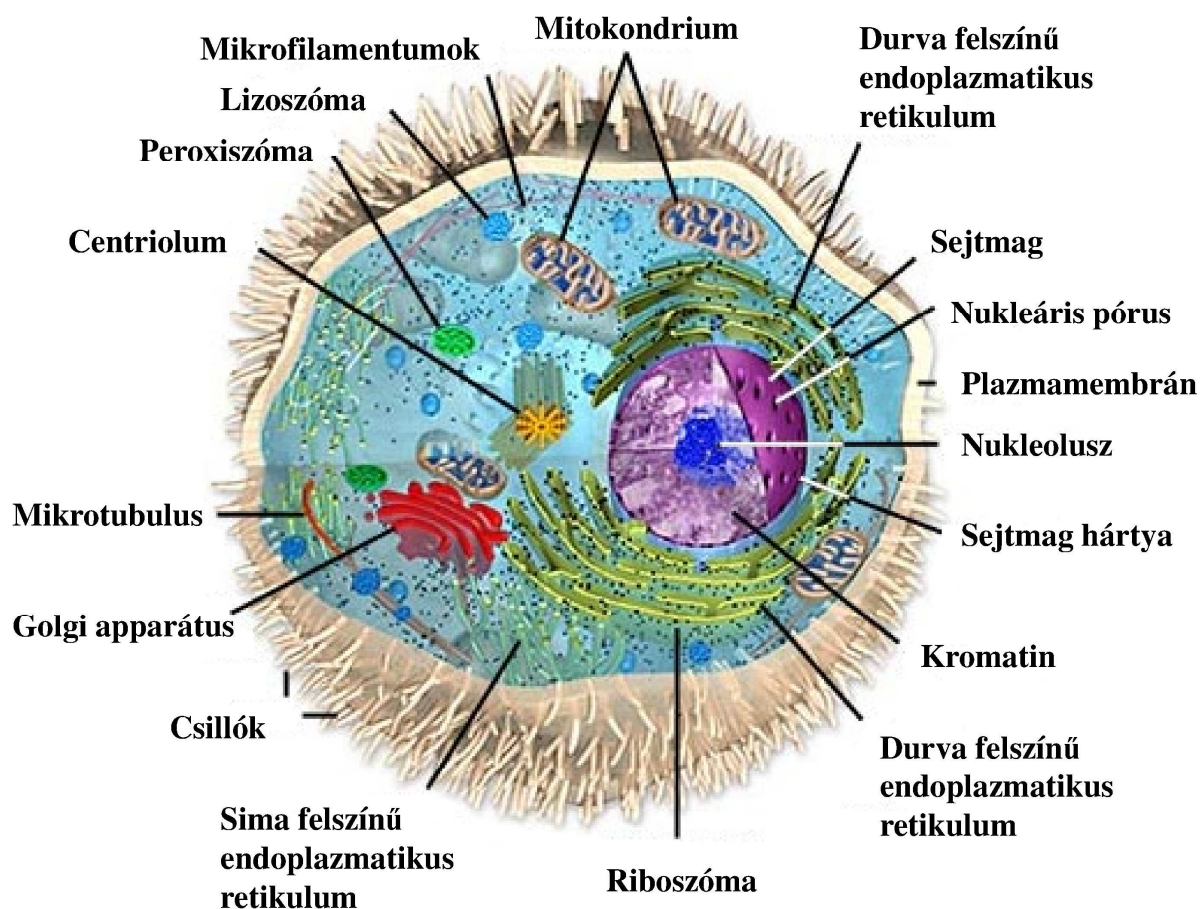
A vakuólum nagyrészt vizet tartalmaz, így a növényisejt beltartalom átlagos viszkozitása relatíve alacsony, ami elméletben alátámasztotta a nyíróerő-érzékenységet. Vannak azonban olyan növényi sejtek, melyeknek a sejtfala kellően ellenállónak bizonyult a mechanikus kevertetés által okozott nyíróerő elviseléséhez. A fermentor illetve a bioreaktor típusát, az adott sejtenyészetnek a keverési nyíróerőkkel szembeni érzékenység alapján választhatjuk ki, mind a laboratóriumi szintű fermentáció, mind pedig a léptéknövelés esetében is. Számos növényisejt technológia kevert tankreaktorokat használ, kihasználva annak minden előnyét (magas oxigén transzfer, tápközeg homogenitása, standard műszaki és analitikai eljárások, relatíve egyszerűbb léptéknövelés, stb.). Ígéretes tenyésztési technológia az egyszer használatos bioreaktor is, amit az emlőssejt kultúrákra is használ a gyógyszeripar. Ezek a reaktorok nem üvegből vagy acélból, hanem műanyagból készülnek, és nem tartály, hanem zsák alakúak; a zsákot egy billegethető asztalra helyezik, megoldva ezzel a tenyészet levegőztetését (lásd pl. <http://www.pharmaceutical-technology.com/contractors/purification/ge-healthcare/ge-healthcare1.html>).

