

Pécs Miklós

BIOTERMÉK TECHNOLÓGIA

Jegyzet, amely sohasem készül el teljesen.

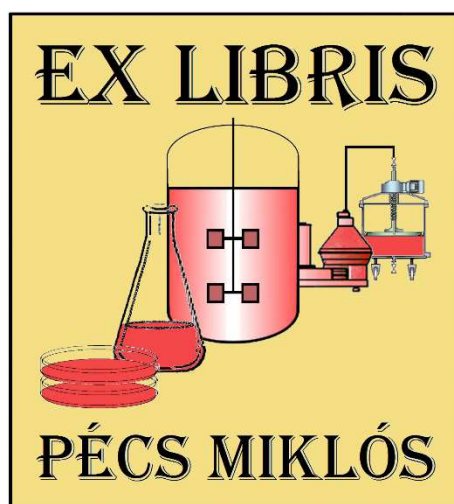
Tartalmazza a:

Biotermék és gyógyszeripari biotechnológia,

a Biotermék technológia II,

és a Gyógyszer és orvosi biotechnológia

tárgyak számos fejezetét



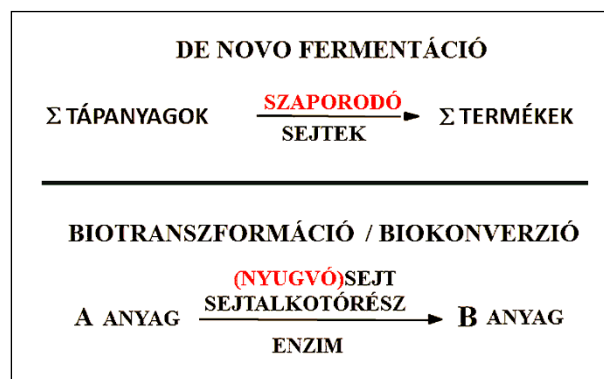
2023. SZEPTEMBER 1.

BME VBK Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

1. BEVEZETÉS

Biotermék technológia? Mi is ez a tárgy? Mivel foglalkozik? A cím szerint a biotermékek (=biotechnológiai úton előállított termékek) gyártástechnológiájával foglalkozik. Tehát technológiai tárgy.

Először is, mi az a biotechnológiai út? Sokféle definíció született rá, de egyre tágítani kellett a lefedett kört. Végül is egy eléggé általános és sokféleképpen értelmezhető meghatározás született: Sejt és molekuláris szintű folyamatok alkalmazása problémák megoldására vagy termékek előállítására. Technológiai szempontból ezt leszűkíthetjük annyira, hogy olyan technológia, amelyben mikroorganizmusokat, szöveti sejteket, vagy azok valamely alkotórészét (pl. enzimeket) használunk fel. Ez jól illeszkedik a Biomérnöki műveleteknél használt felosztáshoz:

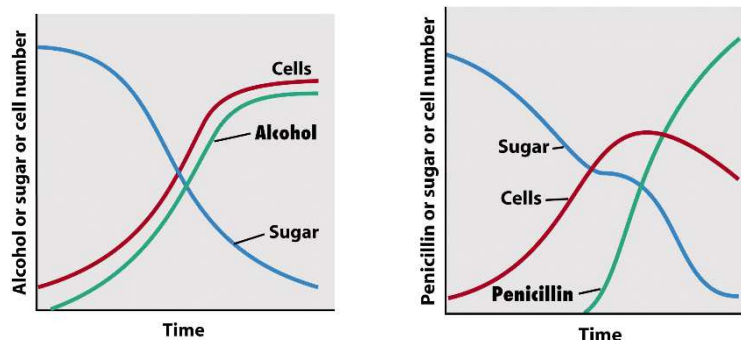


1. ábra Biotechnológiai gyártási technológiák

Ha ez már megvan, akkor nézzük, milyenek azok a **biotermékek**. Ezeket is többféleképpen csoportosíthatjuk. Képződésük, bioszintézisük szerint lehetnek:

- Sejtek, sejttömeg: pékélesztő, egysejt-fehérje, starter kultúrák
- Primer metabolitok: etanol, szerves savak, aminosavak, nukleotidok
- Szekunder metabolitok: antibiotikumok, növényi hormonok, pigmentek, alkaloidok
- Polimer sejtalkotók: enzimek, poliszacharidok, nukleinsavak
- Rekombináns fehérjék: hormonok, ellenanyagok, enzimek

A képződés módja sok tekintetben meghatározza a technológiát:



2. ábra Primer és szekunder metabolit fermentációk lefutása

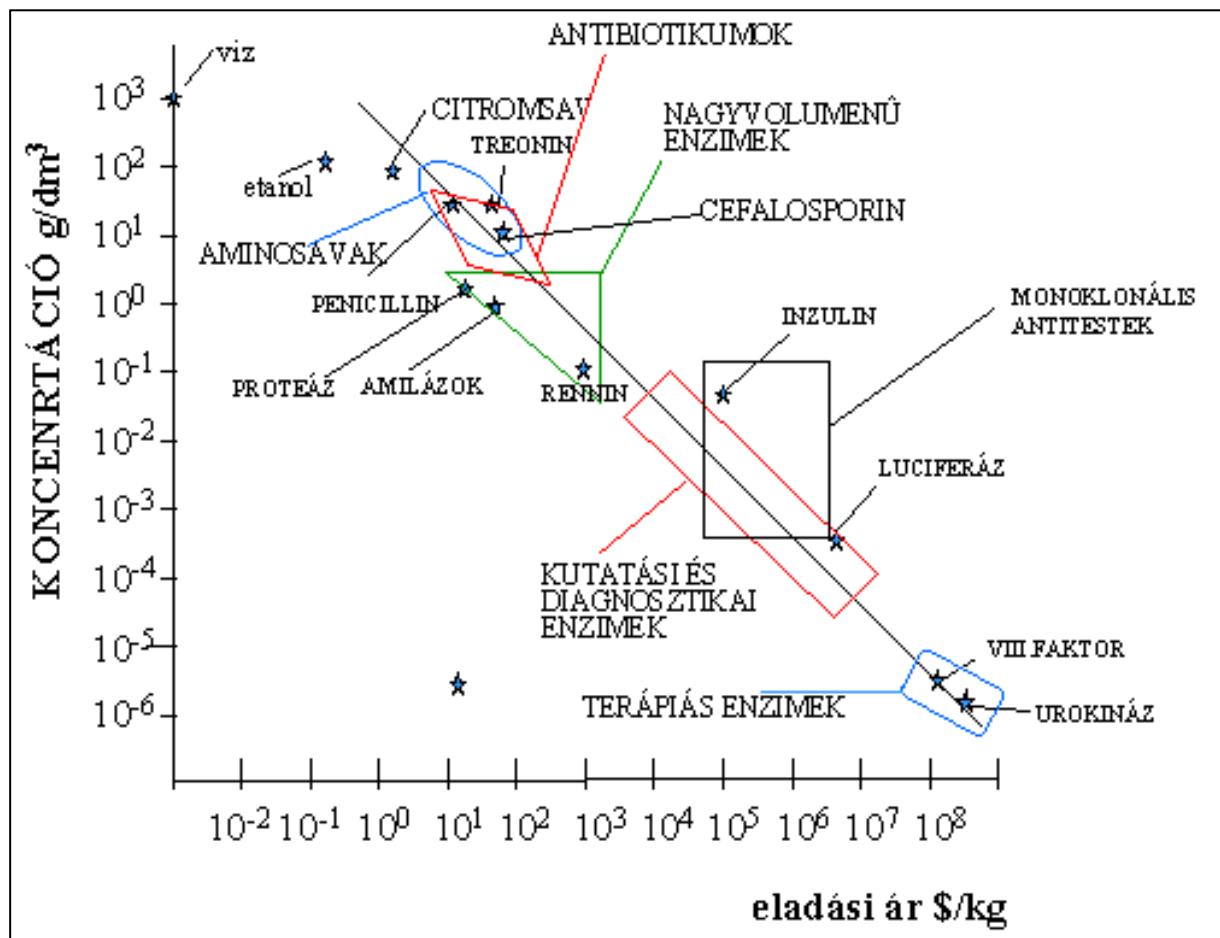
Különbséget tehetünk az egyes termékek között a gyártási volumen szerint:

- Nagy tömegben előállított (bulk) anyagok: élelmiszeripari, vegyipari alapanyagok, a fehér és a zöld biotechnológia termékei. Jellemzői:
 - versenypiac, kis haszon
 - az innováció a költségek lefaragására irányul

- Finomvegyeszer, új gyógyszerek, diagnosztikumok: kis mennyiségben termelik, de magas áron. Elsősorban a piros biotechnológia termékei.
 - innovatív termékek,
 - kisebb mennyiség
 - nagyobb profit

A termelés léptéke meghatározza a technológiában használható műveleteket és berendezéseket. Pl. elektrodiálízist vagy vizes kétfázisú extrakciót még nem lehet tonna/órás kapacitással alkalmazni.

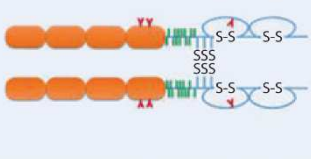
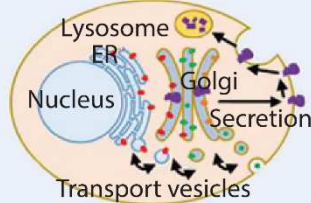


A biotechnológiai termékekre is érvényes a termelési volumen és az ár közötti fordított arányosság. Ezt az összefüggést logaritmikus ábrázolásban vizsgálva közelítőleg egyenest kapunk.



