

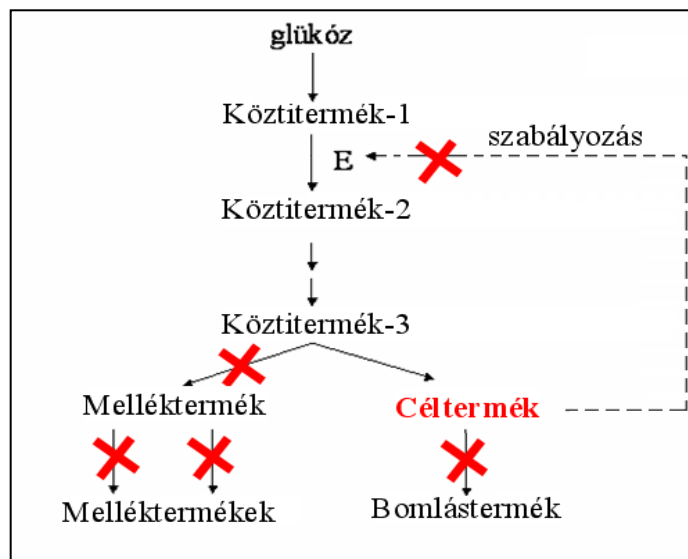
1. Aminosavak, anyagcsere mérnökség (metabolic engineering)

1.0.1. Anyagcsere mérnökség

A klasszikus anyagcsere mérnökséget (metabolic engineering) elsősorban a primer metabolitokat termelő törzsek fejlesztésénél alkalmazzák. Olyan törzsek kialakítása a cél, ahol a kívánt metabolitot nagy mennyiségben tudja előállítani a sejt. Ehhez az anyagcsere-útvonalakat fel kell deríteni, és a kívánt irányba kell módosítani. Ennek eszköze a klasszikus indukált mutációs + szelekciós technika, sok lépésben lehet fejleszteni a megfelelő törzseket. (Klasszikusnak nevezzük, mert ~40 évvel megelőzte a rekombináns génmanipulációt.) Ha már ismerjük bioszintézis reakciólépéseit, akkor:

1. Először is le kell zárni azokat az elágazó anyagcsereutakat, amelyek elvonnák a kívánt termék előállításához szükséges köztitermék molekulákat, le kell állítani a mellékreakciókat.
2. Emellett meg kell szüntetni azokat a reakciókat, amelyek termékünket tovább alakítanak, hiszen ezek elbontják a már létrehozott célterméket. Ezt a két célt hiány- (auxotróf) mutánsok izolálásával lehet megvalósítani. Ha a mellék-, vagy bomlástermék egy létfontosságú metabolit, ami esszenciális a mikrobának, akkor ezt az anyagot a bioszintézis út lezárása esetén is biztosítani kell. Erre két lehetőség van: - vagy a táptalajba kell adagolni a hiányzó vegyületet (ami megnöveli a költségeket), vagy a hiánymutánsok között úgynevezett leaky (szivárgó) mutánst kell keresni. Ennél a terméket továbbalakító lépés a mutáció következtében nem áll le teljesen, csak lelassul (csökkent kópiaszám, vagy kisebb váltátszámú enzimfehérje). Így a mikroba kis mennyiségben megtermeli magának a szükséges anyagot, de a hasznos termék felhalmozódását nem csökkenti.
3. Más oldalról a túltermelést megakadályozó visszacsatolásokat kell kiiktatni, amelyek a termék feldúsulása esetén leállítanak a bioszintézist. Még a legegyszerűbb mikrobában is működnek ilyen enzimszintű szabályozó mechanizmusok. A felhalmozódott metabolit hozzákötődik a bioszintézis út legelső reakcióját katalizáló enzim egy speciális kötőhelyéhez (nem a szubsztrát kötőhelyéhez, hiszen a további átalakítások miatt már a szerkezet nem hasonlít a szubsztráthoz) és ezáltal megváltoztatja az enzimfehérje konformációját (harmadlagos vagy negyedleges szerkezetét) amitől az enzim aktivitása lecsökken.

A sérült feed back repressziójú mutánsokat rendszerint antimetabolit rezisztenciájuk alapján azonosíthatjuk. Az antimetabolitok a „valódi” metabolitok szerkezetanalógjai, származékai, amelyek nem képesek betölteni az eredeti metabolit biokémiai funkcióját, de képesek a szabályozott enzim kötőhelyéhez kapcsolódni és leállítani annak működését. Az antimetabolitok az ép szabályozású sejtek számára mérgezőek, hiszen állandóan akadályozzák a bioszintézist. Az antimetabolitos kezelést csak azok a mutánsok élik túl, amelyeknél a szabályozott enzim kötőhelye sérült, és így sem az eredeti, sem az antimetabolit nem tud kötődni.



1. ábra A klasszikus anyagcsere mérnökség beavatkozási pontjai

Ezeknél az antimetabolit rezisztens mutánsoknál a túltermelést fékező szabályozás nem működik, képesek a kívánt anyagot nagy mennyiségben felhalmozni.

1.0.2. Aminosavak gyártása

Az aminosavak tipikusan olyan elsődleges anyagcsere termékek, amelyek termelésénél anyagcseremérnöki beavatkozásokkal fejlesztették a termelő törzseket. Szemléltetésül néhány ipari aminosavtermelő mutáns törzs genetikai jellemzőit mutatja a táblázat:

1. táblázat Néhány mutációval létrehozott aminosav túltermelő törzs

Aminosav	Törzs	Genetikai jellemzők	Kihozatal (g/l)	C-forrás
Arginin	Brevibacterium flavum	Gua ^r , Ta ^r	35 25	Glükóz Ecetsav
Glutaminsav	Corynebacterium glutamicum	Vad törzs	>100	Glükóz
	Beribacterium flavum		98	Ecetsav
	Arthobacter paraffineus		82	n-paraffin
Lizin	Corynebacterium glutamicum	Hom ^r , Leu ^r , AEC ^r	39	Glükóz
	Beribacterium flavum	AEC ^r	57	Szacharóz
	Beribacterium flavum	Hom ^{leaky} , Thr ^r	75	Ecetsav
Triptofán	Corynebacterium glutamicum	Phe ^r , Tyr ^r , 6FTrp ^r 5MTrp ^r	12	Glükóz

(- = hiánymutáns, r = rezisztens mutáns, Ta = tiazol-amin, Hom = homoszerin, AEC = amino-etil-cisztein, 6FTrp = 6-fluor-triptofán, 5MTrp = 5-metil-triptofán)

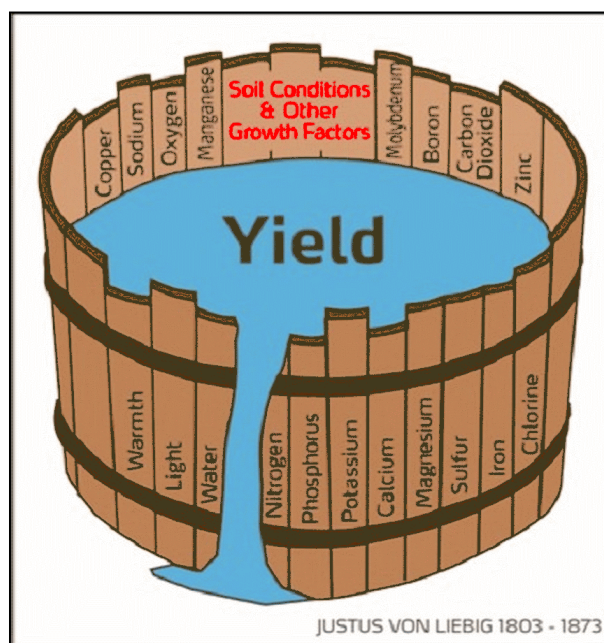
1.0.3. Az aminosavak felhasználása

Aminosavakat több célból termelnek.

Ízfokozóként használják a nátrium glutamátot az élelmiszeriparban (Delikát, Vegeta).

Édesítőszer (aszpartám, Asp-Phe-OMe) gyártanak az aszparaginsavból és a fenilalaninból.

Takarmány- és élelmiszer-kiegészítőként alkalmazzák a lizint, a metionint, a treonint és a triptofánt. A takarmányozásnál alapvető kérdés az összetétel kiegyensúlyozottsága, azaz a bevitt anyagok aránya minél jobban feleljen meg a táplált szervezet igényeinek. Ez megegyezik a Liebig által a növényekre felállított minimum-törvénnyel: „ha egyetlen tápanyag-komponensből is hiány van, a növények növekedése korlátozott, még akkor is, ha az összes többi tápanyag megfelelő mennyiségben jelen van. A növények növekedése akkor fokozódik, ha a hiányzó tápanyagot hozzáadjuk.”

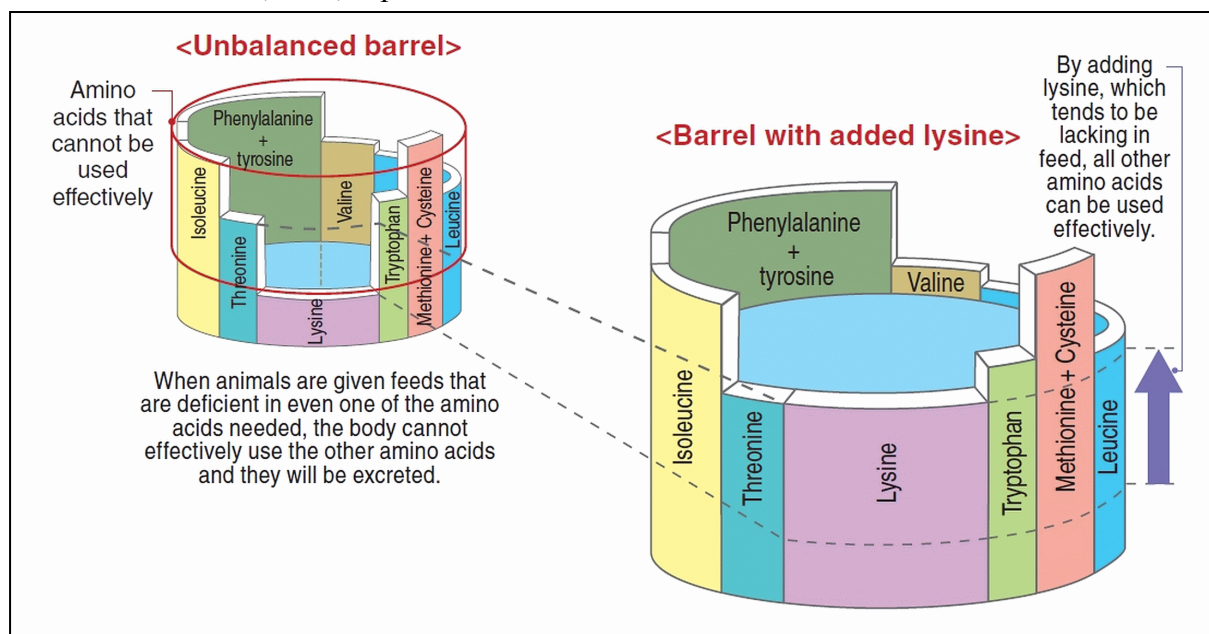


2. ábra Liebig minimum elvének szemléltetése

Ez érvényes a fehérjetartalomra, és a fehérjén belül az aminosavak arányára is. Az esszenciális aminosavakat a táplálékkal kell bevinnünk a megfelelő mennyiségben. Ha egy komponensből is kevesebb van a kívánatosnál, az lefékezi a gyarapodást, és a többi tápanyag sem hasznosul megfelelően (analóg a mikrobanövekedésnél tárgyalt szubsztrátlimitációval). Ezt szemlélteti a jelképes ábra, amelyen látható, hogy a legkisebb elem határozza meg a teljes kapacitást. Ha bizonyos aminosavakból hiány van, a fehérje nem, vagy csak rosszul hasznosítható. Ha nem hasznosul a fehérje, akkor a megmaradt aminosavak kiürülnek és környezet-szennyezést okoznak.

A mérsékelt égövön, így Magyarországon is az alapvető takarmány bázis a kukorica, mellette egyéb gabonafélék. Ezek fehérjetartalma kicsi, és ráadásul a fehérjék sem tartalmazzák megfelelő mennyiségben az esszenciális aminosavakat. A szénhidrát tartalom mellé tehát teljes értékű fehérjét kell adni. Számításba jöhet növényi oldalról a szója, illetve a lóbab, de ezek termesztése ezen a klímán nem gazdaságos. Egyedüli hazai fehérjeforrás a napraforgóda-ra, viszont ez is korlátozott mennyiségben termelődik és lizin-hiányos. Állati eredetű fehérjeforrások a halliszt, a húsliszt és tejfehérje, de ezek nagyon drágák.

Ez indokolja, hogy biotechnológiai úton előállított esszenciális aminosavakat adagolnak a táplálékokhoz és a takarmányokhoz. A kukorica komplettálásában a három legfontosabb aminosav: metionin, lizin, triptofán.



3. ábra Kukorica fehérje hasznosulásának fokozása lizin hozzáadásával.

Antioxidánsként a cisztein és a triptofán vált be (főleg gyümölcsle illetve tejpor gyártásánál).

Aminosavakat még sokféleképpen fel lehet használni. Például a kenyér készítésénél is adhatnak lizint a tésztahoz. Orvosi gyakorlatban infúziós oldatok készítésére használnak aminosavakat, illetve gyógyszerek előállításához.

1.0.4. Történet és piac

Az aminosavgyártás története 1909-ben kezdődött, amikor Japánban nátrium-glutamátot kezdtek gyártani (ételízesítő, ízfokozó) siker, illetve szójafehérje hidrolízisével. 1957-ben Kinoshita, a Kyowa-Hakko cég kutatója a *Corynebacterium glutamicum* mutáns törzseivel kezdett glutaminsavat és nukleotidokat előállítani, ezzel Japánban megjelent a fermentációs ipar új ága, az aminosavak és a nukleotidok előállítása. A *Corynebacterium* és *Brevibacterium* tör-

zsekből izolált mutánsokat használták mert ezeknél két anaplerotikus út is működik, míg az *E. colinál* és a *B. subtilisnél* csak egy.