A szerzők köszönik **Dr. László Miklós** (S-Biotech Kft., Budapest) hasznos tanácsait és észrevételeit.

12 Rovar- és emlőssejt fermentációk

12.1 BEVEZETÉS

Az ipari biotechnológiai folyamatok során hagyományosan mikroorganizmusokat (baktériumokat illetve élesztő- és fonalas gombákat) alkalmaznak valamely piacképes termék előállítására; a bioiparon belül jelentős túlsúlyban vannak a mikrobiális technológiák. Relatívén azonban egyre nő az olyan biotechnológiai eljárások száma és jelentősége, melyek „magasabb rendű” (állati, növényi) eukarióta sejteket használnak (12. 1. ábra).



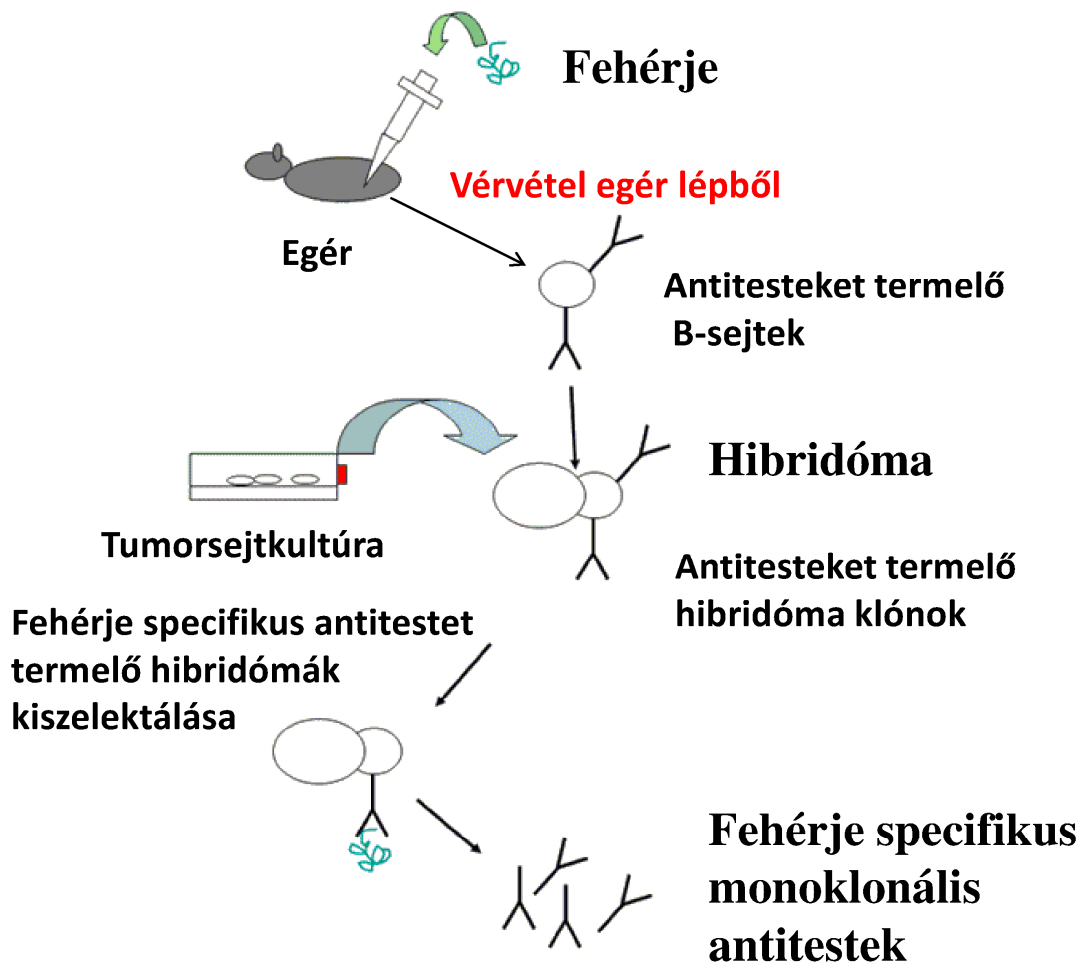
12. 1. ábra: Az állati sejt általános felépítése

Az emlős- és rovarsejt tenyészetek esetében a termék szinte kizárólag heterológ rekombináns protein, vagyis a termelő sejt normál anyagcseréjéhez nem tartozó, szerkezetét vagy kifejeződésének szabályozását tekintve molekuláris biológiai módszerekkel módosított fehérje (pl. monoklonális antitestek, citokinek, rákellenes fehérjék, hormonok, stb.). A növényi sejt fermentációk alapjait és az így létrehozott termékeket jegyzetünk előző (11.) fejezetében tekintettük át.