3. ábra A termelés és az ár kapcsolata biotechnológiai termékeknél

Mit nézünk meg az egyes termék(csoport)oknál? Nem elsősorban a szűken vett technológiát (táptalaj, hőmérséklet, pH, idő, fordulatszám, hígítási sebesség), hanem a teljes folyamatot, a termék tulajdonságait, a termelő törzseket, a fermentációt (upstream), és a feldolgozást (downstream processing). Ezzel a sorrenddel követjük a technológia kifejlesztésének menetét (4. ábra).

A termék felhasználása, funkciói általában a legelső alfejezethez, a termék leírásához tartoznak. Ha viszont a termék továbbfejlesztéséről lesz szó, újabb módosítások újabb alkalmazásokat tesznek lehetővé, akkor ez az adott fejezet végére kerül.

Protein		<p>Molecule design</p> <p>N-linked glycan recognition sequence</p> <p>C-terminal peptide</p> <p>Polysialylation acceptor</p> <p>Linker sequence</p>
Cells		<p>Host selection</p> <p>Strain engineering</p> <p>Glycosyltransferases</p> <p>Glycosidases</p>
Upstream		<p>Growth conditions</p> <p>Temperature, pH, CO₂, NH₄</p> <p>Additives</p> <p>Inhibitors</p> <p>Precursors</p>
Downstream		<p>Chromatography</p> <p>Anion exchange</p> <p>Hydrophobic interaction</p> <p>Hydroxyapatite</p>

4. ábra A fermentációs technológia fejlesztés fázisai

1.1.1. A céltermék molekula alapos megismerése.

Szerkezetét, fizikai, kémiai tulajdonságait mind ismerni kell, nehogy a fejlesztés egy későbbi fázisában derüljön ki egy összeférhetetlenség vagy bomlékonyság. Sok paramétert érdemes méréssel ellenőrizni, nem mindig lehet a szakirodalomra támaszkodni.

Adalék: például a tejsav forráspontjára a legtöbb táblázatban 112 °C-ot találunk. Az csak egy kis lábjegyzetből derül ki, hogy ez 14 Hgmm-en mért adat, valójában atmoszférikus nyomáson ez 218 °C.

Termékünk pontos ismerete különösen fontos a rekombináns fehérjéknél. Nem lehet megúszni a hosszadalmas és drága vizsgálatokat:

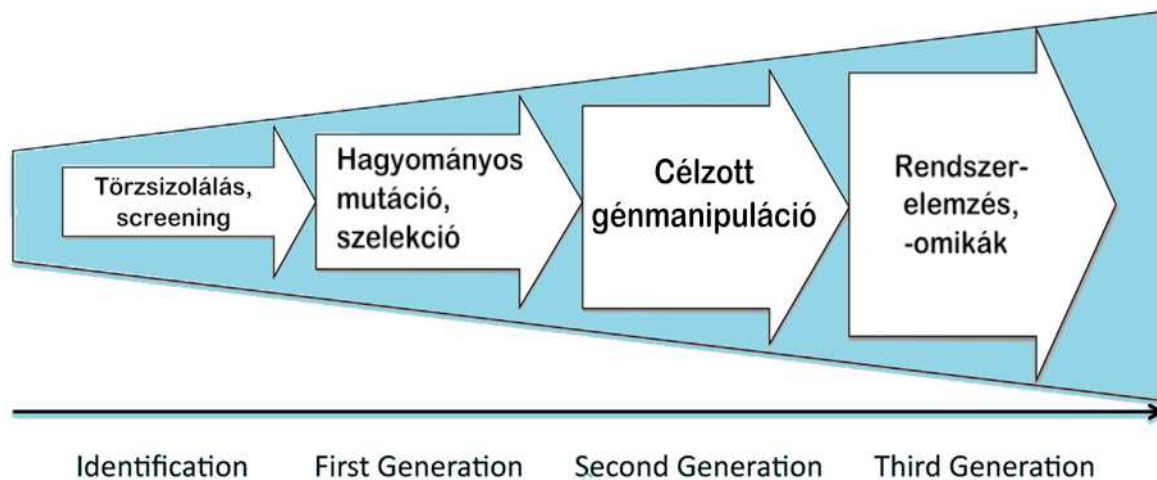
- Az aminosav sorrend elemzés (MS – MS)
- A glikozilációs mintázat elemzése (MS – MS), izoformák előfordulása
- A másodlagos/harmadlagos szerkezet felderítése (legalább a diszulfid hidak), (Röntgen-krisztallográfia)
- Domén-szerkezet, természetes érési/aktiválási útvonal
- Aktiváló/inaktiváló hatások, bomlékonyság

Ide tartozik még a megfelelő érzékenységű analitika kidolgozása a fő és melléktermékekre. Ezzel elkerülhetjük az olyan kellemetlen meglepetést, hogy már a tisztítás optimalizálása után derül ki, hogy a termékünk nem egységes, hanem több komponensből áll.

1.1.2. A megfelelő termelő szervezet kiválasztása/létrehozása.

A természetben élő mikrobák a legritkább esetben termelnek olyan mennyiségű terméket, hogy az azonnal üzemíthető legyen. Ezzel együtt az első lépés a törzs keresése, a screening. Természetből, illetve törzsgyűjteményekből összeszedett törzseket sorozatban vizsgálunk abból a szempontból, hogy képesek-e – ha kis mértékben is – az általunk kívánt termelésre, átalakításra. Ez történetileg is a legelső módszer (~100 éves) a törzsmunkában, az így kiválasztott törzseket majdnem mindig tovább fejlesztik, de a törzsizolálás ma is hasznos kutatómunka.

Adalék: az italcsomagolásban nagyon előnyös a PET palack használata: átlátszó, inert, nyomásálló (ezért szénsavas italok is lehet benne tárolni). Ugyanakkor éppen az inertisége miatt a természetben nem bomlik le, évszázadokig szennyezi a környezetet. Japán kutatók sziszifuszi screening munkával végül találtak egy mikroorganizmust, amely képes a PET anyagát bontani. Azonosították az enzimet, el is nevezték PETáz-nak. Ez egy lassan növekvő mikroba kis aktivitású enzime, de ez jó alap, amin el lehet indulni, a további törzsjavítási lépésekkel valószínűleg megoldható lesz a PETáz nagybani termelése.



5. ábra A törzsfeljesztési módszerek fejlődése

A kiválasztott törzs genetikai továbbfejlesztésének első generációja az indukált mutáció + szelekció volt (~70-80 éve alkalmazzák). Az anyagcsereutak térképének ismeretében egyes reakciólépések és szabályozási mechanizmusok eliminálásával törekednek a célvegyület túltermelésére. Ez a technika elvesz a genetikai tulajdonságokból, nem ad hozzá új elemeket. Auxotróf és rezisztens mutánsok izolálásával éri el a megnövekedett termékképzést.

A második generációt (~50 éve) szokták génmanipulációnak nevezni, a létrejött élőlény GMO (genetikailag manipulált organizmus). Eszköze a rekombináns DNS technika, a kiválasztott gazdaszervezetbe vektorok segítségével viszik be az idegen fehérjék termeléséhez és annak szabályozásához szükséges géneket.

Harmadik generációnak tekintik a rendszerszintű biokémiai vizsgálatot/beavatkozást. Felderítik és átalakítják az érintett anyagcsere-folyamatok fluxusát, azonosítják és megszüntetik a szűk keresztmetszeteket („-omikák”: metabolomika, genomika, proteomika).

1.1.3. Upstream optimalálás

A harmadik szakaszban a kialakított nagy termelőképeségű törzshöz ki kell dolgozni a megfelelő fermentációs technikát. Ennek tárgyalása során nem elsősorban az optimális technológiai paraméterek (T, pH, t, V, stb.) bemagolásáról szól, hanem olyan általános elvek bemutatásáról, amelyek segítenek eligazodni új, még nem ismert technológiák esetében is.

Példa: ha az optimális pH a kérdés, akkor jó becslés az élesztők és fonalas gombák esetén az 5-6 közötti érték. Baktériumoknál nem hibázunk nagyot, ha 6,5 – 7,5 közötti értéket adunk meg. Érdemes megjegyezni a kivételeket: a tejsavbaktériumok lesavanyítják a fermentlevet akár 4,5-re is, de itt már saját magukat is gátolják – célszerű ezeknél is a pH-t ennél magasabb értéken szabályozni.

