

2. A MIKROBÁK ÉS SZAPORÍTÁSUK

A biológiai ipar jellemzően mikroorganizmusokat, vagy állati és növényi szervezetek elkülönített sejtjeit szaporítja el, és ezek anyagcseréjét használja fel a kívánt folyamatok végrehajtására.

Ez a folyamat a fermentáció (sejtek szaporítása, illetve termék-képzése), a reaktoredény, amiben végrehajtjuk a fermentor.

A környezeti tényezők hatnak a mikrobák életfolyamataira, ezáltal szaporodásukra. Ennek törvényszerűségeit, kvantitatív leírását tárgyalja a szaporodási kinetika.



Az ipari jelentőségű mikroorganizmusok típusai

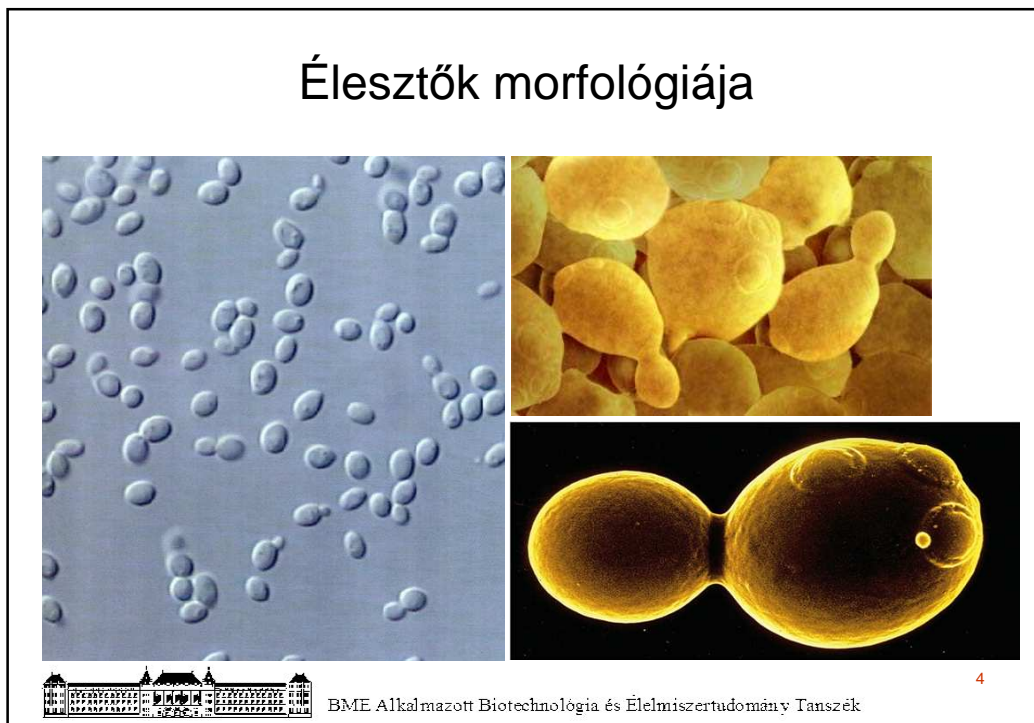
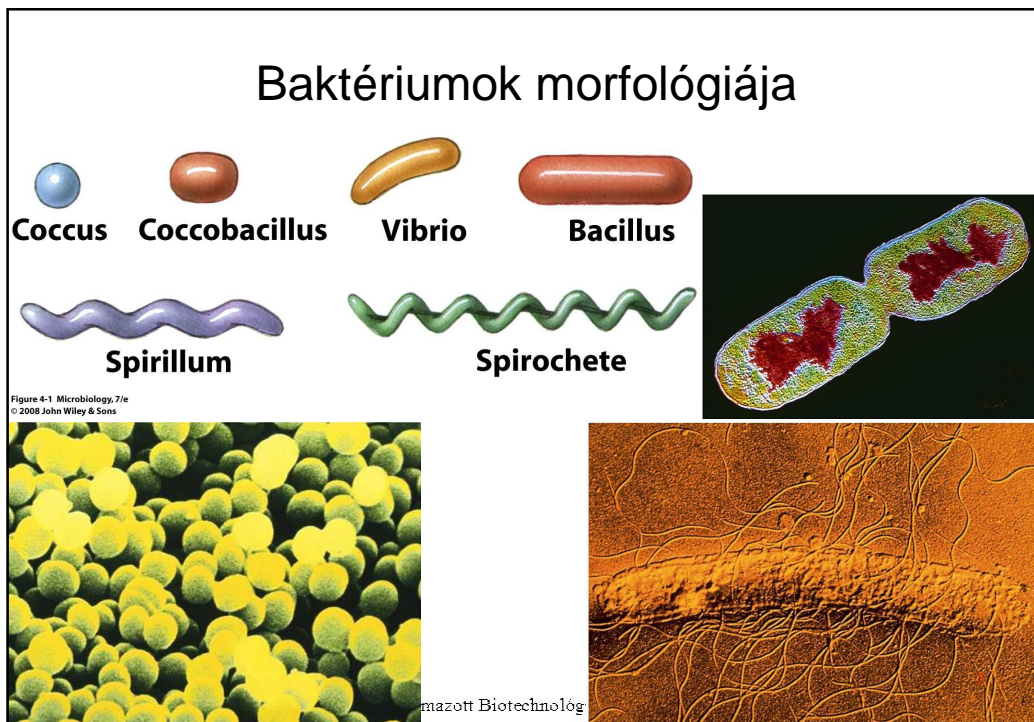
Baktériumok: méret 0.5-5 μm ; gömb, pálca vagy spirális, osztódással szaporodnak, egyesek spóráképzők