1981-ben már évi 365.000 t aminosavat állítottak elő, 1998-ra pedig az aminosavak éves forgalma elérte a 1.7 Mrd \$-t:

Aminosav	Éves termelés
Glutaminsav	320.000 t/év
D,L-metionin	70.000 t/év
Lizin	40.000 t/év
Aszparaginsav	1.000 t/év
Arginin	300 t/év
Cisztein, triptofán	200 t/év

2. táblázat Az aminosav termelés megoszlása (1998)

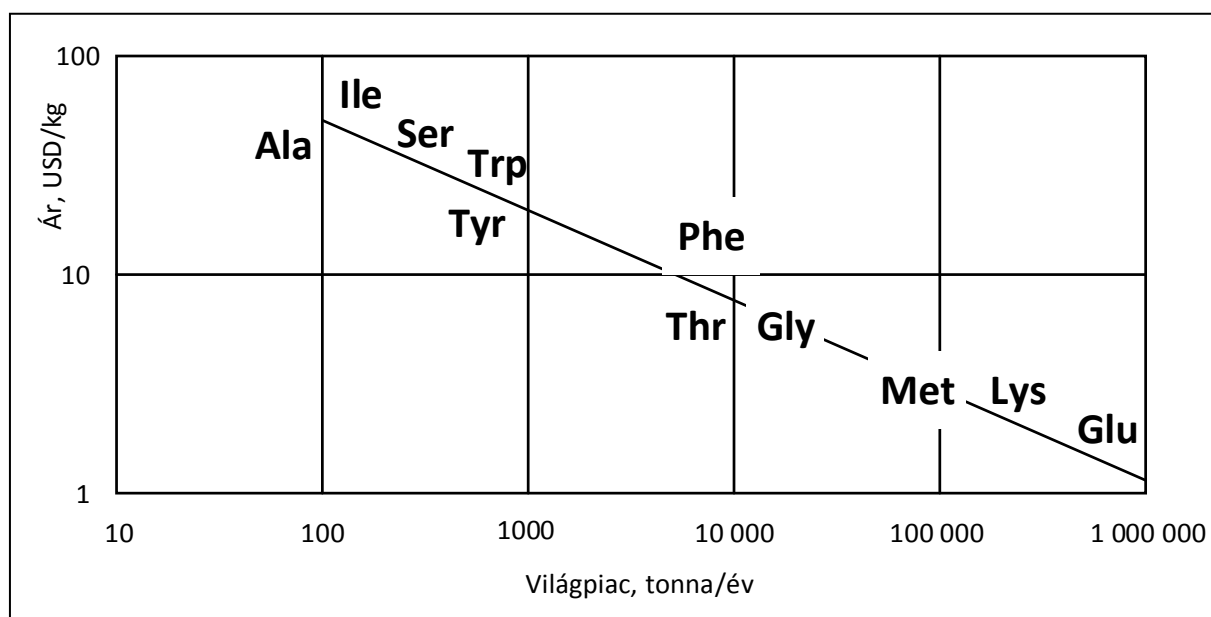
Ehhez képest a 2006-os adatok:

Mennyiség t/év	Aminosav	Alkalmazott eljárás	Felhasználás
1.000.000	L-Glutaminsav	Fermentáció	Ízfokozó
350.000	L-Lizin	Fermentáció	Takarmánykiegészítő
350.000	D,L-Metionin	Kémiai szintézis	Takarmánykiegészítő
75.000	L-Threonin	Fermentáció	Takarmánykiegészítő
10.000	L-Aszparaginsav	Enzimikus konverzió	Aszpartám
10.000	L-Fenilalanin	Fermentáció	Aszpartám
10.000	Glicin	Kémiai szintézis	Táplálékkiegészítő, édesítőszer
3.000	L-Cisztein	Cisztin-redukció	Táplálékkiegészítő, gyógyászat
1.000	L-Arginin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
500	L-Leucin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
500	L-Valin	Fermentáció, extrakció	Peszticidek, gyógyszergyártás
300	L-Triptofán	Nyugvósejtes konverzió	Gyógyszergyártás
300	L-Izoleucin	Fermentáció	Gyógyszergyártás

3. táblázat Az aminosav termelés áttekintése (2006)

Jelenleg a világon 17 nagy cég folytat fermentációs aminosavgyártást, ebből 13 Japán tulajdonú. Az Ajinomoto egymagában uralja az aminosav piacot mintegy 60 %-os részesedéssel. 23 országban 121 üzeme működik, alkalmazottainak száma kb. 30 000. A világpiacon számottevő versenytárs a német bázisú Evonik multi (2007 előtt: Degussa), amely sokféle vegyi anyag mellett aminosavakat is gyárt (150.000 t/év metionint, 280.000 t/év lizint, 30.000 t/év treonint). Az USA-ban a Stauffer Chem. állít elő glutaminsavat, az ADM lizint (60.000 t/év), Franciaországban az Orsan S.A glutaminsavat és aszparaginsavat, a Rhone Poulenc szintén aszparaginsavat. Magyarországon az Agroferm Rt (Kaba, első tulajdonos: Kyowa-Hakko, Japán) 5-6.000 t/év kapacitással állított elő lizint, de a piac változásai miatt 2004-ben eladták a Degussa-nak és treonin gyártására álltak át.

Az aminosavakra is igaz a mennyiség-ár függvénynek az a formája, amely log-log ábrázolásban egyenest ad.



4. ábra Az aminosav termelés léptéke és az árak összefüggése

1.0.5. Aminosavak gyártása

Aminosavakat többféle úton is elő lehet állítani:

- Az egyik lehetőség az izolálás fehérje-hidrolizátumokból. Működő technológia létezik cisztein, leucin, aszparaginsav, tirozin és glutaminsav gyártására.
- Elő lehet állítani kémiai szintézissel (Met, Gly, Ala, Trp), ezeknél az aminosavaknál a fermentációs út nem elég hatékony. A szintézisek racém elegyet eredményeznek, amit aztán reszolválni kell.
- Elő lehet állítani aminosavakat biotechnológiai úton is:

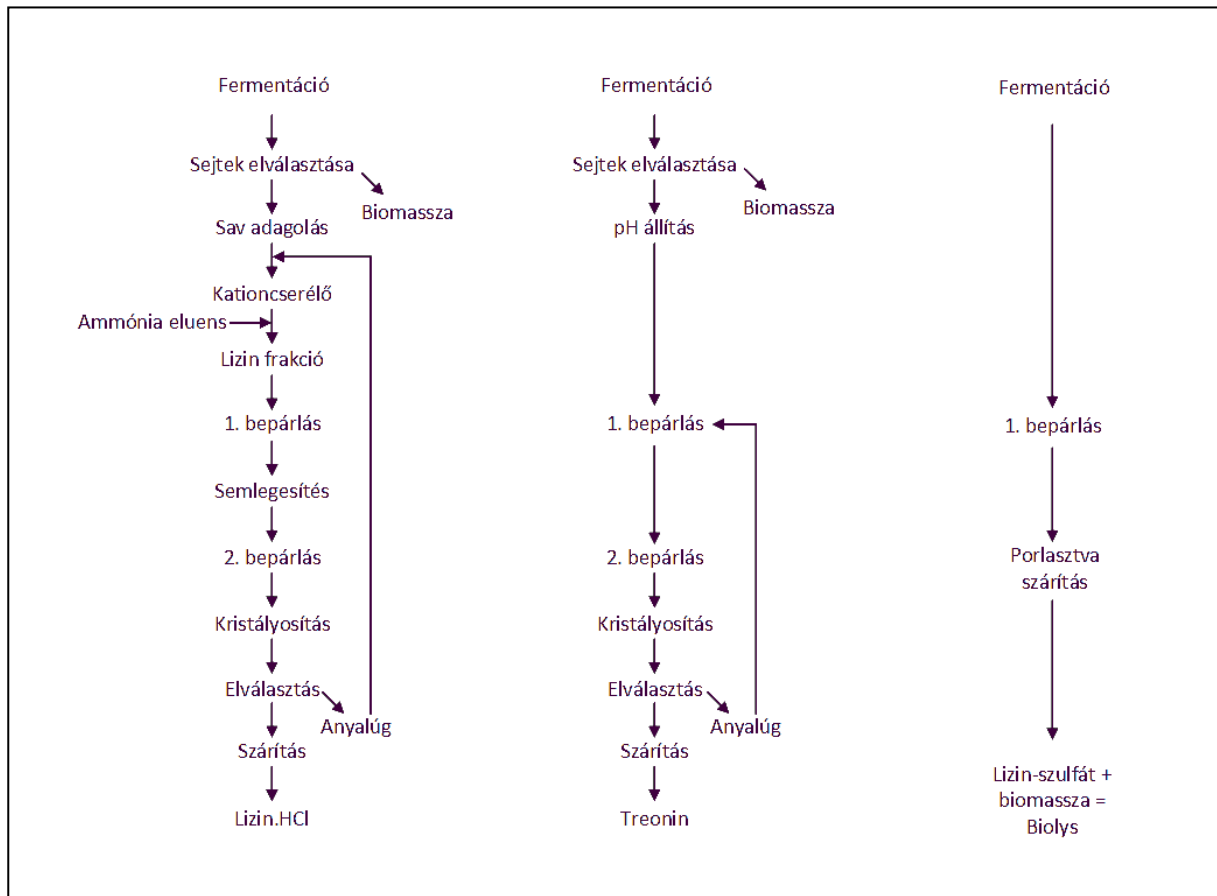
Direkt fermentációval (de novo bioszintézis): a vad törzsekből az anyagcsere mérnökség elvei szerint létrehozott és izolált auxotróf és regulátor-mutánsokat használják, főleg glutaminsav és lizin előállításakor.

Prekurzoros eljárással (Ser, Trp): ennél egy olyan vegyületet adnak a fermentációhoz, amit a mikroba beépít a végtermékbe, ezáltal könnyebben, gyorsabban, nagyobb mennyiségben tudja előállítani az aminosavat.

Biotranszformációval (enzimes, sejtes): csak egyetlen biokémiai reakció végrehajtása, amihez a szükséges enzimet nem mindig izolálják, hanem sokszor nyugvósejtes tenyészet formájában alkalmazzák (pl.: aszparaginsav).

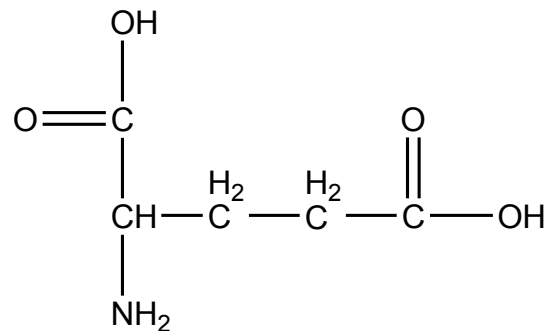
A fermentációt nagy, 50-500 m³-es levegőztetett fermentorokban célszerű végrehajtani, ami viszonylag olcsóvá teszi a gyártást. A rátáplálásos technológiák alkalmazásával nagy koncentrációkat lehet elérni, így a downstream műveletek költségei csökkennek. Aminosavtermelésnél szabályozni kell a pH-t, amit a szokásos alkálilúgok mellett ammóniagáz bevezetésével vagy karbamid adagolásával is meg lehet oldani, ráadásul ezek nem hígítják az oldatot. A fermentorokban a sterilitást fenn kell tartani, illetve a fágok elleni védekezéséért érdemes fágrezisztens mutánsokat alkalmazni.

Az aminosavak feldolgozásánál jellemzően ioncserét, izoelektromos ponton történő kicsapást, szerves oldószeres extrakciót szoktak alkalmazni. Az aminosavak - az egy triptofán kivételével - viszonylag hőstabil molekulák, lehet (vákuum)bepárlással töményíteni az oldatot.



5. ábra Aminosav feldolgozási műveletsorok

1.1. Glutaminsav fermentáció



Egy kis történelem:

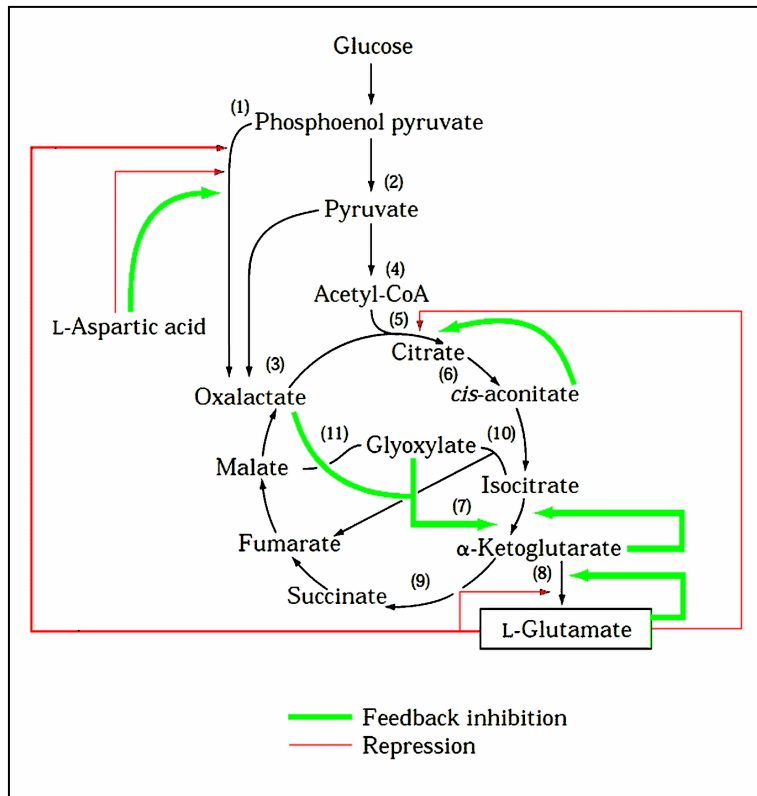
- 1866 – először búza gluténből izolálták (Ritthousen)
- 1890 – kémiai szintézis (Wolff)
- 1908 – Ikeda elsőként izolált egy sajátos ízű kivonatot egy hínárszerű tengeri moszattól (*Laminariaceae*). Ezt az ízt „umami”-nak nevezik, és nem sorolható be a négy alapízhez („ötödik íz”).
- 1909 – Ikeda és Suzuki szabadalmuk alapján gyártani kezdték a mononátrium-glutamát monohidrátot, mint ízesítőt.
- 1910 – az Ajinomoto cég megkezdte a gyártást glutén és szójadara a hidrolizátumából.
- 1957 – Kinoshita a Kyowa-Hakko cég kutatója a *Corynebacterium glutamicum* mutáns törzseivel megvalósította a de novo fermentációs gyártást.
- 2007 – a világtermelés elérte az 1.000.000 tonnát

A glutaminsav fermentációját először 1957-ben a *Corynebacterium glutamicum* (rég neve *Micrococcus glutamicus*) törzsszel oldották meg. Mikrobiológiai leírása szerint ez egy Gram+, nem spórás, nem csillós törzs.