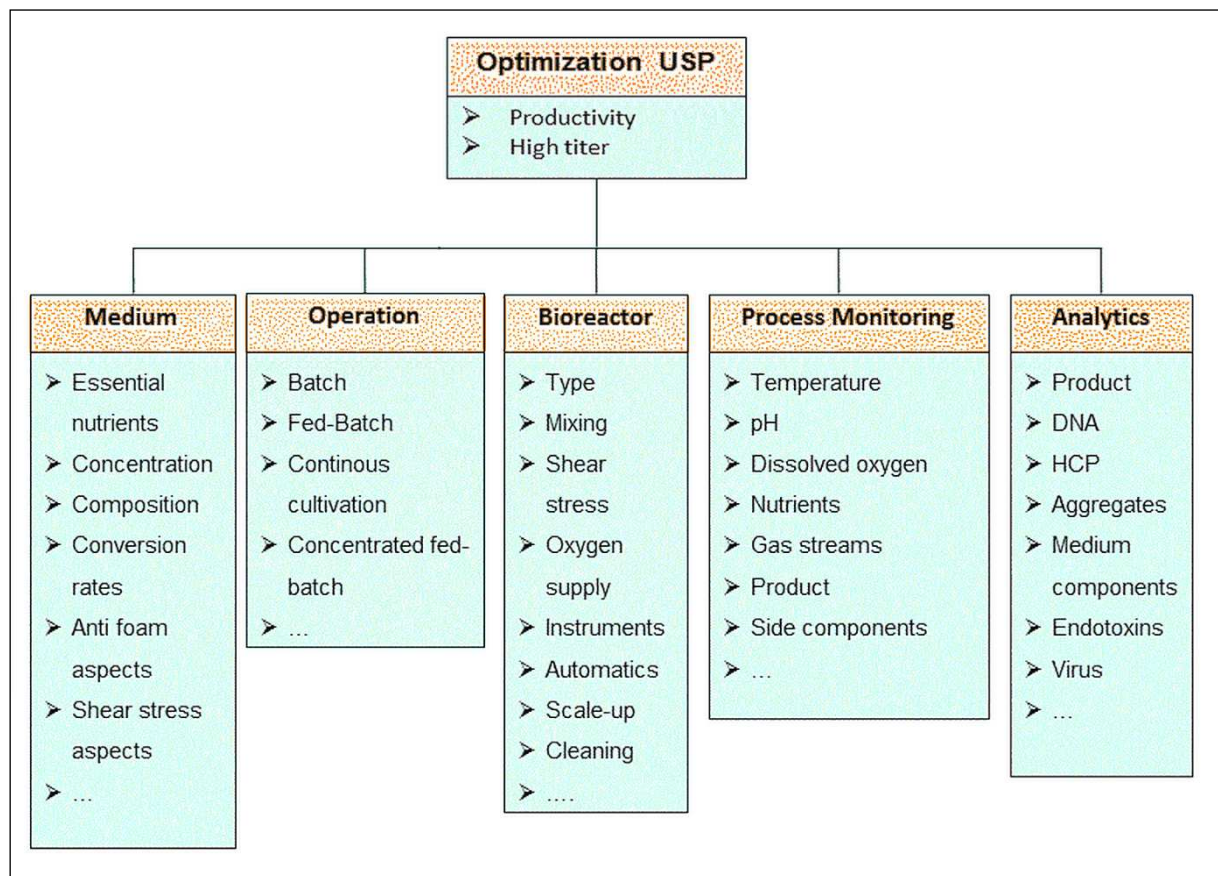
A fermentációs folyamat két célfüggvénye a végső (vágási) termékkoncentráció és a produktivitás (termék/idő.térfogat). A kettő gyakran ellentmondásba kerül egymással. A szakaszos fermentációval, különösen a rátáplálással nagy termékkoncentráció érhető el, de alacsony a produktivitás. A folytonos fermentáció viszont kisebb koncentrációt eredményez, de jóval nagyobb a produktivitás.

1.1.4. Downstream optimálás

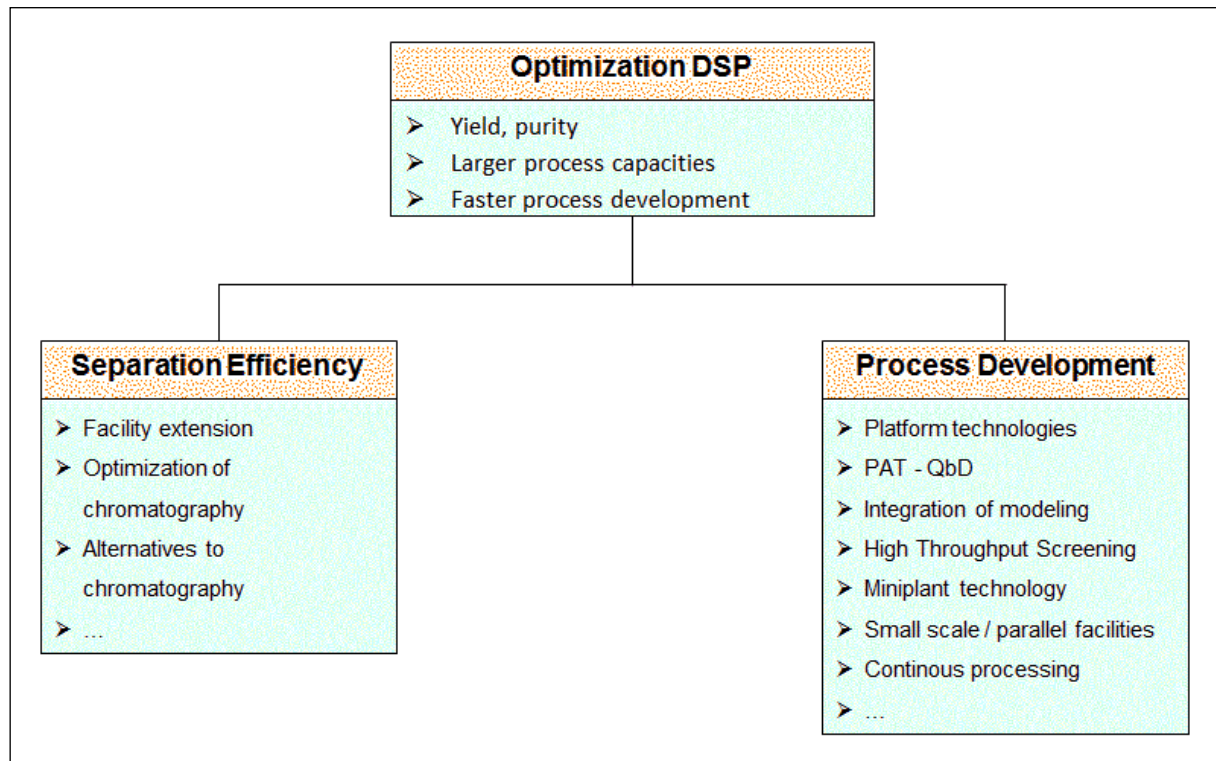
A fermentációs technológia fejlesztésétől nem választható el élesen a negyedik fázis, a termékizolálás (downstream processing) optimálása.

A termékizolálás egy művelet sor, aminek során a kívánt anyag egyre nagyobb tisztaságú lesz, végül megfelel a felhasználó, a piac igényeinek. A műveleteknek nincs köbevésett sorrendje, de az esetek nagy részében a következő sorrendet alkalmazzák:

1. Szilárd-folyadék elválasztás: a fermentálé folyadékfázisától különítik el a sejttömeget, és/vagy a táptalaj szilárd szemcséit, esetleg a kikristályosodott terméket.
- (1/b) Sejtfeltárás. Erre a műveletre csak akkor van szükség, ha a kinyerni kívánt anyag a sejteken belül található (intracelluláris). Ekkor a sejtek falát és membránját el kell rontcsolni ahhoz, hogy a termék molekulák kiszabaduljanak, oldatba kerüljenek.
2. Koncentrálás/capturing: a legnagyobb mennyiségű idegen anyagokat, azaz elsősorban a vizet távolítják el, általában fázisváltással. Fehérjéknél ez affinkromatográfiával történik.
3. Tisztítás: a termék és a mellette lévő szennyező anyagok fokozatos elválasztása
4. Végtisztítás: a terméket a kereskedelmi forgalomba hozás előírásainak megfelelő tisztaságig tisztítják



6. ábra Az upstream optimálás részfeladatai

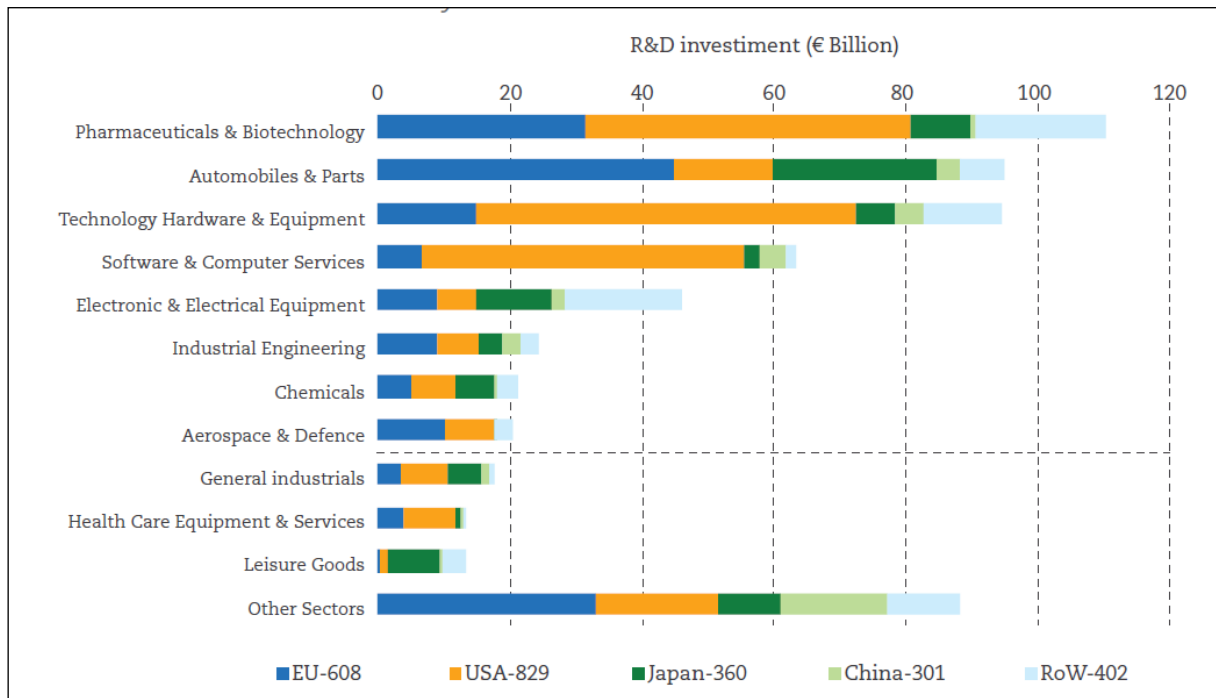


7. ábra A downstream optimálás részterületei

A termékizolálás műveleteivel a „Biológiai iparok elválasztási műveletei” tárgy foglalkozik részletesen.