Sugárgombák: (aktinomiceták): fonalas szerkezet (micélium), hosszirányú növekedés, spóráképzők (szaporító képlet)

Élesztők: ovális alakú, 5-20 μm , szaporodás főleg sarjadással, a leánysejtek együtt maradnak 1-10 sejtig.

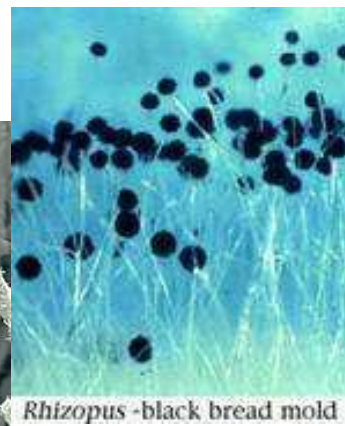
Penészek: 4-20 μm fonalas szerkezet (hifa), szaporodásuknál az ivaros és vegetatív szakaszok váltakoznak, jellegzetes spóratartókat fejlesztenek.





A fonalas gombák morfológiája

A spóratartók jellegzetes alakjai:



Rhizopus -black bread mold



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

A mikroorganizmusok fejlődését, növekedését befolyásoló tényezők

- **Tápanyagok**

Víz

Makrotápelemek (szénforrás, N-forrás, P, S, Ca, K, Na, Fe)

Mikrotápelemek (szinte az összes elem)

Növekedési faktorok, vitaminok

- **Oxigén**

aerob anyagcsere: O_2 -t használ fel az anyagcseréjében

anaerob anyagcsere: nem igényel molekuláris oxigént

- **Hőmérséklet**

pszichofil - hidegkedvelő, mezofil - közepes hőmérsékleten

termofil – melegkedvelő (hőforrásokban akár 90 fokon is)

- **pH**

Savkedvelő/savtermelő - ~ semleges - alkálikus rothasztók



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Táplálkozási típusok szénforrás és energiaforrás alapján

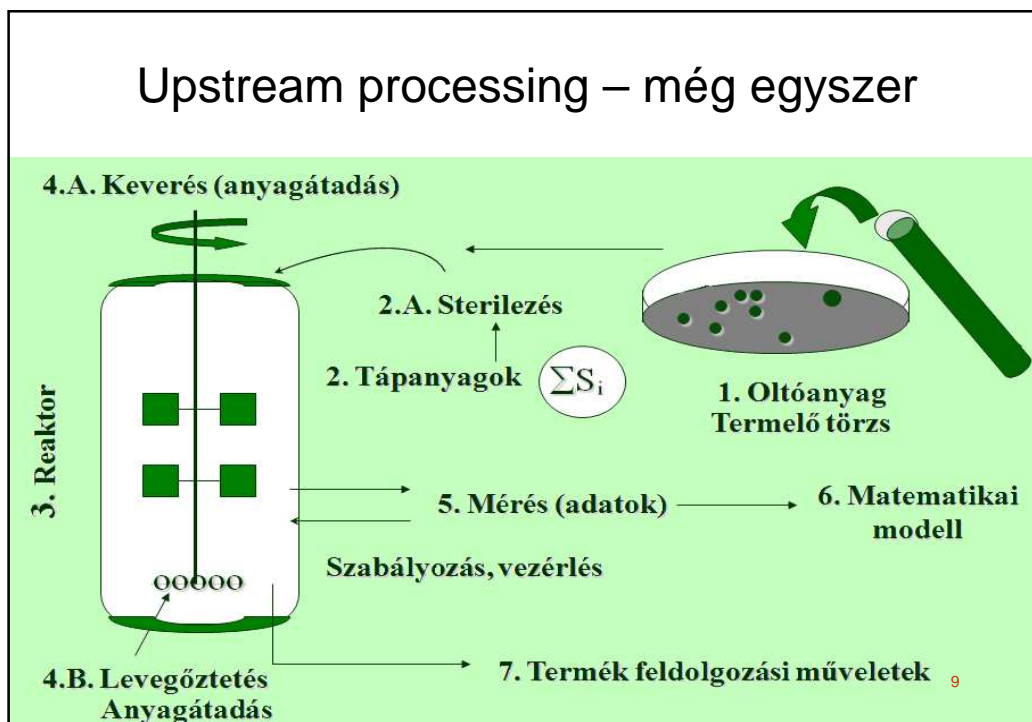
- Autotróf: energiaforrásként nem igényel szerves vegyületeket
 - Fotoautotróf: energiaforrása a fény, C-forrása lehet CO₂ (növények), vagy szerves vegyületek
 - Kemoautotróf: ásványi redox-reakciók energiájának hasznosítása (vas- és kénbaktériumok), C-forrása lehet CO₂, vagy szerves vegyületek
- Heterotróf: az energiát szerves vegyületek lebontásából nyeri, ugyanez a szénforrása is