1.1.2. Bioszintézis és szabályozása

A *Corynebacterium glutamicum* törzsnél ha az α -keto-glutarát dehidrogenáz (az ábrán a 9. enzim) aktivitását lecsökkentjük, és a szubsztrátját glutaminsav formájában elvonjuk, akkor a citrátkör mint körfolyamat nem zárul, a folyamat végén nem kapjuk vissza az oxálacetátot. A folyamat mégis működik, mert a szükséges intermediereket a két anaplerotikus reakció (1 és 2) szolgáltatja. A piruvátok hasznosulását megfigyelve látható, hogy egyrésztől dekarboxilezéssel acetyl-CoA és szén-dioxid keletkezik, másrészt viszont CO₂ fixálással oxálacetát jön létre. Az eredő folyamatot tekintve tehát két piruvátból keletkezik egy citromsav molekula. Ez tartalmazza a kiindulási glükóz mind a hat szénatomját. Ebből egy szén-dioxid formájában elvesz az izocitrát dekarboxilezésénél, így öt szénatom kerül a glutaminsavba.

A glutaminsav termelés erősen függ a sejt citoplazmamembránjának a permeabilitásától. Ha a membrán permeabilitása nő, a glutaminsav kiáramlik a sejtől. Ez számunkra kedvező jelenség, mert egyrészt a belső koncentráció a feed back határ alatt marad, nem fékeződik le a bioszintézis, másrészt az extracelluláris terméket könnyebb kinyerni a fermentléből.



A szabályozott enzimek: 1. foszfo-enol-piruvát karboxiláz; 2. piruvát kináz; 3. piruvát karboxiláz; 4. piruvát dehidrogenáz; 5. citrát szintetáz; 6. akonitáz; 7. izocitrát-dehidrogenáz; 8. glutamát-dehidrogenáz; 9. α-keto-glutarát dehidrogenáz; 10. izocitrát-liáz; 11. malát-szintetáz.

6. ábra A glutaminsav bioszintézisének reakciói és szabályozása

A membrán permeabilitása viszont az alkotó foszfolipidek zsírsavösszetételétől függ. A savprofilra a következő tényezők vannak hatással:

1. Biotin koncentráció: a biotin az acetyl karboxiláz enzim kofaktora. Ez a reakció a zsírsav bioszintézis első lépése, minden egyes C2 egység beépítésének első állomása. A biotin hiánya tehát megzavarja a lipidek bioszintézisét, a membrán átteresztővé válik. Ugyanakkor a sejtek növekedéséhez valamennyi biotinra szükség van. A két ellentétes hatás eredőjeként beállítható egy optimális biotin koncentráció, amely mellett a glutaminsav szintézis maximális. Ez az érték általában 2-5 µg/l, de mindenképpen 10 µg/l alatt van. 30 µg/l fölött a tenyészet a glutaminsav mellett/helyett már jelentős mennyiségű tejsavat termel.
2. Olajsav (telítetlen zsírsav) adagolása fokozza a permeabilitást.
3. Nemionos detergensok, így szorbitán zsírsav észterek (Tween 60, Tween 40) hozzáadása is megváltoztatja a membrán szerkezetét, növeli a permeabilitást.
4. Penicillin alkalmazása valójában nem a sejtmembránt, hanem a sejtfalat gyengíti meg, de ez is a Glu kiáramlásával jár.

A szénforrások közül a melaszban sok a biotin, így e táptalajkomponens használatakor ez problémát jelent. Ilyen tápoldatoknál a biotin hatását a fent említett anyagok adagolásával szokták ellensúlyozni.

1.1.3. Fermentáció

A glutaminsav fermentációnál 100-200 g/l C-forrás bevittelt szoktak alkalmazni, ami lehet szacharóz (melasz), glükóz, esetleg ecetsav, etanol és n-paraffinok. Ilyen tömény (>10%) cukor oldattal nem lehet indítani a fermentációt (ozmózis, savtermelés), ezért egy részét a 36. óra után rátáplálással (fed batch) viszik be. Kis léptékben (laboratóriumi és oltótenyészetek) nitrogénforrásként szerves anyagokat (kukoricalekvárt, kazein hidrolizátumot) is adnak a táptalajba, a nagy léptékű, termelő fermentációknál az olcsóbb ammóniumsókat. A későbbiekben a nitrogén bevitel megoldható úgy, hogy a pH szabályozásra ammónia gázt il-

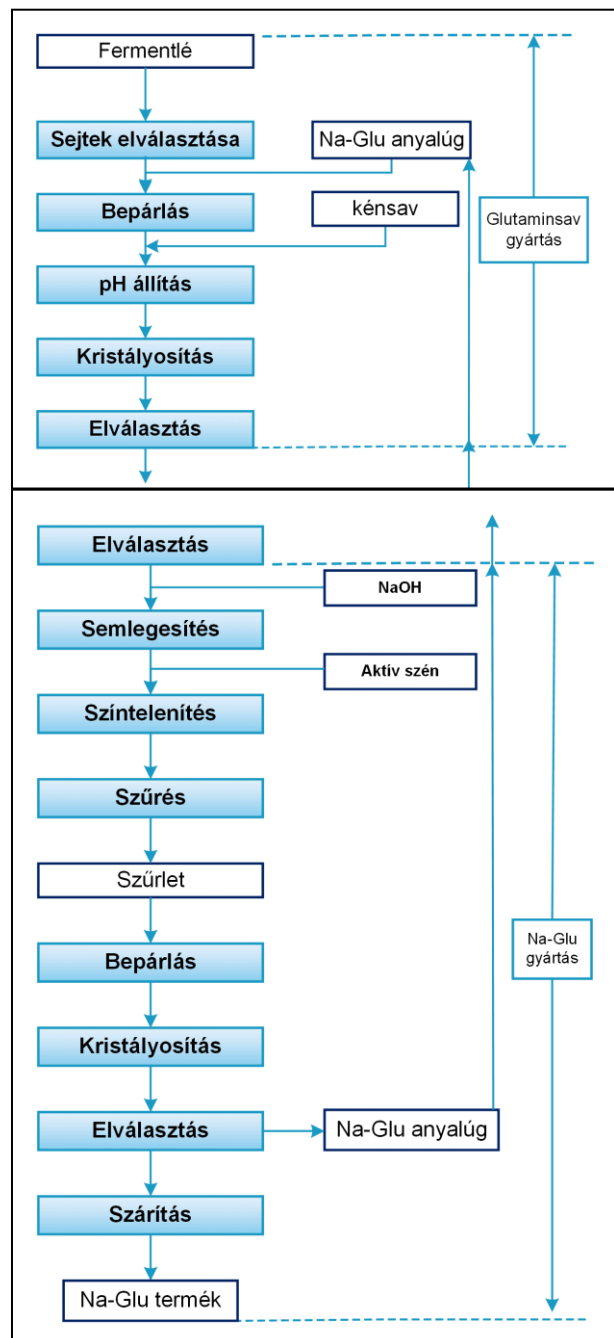
letve karbamidot használnak. Túlságosan sok ammónia jelenlétében viszont a glutaminsav egy része glutaminná alakul át, ami rontja a kihozatalt.

A fermentáció optimális pH-ja 7-8 között van (mint általában a baktérium fermentációk), a hőmérsékletprofil kétlépcsős: az első 14 órában 30-32 fok, ezután felemelik 38 °C-ra. Ez megváltoztatja az anyagcserét, lecsökkenti az α -ketoglutársav dehidrogenáz aktivitását és növeli a sejtmembrán permeabilitását glutaminsavra nézve. A fermentációs idő 72 óra, maga a sejtszaporodás ~30 óra alatt lezajlana, de a rátáplálásokkal elnyújtják a folyamatot, ezzel lehet nagy termék koncentrációt (~10%) elérni. Intenzív levegőztetés szükséges, mert ennek hiányában melléktermékként tejsav jelenik meg. A termelő törzs Fe^{2+} , K^+ , Mn^{2+} ionokat igényel kofaktorként. A fermentáció végén a cukorra számított konverzió 50-60% között mozoghat.

1.1.4. Feldolgozás

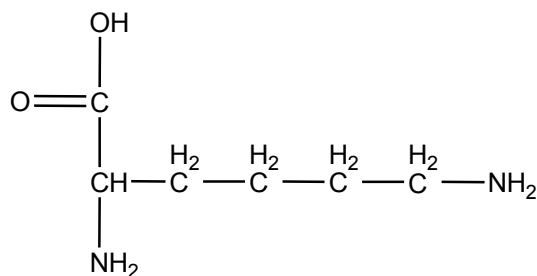
A fermentlé feldolgozása két szakaszra bontható. Előbb a kristályos glutaminsavat állítják elő, majd ezt mono-nátrium glutamáttá alakítják. Mindkét folyamat kulcs lépése a bepárlás, majd kristályosítás. Kénsavval beállítják az izoelektromos pontot, a glutaminsav disszociációja visszazorol, ezáltal oldhatósága romlik, hatékonyabban kristályosítható. A kivált anyagot pl. szűrőcentrifugával elválasztják.

A kristályos glutaminsavat nátrium hidroxiddal feloldják és közömbösítik. Aktív szenes tisztítás után bekonzentrálják és ki-kristályosítják. A kristályosítás anyalúgját visszaviszik a glutaminsav feldolgozás folyamatába.



7. ábra Na-glutamát kinyerése fermentléből

1.2. Lizin fermentáció (α,ϵ -diamino-kapronsav)



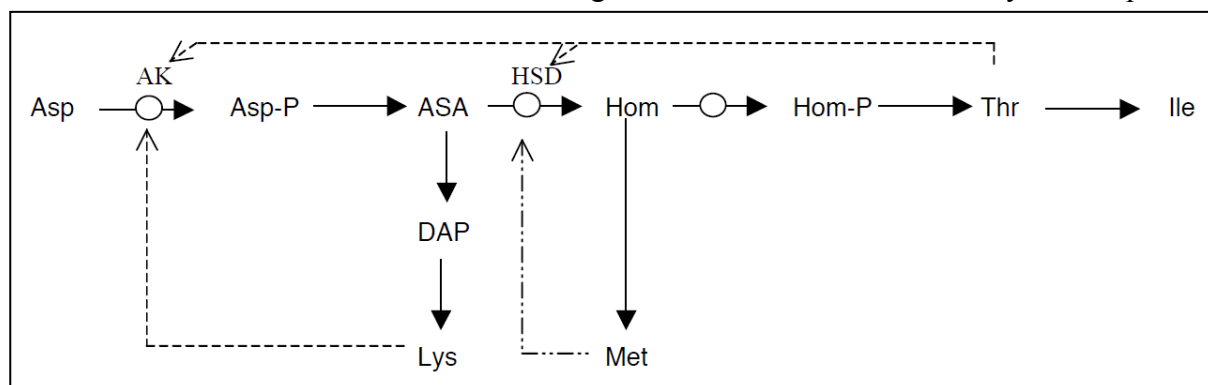
Hazánkban a takarmányozásban használatos gabonák, különösen a kukorica lizinben szegény (4. táblázat). A lizin hiánya korlátozza a többi komponens hasznosulását is, ezért célszerű kiegészítésként hozzáadni (3. ábra). Lizin kiegészítéssel az egy-gyomrúaknál (sertés, csirke) 15-20%-kal javul a takarmány-hasznosítás. Egy tonna lizin elegendő 70 tonna takarmány komplettálásához.

Tápanyag/takarmány	Lys (%)
Kukorica	0.21
Zab	0.5
Árpa	0.4
Búza	0.6
Szója	2.9
Élesztő	3.4
Tejpor	2.5
Húsliszt	2.6

4. táblázat Takarmányok lizintartalma

1.2.1. Bioszintézis, anyagcseremérnökség

A lizin de novo fermentációjának kidolgozásához is az anyagcseremérnökség módszereit használták. Elsőként fel kellett deríteni és megérteni a reakcióutakat és szabályozási kapcsola-



8. ábra Az aszparaginsav aminosav család bioszintézise és szabályozási mechanizmusai a *C. glutamicum*-ban. A sejtekben a lizin kétféle anyagcseréúton is képződhet, mindkettő aszparaginsavból indul:

- Diamino-pimelinsav út
- Aszparagin-szemialdehid út

A *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsek ez utóbbi utat használják.