1.2. Gazdasági háttér

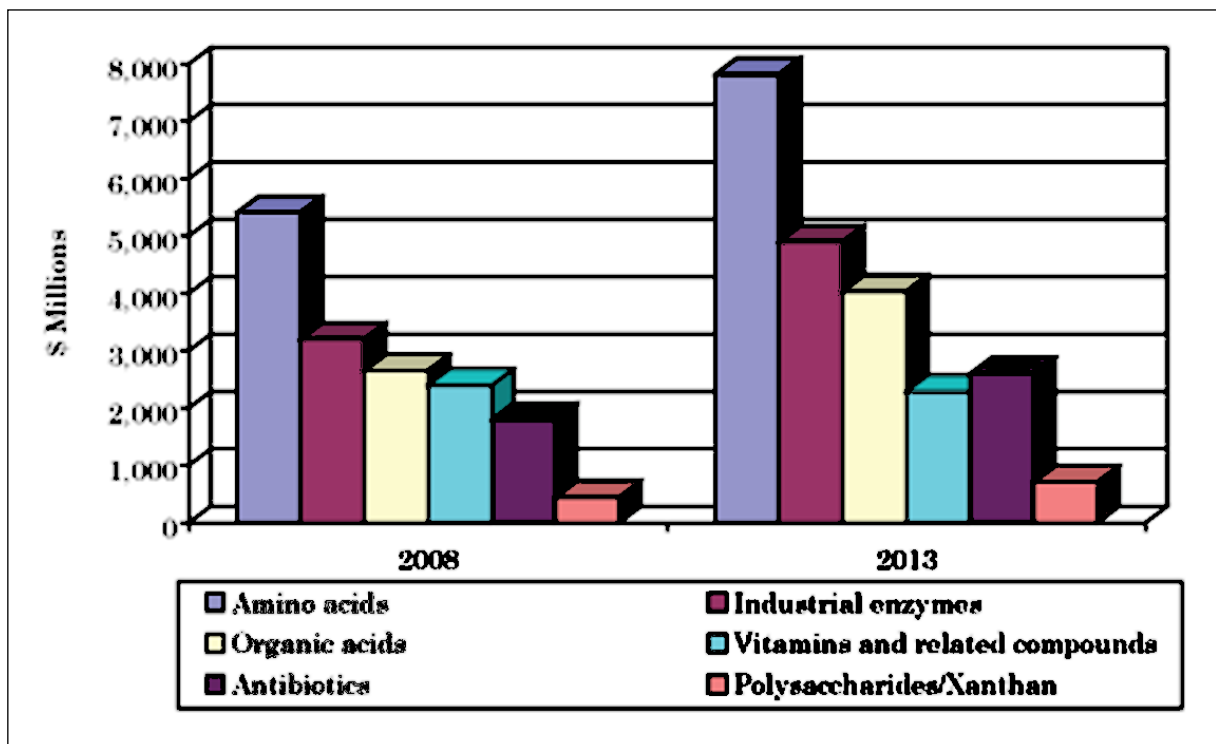
A következőkben azt vizsgáljuk, hogy gazdaságilag mennyire jövedelmező a biotechnológia termékeinek gyártásával foglalkozni. A gazdasági terület jövőjének fontos mérőszáma, hogy mennyi pénzt fordítanak kutatás-fejlesztésre. Tehát nem a termelő kapacitások bővítésére új beruházásokkal, hanem innovációra. Az ábrán látható, hogy a gyógyszer- és biotechnológiai iparban a legnagyobbak a ráfordítások, meghaladják az autóipar és az IT technológia fejlesztésére szánt összeget is.



8. ábra K+F beruházások a különböző iparágakban

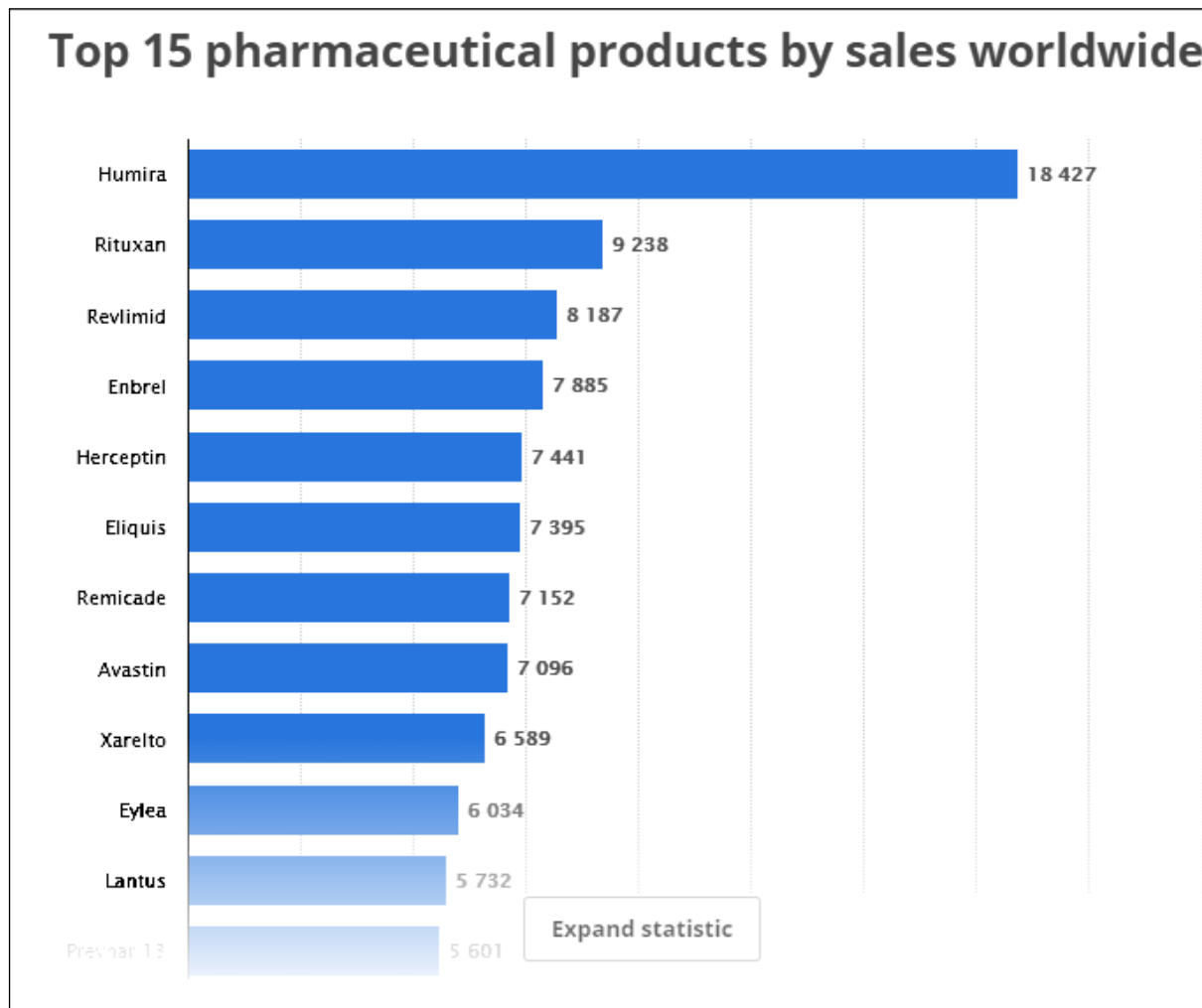
Gazdasági téren érdemes megkülönböztetni az olcsó tömegtermékeket (bulk products) és az innovatív, szabadalommal védett, nagy hasznot hozó termékeket.

A bulk termékek piacán erős verseny van, a profitráták alacsonyok. Ezzel együtt a piac évről évre bővül. A termék önköltségében döntő tényező a tápoldat költsége, elsősorban a szénforrás. Ennek ára az egész világon közel állandó, de az ázsiai országok olcsó munkaereje is érvényesül a versenyképességben



9. ábra A bulk termékek piacának növekedése

A 9. ábrán látható, hogy minden kategóriában nőtt a termelés, kivéve a vitaminokat. Ez utóbbi csökkenés arra vezethető vissza, hogy a kétezres évek első évtizedében tetőzött a „vitaminőrület”, az a trend, hogy az egészség szempontjából előnyös, ha az emberek a normál vitamin szükségletük többszörösét viszik be naponta. Ez azóta elmúlt, mint minden divat, a vitamin igény és ezzel a termelés normalizálódott.