A mikrobák kémiai összetétele

Organizmus	Összetétel a szárazanyag %-ában			Elérhető sejt-koncentráció a tenyészetben (sejt/ml)	A tenyészet szárazanyag súlya (g/100 ml)
	Fehérje	Nukleinsav	Lipid		
Baktériumok	40-50	13-25	10-15	2·10 ⁸ -2·10 ¹¹	0,02-2,9
Élesztők	40-50	4-10	1-6	1-4·10 ⁸	1-5
Fonális gombák	10-25	1-3	2-7	nem értelmezhető	3-5





Törzsszelekció, törzsjavítás, törzsfenntartás

- Törzsszelekció:** mikroorganizmusok összegyűjtése (törzsgyűjteményből, izolálása a természetből, talajból, vízből...) Ezek termelőképességét próbafermentációval egyenként meg kell vizsgálni. Általában kis termelésű törzseket találunk.
- Törzsjavítás, törzsfejlesztés:** nagyobb termelőképességet genetikai beavatkozásokkal érhetünk el.
Indukált mutáció: besugárzással vagy vegyszerekkel pontszerű változásokat idézünk elő a géneken. Statisztikus: a sok mutáns közül kell megtalálni a néhány jobban termelőt.
A mutációs-szelekciós lépéseket ismételtetik
Génmanipuláció: a sejtekbe célzottan visznek be olyan gént, amelyet azok eredetileg nem tartalmaztak – a törzs idegen fehérjét termel (inzulint, immunfehérjéket, stb.)



Törzsszelekció, törzsjavítás, törzsfenntartás

3. Törzsfenntartás

Cél: a maximális termelőképesség megőrzése

folyamatos, rendszeres átolttással: néhány ciklus után a termelőképesség csökkenhet

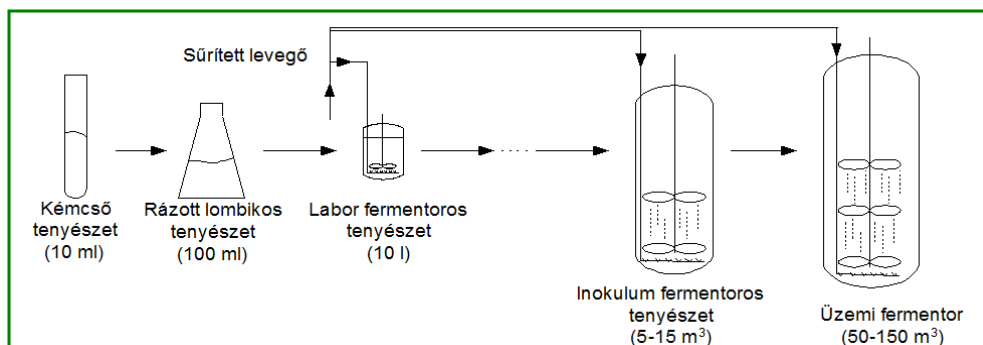
a tenyészetek tartósításával:

- fagyasztva szárítással (liofilezés)
- mélyhűtéssel (-180 fokon, cseppfolyós N₂-ben)



Lépcsőzetes szaporítás

A törzskonzerv nem elegendő egy ipari fermentor beoltásához, fokozatosan szaporítják fel, egyre nagyobb térfogatokban.



Fermentációs tápoldatok

**C-forrás + N-forrás + O₂ + ásványi sók +
speciális tápanyagok (pl. vitamin) →**
→ Új sejttömeg (ΔX) + termékek + CO₂ + H₂O

Mikrobák tápanyag igénye → ezt elégíti ki a tápoldatok



Fermentációs tápoldatok

A kiválasztott törzs számára meg kell találni az megfelelő összetételű tápoldatot (→ optimalizációs kísérletek).

Gazdasági szempontok: olcsó legyen → melléktermékek, hulladékok

C- forrás: keményítő, cukrok (melasz, tejcukor, szulfitszennylég), néha kőolaj, alkoholok, szerves savak

N-forrás: szervetlen: műtrágya minőségű sók (ammónium-nitrát, karbamid, stb.)

szerves: (olajmentesített) szójadara, élesztőkivonat, húskivonat, kazein...