Anyagcsere-mérnökileg a következő mutációs változásokat hozták létre:

Hom⁻ illetve Hom^{leaky}, Met⁻, Thr⁻ *auxotróf* törzseket izoláltak, amelyek AEC^r = (5-(2-amino-etil)-L-cisztein)-*re-zisztensek*, azaz regulációs mutánsok.

A homoszerin és treonin túltermelés visszacsatolását nem kell megszüntetni, mert az *auxotrófia* miatt ezek nem jelennek meg számottevő mennyiségben.

A 7. ábrán egy lizin túltermelő törzs mutációs átalakításai láthatók.

A regulált enzim az aszpartokináz, ez két α és két β alegységet tartalmaz. Két külön promóter indukálja az α és a β mRNS szintézisét. A β -alegységhez kötődik a lizin és a treonin, ezzel csökkentik az enzim-komplex aktivitását.

1996-ban a korszerű génmanipulációs módszerek felhasználásával tökéletesítették a törzset. A lizin exportálásáért felelős enzim génjét – *LysE* – multikópiás plazmid segítségével sok kópiában vitték be a sejtbe, ezáltal megnövelték a sejtől a fermentáléba irányuló transzport sebességét, fokozták a lizin termelést.

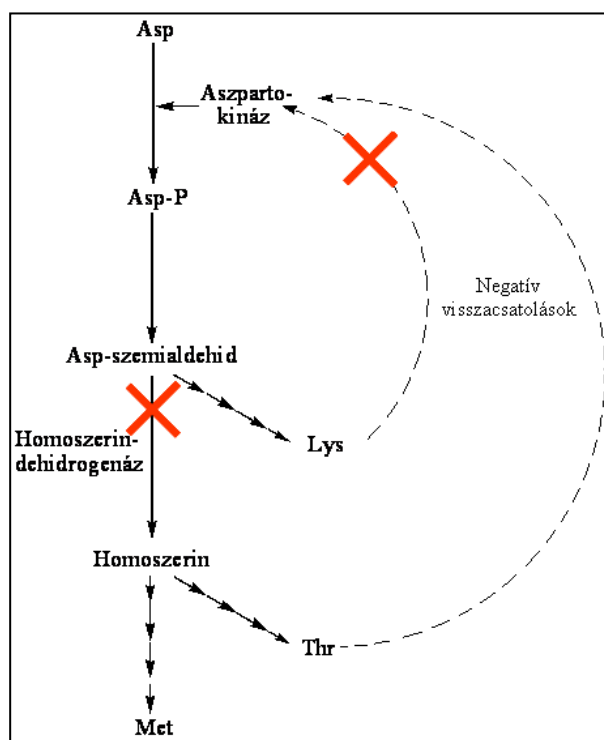
Lizint lehet még termelni *Candida periculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis lipolytica* fajokkal, de ezek intracelluláris lizint termelnek.

1.2.2. Lizin fermentáció

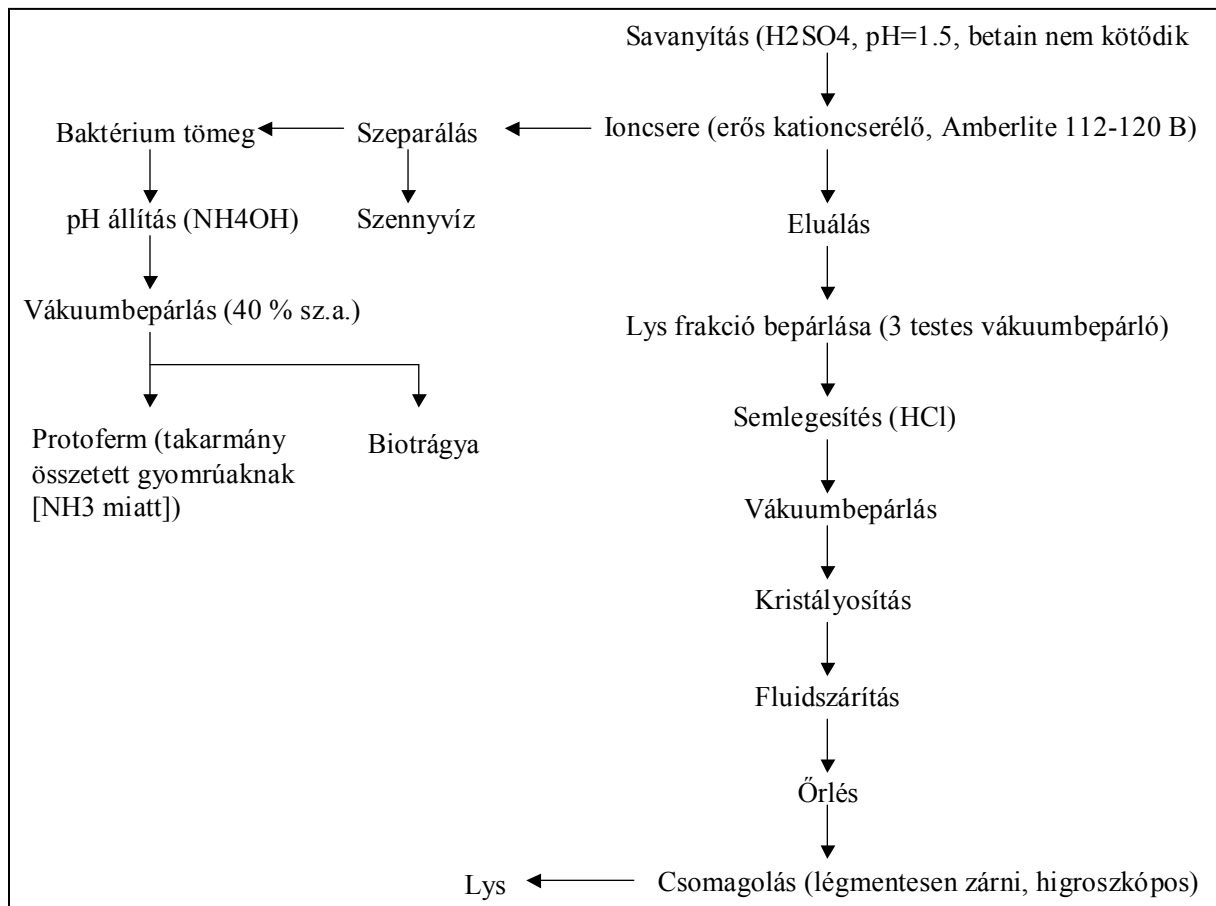
A lizin fermentáció az azonos törzs miatt sok szempontból hasonlít a Glu fermentációra. A C-forrás glükóz, melasz, alternatív megoldásokban ecetsav vagy paraffin lehet. A nitrogénforrásként ammóniumsók, a pH szabályozáshoz használt ammónia jöhet számításba. A homoszerin, treonin és metionin szuboptimális koncentrációban jelen kell, hogy legyen (szójadara, kukoricalekvár adagolás), de ha leaky a mutáns, akkor nem kell adagolni, ezzel csökken az önköltség. A biotin koncentrációnak itt is szerepe van, de fordított: legalább 30 $\mu\text{g/l}$ -es koncentrációban kell jelen lennie.

A fermentáció optimális pH-ja 7, optimális hőmérséklete 28°C, a fermentáció ideje 60 óra. 100-120 g/l végső lizin koncentrációt lehet elérni, a produktivitás $Y_p=30-40\%$. A fermentáléba adagolva az antibiotikumok serkentik a lizin termelését (titer növelő anyagok: klór-*amfenikol*, tetraciklin) továbbá felületaktív anyagoknak (kvaterner ammónium sók) is hasonló termelésfokozó hatásuk van. A lizin fermentációnál egy speciális fertőzésveszély áll fenn, lizin-dekarboxilázt termelő baktériumok jelenhetnek meg. Ezek kadáverinné (hullaamin) alakítják a megtermelt lizint. Ilyen törzsek pl. az *Escherichia coli*, *Clostridium welchii*, *Aerobacter aerogenes*. Tetraciklin adagolásával a befertőzés veszélye is csökkenthető.

A következő ábrán a lizin-kinyerés és feldolgozás blokksémája látható.



9. ábra A lizin túltermelés érdekében végrehajtott anyagcsere módosítások



10. ábra A lizin feldolgozás lépéssora

A magas a N-tartalmú mellékterméket takarmány adalékként, vagy biotrágyaként hasznosítják.

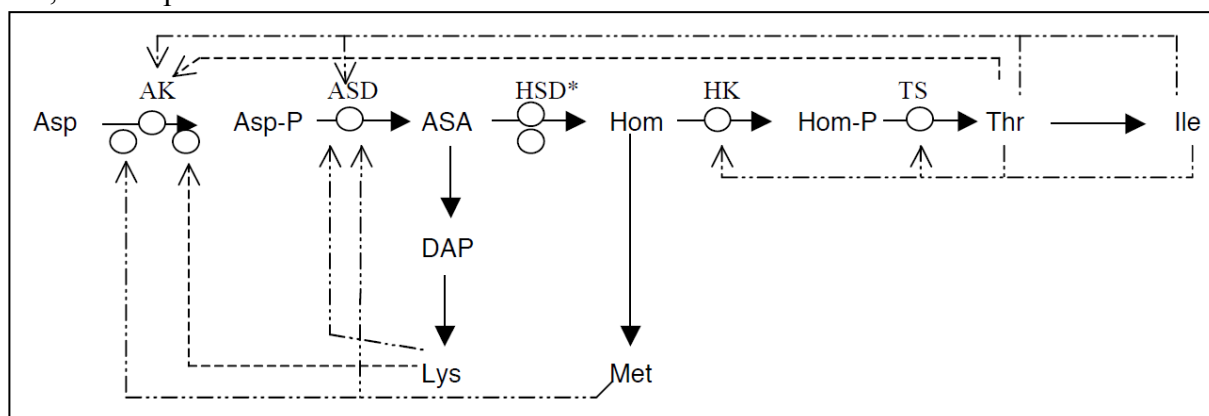
Magyarországon is működött egy lizin-gyár Kabán, a Kyowa-Hakko cég 1991-ben telepített hazánkba egy 6000-6200 t/év kapacitású üzemet (Agroferm), ami manapság kis üzemnek számít. A lizin termelésnél árháború van, a világtermelés 3-400.000 t/év (leállított, üres kapacitások is vannak), ennek túlnyomó részét japán cégek, japán törzssel és technológiával, sok országban termelik. Az éves forgalom körülbelül 200 M\$/év. Magyarországon a szója illetve a lóbab termesztése nem gazdaságos, a halliszt és a húsliszt drága, a napraforgó dara viszont lizinhiányos, így a lizinnak biztos piaca van. A gyár a hazai igényeket (3-4000 t) kielégítette, és még exportra is termelt. Az üzemben a fermentációk reprodukálhatósága nagy, ami a technológiai fegyelemnek és az állandó nyersanyag-minőségnek volt köszönhető. A fermentorok fed-batch időprogram szerint működtek, egy folytonos sterilizáló működött a hígított melasz sterilizására. Leaky törzset használtak, így nem kellett kukoricalekvárt vagy szójahidroliátumot adagolni. 4 db 240 m³ térfogatú fermentor volt az üzemben.

Az üzem gazdasági helyzetét megingatta a szójafehérje alacsony ára. A gyárat 2004-ben átvette a Degussa cég, és átállította treonin termelésre. Nagy kapacitás-bővítés után (~30.000 t/év) jelenleg Evonik Agroferm néven termelt. Az üzemet végül sajnos gazdasági okok miatt 2018 április 30-án bezárták.

1.3. Treonin előállítása

A treonint genetikailag manipulált *E. coli* törzssel állítják elő. A manipuláció a mikrobatorzsek racionális átalakításának iskolapéldája. A kiinduló törzset, az L-treonin szerkezet-analógiára, az α -amino- β -hidroxi-valeriánsavra (AHV) rezisztens mutánsokat 1969-ben izolálta Shii és Nakamori. Ezután több, ipari termelésben is alkalmazható mikrobatorzset fejlesztettek ki olyan auxotróf és antimetabolit rezisztens mutánsok létrehozásával, amelyek együttesen a treonin bioszintézis irányába terelték az anyagcserét.

A treonin túltermelő *E. coli* mutánsok ésszerű megtervezéséhez részletesen meg kellett ismerni a bioszintézist. A treonin bioszintézis szabályozása az *E. coli*-ban bonyolultabb, mint a *C. glutamicum*-ban. A *Corynebacterium*októl eltérően az *E. coli*-ban az aszpartokináznak három izoenzime van (AK-I, AK-II és AK-III). Az első kettő több doménből álló fehérje, amelynek homoszerin dehidrogenáz aktivitása is van, tehát ugyanaz a fehérje katalizálja a folyamat első és harmadik lépését. Az AK-I aktivitását csökkenti a treonin feedback inhibíciója, termelődését pedig operon szinten fékezi a treonin és az izoleucin együttes hatása. Az AK-II bioszintézisét a metionin represszálja. Az AK-III-ra pedig a lizin hat, mind enzim inhibícióval, mind represszióval.



11. ábra Az aszparaginsav aminosav család bioszintézise és szabályozási mechanizmusai *E. coli*-ban

A folyamat második lépését az aszpartát szemialdehid dehidrogenáz (ASD) katalizálja. Expresszióját mind a lizin, a treonin és a metionin gátolja, legerősebb hatású a lizin. A két utolsó enzim, a homoszerin kináz (HK, *thrB*), és a treonin szintetáz (TS, *thrC*) együttesen expresszálódnak az AK-I-gyel (*thrA*), ezek hárman alkotják a *thrABC* operont.

Ezekon a szabályozási mechanizmusokon túl más hatások is befolyásolják a treonin felhalmozódást. Ilyenek a treonint lebontó enzimek, mint a treonin dezamináz (*ilvA*), a treonin dehidrogenáz (*tdh*) és a treonin felvételt és kibocsátást szabályozó transzport mechanizmusok.