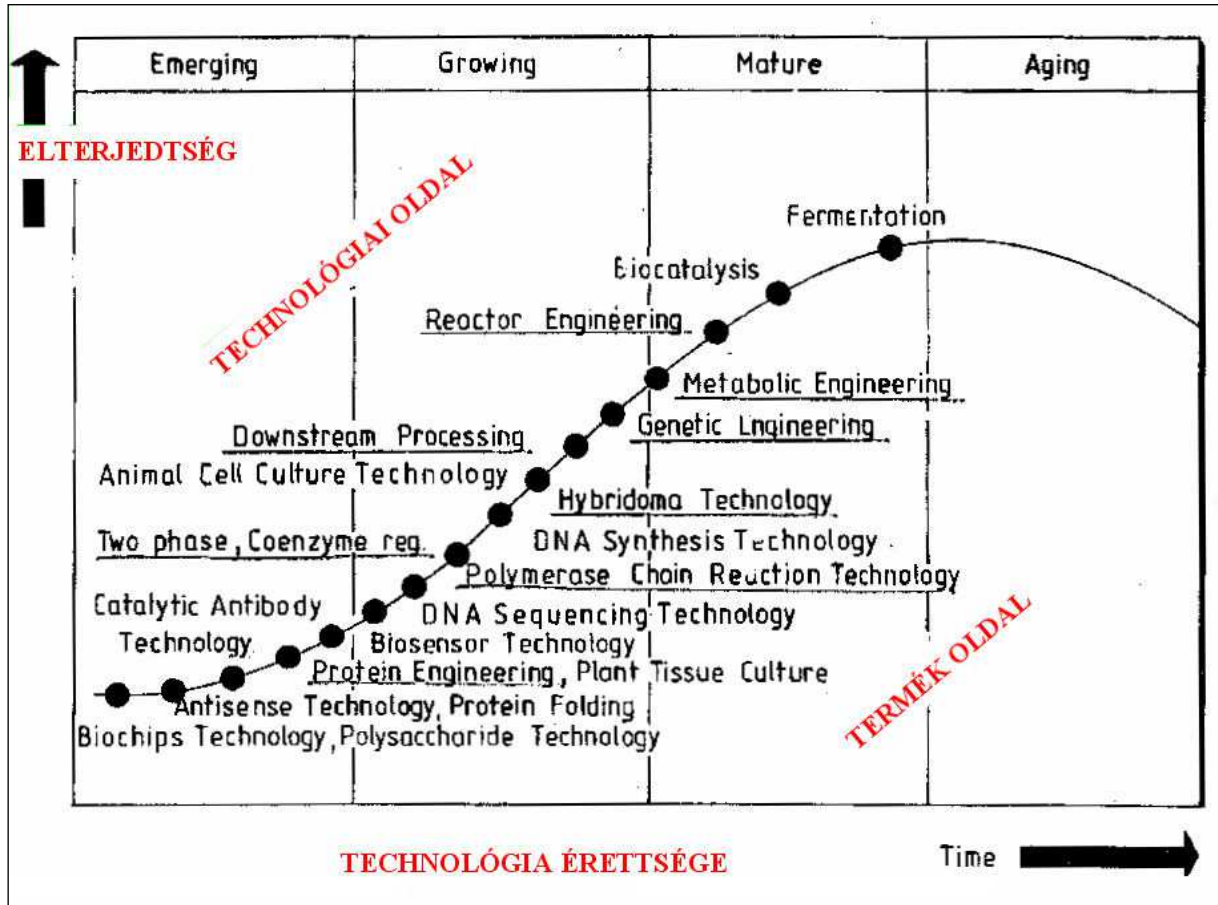


10. ábra A gyógyszeripar legnagyobb árbevételű termékei

Az igazi blockbuster-ek, az óriási bevételt és profitot hozó termékek a gyógyszerek, azon belül a biotechnológiai úton gyártott gyógyszerek, még szűkebben a monoklonális antitestek.

A top10-be csak két kis molekulájú anyag fért be, az Eliquis és a Xarelto, ezek véralvadásgátló szerek. A Lantus hosszú hatásidejű módosított inzulin, a többi gyógyszer monoklonális antitest.

A termékek bemutatásánál azt is figyelembe kell venni, hogy az adott anyag, vagy technológia életciklusának melyik szakaszában van. Erre a területre is jellemző, hogy minden újdonság idővel érett és elterjedt megoldás lesz, ami azután fokozatosan elavul, és átadja a helyét újabb, előnyösebb fejlesztéseknek.



11. ábra A biotechnológia részterületeinek életciklus-görbéje

2. EGYSEJT-FEHÉRJE TERMELÉS

2.1. Bevezetés

A fermentációs ipar technológiai közül a legegyszerűbbek azok, amelyekben maga a sejt-tömeg a termék. A mikrobiális sejteknek két fő felhasználási területe van:

1. Proteinforrás (egysejt-fehérje, single cell protein, SCP) emberi és állati fogyasztásra.
2. Inokulum (oltó-, starter-) kultúrákként, élelmiszeriparban (pl. pékélesztő), mezőgazdaságban, hulladékkezelésben.

2.1.1. Proteinigény

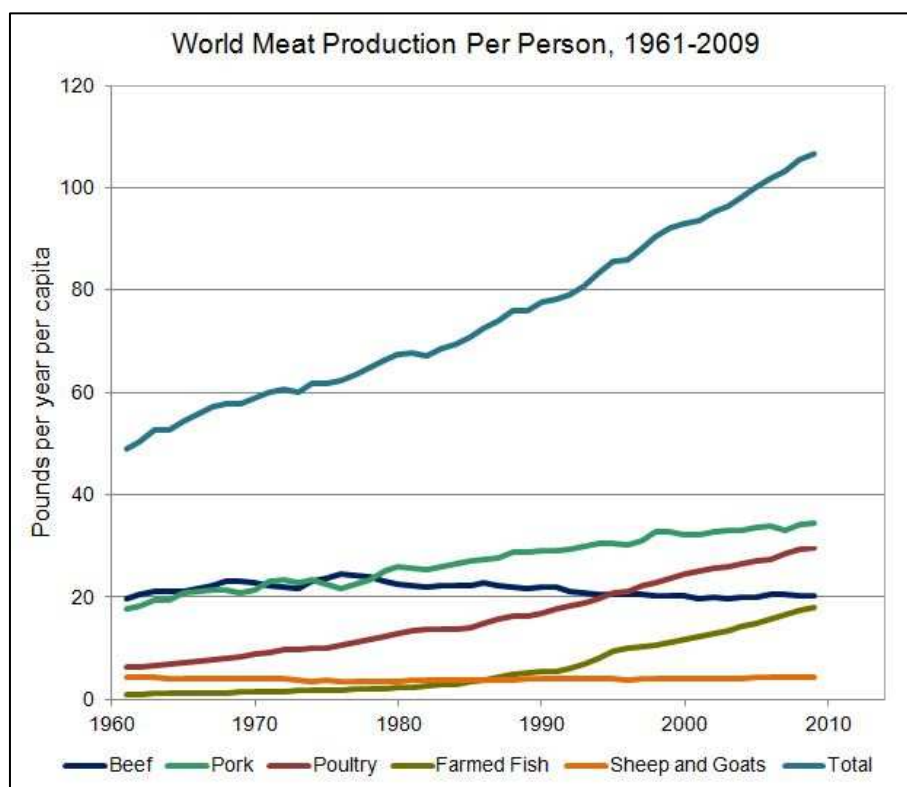
A világ fejlődő országainak nagy részében gondot jelent a növekvő lakosság megfelelő élelmiszer ellátása. Ennek egyik aspektusa a fehérje hiány. Nem elegendő a szükséges kalória mennyiséget pl. szénhidrátokból biztosítani, a megfelelő fehérje bevitelre is szükség van. A táplálékláncban az originális fehérje termelők a növények. Az állati szervezet csak fehérjéből tud fehérjét termelni, és ráadásul ez az átalakítás elég rossz hatásfokú (jó esetben is csak kb. 2-3 kg takarmány fehérjéből lesz 1 kg állati fehérje. Tisztán növényi (vegetáriánus) étrenddel körülményes a megfelelő fehérje bevitelt biztosítani, így az állattenyésztés közvetítő, átalakító szerepét nem lehet megkerülni. Így a fehérjeigény mind az emberi, mind az állati táplálkozásban jelentkezik.

A fehérje alultápláltság kétféle formában is jelentkezhet: mennyiségi és minőségi hiányként. A mennyiségi hiány azért lép fel, mert az emberi szervezet a beviteltől függetlenül naponta kb. 8-10 g elemi nitrogénnek megfelelő nitrogénvegyületet választ ki, elsősorban a vizelettel. Ennek pótlására legalább ugyanennyi nitrogént kell bevinni, szerves vegyületek, elsősorban fehérjék formájában. Tehát napi 50-60 g fehérje bevitelre van szükség. A minőségi fehérjeéhezés viszont abból adódik, hogy az esszenciális aminosavakat szervezetünk nem képes előállítani, ezért azokat a táplálékkal kell elfogyasztanunk. A megfelelő aminosav összetételű, teljes értékű fehérje bevitelre külön figyelmet kell fordítani. A legnagyobb mennyiségben termelt hasznónövények (gabonafélék) fehérje tartalma kicsi, és ebben is kevés az esszenciális aminosav. Egyedül a hüvelyesek (szója, csicseriborsó, babfélék) tartalmaznak nagyobb mennyiségű és teljes értékű fehérjét. Az állati eredetű termékek (hús, tej, tojás) fehérjetartalma és összetétele megfelelő, de ez csak fehérjék átalakításával jön létre.

Ennek fényében a világ egyre növekvő élelmiszerigénye ösztönzi az ún. nem-konvencionális proteinforrásokra irányuló kutatásokat, amellyel kiegészíthetjük a már meglévő forrásokat. A növények és állatok átalakító kapacitása mellett célszerűnek látszik a lényegesen gyorsabban szaporodó mikroorganizmusok anyagcseréjét igénybe venni.

Nagy érdeklődés irányul az olcsó anyagok hasznosításával nyerhető mikrobiális fehérjére, vagy más néven **egysejt-fehérjére** (Single Cell Protein). Az egysejt-fehérje igény két területen is jelentkezik. Egyfelől a jelenleg meglévő fehérje források mellett a táplálékbázis kiszélesítése, másfelől a takarmányozásban alkalmazott konvencionális fehérje-komponensek (szója, halliszt, tejfehérje) kiváltása lehetőleg olcsóbb mikrobiális fehérjékkel.

Az egysejt-fehérjének tipikusan olyan, többféle fehérjéből álló fehérjeforrást nevezünk, amelyet tiszta vagy vegyes összetételű alga, élesztő, gomba vagy baktérium kultúrákból vonnak ki. A kultúrákat olcsó mezőgazdasági vagy élelmiszeripari hulladékon tenyésztik, a fehérjét pedig nagy protein-tartalmú tápanyagok helyettesítésére lehet felhasználni akár emberi, akár állati célra.