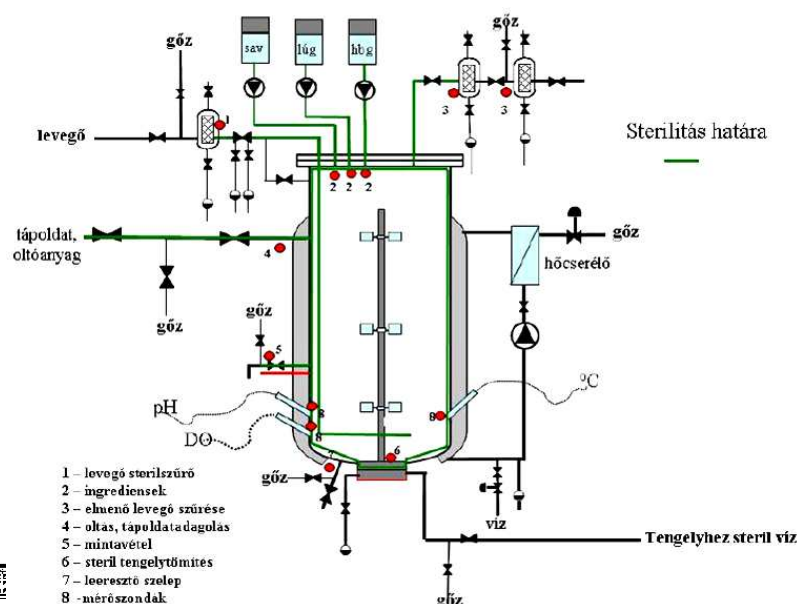
Ipari fermentációk

Ha megvan a megfelelő törzs, a megfelelő tápoldat, akkor kereshetünk egy megfelelő bioreaktort (fermentort), amiben végrehajtjuk a fermentációt. Sokféle funkció, sokféle szerelvény:

- gőzfűtés, vízűtés (duplikátor, csőkígyó)
- keverés (lehet alsó- és felső meghajtású)
- levegő bevitel és kivezetés
- folyadékok beadagolása (inokulum, tápanyag, sav, lúg, hab-gátló)
- és elvétele (leürítő szelep, mintavevő)



Ipari fermentor jellemző szerelvényei



Sterilizálás

A tenyésztésénél általában arra törekszünk, hogy a berendezésben kizárólag a kiválasztott mikrobatorzs szaporodjon. A környezet, azaz a fermentor, a tápoldat, minden anyag viszont sokféle mikrobával szennyezett – ezeket a folyamat megkezdése előtt el kell pusztítani – ez a sterilizálás.

A tápoldattal töltött fermentort gőzzel fölfűtik ~120 fokra (túlnyomás) és ~fél óráig ezen a hőfokon tartják. Ez általában elpusztít minden mikroorganizmust.

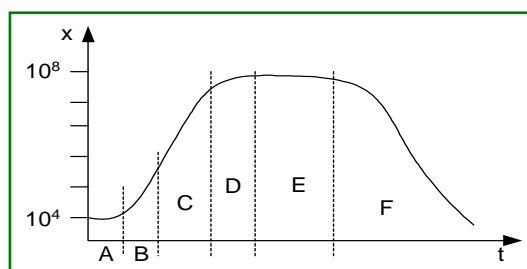
Az így létrehozott steril környezetbe visszük be az oltótenyészetet.

A reaktor steril zárását az egész folyamat alatt fenn kell tartani.



A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

A tenyészet fejlődésének szakaszai:



A. Lappangási (lag) szakasz

B. Gyorsuló növekedés szakasza

C. Exponenciális növekedés szakasza, korlátlan, kiegyensúlyozott növekedés.

D. Lassuló, limitált vagy korlátozott szaporodás

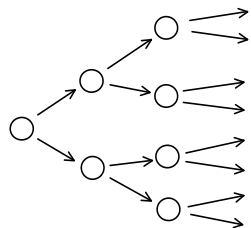
E. Stacionárius, stagnáló szakasz

F. Hanyatló szakasz



A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

Sejtosztódás:



x_0 - kiindulási mikrobakonzentráció

n - a generációk száma

t_g - generációs idő = két sejtosztódás között statisztikai átlagban eltelt idő

$$x_0 \rightarrow 2x_0 \rightarrow 4x_0 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n x_0$$

A generációs idő függ a mikroba fajtól, a tenyésztési körülményektől (tápanyag, hőmérséklet, pH, stb.), sőt még egy adott tenyésztés folyamán is változik.



A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

$$x = 2^n x_0 \quad \text{átrendezve:} \quad n = \frac{\ln x - \ln x_0}{\ln 2}$$

A generációk száma a definícióból kifejezve:

$$\frac{t}{t_g} = n \quad \text{a kettőből:} \quad \frac{\ln x - \ln x_0}{t} = \frac{\ln 2}{t_g} = \mu$$

Az $\frac{\ln 2}{t_g} = \mu$ kifejezés a fajlagos szaporodási sebesség egyik felírása



A fajlagos szaporodási sebesség

A mikrobaszaporodás egy elsőrendű diffegyenlettel írható le:

$$\frac{dx}{dt} = \mu * x \quad \text{az új sejtek mennyisége a jelenlévő élő sejtek számától függ. Átrendezve:}$$

$$\frac{1}{x} * \frac{dx}{dt} = \mu \quad = \text{fajlagos szaporodási sebesség egységnyi mikrotömegre vonatkoztatott szaporodás.}$$

Hogy lehet a μ kétféle felírásának azonosságát igazolni?

$$\frac{dx}{x} = \mu dt \quad \text{szétválasztással integráljuk az egyenletet}$$



A fajlagos szaporodási sebesség

Az integrált forma: $\ln(x) = \mu(t)$

A határozott integrál határai: $x_0 \rightarrow x$ és $0 \rightarrow t$

$$\ln x - \ln x_0 = \mu(t - 0)$$

átrendezve:

$$\frac{\ln x - \ln x_0}{t} = \mu$$

Ezzel visszakaptuk a generációs idővel kapott alakot.