Az összetett szabályozó mechanizmusok ismeretében többféle megközelítéssel is megpróbálták „kitágítani” a treonin bioszintézis folyamatát. Kezdetben az anyagcseremérnökség elveinek megfelelően melléktermék auxotróf és termékanalóg rezisztens mutánsokat szelektáltak.

A már említett AHV-rezisztens törzset, amelynél megszűnt az AK-I feedback inhibíciója, fejlesztette tovább minden próbálkozás. A további munka során izoleucin auxotróf mutánsokat izoláltak. Megszüntették az anaplerotikus PEP-karboxiláz enzim gátlását az aszparaginsav által. Kiiiktatták a treonin-dezamidáz és treonin-dehidrogenáz enzimek működését. A klasszikus mutációs-szelekciós technikán túl génmanipulációval is fejlesztették a törzset. A treonin operont (*thrABC*) multikópiás plazmidba építették és bevitték a sejtekbe. Az így kapott törzs 65 g/l treonint halmozott fel a fermentációban, 48%-os (g Thr/g cukor) hatékonysággal.

A treonin fermentáció sem tér el jelentősen az előző két aminosav technológiától. A manipulált *E. coli* törzsszel 124 g/l koncentrációt is el lehet elérni cukor szénforrásokon. A konverzió cukorra számolva ~60%. A cukor beadagolásánál még a szokásosnál is körültekintőbben kell eljárni, a koncentráció a folyamat során nem emelkedhet 30 g/l fölé. A cukrot tehát folyamatosan vagy nagy gyakorisággal kell adagolni. A steril cukoroldattal ugyanakkor jelentős mennyiségű vizet viszünk be a fermentorba, így a lé térfogata nagymértékben növekszik. Olyan technológia is létezik, ahol oltásnál csak egyharmadáig töltik fel a készüléket, a lé másik kétharmada a beadagolásokkal kerül be. Ezzel a termelési ciklus lerövidül, másfél nap (36 óra) alatt lezajlik. Ilyen rövid fermentációs idő mellett jelentős idővesztéseget jelent két gyártás között a fermentor tisztítása, beszarzsírozása, sterilezése, oltása, emiatt gyakran törekednek félfolytonos-rátáplálásos (repeated fed batch) üzemeltetésre, amelynél ezek a lépések kihagyhatók. Komolyabb kockázat nélkül 4-6 ciklust lehet összevonni, ez után már szükséges a leürítés, tisztítás és sterilezés.

Az *E. coli* törzs érzékeny a koncentráció viszonyokra. A nagy ipari fermentorokban a keverés nem tökéletes, koncentráció különbségek alakulhatnak ki. A rosszabb oxigén ellátású zónákban a *coli* hajlamos anyagcseréjét megváltoztatva kevert savas erjedésbe kezdeni, a cukorból ecetsavat és tejsavat termel. Ezzel rontja a hozamot, hiszen a szénforrás egy része melléktermékké alakul. A jobb és rosszabb oxigén ellátású terek között mozogva a sejtek gyorsan változtatják az anyagcseréjüket, de ezek a váltások rontják a termékképzést. Nagy fermentoroknál (200-500 m³) nem csak az oxigén koncentrációban alakulhatnak ki gradiensek, hanem a pontszerűen beadagolt anyagok (cukor, lúg, ammónium-szulfát) lassú elkeveredése miatt is. Az átkeverési idő (mixing time) 1-2 perc is lehet.

Nitrogénforrásként a törzs hasznosítja a szerves nitrogént (ammónium-szulfát), de az auxotrófiák miatt valamennyi szerves nitrogén forrás (pl. élesztő kivonat) is szükséges. A folyamatot az *E. coli* igényeinek megfelelően 37 C-on, pH= 7,0-7,5 között vezetik. A termelt savakat közömbösíteni kell, amire alkálilúgot, vagy ammóniagázt használnak. A gáznak az az előnye, hogy nem viszünk be vizet a rendszerbe, azaz nem hígítjuk még jobban a fermentlevet.

Magyarországon treonin gyártással az Agroferm (Kaba) cég foglalkozik. Az eredetileg 5-6000 tonna/év lizin gyártására épült üzemet (1991, Kyowa Hakko, Japán), 2004-ban átvette a Degussa cég, és treonin gyártásra állította át. 2007-re a kapacitását 20.000 t/évre növelték, majd 2013-ban 30.000 tonnára bővítették. Felvásárlások és átszervezések következtében a cég jelenleg Evonik Agroferm néven működött. Az üzemet végül sajnos gazdasági okok miatt 2018 április 30-án bezárták.

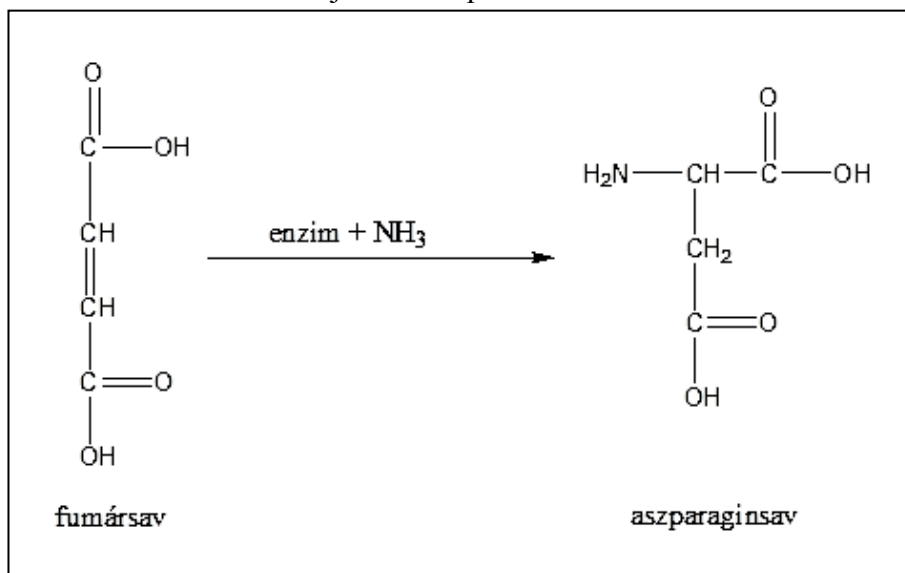
1.4. Aszparaginsav előállítása biokonverzióval

Az aszparaginsav gyártására is kialakították a de novo fermentációra alkalmas mutánsokat, de manapság inkább egy lépéses biokonverzióval állítják elő. Az olcsón hozzáférhető fumársavból és ammóniából az aszpartát-ammónia-liáz hozza létre az aszparaginsavat. Az átalakításhoz nyugvósejtes tenyészetet, illetve tisztított, immobilizált enzimet egyaránt használnak.

A Japán Tanabe cég 1973 kezdett el immobilizált sejttel (poliakrilamid gélben) a világon először így aszparaginsavat előállítani. Tízszeres aktivitásnövekedést értek el azzal, hogy a citoplazmamembrán permeabilitását megnövelték. Az enzim életideje Mg, Mn, és Ca ionok jelenlétében tízszeresére nőtt (120 nap). 1000 l-es reaktort használnak, évente 700 t aszparaginsavat termelnek. A Japán Kyowa-Hakko 1974-ben kezdett el *E. coli*-ből származó immobi-

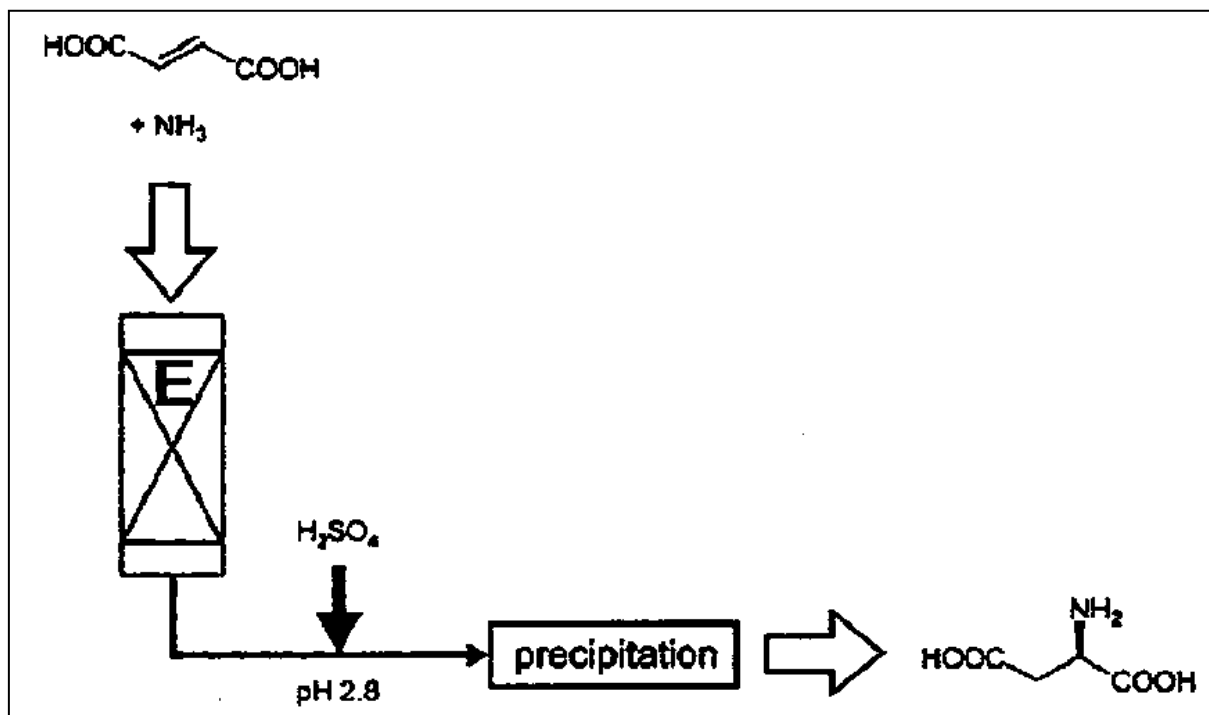
lizált enzimmal aszparaginsavat termelni, míg a Mitsubishi 1986-ban kezdte el a termelést *Brevibacterium flavum* sejtuszpenzió többszöri újrafelhasználásával.

Az amerikai Biocatalytics cég *E. coli*-ból kinyert, immobilizált aszpartáz enzimet használ. A biokonverzió vizes fázisban, 37 °C-on (a *coli* szaporodási optimuma), 8,5-es pH-n játszódik le. $MgCl_2$ kofaktor adagolása növeli az enzim aktivitását és stabilitását. Az ágytérfogat 75 l, megfelelő sebesség beállításával 99%-os konverzió érhető el. Az enzim ezen a hőmérsékleten is stabil, aktivitásának felezési ideje ~6 hónap.



12. ábra Fumársav átalakítása aszparaginsavvá

A kilépő aszparaginsav kinyerésére először a pH-t kénsavval 2,8-re, az izoelektromos pontra állítják. Itt az oldhatóság minimális, hűtésre a termék kicsapódik és szűréssel elválasztható.



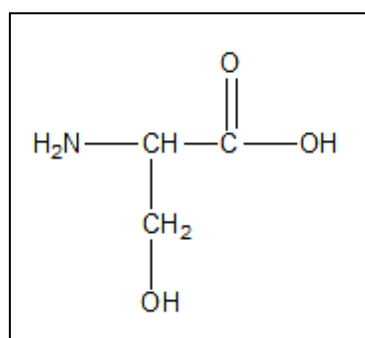
13. ábra Az aszparaginsav gyártás folyamatábrája.

Az aszparaginsavat elsősorban aszpartám (édesítőszer ~200-szor édesebb, mint a szacharóz) gyártásához használják fel, másrészt élelmiszer-adalékként és infúziós oldatokban. Ezenkívül gyógyszergyártási intermediereként is használják.

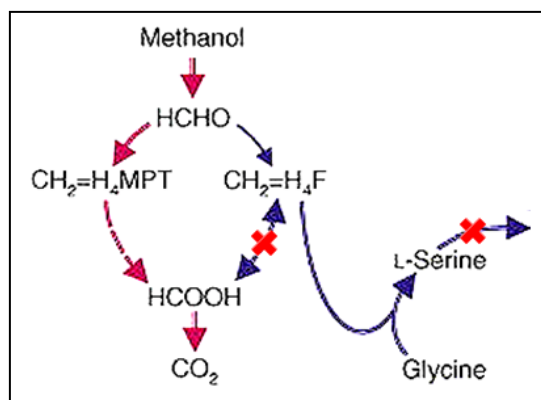
1.5. L-Alanin gyártás

Az alanin egyszerű szerkezetű molekula, szintetikusán is előállítható, de az racém keveréket ad, amit reszolválni kell. A tiszta L-izomer előállítására kifejlesztettek de novo fermentációs eljárást is, de egyszerűbb biotechnológiai út az enzim konverzió L-aszparaginsavból. A *Pseudomonas dacunhae* törzs aszpartát- β -dekarboxiláz enzimével egy lépésben kialakítható az L-alanin (Japán, Evonik/Kína).