Egy baktérium tenyészet sokkal könnyebben, gyorsabban és olcsóbban hozható létre és tartható fenn sterilen, mint egy állati sejt tenyészet. A prokarióták élettana, biokémiája és genetikája egyszerűbb és jobban ismert; robosztusak, vagyis kevésbé érzékenyek a környezet változásaira (ideértve a technológia okozta stressz hatásokat is); jóval gyorsabban, magasabb sejtsűrűséget elérve nőnek. Mi indokolja akkor az állati sejtek biotechnológiai alkalmazását heterológ fehérjék, hormonok előállítására? A részletekbe menő válasz sokrétű, de alapvető ok kettő van: (1) a baktériumok és a gombák szilárd sejtfala megnehezíti (megdrágítja) a nem-szekretált, vagyis a fermentlébe ki nem választott fehérjék kinyerését; (2) a baktériumok, még ha ki is tudják fejezni a heterológ proteinek kódoló géneket, nem képesek poszt-transzlációs módosításokat végezni a kész fehérjéken, melyek stabilitása, oldékonysága és főleg biológiai aktivitása így messze elmaradhat az optimálistól, továbbá eltérő immunogenitást is eredményezhet. Az élesztőgombák ugyan képesek poszt-transzlációs módosításokra, de ezek minőségileg sok szempontból eltérnek az emlős sejtektől (lásd lentebb); ettől függetlenül a *Saccharomyces cerevisiae* vagy *Pichia pastoris* fajokkal ígéretes és szerteágazó kutatások folynak az emlős eredetű fehérjék teljes értékű létrehozására és termelésére („humanizált élesztő”).

12.2 EMLŐSSEJT TENYÉSZETEK BIOLÓGIÁJA

Azt, hogy egy állat bizonyos szerveit a szervezeten kívül is „életben” lehet tartani, az angol Ringer demonstrálta először, a szövettenyésztés alapjait pedig a német Roux rakta le, mindketten a XIX. században. Az emlőssejtek tenyésztésének alapvető technikái azonban csak a II. világháború után, a vírusos betegségek elleni vakcinák fejlesztése kapcsán alakultak ki. Az első tenyésztett emlőssejtek az afrikai szürkemajom (*Chlorocebus sp.*) veséjének sejtjei voltak 1949-ben, melyeket a gyermekbénulást (poliomyelitis) okozó poliovírus tenyésztésére használtak (Enders, Robbins, Weller – Orvosi Nobel-díj, 1954). A felfedezést hamarosan a mumpsz, a feketehimlő, a kanyaró és egyéb vírusok elleni vakcinák kifejlesztése követte, más-más állatfajok sejtjeit használva fel gazdának. A mai értelemben vett emlőssejt biotechnológia születése 1975-re, az első hibrid sejtek (hibridómák) megalkotásának időpontjára tehető. Ezek a sejtkonstrukciók egyesítik az emberi myeloma (rákos csontvelő) sejtek időben végtelenített és gyors növekedési potenciálját és az egér immunrendszer B-limfocita sejtjeinek specifikus antitest termelési képességét (Milstein, Köhler, Jerne – Orvosi Nobel-díj, 1984; <http://www.1lec.com/Immunology/Monoclonal%20Antibodies/index.html> - 12. 1. nem-interaktív animáció és 12. 2. ábra).



12. 2. ábra: Hibridóma sejtek kialakítása

Mivel azonban az így nyert egér-antitest az emberitől részben eltérő szerkezete miatt immunválaszt váltott ki a terápia során, a gyakorlati alkalmazáshoz „humanizálni” kellett a fehérjét. Az első, részlegesen sikeres módszer az ún. kiméra-antitestek voltak; ezekben az antitestet kódoló gén egér illetve ember eredetű DNS-fragmentumokból épült fel, vagyis a különbség a humán antitesthez képest kisebb. A teljesen humanizált monoklonális antitestek kifejlesztése a „phage display” technika révén vált lehetségessé az 1990-es évek elején (<http://www.sciencelauncher.com/phagedisplay.html> - 12. 2. nem-interaktív animáció). A monoklonális (ugyanazon immunsejtből származó, ezért mono-specifikus) antitestek előállítása az emlőssejt biotechnológia máig legfontosabb területe (12. 1. táblázat).