A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

A fentiek szerint t_g és μ között fordított arányosság van:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

t_g és μ értéke minden tenyésztésben más és más, sőt egy tenyésztésen belül is változik.

Jellemző legrövidebb generációs idők:

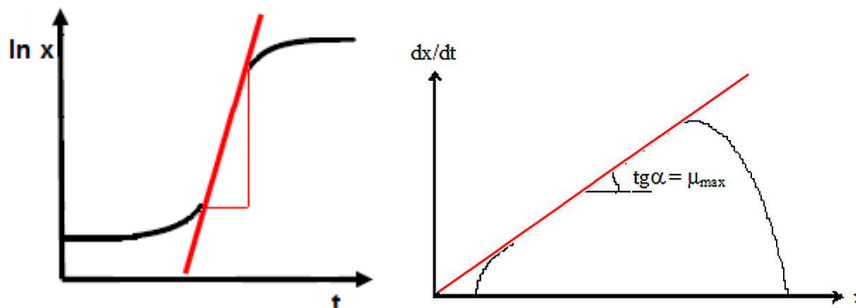
baktériumok: ~20 perc, élesztők: 1-2 óra, penészek: 5-24 óra

Egy tenyésztésen belül legnagyobb (és állandó) a szaporodási sebesség az exponenciális szakaszban: μ_{\max}



A maximális növekedési sebesség meghatározása

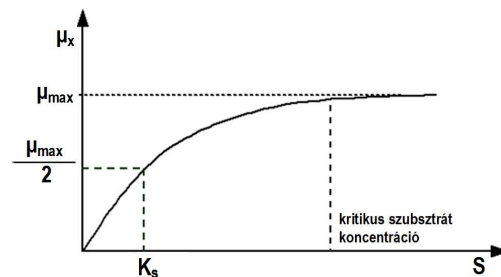
- féllogaritmikus ábrázolásból
- átszerkesztett diagramból



A szubsztrátkoncentráció hatása a szaporodásra

A sejtek sokféle szubsztrátot dolgoznak fel egyidejűleg – ez sokféle enzimes reakciót jelent – a sebesség-meghatározó lépés ezek közül a leglassabb. Egy enzimes reakció sebessége határozza meg az egész anyagcsere eredő sebességét – jogos az enzimeknél használt egyenlet alkalmazása.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A szubsztrátkoncentráció hatása a szaporodásra

A kritikus szubsztrátkoncentráció fölött a szaporodási sebesség állandó és maximális. Ha a tenyésztés során a mikroba tápanyagfogyasztása következtében az adott szubsztrát koncentrációja a kritikus alá csökken, akkor kezdi korlátozni, limitálni a növekedést.

Ezáltal a tenyészet átlép az exponenciális fázisból a hanyatló szakaszba.

Egy adott mikrobánál a μ_{\max} értéke állandó, de a K_S és S_{krit} koncentrációk minden egyes szubsztrátra mások és mások.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Komplex kinetikai leírás

A teljes fermentációs folyamat leírásához három folyamat, a szaporodás, a szubsztrátlebontás és a termékképződés sebességét, és a köztük lévő kapcsolatokat kell megvizsgálni.

Ehhez bevezetjük a következő fajlagos sebességeket:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad \mu_x - \text{fajlagos növekedési sebesség}$$

$$\mu_s = \frac{1}{x} \frac{dS}{dt} \quad \mu_s - \text{fajlagos szubsztrátfelhasználási sebesség}$$

$$\mu_p = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} \quad \mu_p - \text{fajlagos termékképződési sebesség}$$



Hozamkonstans

Elsőként a növekedés és a tápanyagfelhasználás közötti összefüggést vizsgáljuk. A fajlagos sebességek hányadosa adott törzs és adott szubsztrát esetén állandó:

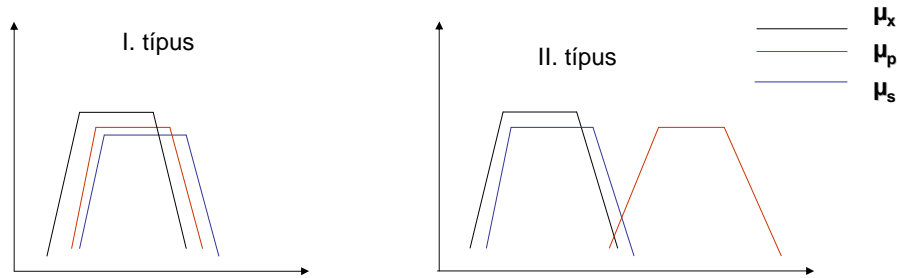
$$Y = \frac{\mu_x}{\mu_s} = \frac{\frac{1}{x} \frac{dx}{dt}}{\frac{1}{x} \frac{dS}{dt}} = \frac{dx}{dS}$$

Ezt nevezzük **hozamkonstansnak** (yield), jelentése: egységnyi szubsztrát felhasználása révén létrejött mikrobatömeg.