1.6. Szerin előállítása



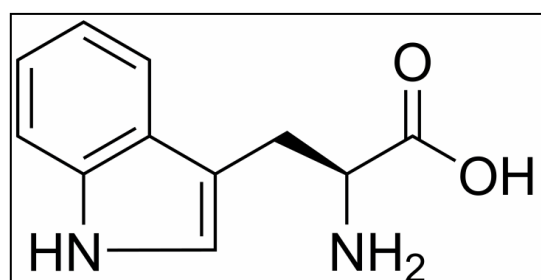
A szerint ipari mértékekben glicinből, főként fakultatív metilotrófokkal (pl. *Pseudomonas* törzsszel) állítják elő. A fermentációnál glicint és metanolt adagolnak egyszerre (koszubsztrátok). Az anyagcserében a szerint továbbalakító enzim, a hidroxipiruvát-reduktáz aktivitását csökkentik pH emeléssel (8.5-9.5), és hőmérséklet emeléssel (30°C-ról 40-42 °C-ra) illetve Co^{2+} vagy Ni^{2+} adagolással (specifikus inhibitorok). A folyamat így biokonverzióvá egyszerűsödik. Ezért gyakran használnak nyugvó/immobilizált sejtes tenyészetet.



Bár a glicin fontos fehérjealkotó aminosav, a gyártáshoz szükséges koncentrációban toxikus a sejtekre. Ezért glicin-toleráns mutánsokat izoláltak és alkalmaznak.

A végső szerin koncentráció 20-24 g/l, ami ~50%-os konverzióhoz felel meg. Az ábrán a szerin előállításához átalakított anyagcsere-útvonal látható (lásd a metanol alapú egysejt fehérje termelésével foglalkozó fejezetet).

14. ábra A metanol hasznosítás szerin útja



1.7. L-triptofán termelés

A triptofán biotechnológiai előállítása többféle úton is lehetséges:

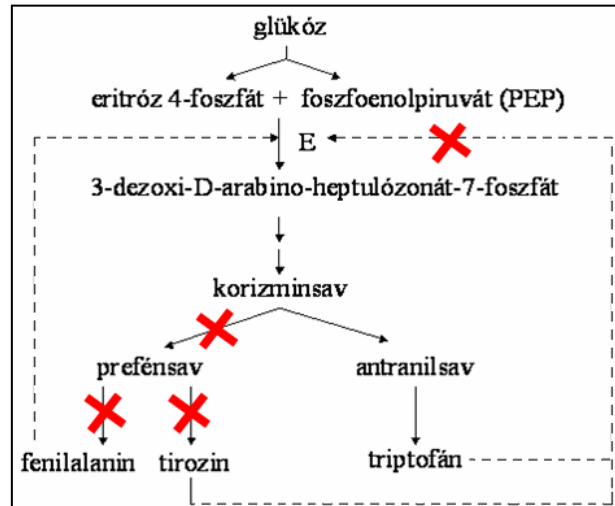
1. De novo bioszintézis: szénhidrátokból sok lépéssel. A japánok erre is találtak anyagcsere-mérnöki megoldást a *Corynebacterium* és *Brevi-*

bacterium törzsekkel. A három aromás aminosav bioszintézise az allostérikusan szabályozott elágazó anyagcsereutak iskolapéldája. A cukorszarmazékokból induló bioszintézis közösen halad a korizminsavig, itt kettéválik. Az anyagfluxus egy része antranilsavon keresztül négy lépésben triptofánná alakul. A további mennyiségből prefénsav lesz, ami egy további elágazás után fenilalanint és tirozint ad.

Az anyagcsere-mérnökség elveinek megfelelően a klasszikus mutációs-szelekciós technikával a következő tulajdonságú mutánsokat izolálták:

- Phe⁻, Tyr⁻, (auxotrófok)
- 5-Me-Trp^r (5-metil-triptofán antimetabolittra rezisztensek)

A mutánsokkal a fermentáció megvalósítható, de az előzőekben említett technológiákhoz képest hátrány, hogy a triptofán sokkal rosszabbul oldódik, mint a poláris oldalláncú aminosavak. Az oldhatósági határ ~12 g/l (erősen függ a pH-tól és a hőmérséklettől), azaz csak kb. tizedrésze a lizinnél vagy a glutaminsavnál elérhető koncentrációnak.



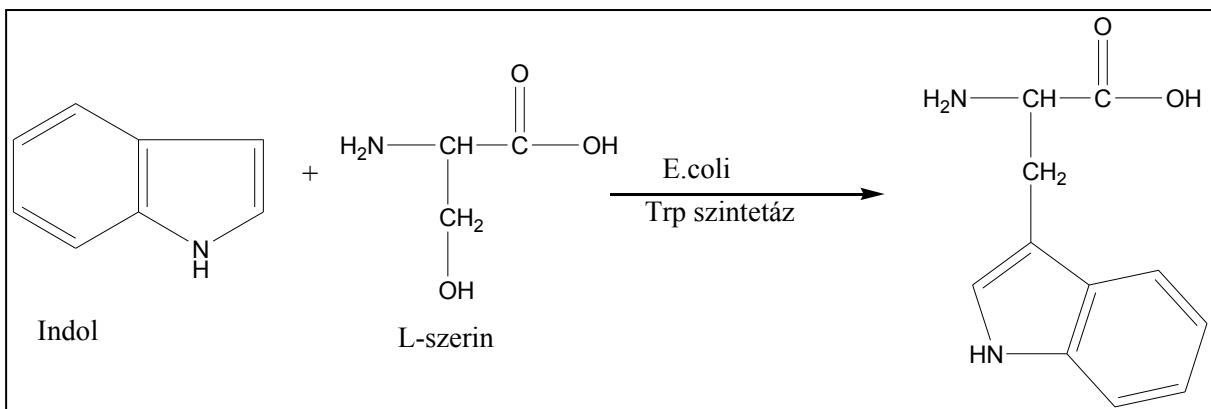
15. ábra Triptofán túltermelő törzs anyagcserejének átalakítása

2. Prekuzoros bioszintézis: indol, vagy indol+glicin adagolásával.

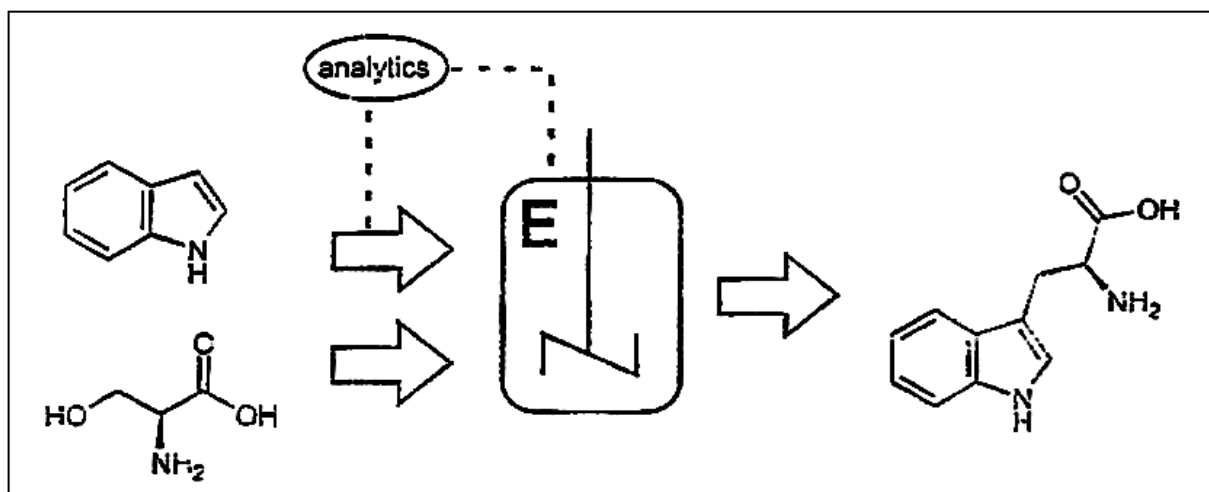
A triptofán bioszintézis utolsó lépésében a triptofán szintetáz enzim az indol vázról lehasítja az addig felépített oldalláncot, és egy szerint kapcsol a helyére. A reakció második lépését, az indol + szerin = triptofán folyamatot számos mikroba enzime képes katalizálni.

Erre a folyamatra többféle technológiát is lehet építeni. Az prekuzor mindegyikben szintetikusán előállított indol. Adagolhatjuk:

- Szerintermelő metilotrófok tenyésztéséhez, ezzel a szerin és a triptofán szintézist össze lehet kapcsolni: metanol, glicin és indol adagolásával.
- Élesztő törzsek (*Candida*, *Hansenula*) tenyésztéséhez – jó hatásfokkal triptofánná alakítják. Az indol nagyobb koncentrációban károsítja a sejteket, ezért folyamatosan, mérések alapján adagolják, koncentrációját a 0,5 – 1,0 g/l-es tartományban tartják. Triptofánra el lehet érni az oldhatósági határt (~12 g/l)



16. ábra A triptofán-szintetáz reakció



17. ábra A triptofán előállítása enzimes konverzióval

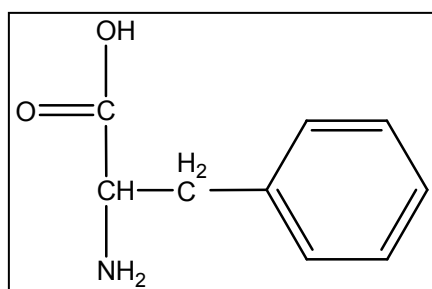
3. Enzimes biokonverzió: pl. az *E. coli* triptofán-szintáz enzime a szerinből és indolból triptofánt hoz létre. Az Amino GmbH (D) 1988-ban kezdte a triptofán termelést az ábrán látható reakcióséma szerint, nyugvósejtes *E. coli* szuszpenziót használva.

A biokonverzió vizes fázisban játszódik le, 8-9 közötti pH-n, 40 °C hőmérsékleten. A Trp koncentráció eléri a telítési határt (~12 g/l), sőt a képződött termék kiválik az oldatból. A reakcióhoz piridoxál-foszfát kofaktor szükséges. A pH-t NH_4OH -dal szabályozzák, az indolt on-line analízis alapján adagolják. Hat óra elteltével a levet feldolgozzák, a triptofán csapadékot és a sejteket leszűrik. A szűrőn maradt anyagból a terméket meleg vízben feloldják, elválasztják, majd aktív szénnel derítik. A konverzió indolra számolva ~96%. Kihozatal: 75 g Trp/l/nap, az éves kapacitás: 30 t/év. (Kevésnek tűnik, de a Trp világpiaca csak néhány száz tonna/év)

A triptofán felhasználása:

- esszenciális aminosavként tápszerekben és infúziós oldatokban adják;
- aktív gyógyszerkomponens, mert intermedierje a szerotonin anyagcserének, így altató, nyugtató, sőt antidepresszáns hatása van;
- gyógyszeripari alapanyag

1.8. L-fenilalanin termelés



Az L-fenilalanint több különböző úton is elő lehet állítani:

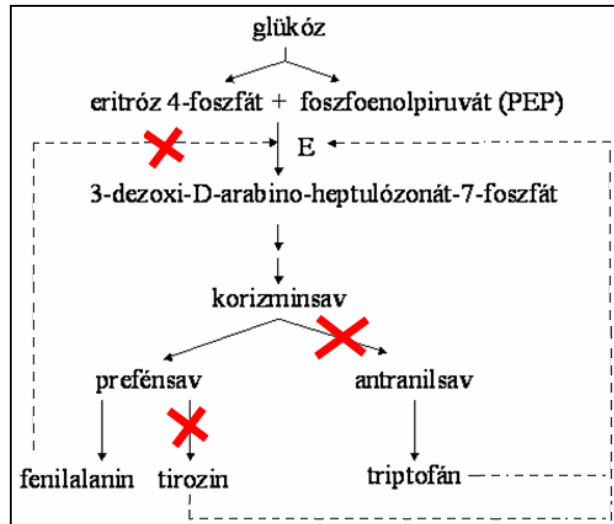
- de novo fermentációval és
- biokonverzióval.

1. A de novo fermentációs technológiánál *Corynebacter glutamicum* vagy *E. coli* mutánsait használják. A triptofánnál leírtak szerint az aromás aminosavak bioszintézise összekapcsolódik, ugyanazt az ábrát használhatjuk itt is, csak más ponton kell lezárni

reakcióutakat: auxotróf (Tyr⁻, Trp⁻) és feed back regulációs (p-F-fenilalanin rezisztens) mutánsok.

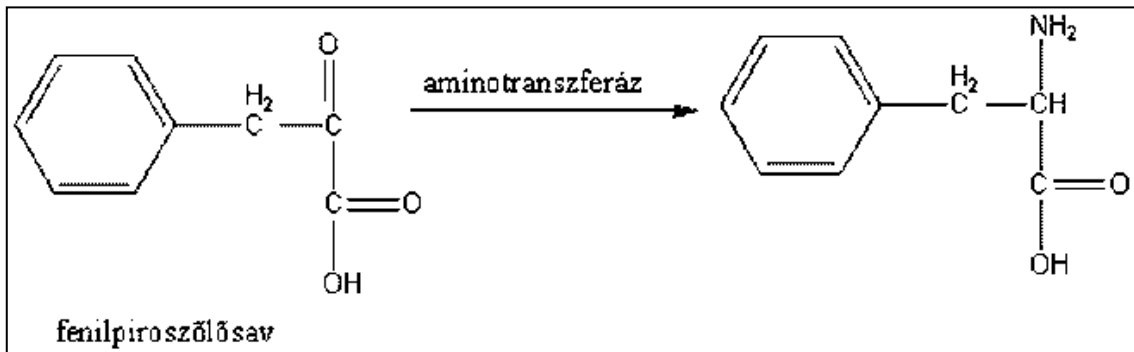
Ipari léptékben (3x150 m³-es fermentor) 2,5 napos fermentációs idő alatt 20 g/l-es koncentrációt lehet elérni. (A fenilalanin is rosszul oldódik.) Az üzem kapacitása évi ~1000 tonna, a világpiac ~10%-a.