12. ábra A húsfogyasztás alakulása

A Single Cell Protein (magyarul egysejt-fehérje) kifejezést a Massachusettsi Műszaki Egyetem (MIT) tudósainak egy csoportja alkotta meg 1966-ban. A kifejezés félrevezető, mert valójában nem csak az izolált sejtfehérjét jelenti, hanem valójában „bármely mikrobiális biomassza, akár egy-, akár soksejtű baktériumok, élesztők, fonalas gombák vagy algák, amelyek használhatók táplálékként, vagy takarmány-adalékanyagként.”

2.1.2. Történeti áttekintés

Az élesztőt empirikusan már 5000 éve használták kenyér és italok előállításánál, anélkül, hogy tudtak volna a mibenlétéről. A fermentált élelmiszerekben maradó biomasszát öntudatlanul is elfogyasztották. A sörgyártás melléktermékeként keletkező élesztőt a sörtörkölyel együtt már nagyon régen állatok hizlalására használták fel. Az élesztő tulajdonságait és működését végül Pasteur munkássága tárta fel. A szárított, élelmiszerminőségű élesztők és ezek autolizátumai sok éve használatosak. A szárított gombamicéliumok a kellemes ízük miatt felhasználhatók levesekben, szószokban, mártásokban. A második világháború során az élelmiszerhiány enyhítésére mind Németországban, mind a Szovjetunióban nagy mennyiségű élesztőt termeltek emberi fogyasztásra. 1966-ban, amikor az SCP kifejezést először használták, ekkor a világon összesen kb. 800.000 tonna mikroba biomasszát állítottak elő, ebből 600.000 tonna pékélesztő volt.

Általánosan elmondhatjuk, hogy az ár, ezzel a gazdaságosság erősen függ a felhasználási céltól. A pusztán takarmányozási célú termék gyártása a gazdaságosság határán billeg. Csak nagyon olcsó szubsztrátból, olcsó technológiával lehet gazdaságos. Ha a sejtömeget élelmiszerként vagy élelmiszer adalékként lehet eladni, az ár máris többszöröse az előzőnek, drágább szubsztrátok és technológia is alkalmazható. Ugyanez a helyzet az inokulum/starter tenyészetekkel is, magasabb áron értékesíthetők.

Az SCP-gyártás előnyei

A tradicionális fehérje-előállító módszerekkel szemben az egysejt-fehérje termelés a következő előnyökkel rendelkezik:

- A mikroorganizmusok nagyon erőteljesen növekednek, és nagy hozammal gyarapodnak. (100 kg élesztő 500 tonna fehérjét termel 24 óra alatt, míg egy 500 kilós fiatal marha ennyi idő alatt csupán fél kg fehérjét képes szintetizálni – 5,5-9 kg növényi fehérje elfogyasztása után. Hasonlóan, a mesterséges tóban élő algák 50 tonnányi (száraz tömeg) fehérjét képesek termelni évente egy hektárnyi területen. Ez a hozam 10-15-ször nagyobb, mint a szójababé, és 25-50-szer nagyobb, mint a kukoricáé.)
- Nagy a fehérjetartalmuk – ld. a táblázatot
- Az egysejt-fehérjében sok esszenciális aminosav van.
- A termelt élesztő tömeg vitamintartalma is nagy.
- Nyersanyagként mezőgazdasági és ipari hulladékok és melléktermékek is hasznosíthatók a mikrobák számára.
- A magas hozamú, jó összetételű törzseket kiválaszthatjuk, és relatíve könnyen szaporíthatjuk.
- A biomassza-gyártás független az évszakoktól és az időjárástól.

Az SCP-gyártás hátrányai

- A sejtfalak anyagai nem, vagy csak nehezen emészthetők. Ez egyrészt veszteség, másrészt ezek a makromolekulák allergiás reakciókat okozhatnak.

2.1.3. Az SCP és termelő mikrobák tulajdonságai

Ha a biomasszát más fehérjék helyettesítésére akarjuk használni, akkor az első megvizsgálendő kérdés az, hogy összetételükben, tulajdonságaikban mennyire hasonlók.

Általánosságban a mikrobiális biomassza 45-55 % fehérjét tartalmaz, habár néhány baktérium proteintartalma akár 80% is lehet. A biomassza egyéb esszenciális tápanyagokat is tartalmaz, így ideális kiegészítés a hagyományos tápanyagok mellett vagy helyett.

%	élesztő	metanol-baktérium	tisztított fehérje	gombák	algák	szójaliszt	tejpor
fehérje	60.0	83.0	80.0	42.0	70.0	45.0	34.0
aminosavak	54.0	65.0				40.0	
zsírok	9.0	7.4	8.0	13.0	5.0	1.8	1.0
nukleinsavak	5.0	15.0	1.0	9.7	4.0		
ásványi sók	6.0	8.6	8.0	6.6	7.0	6.0	8.0
nedvességtartalom	4.5	2.8	4.0	13.0	6.0	12.0	5.0

1. táblázat Különböző fehérjeforrások összetétele

Az 1. táblázat jobb oldalán látható a klasszikus teljes értékű fehérje források összetétele. Ehhez képest az egysejtű biomasszák fehérjetartalma jóval nagyobb. Az aminosav tartalom sor az összes fehérjéből emésztéssel felszabadítható mennyiséget jelenti. Az összes fehérje tartalomnak csak 80-90%-a hasznosul az enzimes bontás után, a többi a nehezen bontható frakciókban (pl. sejtfal) található. Az összetétel 100%-ához hiányzó anyagmennyiség a nem mért

szénhidrát tartalomnak tudható be. A „tisztított fehérje” a metanol hasznosító baktérium biomassájából kinyert, nukleinsav-mentesített preparátumot jelenti. A hagyományos fehérje források nukleinsav tartalma gyakorlatilag nulla, míg a mikrobáké, különösen a baktériumoké jelentős. Ez azért hátrányos, mivel a szervezetben a nukleinsavak, pontosabban a purinvázis nukleotidok húgysavvá bomlanak le. 1 g RNS-ből 100-150 mg húgysav képződik. Ennek pedig rossz az oldhatósága, hajlamos kristályos formában kiválni. Megjelenhet vesekő formájában, de kirakódhat az ízületi felszínre is, ami fájdalmas gyulladást okoz (köszvény). A zsírtartalom összehasonlítása nem releváns, mert a szójadara és a tejpor olaj/zsírtartalmát előzetesen kivonják, szójaolaj illetve vaj formájában élelmiszerként hasznosítják.

Az összetételen túl más praktikus szempontok is befolyásolják, hogy melyik mikroorganizmust választják ki a technológiához.

A **baktériumokra** gyakran magas fehérjetartalom jellemző és nagy a növekedési sebességük, de emellett hátrányos tulajdonságaik is vannak:

- A sejtek kis méretűek és kis sűrűségűek, ami nehezíti és költségessé teszi a szaporító közegtől való elválasztást.
- nukleinsav tartalmuk magas a gombákhoz és élesztőkhöz képest. A nukleinsav mennyiségének csökkentésére további lépéseket kell bevezetni az eljárás során, ezzel emelkednek a költségek.
- Az általános közvélekedés szerint minden baktérium káros és betegségeket okoz. Széleskörű tájékoztató programok kellenének, hogy ezt a félreértést megszüntessük, és a társadalom elfogadja a bakteriális fehérjéket is.

Az **élesztők** előnyeit jelentik a nagyobb sejtméret (könnyebb elválasztás), alacsonyabb nukleinsav-tartalom, magas lizin-tartalom és a savas pH-n való szaporítás lehetősége. Ám a legfőbb előny mégiscsak a társadalom felőli bizalom, elfogadás a tradicionális erjesztési eljárások és a sok éves történelem miatt. Hátrányt jelent a lassabb növekedés, az alacsonyabb fehérjetartalom, és az, hogy a baktériumoknál kevesebb metionint tartalmaznak.

A **fonalas gombák** előnye az egyszerű elválasztásuk, de lassabban növekednek, alacsonyabb a fehérjetartalmuk és a társadalmi elfogadottságuk. Az **algáknál** hátrány, hogy a sejtfa-lukban lévő cellulózt az ember nem képes megemészteni, valamint hajlamosak a nehézfémek felhalmozására.

A törzs kiválasztásában nem elhanyagolható szempont, hogy milyen **szubsztrátok hasznosítására** képes. Mivel az egysejt-fehérje termelésénél a költségek nagy hányadát a szubsztrát költsége teszi ki, a választás is aszerint történik, hogy melyik, olcsón rendelkezésre álló szénforrást melyik mikroba képes gazdaságosan hasznosítani. Mik lehetnek ezek az olcsó szénforrások? A legolcsóbb a légköri szén-dioxid, valamint az ipari és mezőgazdasági melléktermékek és hulladékok.