Termékképződési kinetika

Ha a mikroorganizmus valamelyik metabolit termékét akarjuk üzemi méretekben előállítani, akkor mindhárom folyamatot együttesen célszerű vizsgálni. A folyamatok időbeli lefutása szerint két alaptípus különíthető el:



Termékképződési kinetika

1. A termékképződés párhuzamos a növekedéssel
(pl.: alkoholos erjesztés, tejsav fermentáció, ... → primer anyagcsere-termékek
→ növekedéshez kötött termékképződésű fermentációk
2. A termékképződés később kezdődik – a keletkező termék mennyisége itt nem a szaporodástól függ, hanem a jelenlévő sejtek számától.
(pl.: antibiotikum fermentációk... → szekunder anyagcsere-termékek)
→ sejtszámhoz kötött termékképződésű fermentációk



Termékképződési kinetika

1. Növekedéshez kötött termékképzés: $\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt}$

$$\mu_p = \alpha \cdot \mu_x$$

2. Sejtszámhoz kötött termékképzés: $\frac{dp}{dt} = \beta \cdot x$

$$\mu_p = \beta$$

3. Vegyes típusú termékképzés: $\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta \cdot x$

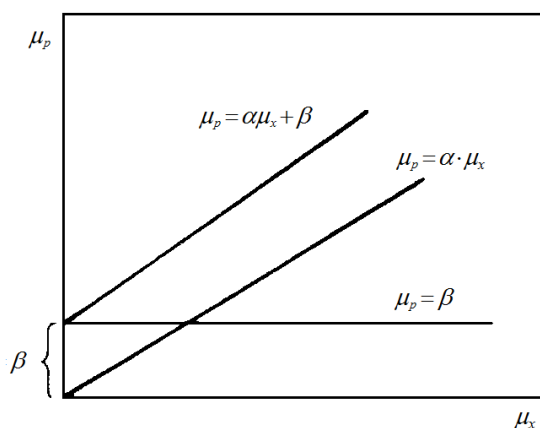
$$\mu_p = \alpha \mu_x + \beta$$



Termékképződési kinetika

Ugyanez diagramon:

(Luedeking-Piret ábrázolás)



Fermentáció típusok

Szakaszos (batch) fermentáció: az összes tápanyagot és mikrobát egyszerre, a folyamat elején visszük be, betáplálás és elvétel nincs. A folyamat végén az összes fermentlevet egyszerre vesszük el és feldolgozzuk.

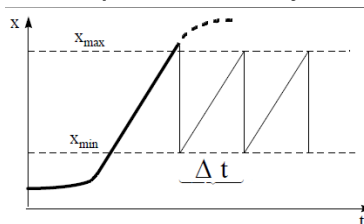
Rátáplálásos (fed-batch) fermentáció: a tenyésztés indításánál elkészített tápoldaton kívül menet közben is adnak be tápanyagokat, a létrejött fermentlevet a folyamat végén egyszerre engedik le.



Fermentáció típusok

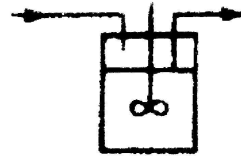
Félfolytonos (semicontinuous) fermentáció:

Ez ismétlődő szakaszos fermentációk sorozatának fogható fel. Az egyes fermentációs ciklusok között a fermentort nem ürítik ki teljesen, ehelyett a szakaszos tenyésztés végén a kész fermentlé kb. 90 százalékát lefejtik, majd a készüléket friss, steril tápoldattal töltik fel. A tenyésztés újra indul, a mikroorganizmusok elszaporodása és termékképzése után újabb lefejtés-feltöltés következik.



Folytonos fermentáció

Folytonos fermentáció: folyamatos a tápoldat bevezetés és termékeltávolítás. A két térfogatáram egymással egyenlő, a készülékben lévő fermentáló térfogata is állandó. A rendszerben állandósult állapot alakul ki.



Előnyei:

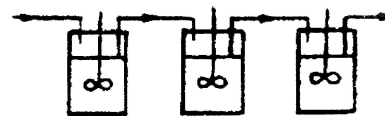
- produktivitása 5-10 -szer nagyobb, mint a szakaszos tenyésztésé
- automatizálási lehetőség, az üzem egésze folytonossá tehető
- egyenletes terméket biztosít



A folytonos fermentáció változatai

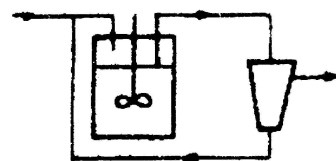
Többlépcsős folytonos fermentáció.

Ezeket két vagy több, folytonos fermentorból álló lánc alkotja. Az első reaktorból elvett fermentlevet a második fermentorba vezetik.



Sejtrecirkulációs folytonos fermentáció.

Az eltávozó sejtek egy részét állandóan visszavezetjük a fermentorba egy folytonosan működő elválasztó (szűrő, ülepítő, centrifuga) segítségével. Ezáltal megnövelhető a reaktorban a sejtkoncentráció, így sokkal intenzívebben zajlanak le a biokémiai folyamatok.