18. ábra Fenilalanin túltermelő törzs anyagcseréjének átalakítása



2/1. Biokonverzió fenilpiroszölősavból

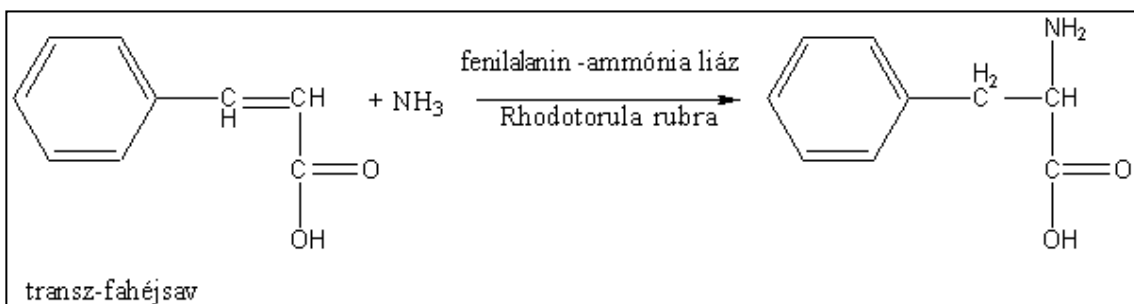
Az aminosavak bioszintézisének egyik alapreakciója a transzaminálás, ahol az α -keto-sav oxigénje amino csoportra cserélődik ki. A reakciónak számos változata ismert, ezek az átalakított aminosav szubsztráton kívül aminodonorban különböznek. Az egyszerűbb és gazdaságosabb esetben ammónium ion is megfelel a reakcióhoz, de sokszor szerves nitrogén donor szükséges. A fenilpiroszölősavat átalakító enzim sajnos aminosavat igényel aminodonorként (Glu, Asp). Így tulajdonképpen egyik aminosavból hozzuk létre a másikat – nehéz gazdaságossá tenni. A reakciót nyugvósejtes tenyésztéssel (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*) hajtják végre.



19. ábra Fenilalanin előállítása fenilpiroszölősavból

2/2. Biokonverzió transz-fahéjsavból

A szerves kémiából jól ismert addíciós reakció enzim katalízissel sztereoselektíven hajtható végre. A szükséges fenilalanin ammónia-liázt *Rhodotorula* és *Rhodococcus* törzsek termelik megfelelő aktivitással. Más törzseknél is létezik az enzim, de labilis, és erős a fahéjsav szubsztráthinhibíciója.



20. ábra Fenilalanin előállítása transz-fahéjsavból

A használt enzimek is bomlékonyak, ezért a reakciót szigorúan anaerob körülmények között, nitrogén atmoszférában, az oxigén teljes kizárásával hajtják végre. Az élesztőt aerob körülmények között szaporítják el, majd az enzimet indukálják. Ehhez fenilalanint kell bevenni, erre olcsóbb megoldás, ha fehérje hidrolizátumot vagy szintetikus DL-fenilalanint adnak. Ha kialakult az enzim aktivitás, akkor bevisznek 25 g/l fahéjsavat ammónium-cinnamát formájában és 15% (!!)-os ammóniát, ami 10,6-es pH-t eredményez. Erre az extrém koncentrációra azért van szükség, hogy a reakció egyensúlyát jobbra, a fenilalanin termelés irányába toljuk el. A folyamat előrehaladtával több részletben még egyszer ennyi ammónium-cinnamátot adagolnak be. Az 50 g szubsztrátból 42-43 g fenilalanin keletkezik, ami ~85%-os kihozatalnak felel meg.

A három bemutatott technológia paramétereinek összehasonlítását mutatja be a következő táblázat.

	Fermentáció	Biokonverzió-1	Biokonverzió-2
Nyersanyag	glükóz	fenilpiroszölősav	transz-fahéjsav
Produktivitás (g/l/h)	0.6	3.5	1
Reakcióidő (óra)	24	8	15
pH	7	7.5	10,5
Hőmérséklet (°C)	35	35	25
Sejttömeg konc. (g/l)	20	10	70
Aminodonor	-	L-aminosav	NH ₃
Önköltség (\$/kg)	13	35	32

5. táblázat Fenilalanin termelő technológiák összehasonlítása

Az összehasonlítás felső két sorában, a műszaki paraméterek a konverziós technológiák előnyét mutatják, de gazdasági szempontból mégis a fermentáció a legolcsóbb.

A termelt L-fenilalanin túlnyomó részét (~90%) aszpartám (édesítőszer) gyártásához használják fel. Az aszpartám egy aszparaginsavból és egy fenilalanin metilészterből álló dipeptid. Gyártását részletesen az „Ipari enzimek” fejezetben tárgyaljuk.

Kisebb mennyiséget esszenciális aminosavként adagolnak tápszerekbe és infúziós oldatokba, illetve a vegyiparban alapanyagként szolgál.

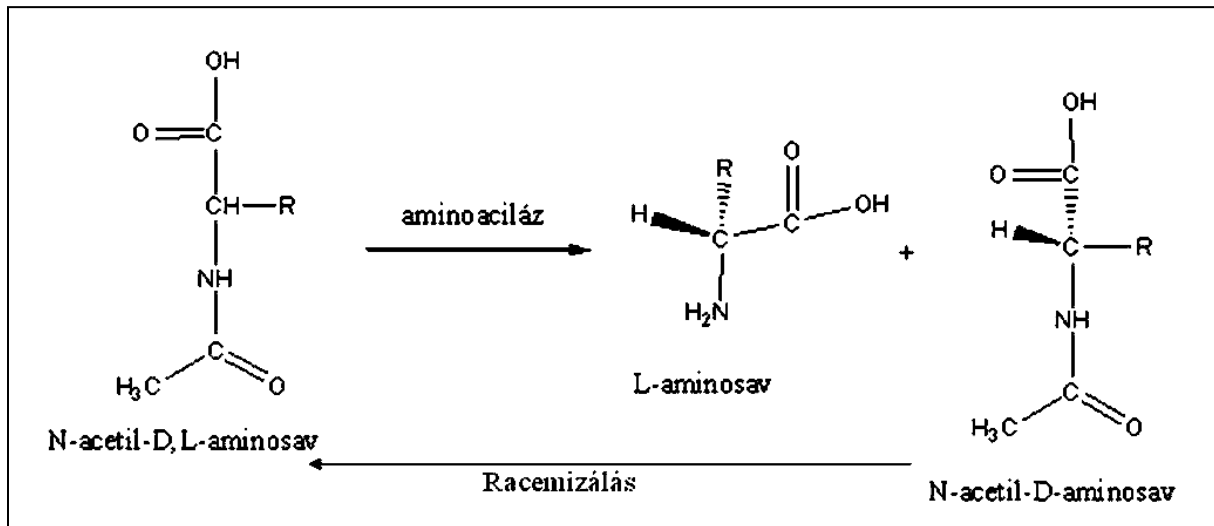
1.9. Reszolválás

A szó jelentése általánosságban a racém (DL) elegyek komponenseinek szétválasztása. Kémiai szintézisek rendszerint nem sztereoselektívek, az optikailag aktív termékek racém elegy formájában keletkeznek. A biológiai, biokémiai rendszerek viszont csak az egyik izomert hasznosítják, a másik izomer legalább is haszontalan ballaszt, veszteség, sőt negatív hatású is lehet (pl. az egyik izomer édes ízű, a másik keserű). Maga a reszolválás művelete is kapcsolódik a biotechnológiai iparokhoz, mivel ezekben legtöbbször az enzimek sztereoselektivitását használják ki. A technológiát azért tárgyaljuk itt, az aminosavak fejezetben, mert a legnagyobb léptékű, ipari reszolválás az L-metionin gyártásához kapcsolódik. Az aminosavaknál csak a L-forma biológiailag aktív, ez épül be a fehérjékbe. A metionin előállítható de novo fermentációval is, de a szintetikus gyártás gazdaságosabb, annak dacára, hogy az DL-metionint eredményez. Ezt a terméket enzimesen reszolválják a tiszta L-forma elérésére.

A biokémiai úton történő reszolválásnak két fő útja van (ld. Biomérnöki alapfolyamatok):

- aszimmetrikus szintézis,
- aszimmetrikus hidrolízis

Ezek közül az aszimmetrikus hidrolízissel foglalkozunk, mert a szintetikus előállított aminosavak (metionin, alanin,...) esetében ezt alkalmazzák. Ennek első lépéseként a racém aminosav keverékre olyan funkciós csoportot kötnek, aminek eltávolítása azután egy sztereo-szelektív enzimmel megoldható. Az általánosan alkalmazott származékképzés az N-acilezés (legegyszerűbben acetilezés), majd hidrolízis aminosziláz enzimmel. Az aminosziláz csak az L-aminosavakat szabadítja fel, a D-származék megmarad. Elválasztás után ez utóbbit lúgos főzéssel racemizálják, újra acilezik, és visszaviszik a folyamat elejére. Így gyakorlatilag a teljes anyagmennyiség átalakítható.



21. ábra Aszimmetrikus hidrolízis

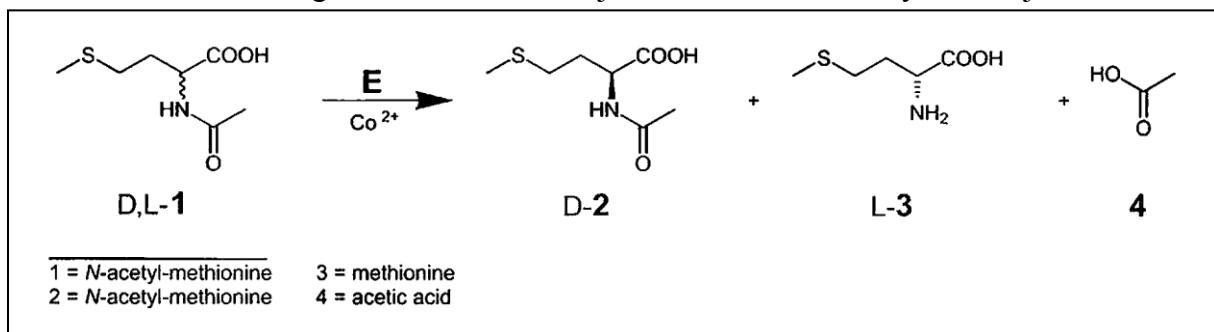
Az enzimet az *Aspergillus oryzae* termeli, sokféleképpen immobilizálják (DEAE-Sephadexhez ionos kötéssel, acetilcellulózhhoz kovalens kötéssel vagy poliakrilamid gélbe zárással).

1.9.1. A metionin reszolválása (Degussa eljárás).

Az Evonik (régii nevén Degussa) nagy aminosav gyártó, fermentációsán és szintetikusán is gyárt aminosavakat. Eljárásukat alapvetően metioninra dolgozták ki, de működik más aminosavakra is (Ala, Phe, Val, Leu, Trp, Tyr).

A folyamatban acetyl csoporttal acileznek, a hidrolízist oldott enzimmel, semleges közegben (pH = 7,0), 37 °C-on végzik. Az enzim működéséhez Co^{2+} kofaktor szükséges.

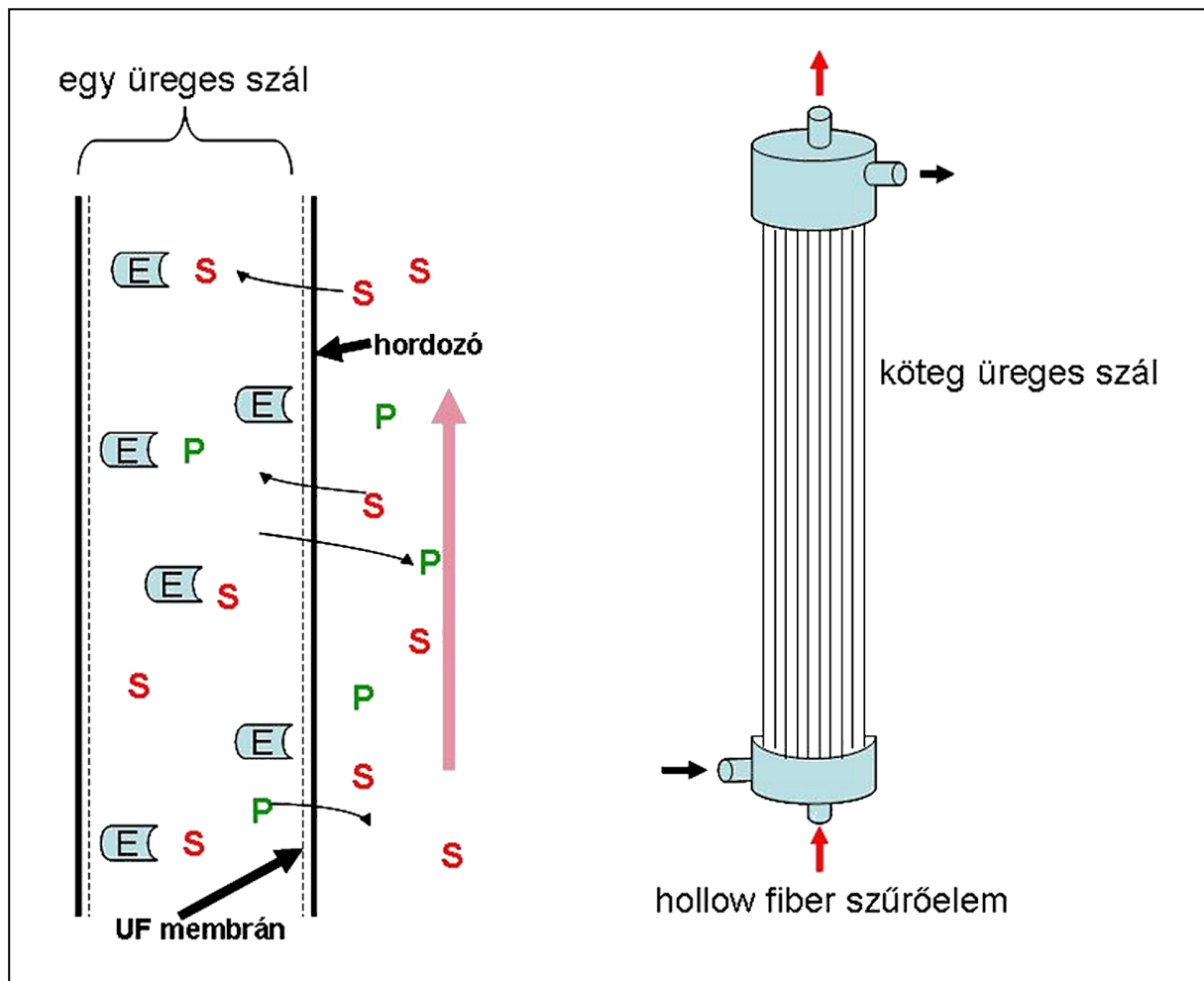
Feldolgozás: az enzimet ultraszűrővel lehet visszanyerni, az L-Met kristályosítható. A D-N-acetyl-metionint lúgos főzéssel racemizálják és visszaviszik a folyamat elejére.