	Mikroorganizmus	Nyersanyag
Baktériumok	<i>Hydrogenomonas, Cellulomonas, Pseudomonas, Methylomonas, stb.</i>	kőolajipar szénhidrogén maradékai, metanol
Élesztők	<i>Candida sp, Saccharomyces fragilis, Torula sp, Rhodoturula spp.</i>	Savó, etil-alkohol, keményítő, n-paraffinok, szulfid, stb.
Penészek	<i>Aspergillus terreus, Trichoderma reesei, Penicillium spp.</i>	Papírcellulóz, keményítő, szalma, cukornád bagassz/répaszelet, stb.
Algák	<i>Scenedesmus sp, Spirulina, Chlorella</i>	légköri szén-dioxid

2. táblázat A különböző szubsztrátokon szaporítható mikroorganizmusok

A mikrobatorzs kiválasztásában a következő tényezőket kell figyelembe venni:

- milyen szubsztrátot igényel szén- és nitrogénforrásként, illetve milyen kiegészítő tápanyagok szükségesek
- nagy fajlagos növekedési sebesség, termelékenység és hozam egy adott szubsztrát esetén
- pH- és hőmérséklettűrés
- levegőztetési igény, habzási jellemzők
- növekedés morfológiája a reaktorban
- biztonság és elfogadottság – nem patogén, nem termel toxinokat
- könnyű elválaszthatóság
- a termék fehérje, RNS és tápanyag-tartalma. A baktériumok az élesztőknél és gombáknál több és értékeesebb fehérjét termelnek. Azonban a magasabb protein-szintekhez több nemkívánatos RNS is tartozik.
- a végtermék szerkezeti tulajdonságai
- általánosságban a baktériumok gyorsabban és magasabb hőmérsékleten növekednek, mint a gombák, így kevesebb hűtésre van szükség.
- A bakteriális és élesztő fermentációk levegőztetése egyszerűbb.
- A gombákkal összevetve, amelyek szűréssel könnyen elválaszthatók, a baktériumok és élesztők esetében ülepítési technikák és centrifugálás szükséges.
- Az SCP-gyártásban alkalmazott mikroorganizmusoknak biztonságosnak és élelmiszeripari használatra elfogadottnak kell lennie. A szervezeteknek genetikailag stabilnak kell lenniük, hogy az optimális biokémiai és fiziológiai tulajdonságú törzsek a folyamat során több száz generáción keresztül fenntarthatók legyenek.

2.1.4. Az SCP-gyártási technológia

Sejtszaporítás a felsorolt alapanyagokon, aerob fermentációval történik. A gyártás gazdaságossága a minél nagyobb, több száz, vagy akár több ezer köbméteres fermentorok alkalmazását indokolja. Ezekben intenzív levegőztetéssel nagy oxigénbevittelt kell biztosítani, ami elősegíti a mikroba légzését. Ez viszont több metabolikus hőt termel, aminek elvezetéséhez pedig hatékony, nagy felületű hűtőrendszer szükséges. A produktivitás maximálásához folytonos fermentációt célszerű alkalmazni. Ennél viszont a kilépő fermentlében viszonylag alacsony a biomassza koncentráció, ez a feldolgozás költségeit növeli. A különböző eljárásokhoz különböző fermentor konstrukciók szükségesek, figyelembe véve a kérdéses folyamat által támasztott igényeket.

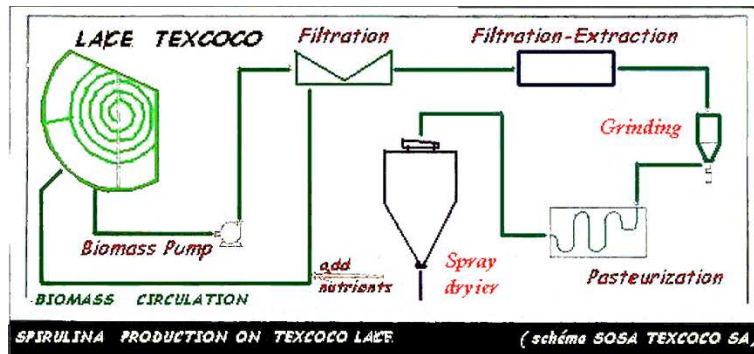
A sejtek kinyerésére változatos műveleteket alkalmaznak, így növekvő költség szerint rendezve: ülepítés, flotálás, kicsapás, szűrés, membránszűrés és legdrágább a centrifugálás. Ha a terméket nem használják fel azonnal, helyben, akkor a tárolhatóság, szállíthatóság érdekében szárítják, esetleg savanyítják, ami további költségekkel jár.

2.1.4.1. *SCP termelés CO₂-on*

A létező legolcsóbb szénforrás a levegő szén-dioxid tartalma. Ennek hasznosításához azonban energia szükséges, ezt a fotoautotróf szervezetek a szintén ingyenes napfényből biztosítják. Fotoszintézisre egysejtű szervezetek, a kékbaktériumok és a zöldalgák is képesek, ezekre több egysejt-fehérje előállítási technológia épül.

Spirulina – Arthrospira fajok

A kékbaktériumok (*Cyanobacteria*) közé tartozó *Spirulina* (más néven *Arthrospira*) fajokat már a mai Mexikó területén élő aztékok is fogyasztották. A Texcoco tó vizéből szűrték ki



13. ábra A Texcoco tóra épülő technológia

a láncokat formázó sejteket. Ettől teljesen függetlenül Afrikában, a Csád tó mellett élő kanembu törzs is fogyasztotta, sőt piacra is vitték a szárított algalepényeket. Iparszerűen az 1970-es évektől foglalkozik vele a Sosa Texcoco vállalat. A tenyésztés szabad téren, mintegy 10 hektáron elhelyezkedő sekély tavakban történik. A mélységük kb. 60 cm, a napfény körülbelül ilyen mélységig hatol be a vízbe. A bikarbonátban gazdag víz (pH~8,5) a légkörből tud felvenni további szén-dioxidot és oxigént. Nitrogénforrásként nitrát sókat is adnak a vízhez. A terméket félfolytonos üzemben lefejtik, szűrés és pasztörizálás után porlasztva szárítják. Annak dacára, hogy a prokariótáknak nincs zöld szintestük, termék mégis sötétzöld színű.

A technológia elsősorban a napfényes, meleg éghajlatú országokban terjedt el, jelenleg 22 országban foglalkoznak vele Hawaiiától Indiáig. Európában egyedül Görögországban próbálkoznak vele.



14. ábra Étkezési Spirulina termékek

Valódi zöldalgák

A zöldalgák között számos olyan faj található, amelyik szuszpenzióban magányosan vagy néhány sejtből álló csoportokban növekszik (*Chlorella*, *Scenedesmus*). A fotoszintézisen alapuló szaporítást az előzőekhez hasonlóan szabad téren, sekély (20-50 cm mély) beton vagy műanyag lagúnákban, csatornáknak végzik. Nitrogénforrásként szervesetlen sókat alkalmaznak. A folyadékon időnként levegőt fúvatnak át, inkább az ülepedés meggátlása, mint a gázcsere érdekében. Folytonos betáplálást és elvételt alkalmaznak. Veszélyt jelenthet a baktériumok

megjelenése. Az algák és a baktériumok hajlamosan szimbiózisba lépni (az algák oxigént termelnek és szén-dioxidot fogyasztanak, a baktériumok éppen fordítva). A vegyes biomassa tulajdonságai már nem olyan kedvezőek, ezért a vegyes populáció tenyésztése nem előnyös.

Az algák fehérjetartalma 40-50%, nukleinsav tartalma kicsi, mindössze 4-6%. A biomassa kinyerésére nem alkalmaznak centrifugálást, mert az túl drága művelet, hanem méz-tejjel kicsapják az algákat.

A tenyésztéssel csak a napfényes országokban érdemes foglalkozni (Izrael, Florida). A telep kialakítása elég nagy beruházást igényel, ami csak nehezen térül vissza. Az előállítási költség: 4-10 USD/kg között mozog, míg a szójadara csak 3 USD/kg. Tehát takarmányozási célra nem gazdaságos, élelmiszerként viszont az lehet.

Átmenetet jelent a következő fejezethez (ahol a szénhidrát szénforrásokat vizsgáljuk) a *Chlorella* alga heterotróf tenyésztése. Japánban az algát aszeptikusan, zárt fermentorban, melasz szénforráson szaporítják. Az így kapott alga tömeget a japán konyha speciális élelmiszer adalékként használja. Az éves termelés ~3.000 t/év, az előállítási költsége: 10-15 USD/kg.

2.1.4.2. Egysejt-fehérje szénhidrátokon

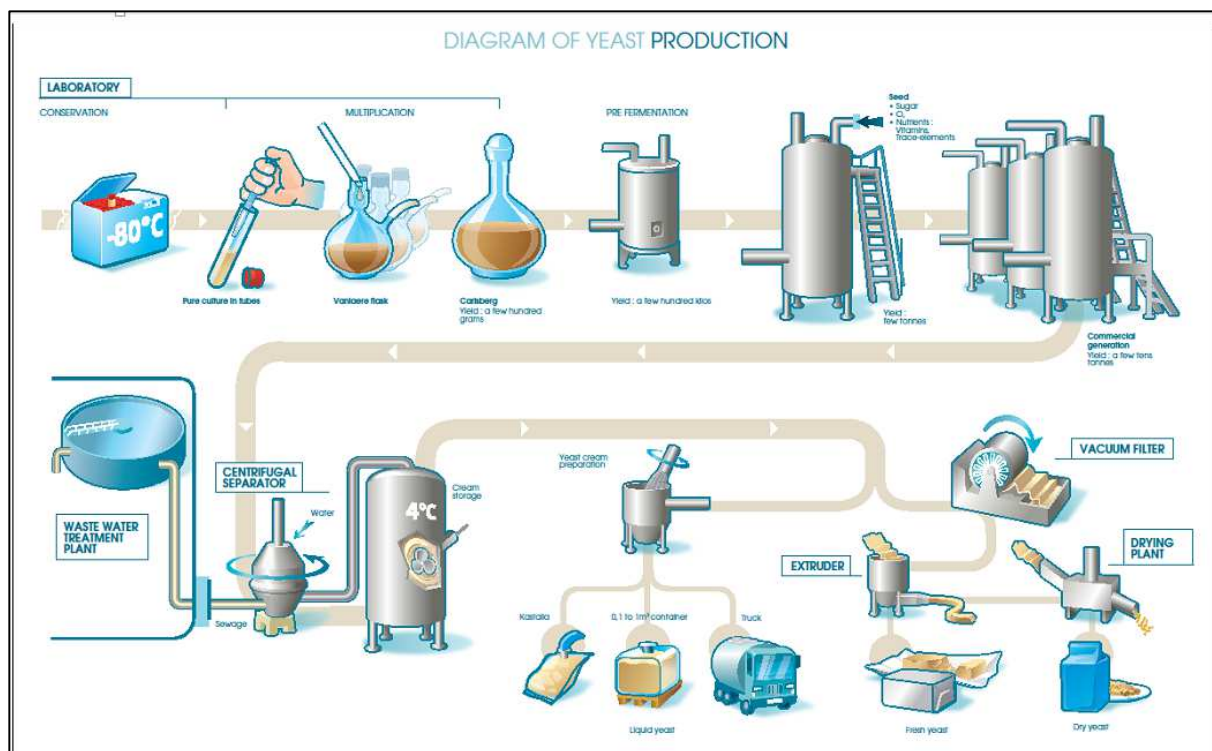
Az egysejt-fehérje előállításához ugyanazok a számításba jöhető szénhidrátok, mint a fermentációs ipar egyéb területein. Egyedül az ár a kritikus tényező, a más területen megszokott glükóz, izocukor, (tiszt) szacharóz itt drágának számít, csak akkor jöhet számításba, ha a biomasszát élelmiszerként és nem takarmányként lehet eladni.