A folytonos fermentáció kinetikája

A folytonos reaktoroknál a reaktoron átmenő anyagáramot két összefüggő paraméterrel jellemezhetjük:

$$\text{tartózkodási idő} = \frac{V}{W} \qquad \text{hígítási sebesség} = D = \frac{W}{V}$$

V = a reaktorban lévő anyag térfogata
 W = az átmenő térfogatáram

A tartózkodási idő az átlagosan a reaktorban töltött időt jelenti, a hígítási sebesség pedig az időegység alatt végrehajtott térfogatcserék számát.



A folytonos fermentáció kinetikája

Ha a betáplálásban nincsenek sejtek, akkor a reaktorban szaporodó sejtek koncentrációjára az alábbi mérlegegyenletet írhatjuk fel:

változás = szaporodás – kimosás

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x - D \cdot x$$

Állandósult állapotban az x sejtkoncentráció is állandósul, ekkor a szaporodás egyenlővé válik a kimosódással:

$$\mu \cdot x = D \cdot x \qquad \text{azaz} \qquad \mu = D$$



A folytonos fermentáció kinetikája

$$\mu = D$$

→ a fajlagos szaporodási sebesség egyenlővé válik a hígítási sebességgel. A hígítási sebességet mi választjuk meg (egy szivattyú beállításával), ez a rögzített érték. A szaporodó tenyészet ehhez alkalmazkodik, és egy tranziens (átmeneti) szakasz után a szaporodás sebessége egyenlővé válik a kimosásával. A tranziens szakasz után áll be az állandósult állapot.

A folytonos tenyésztés minden esetben szakaszos tenyésztéssel kezdődik. Amikor a szakaszos görbe t_1 időpontban eléri a x_1 mikrobakonzentrációt, akkor folytonosítjuk a rendszert, azaz D hígítási sebességgel adagolni kezdjük a tápoldatot.



A folytonos fermentáció kinetikája

Különböző beállított D értékeknél:

Ha $D = 0$, a rendszer szakaszos tenyészetként működik.

Ha $0 < D < \mu_{\text{pillanatnyi}}$, akkor a sejtkoncentráció növekszik, a szaporodási sebesség pedig csökken, mindaddig, amíg egyenlővé nem válik a D -vel.

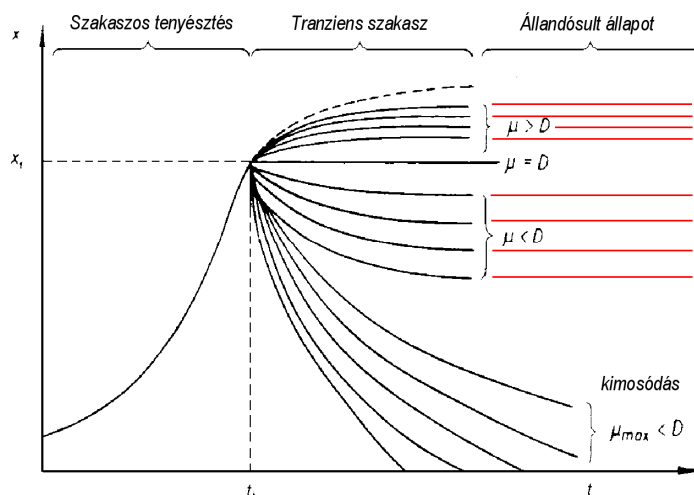
Ahol a D éppen egyenlő μ_{pill} -val, ott azonnal beáll az állandósult állapot (ezt nehéz eltalálni).

Ha $D > \mu_{\text{pill}}$, az a sejtkoncentráció csökkenését, és a szaporodás gyorsulását eredményezi, mindaddig, amíg az el nem éri D -t.

Ha $D > \mu_{\text{max}}$, akkor a tenyészet még a maximális szaporodási sebesség mellett sem tud annyi sejtet termelni, mint amennyit elveszünk. Így nem tud egyensúlyi, állandósult állapot kialakulni, a sejtkoncentráció csökken, végül teljesen eltűnnek a sejtek rendszerből (= kimosódás).



A folytonos fermentáció kinetikája



A folytonos fermentáció kinetikája

Ugyanezt a szakaszos sebességi görbén:

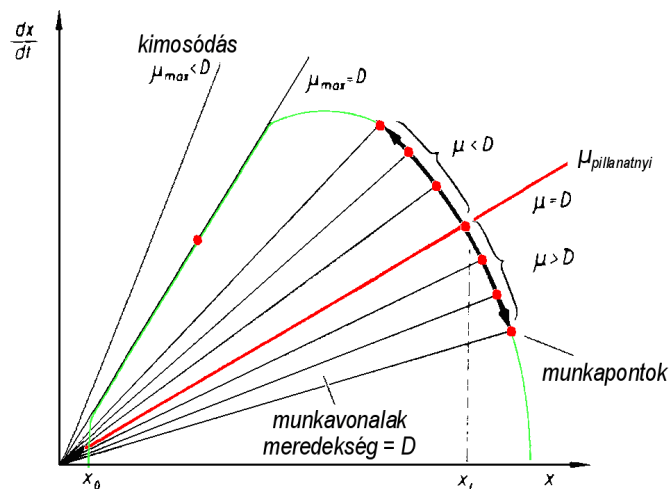
A folytonosítás pontjában (x_1) az origóból húzott egyenes iránytangense egyenlő az x_1 sejtkoncentrációnál mérhető ($\mu_{\text{pillanatnyi}}$ -val).