Főbb kategóriák	Név	Alkalmazás	Mechanizmus/Célpont	Típus
Gyulladás- csökkentő	infiximab	<ul style="list-style-type: none"> rheumatoid arthritis Crohn betegség fekélyes kolitisz 	TNF- α inhibíció	kiméra
	adalimumab	<ul style="list-style-type: none"> rheumatoid arthritis Crohn betegség fekélyes kolitisz 	TNF- α inhibíció	humán
	basiliximab	<ul style="list-style-type: none"> akut rejeckió vese transzplantáció után 	IL-2 inhibíció (aktivált T-sejtek)	kiméra
	daclizumab	<ul style="list-style-type: none"> akut rejeckió vese transzplantáció után 	IL-2 inhibíció (aktivált T-sejtek)	humanizált
	omalizumab	<ul style="list-style-type: none"> allergiás asztma 	humán immunoglobulin E (IgE) gátlás	humanizált
Rákellenes	gemtuzumab	<ul style="list-style-type: none"> akut myeloid leukémia 	myeloid sejt felszíni antigén CD33 (leukémia sejtek)	humanizált
	alemtuzumab	<ul style="list-style-type: none"> B sejt leukémia 	CD52 antigén (T- és B-limfociták)	humanizált
	rituximab	<ul style="list-style-type: none"> nem-Hodgkin limfóma 	foszfoprotein CD20 (B limfocita)	kiméra
	trastuzumab	<ul style="list-style-type: none"> mellrák (HER2/neu overexpresszió) 	HER2/neu (erbB2) receptor	humanizált
	nimotuzumab	<ul style="list-style-type: none"> pikkelyes sejtkarcinóma, Glióma 	EGFR inhibítor	humanizált
	cetuximab	<ul style="list-style-type: none"> pikkelyes sejtkarcinóma kolorektális karcinóma 	EGFR inhibítor	kiméra
	bevacizumab	<ul style="list-style-type: none"> Anti-angiogén rák terápia 	VEGF inhibíció	humanizált
Egyéb	palivizumab	<ul style="list-style-type: none"> RSV infekció (gyerek) 	(F) protein gátlás	humanizált
	abciximab	<ul style="list-style-type: none"> koronária angioplasztika 	trombocita GpIIb/IIIa receptor gátlás	kiméra

12. 1. táblázat: A legfontosabb termelt antitestek

A hibridóma sejtek mellett számos emlőssejt vonalat – azaz klónozott, a szülői sejttel megegyező sejtpopulációt – is platformként használnak (12. 2. táblázat).

Sejtvonal	Forrás
BHK21	Szíriai aranyhörcsög vese fibroblaszt
CHO	Kínai törpehörcsög ovárium
GH3	Patkány hipofízis tumor
HEK293	Humán embrionális vese
HeLa	Humán cervix karcinóma
HepZ	Patkány májsejtek
J558L	Egér myeloma
MDCK	Cocker spániel (kutya) vese
NS0	Myeloma
Vero	Majom vesesejtek
WI-38	Humán foetális tüdősejtek

12. 2. táblázat: A legfontosabb emlőssejt-vonalak

Rekombináns fehérjék termelésére jelenleg a leggyakrabban a kínai hörcsög (*Cricetulus griseus*) petefészek sejtjeit alkalmazzák; gyenge felszínhez tapadási képessége miatt jól növeszthető sülyesztett körülmények között.

A monoklonális antitestek – hasonlóan a legtöbb sejten kívülre kiválasztott (szekretált) proteinhez – glikoproteinek, vagyis olyan fehérjék, melyekhez a translációt követően egy jól definiált cukorcsoport kapcsolódik. A jelenség neve glikoziláció. A glikoziláció nem követ olyan, templát által egyértelműen meghatározott menetet, mint a DNS, az RNS vagy a fehérje szintézis, emiatt ugyanahhoz a polipeptid lánchoz mennyiségileg-minőségileg különböző cukorszármazékok kapcsolódhatnak (glikoform fehérjék).

A glikozilációnak két típusa van: a gyakoribb N-(nitrogén), és a ritkább O-(oxigén). Az előbbi esetben az N-acetil-glükózamint, mannózt és glükózt tartalmazó oligoszacharid a fehérje egyik aszparaginjának amino ($\underline{\text{N}}\text{H}_2$ -) csoportjához kötődik a sejt endoplazmatikus retikulumának felszínén. Innen a molekula a Golgi-apparátusba kerül, ahol a cukorkomponens további változásokon mehet keresztül. Az O-glikoziláció során az oligoszacharidok a fehérje egyik szerinjének vagy treoninjának hidroxil ($\underline{\text{O}}\text{H}$ -) csoportjához kötődnek. Az oligoszacharid

pontos szerkezete alapvető a glikoproteinek aktivitása szempontjából, és abban is szerepet játszik, hogy a fehérje eljusson a szervezeten belül a szükséges helyre. Glikoproteineket ezért emlőssejt tenyésztés révén termelnek – a baktériumok sem a szükséges enzimekkel, sem a sejt-szervekkel nem rendelkeznek, a gombák poszt-transzlációs módosításai pedig sokszor nem a szükséges glikozilációs mintázatot eredményezik. A nem-glikoprotein jellegű emlős fehérjék (pl. inzulin, hemoglobin, humán növekedési hormon) azonban olcsóbban termeltethetők bakteriális rendszerekkel.

A monoklonális antitestek többségét onkológiai jellegű illetve fertőző betegségek gyógyítására használják. A rákos/fertőzött sejtekre specifikus antitestek célzott immunválaszt indukálnak. Megfelelő módosítást követően alkalmassá tehetők továbbá citotoxikus anyagok (pl. ricin, abrin) megkötésére és szállítására, melyek így – a monoklonális antitest specificitását kihasználva – a beteg/fertőzött sejtet szelektíven, a környező sejtek/szövetek károsítása nélkül pusztítják el. Transzplantációk során a szervezet immunrendszerének szelektív blokkolására is alkalmasak. A molekuláris biológiai módszereket alkalmazó diagnosztikai laboratóriumokban rutinszerűen használnak monoklonális antitesteket definiált anyagok (elsősorban fehérjék) jelenlétének kimutatására szinte tetszőleges mátrixból (pl. a Western blot technika egy membrán felületére rögzített fehérje-halmazból, az immunfluoreszcens technikák pedig fixált szövetből vagy akár élő sejtől is). A pusztító detektáláson túl preparatív célokra (pl. enzimek tisztítása immuno-affinitás kromatográfia révén) is alkalmazzák őket.