22. ábra Metionin reszolválása

1.9.2. A Degussa AG kísérleti enzim membrán reaktora

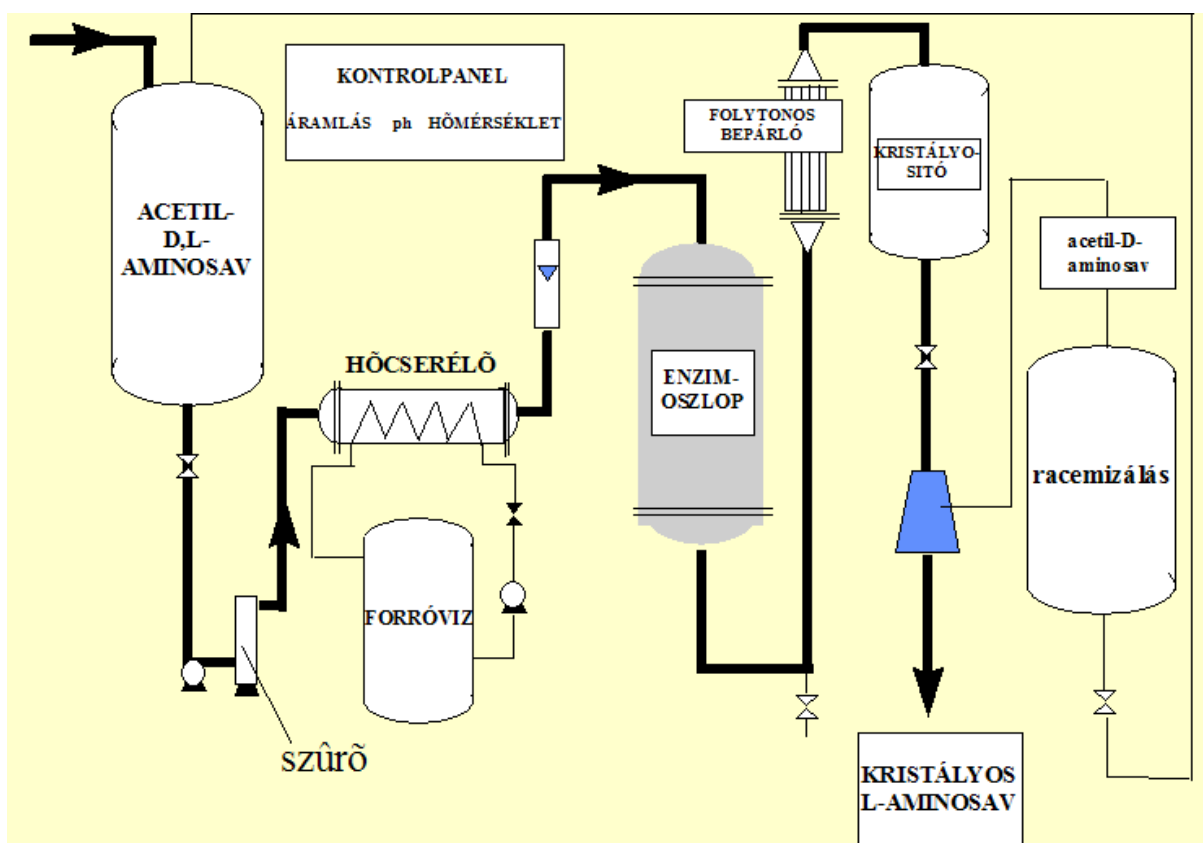
Az oldott enzimet egy ultraszűrő membrán tartja vissza, míg a termék szabadon áthalad. A keringetés során az enzim lassan elveszti az aktivitását a nyíró hatások miatt. Kapacitás: 200 t/év. Ugyanebben a berendezésben megoldották a metionin, valin és fenilalanin reszolválását is.



23. ábra Enzim rögzítés ultraszűrő membránnal

1.9.3. A Tanabe eljárás

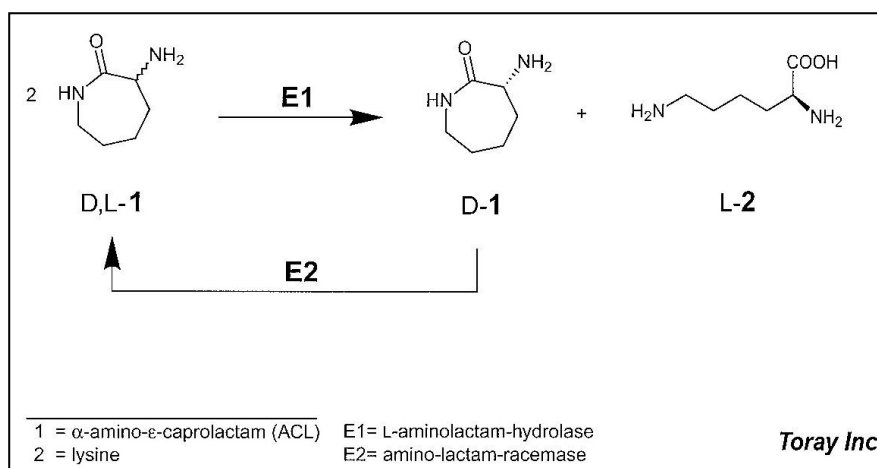
A japán Tanabe cég ugyanezt a reszolválási technológiát immobilizált enzimekkel oldja meg. A folyamat majdnem minden lépése folytonosítható, ez egyedül a kristályosításnál és az azt követő szűrésnél okoz nehézséget.



24. ábra Tanabe eljárás rögzített enzimmel

1.9.4. Lizin előállítása kaprolaktámból aszimmetrikus hidrolizissel

Az aszimmetrikus hidrolízis egy nagyon speciális esete a D,L- α -amino- ϵ -kaprolaktám hidrolízise lizinné (a Toray Ind. Co eljárása).



25. ábra Lizin gyártás kaprolaktám aszimmetrikus hidrolízisével

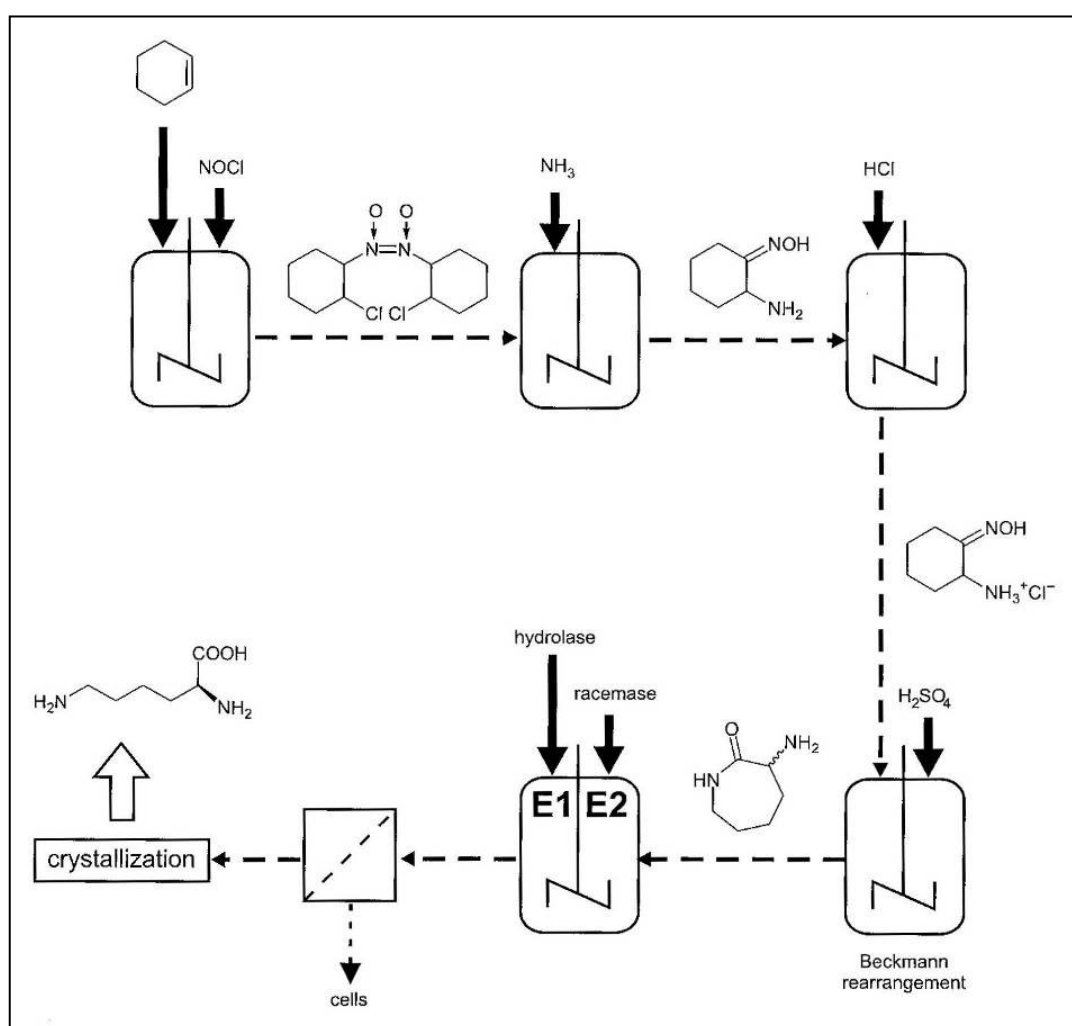
A kaprolaktám szintetikus intermedier, polikondenzációs műanyagok alapanyaga. Enzimikus reakcióval viszont L-lizinné alakítható. A kémiai szintézis racém kaprolaktámot hoz létre, az enzim viszont ebből csak az L formát hidrolizálja, a D-kaprolaktám gyűrűs formája megmarad. Az eljárás jól kiegészíthető enzimikus racemizálással, melynek során egy másik mikroorganizmus erre alkalmas enzime a maradék D formát racemizálja. Célszerű lenne a két

reakciólépést egy reaktorban, egyidejűleg megvalósítani. Ehhez viszont olyan enzimeket/mikroorganizmusokat kell választani, amelyek azonos körülmények között működnek optimálisan. Ha a két enzim/törzs azonos pH-n aktív, akkor a két lépés egy reaktorban megvalósítható. A kiválasztott reakciókörülmények: vizes lúgos közeg (pH = 8-9), a hőmérséklet $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, nyugvósejt szuszpenzió. A technológiához szelektált mikroorganizmus párok:

Candida humicola + *Alcaligenes faecalis* (alkálikus rothasztó, lúgos a közeg) vagy
Cryptococcus laurentii + *Achromobacter obae*

A reaktor szakaszos üzemben működik, a ciklus hossza 25 óra. Ezalatt a kihozatal eléri a 99,5%-ot. Az üzem kapacitása 4000 t/év. Ez inkább egy pilot (tanulmány) üzem, termelése elhanyagolható a világpiachoz képest.

A gyártás a kaprolaktám kémiai szintézisével kezdődik. A kiindulási anyagok a ciklohexén és a nitrozil klorid (NOCl). A kettős kötésre addicionált termék dimer formában jelenik meg, ez ammónia hatására oximot képez. Ebből Beckmann átrendeződéssel alakul ki a racém kaprolaktám, amit azután az enzimek átalakítanak.



26. ábra A félszintetikus lizingyártás folyamatábrája

Tartalomjegyzék

1.	Aminosavak, anyagcsere mérnökség (metabolic engineering).....	1
	1.0.1. Anyagcsere mérnökség.....	1
	1.0.2. Aminosavak gyártása.....	2
	1.0.3. Az aminosavak felhasználása.....	2
	1.0.4. Történet és piac.....	3
	1.0.5. Aminosavak gyártása.....	5
1.1.	Glutaminsav fermentáció.....	7
	1.1.2. Bioszintézis és szabályozása.....	7
	1.1.3. Fermentáció.....	8
	1.1.4. Feldolgozás.....	9
1.2.	Lizin fermentáció (α,ϵ -diamino-kapronsav).....	10
	1.2.1. Bioszintézis, anyagcseremérnökség.....	10
	1.2.2. Lizin fermentáció.....	11
1.3.	Treonin előállítása.....	13
1.4.	Aszparaginsav előállítása biokonverzióval.....	14
1.5.	L-Alanin gyártás.....	16
1.6.	Szerin előállítása.....	16
1.7.	L-triptofán termelés.....	16
1.8.	L-fenilalanin termelés.....	18
1.9.	Reszolválás.....	20
	1.9.1. A metionin részolválása (Degussa eljárás).....	21
	1.9.2. A Degussa AG kísérleti enzim membrán reaktora.....	22
	1.9.3. A Tanabe eljárás.....	22
	1.9.4. Lizin előállítása kaprolaktámból aszimmetrikus hidrolízissel.....	23