Az általunk beállított D értékeket is az origóból induló egyenesekkel (munkavonal) jellemezhetjük, amelyek kimetszik a görbén munkapontot, ahol a rendszer állandósult állapotban üzemelni fog. Az x_1 pontban lévő tenyészet a tranziens szakaszban a görbe mentén „átmegy” a munkapontba. Ennek során a sejtkoncentráció és a μ értéke is változik.

Ha a beállított $D > \mu_{\text{max}}$, akkor nincs metszéspont, azaz nincs munkapont, nincs állandósult állapot, a rendszer kimosódik.



A folytonos fermentáció kinetikája

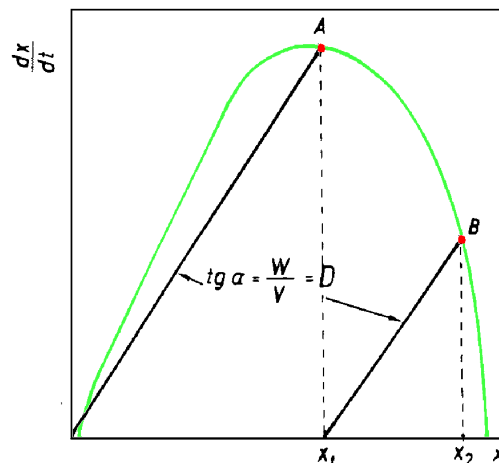


A folytonos fermentáció kinetikája

A sebességi diagram alkalmas többlépcsős, kaszkád rendszerű folytonos fermentációs rendszerek viselkedésének becslésére is. Az első lépcsőben kialakuló állandósult állapotú mikrobakoncentrációt (x_1 -t) az előzőekhez hasonló módon kapjuk meg. A második lépcsőben a befolyóban is találhatóak sejtek, így a munkavonal nem az origóból indul, hanem az x_1 értéktől. Meredeksége a második lépcsőre érvényes hígítási sebesség, amely nem szükségszerűen azonos az elsővel. Az átfolyó térfogatáramoknak azonosnak kell lenniük, így a reaktorok térfogatának kell különböznie.



A folytonos fermentáció kinetikája



A folytonos fermentáció kinetikája

Vizsgáljuk meg, hogy milyen állandósult tápanyag (szubsztrát) koncentráció (S) alakul ki a fermentorban. A szubsztrátra felírt mérlegegyenletben figyelembe kell venni a bevitt tápoldatban lévő anyagot is (S_0).

változás = bevitel - kimosás – fogyasztás

Kihasználva, hogy $\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \cdot \frac{dx}{dt}$ és $\frac{dx}{dt} = x\mu$

a mérlegegyenlet: $\frac{dS}{dt} = D \cdot S_0 - D \cdot S - \frac{\mu \cdot x}{Y}$



A folytonos fermentáció kinetikája

A μ szubsztrátfüggését is figyelembe véve az egyenleteket kiegészíthetjük:

$$\frac{dx}{dt} = x \left[\mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) - D \right]$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_0 - S) - \frac{\mu_m \cdot x}{Y} \left[\frac{S}{K_s + S} \right]$$

Állandósult állapotban nincs változás, a deriváltak nullák. Átrendezve kifejezhetők az állandósult koncentrációk:

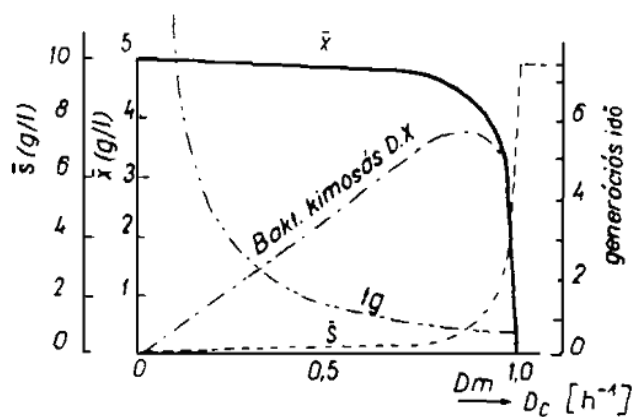
$$S = K_s \cdot \left(\frac{D}{\mu_{max} - D} \right) \quad x = Y \cdot (S_0 - S) = Y \left[S_0 - K_s \left(\frac{D}{\mu_{max} - D} \right) \right]$$



A folytonos fermentáció kinetikája

A konstansok ismeretében x és S változása a D függvényében kiszámítható:

$D \cdot x$ = produktivitás, a kivett sejtmenyiség



A folytonos fermentáció kinetikája

Látható, hogy széles hígítási sebesség tartományban a szubsztrát állandósult állapotú koncentrációja a fermentorban és így az elfolyó lében is igen kicsi. Tehát a szubsztrát csaknem teljesen felhasználódik. Csak a kritikushoz közeli hígítási sebességnél jelenik meg az elfolyó fermentlében jelentős mennyiségben fel nem használt szubsztrát.