12.3 ROVARSEJT TENYÉSZETEK BIOLÓGIÁJA

Számos növényi és állati vírus rovarok (szúnyogok, legyek, stb.) közvetítésével fertőz (pl. a különböző vírusos encephalitis-ek). Másfelől, a *Baculovirus* víruscsalád tagjai kizárólag gerinctelenekben, főleg jól meghatározott rovarfajokban tudnak szaporodni, így potenciálisan felhasználhatók a mezőgazdaság rovar-kártevőinek szelektív pusztítására (biopeszticidok). A rovarsejt-vírus kölcsönhatások kutatása tehát a megismerésen túl gazdasági jelentőséggel is bír.

A *Baculovirus*ok – természetesen még nem néven nevezve, de jól beazonosíthatóan – már a XVI. században ismertek voltak, mint a selyemhernyó (*Bombyx mori*) betegségének kiváltói. A XX. század közepétől alkalmazták őket növényvédelmi célokra, 1983-ban pedig engedélyezték az első *Baculovirus* expressziós vektor-rendszer (angol rövidítése: BEVS)

forgalmazását, megfelelő rovarsejt vonalakkal együtt. Ma már több mint 500 rovarsejt vonal létezik (pl. Sf-9, Sf-21), melyeket több mint 100 különböző rovarfajból izoláltak.

Miért volt szükség rovarsejt-alapú technológiák kifejlesztésére? A rovarsejtek jobban nőnek folyékony tenyészetben az emlőssejtekénél, jobban tolerálják a magas sókoncentrációt, kevesebb mellékterméket hoznak létre és jellemzően könnyebb velük dolgozni molekuláris biológiai, fermentációs technológiai és biztonságtechnikai szempontból egyaránt. A BEVS legfontosabb előnye azonban a *Baculovirus* relatíve nagy méretében rejlik: a hagyományos plazmidokhoz képest nagyobb (hosszabb) idegen DNS-szakaszokat lehet beépíteni a vírus genomba működőképességének veszélyeztetése nélkül. A BEVS-technológiának azonban hátrányai is léteznek: az N-glikoziláció képessége limitált az emlős sejtekhez képest (ennek oka a rovarsejtek glikozil-transzferáz enzimaktivitásainak alacsony szintje). Az O-glikoziláció és a foszforilezés az emlős sejtekhez hasonlóan megy végbe. A legjelentősebb gond azonban a vírus litikus jellege. Mivel a gazdasejt lízise proteázok indukciójával jár együtt, a termelt rekombináns fehérje sokszor áldozatul esik a rovar-(gazda)sejt saját lebontó enzimeinek (lásd lentebb).

A *Baculovirus* dupla szálú, cirkuláris, kb. 150 kb méretű DNS-t tartalmazó vírus. Két formája van: az ún. okklúziós (becsomagolt) formát a polihedrin nevű fehérje veszi szorosan körül, megvédve a vírust a környezet fény- és a hőhatásaitól. Ennek megfelelően ez a forma szabadon, tipikusan növények felületén található, ahonnan a táplálkozó rovar tápcsatornájába kerül. Ott a polihedrin fehérjeburok a tápcsatorna lúgos kémhatása következtében leoldódik, a szabad vírus endocitózissal bekerül a rovar sejtjeibe, majd azok sejtmagjába, ahol önállóan osztódni kezd. A lízisz során a sejtekből kiszabaduló vírust nevezzük bimbózó formának; ezek újabb sejteket támadnak meg, szisztémássá téve a fertőzést. A ciklus utolsó szakaszában a sejtekből felszabaduló vírusok egyre nagyobb arányban polihedrin burkot növesztenek maguk köré; az okklúziós formák a rovar pusztulását követően, a szabadban is képesek a túlélésre a következő fertőzés kezdetéig.

A polihedrin fehérjét kódoló gén promótere szükségszerűen nagyon erős, hiszen nagy mennyiségű fehérjét kell gyorsan létrehoznia, a vírus gazdasejten belüli osztódásához azonban nem szükséges. A BEVS-technológiák lényege, hogy a polihedrint kódoló gént mesterségesen eltávolítják (a promóterét azonban nem!), helyére pedig a rekombináns gént illetve cDNS-t illesztik. Mindez jól magyarázza a keletkező rekombináns fehérje nagy abszolút mennyiségét, de azt is, miért bomlik le ennek egy jelentős része a fermentáció során, illetve miért lesz egy másik része biológiailag inaktív: a polihedrin promóter az ún. késői promóterek közé tartozik, csak a fertőzési ciklus végén, a lízisz közeledtével kapcsol be, így a rekombináns fehérje jó

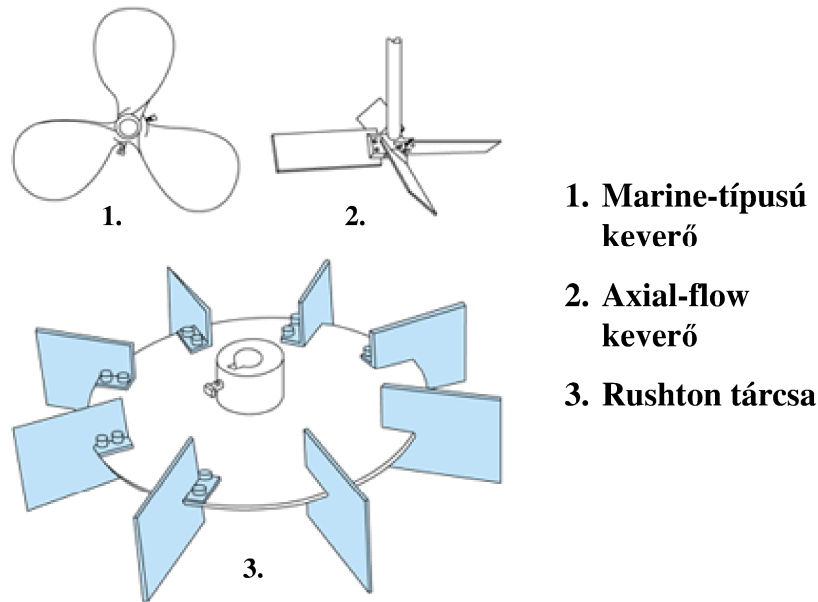
eséllyel szubsztrátumává válik a lizáló sejtől felszabaduló proteázoknak. Másrészt, a poszt-transzlációs modifikációk valós időigényű kémiai reakciók; a lízis gyakran megakadályozza, hogy a glikozilációk megfelelően végbemenjenek.

12.4 ÁLLATISEJT TENYÉSZETEK FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIÁJA

Az emlős- illetve rovarsejtekkel történő fermentációk alapelvei nem különböznek a mikrobiális fermentációktól: ha növeszthetők folyékony tenyészetben, akkor a fermentációk lehetnek szakaszos (batch), ráadagolásos (fed-batch) és folytonos jellegűek. Ez utóbbi – a mikrobiális tenyészetekhez hasonlóan – inkább a kutatás-fejlesztés hasznos eszköze, mintsem a termelésé, bár léteznek olyan gyógyszerek, melyeket perfúzióval termelnek. A bioreaktorok mérete kisebb, mint a mikrobiális technológiáknál (jellemzően 1-5 m³), de a piaci igényekkel párhuzamosan folyamatosan növekednek, és – emlőssejt esetén – már 20 m³ térfogatra is van példa az ipari gyakorlatban. Az inokulum tenyészetek térfogataránya tipikusan 20 % körül van (baktériumok esetében 1-5 %, gombáknál 5-10 % a jellemző érték), emiatt jóval több lépcsőben lehet csak a végső fermentációs térfogatig eljutni. Mivel a tenyészetek aerobok, a bioreaktort levegőztetni és kevertetni kell. A sterilitás kérdése ezen tenyészeteknél jóval gyakoribb és súlyosabb probléma a mikrobiális biotechnológiákhoz képest, hiszen a fertőző mikroorganizmus sokkal gyorsabban nő az állati sejteknél (az állati sejtek generációs ideje tipikusan 12-30 óra között van), a tenyész körülmények pedig általában kedvezőek a behatoló baktériumoknak/gombáknak. További speciális, a sterilitáshoz köthető probléma az emlőssejt fermentáció fokozott biológiai kockázata. Az emlőssejt tenyészetek fogékonyak az emlős/humán kórokozókra, így azok képesek az alkalmazott tenyésztési körülmények között életben maradva a termékbe bekerülni. A kritikus oldott oxigén szint biztosítása azonban – köszönhetően az alacsonyabb specifikus oxigén felvételi rátának – kinetikai értelemben könnyebb. Az állatisejt tenyésztésre használt bioreaktorok K_{La} értékei is alacsonyabbak, mint a mikrobiális fermentoroknál.

Az állatisejt tenyészetek kapcsán elterjedt hiedelem, hogy sejtfal hiányában extrémén érzékenyek a nyíróerőre, s emiatt a táptalaj kevertetése csak minimális intenzitással mehet végbe. A valóságban, noha az állati sejtek mechanikai szilárdsága valóban kisebb a szabadon élő mikroorganizmusokénál, mégis viszonylag jól viselik a kevertetést. Bakteriális tenyészeteknél a specifikus energia disszipációs ráta (ϵ_T) jellemzően 1-2 W/kg fermentlé. Ennek az értéknek a tizedét ($\epsilon_T \sim 0.25$ W/kg) az emlős- és rovarsejt tenyészetek is károsodás nélkül elviselik, így a régebbi szakirodalmakban olvasható $\epsilon_T \sim 0.01$ W/kg ajánlott érték

szükségtelenül alacsonynak tekinthető. Ez két dolgot jelent (1) a bioreaktor K_{La} értékét 4-5 szörösrre lehet növelni ahhoz képest, amit az $\epsilon_T \sim 0.01$ W/kg érték biztosítani tud, (2) nincs szükség állatsejt-specifikus, un. alacsony nyíróerejű keverőkre (noha a legtöbb üzem ezeket – pl. Marine-tárcsa, axial-flow keverő – használja); nincs rá bizonyíték, hogy jobb kihozatalt eredményeznének a hagyományos Rushton-tárcsánál (12. 3. ábra).



12. 3. ábra: Különböző fermentor keverők

Egy másik ok a viszonylag erőteljes kevertetésre – elsősorban nagyobb térfogatú reaktoroknál – a homogenitás szükségessége. Ez a probléma még a lényegesen erőteljesebben kevertetett mikrobiális tenyészeteknél is gyakorta előfordul. A kémhatás és a hőmérséklet 3-4 tized pH-egységet meghaladó egyenetlenségei akár jelentős sejtpusztulással együtt járó stressz hatást is okozhatnak. Baktériumoknál ez a tartomány a fenti érték többszöröse.

A tenyészetek oxigénnel történő ellátásának másik komponense a levegőbuborékok reaktorba juttatása (levegőztetés). A buborékok a reaktor alján található betáplálási ponttól felfelé mozognak, és a táptalaj felszínén szétpattannak. A szétpattanás során, lokálisan óriási disszipációs energia szabadul fel ($\epsilon_T \sim 10^4$ - 10^5 W/kg!), amit a buborékok felületéhez tapadt sejtek ritkán élnek túl. A buborékhoz tapadás (részben éppen az erőteljes kevertetés, részben a sejtek adhéziós adottságai miatt) mikrobiális sejteknél ritkán okoz problémát, emlőssejteknél azonban sajnos gyakorta. Megoldást olyan felületaktív anyagok adagolása jelenthet, melyek megnehezítik a sejtek és a buborékok közötti fizikai kapcsolat kialakulását, továbbá a felületi feszültség csökkentése révén „puhábbá teszik” a fermentlé felszínét, lecsökkentve a levegőbuborékok szétpattanásakor felszabaduló ϵ_T értékét. A gyenge levegőztetés azonban veszélyes is lehet, mivel az oldott CO_2 -szint kritikusan magas értéket érhet el. Különösen a

termelői léptékű fermentorokban állhat elő ilyen helyzet, ahol a több méter magas folyadékoszlop nagy hidrosztatikai nyomása miatt megnő a CO₂ telítési koncentrációja. Az oxigénellátás, a CO₂ kiszellőztetése és a kémhatás szabályozása tehát három, egymással szoros kölcsönhatásban lévő technológiai kérdés; a kémhatást esetenként kifejezetten a CO₂ oldott koncentrációja révén szabályozzák.

Az állati sejtek mérete nagyobb az átlagos baktériumsejtétől (1-3 µm, szemben az emlőssejtek 5-10 µm, és a rovarsejtek 10-20 µm átmérőjével). Vannak állati sejtek, melyek csak akkor növekednek, ha előtte szilárd felületen meg tudnak tapadni; ez lehet a bioreaktor fala, vagy a tápfolyadékba szuszpendált pici (100 µm – 2 mm) golyók (un. mikro-carrier), melyek összességében hatalmas felületet biztosítanak a sejtek növekedéséhez. Léteznek tömör illetve porózus mikro-carrierek; az utóbbiak fizikai védelmet jelentenek a golyók belsejében növekvő sejteknek, egyidejűleg viszont a gázcsere nehezebbé válik. A felszínhez tapadást egy zselatinhoz hasonló extracelluláris fehérje okozza, emiatt átoltás előtt a tenyészethez proteolitikus hatású enzimet (pl. tripszint) kell adni, elősegítendő a sejtek leválását a szilárd felületről.

Az állatisejt tenyészetek sejtűrűsége a 10⁵ – 10⁷ db / mL tartományba esik. A kémhatás és a tenyésztési hőmérséklet sejtvonalspecifikus, de az emlőssejtek tipikus értékei lúgosabbak (pH 7-8) mint a rovarsejteké (pH 6-6.5). A kémhatást leggyakrabban Na₂CO₃-al szabályozzák. Az emlőssejtek tenyésztési hőmérséklete értelemszerűen 37 °C körül van, a rovarsejteké alacsonyabb (25-30 °C). Az emlőssejt tenyészetek egyik jellemzője, hogy glükózból viszonylag nagy mennyiségű tejsavat halmoznak fel a táptalajban, ezzel szemben a rovarsejtek a glikolitikus úton inkább piruvátot állítanak elő, mely a Krebs-ciklusba kerül. Az emlőssejtek specifikus glükóz felvételi rátája ezért jóval, specifikus oxigén felvételi rátája viszont csak kevéssel magasabb a rovarsejtekénél; az anaerob útvonal dominanciája miatt egységnyi glükózból csak kevesebb energiát tudnak előállítani. Érdeemes megemlíteni, hogy a vírusfertőzést követően a rovarsejtek oxigénigénye jelentősen, akár a duplájára nőhet.

Az állatisejt fermentációk egyik kritikus kérdésköre az apoptózis vagy programozott sejthalál jelensége. Természetes közegükben (vagyis szövetekbe rendeződve) az állati sejtek a leghosszabb időt a sejtciklus 'G1' fázisában töltik, melyet az anyagcsere (pl. fehérjeszintézis) normál működésével jellemezhetünk; ez a szakasz analógnak tekinthető a mikrobiális tenyészetek stacioner/idiofázisával. Az 'S' (DNS-szintézis) illetve 'G2' (poszt-szintetikus) fázisok együtt a növekvő-osztódó szakaszt, vagyis az exponenciális fázist jelentik. A fermentorban, önállóan élő állati sejtek ezen utóbbi szakaszhoz alkalmazkodnak sokszor

olyan mértékig, hogy nem is tudnak többé visszatérni a G1 fázisba. Ha a sejtek környezete a reaktorban megváltozik – a változások sokszor minimálisak – akkor egy aktív, genetikailag kódolt, önmegsemmisítő mechanizmus révén elpusztítják magukat (apoptózis), tönkretéve ezzel a fermentációt. Az emlőssejtek apoptózisának molekuláris mechanizmusairól viszonylag sokat tudunk, de ismereteink egyelőre még elégtelenek ahhoz, hogy a jelenséget technológiai léptékben kontrollálni tudjuk. A rovarsejtek apoptózisáról még alap kutatás szinten is keveset tudunk; a kérdést bonyolítja, hogy a rovarsejtek sejtciklusa kissé eltér az emlőssejtektől.

Az élő/holt sejtek arányának ismerete kulcskérdés az állatisejt fermentációk során. Az életképesség mérésének leginkább elterjedt eszköze az ún. áramlási (flow-) citométer (lásd http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html - 12. 3. nem interaktív animáció). Az eljárás során olyan fluoreszcens festékkel kezelik a sejteket, melyek intracellulárisan kötődnek, de az intakt sejtmembránon nem tudnak keresztüljutni. Ha a sejt elpusztult, sejtmembránja immár átérteszti a festéket, ami kötődik és jelet ad. A készülék másodpercenként sok ezer sejtet tud elemezni, ami valós idejű, statisztikusan is értékelhető adatot szolgáltat a felhasználó számára.

Az apoptózis kiváltó oka leggyakrabban valamilyen tápkomponens (pl. növekedési faktor) hiánya vagy koncentrációjának lecsökkenése. Nem véletlen, hogy az állati sejtek tenyésztésének egyik kulcseleme a táptalaj. Szemben a bakteriális és gombatenyészetekkel, melyek szabadon élnek a természetben, az állati sejtek eredetileg egy védelmet és táplálékot biztosító közegben, szövetekbe rendeződve találhatók. Nem meglepő, hogy emiatt a környezet változásaira sokkal érzékenyebbek, anyagcseréjük pedig nem képes arra, hogy egyszerű sókból és szerves anyagokból felépítse biomasszájukat. Az állati sejt tenyészetek táptalaja ezért bonyolult: egy jól definiált recept általában titkos (védett) és az adott sejt vonalra specifikus. Számos cég kifejezetten állati sejt táptalajok fejlesztésére és/vagy forgalmazására specializálódik. Az igényelt komponensek minőségi-mennyiségi ismeretének hiánya esetén korábban sokszor vérszérumot adtak a tenyészethez, ami szerepét tekintve analóg volt a mikrobiális táptalajok komplex komponenseivel (pl. pepton, élesztő-kivonat). Ez a gyakorlat azonban a vírus illetve prion fertőzések valószínűsége (biológiai kockázatok), illetve a termék kinyerés megdrágítása miatt egyre ritkább. A mikrobiális fermentációkhoz képest jelentős különbség, hogy az állatisejt fermentációk táptalaját nem lehet felfőzni; a reaktor üres, direkt gőzös sterilizálását követően szűrik be a kész tápoldatot, ami számos műszaki és emberi hibalehetőséget rejt magában. Nem véletlen, hogy az emlős- illetve rovarsejteket alkalmazó üzemekben a mikrobiális technológiákhoz képest kifejezetten magas szintű, szigorú higiéniai rendszabályokat alkalmaznak (12. 4. ábra).



12. 4. ábra: Állatisejt fermentáló üzem

A szerzők köszönik **Dr. Domonkos Dávid** (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár NyRt., Debreceni Biotechnológia Főosztály) hasznos tanácsait és észrevételeit.