Célszerű megkülönböztetni a könnyen metabolizálható cukorforrásokat (melasz, tejsavó, szulfit szennylég, gyümölcs feldolgozási maradékok), és a nehezen bontható összetett szénhidrátokat (keményítő maradékok, cellulóz).

Élesztőszaporítás melaszon

Jellemzően ezen szénforráson termelik a pékélesztőt, ami az egyik legnagyobb mennyiségben gyártott biomassa termék. A melasz a cukorgyártás mellékterméke (anyalúgja), ami 40-45% cukrot, túlnyomórészt nem-kristályosítható szacharózt tartalmaz. A melaszt eredeti töménységében nagyon nehéz sterilizálni, mert védőközeget jelent a benne lévő mikrobák számára, ezért hígítás (4-6%-ra) után sterilizálják, és kiegészítik szervesetlen sókkal. Az élesztők közül a *Saccharomyces cerevisiae* mellett a *Candida utilis*-t tenyésztik, jellemzően folytonos fermentációban, $D=0,2-0,3 \text{ h}^{-1}$ hígítási sebességgel. Intenzív levegőztetésre van szükség ahhoz, hogy az teljesen eloxidálja a cukrot szén-dioxiddá és vízzé és ne termelődjön alkohol. A sejteket szeparátor centrifugával besűrítik (élesztőtej) majd a felhasználásnak megfelelően dolgozzák fel. A sütőélesztőben meg kell őrizni az enzimaktivitásokat, ezért a vizet préseléssel vagy kíméletes szárítással távolítják el.

A takarmányélesztőnél ez nem szempont, a denaturált fehérjék is megfelelőek az állatok számára. Az élesztő emberi fogyasztása manapság nem jellemző, a második világháború alatt viszont nagy mennyiségben termelték az élelmiszerhiány enyhítésére mind Németországban, mind a Szovjetunióban.



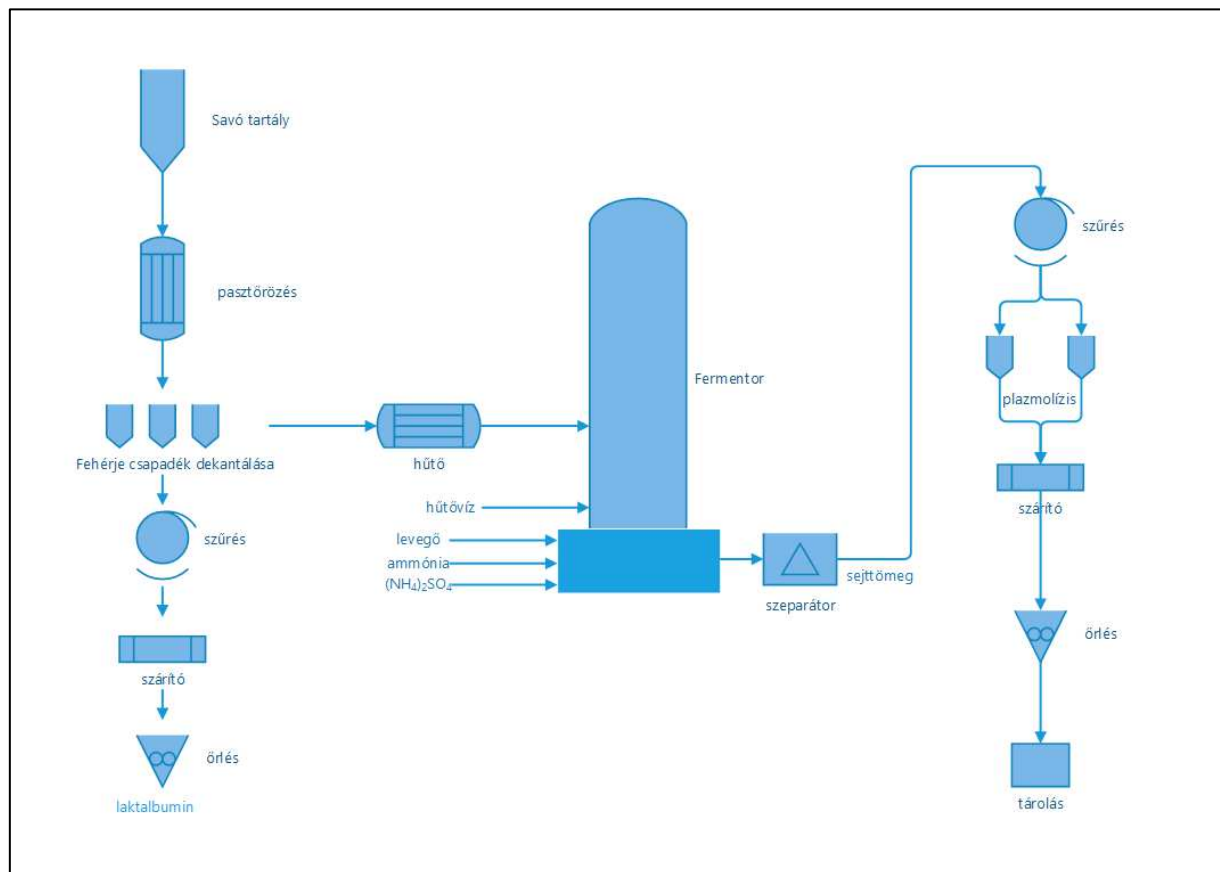
15. ábra Az élesztőgyártás teljes folyamata

Élesztőszaporítás laktózon (sajtgyári savón)

A sajtgyártás mellékterméke, a savó kb. 5% tejcukrot kb. 1% fehérjét és oldott ásványi anyagokat tartalmaz. A gyártás során nagy mennyiségben keletkezik, a sajt tömegének többszöröse. Ha ezt szennyvízként tekintjük, a $\text{BOI} = 70.000 \text{ mg O}_2/\text{l}$, ami igen nagy szerves anyag terhelést jelentene. Valamilyen ártalmatlanítási/hasznosítási módot mindenképpen találni kell. Kis szárazanyag tartalma miatt elszállítani gazdaságtalan, helyben érdemes megoldást találni. A fehérje tartalmat érdemes elkülöníteni és hasznosítani (főzéssel kicsapható, vagy ultraszűréssel betöményíthető), ez tápszerekben, élelmiszeripari adalékként felhasználható. A laktózt a legtöbb mikroorganizmus nem képes szénhidrátforrásként felhasználni, csak egyes élesztők képesek β -galaktozidáz termelésére:

- *Saccharomyces lactis*,
- *Candida utilis*,
- *Saccharomyces fragilis*,
- *Kluyveromyces lactis*
- *Kluyveromyces marxianus* (a törzsek nevét többször megváltoztatták)

Ennek jellegzetes példája a BEL Fromageries (francia tejipari cég) eljárása. *Kluyveromyces marxianus* törzset szaporítottak tejsavón, amiben az 5% laktóz mellett jelen volt 0,8% protein (nem választották el) és 0,2-0,6% tejsav is. A biomassa termeléshez intenzív levegőztetés szükséges, ezt keverő nélkül, air lift fermentorban oldották meg. A takarmányozási célú biomassa mellett az ásványi anyagok és a tejsav is megmaradhatnak. Az élelmiszer minőségű sejttömegnél viszont nem, a sejteket lecentrifugálják, az oldott anyagokat mosással eltávolítják, és a terméket szárítják. A sejthozam 0,45-0,55 g/g, az elfogyasztott laktózra vonatkoztatva.



16. ábra BEL Fromagerie eljárás

Szulfid szennylég, mint szénforrás

A szulfid szennylég a cellulóz/papíripar mellékterméke. A faanyagot a kalcium-hidrogén-szulfittal, kén-dioxid feleslegben főzve a lignin lignoszulfosavvá alakul és feloldódik, a cellulóz szálak kiszabadulnak, ezeket használják papírgyártásra. Eközben a hemicellulóz részben monoszacharidokká hidrolizál, amit egyes mikroorganizmusok képesek hasznosítani. A szabad cukrok összetétele, és mennyisége (2-7 %) az alapanyag és a főzési eljárás típusával változik, rendszerint nagyrészt pentózokat tartalmaz. Ez a cukortartalmú lé a szulfid szennylég. Szennyvízként ez nagyon környezetterhelő, a BOI 50.000 mg O₂/l körül van, célszerű helyben ártalmatlanítani/hasznosítani. Svédországban 1909 óta fermentációs alapanyagként használják. A második világháború idején az élelmiszerhiány enyhítésére az így termelt élesztőt emberi fogyasztásra is felhasználták. Elsőként *Saccharomyces cerevisiae*-t szaporítottak, de ez a törzs rosszul hasznosítja a pentózokat. Később áttértek a *Candida tropicalis* és *Candida utilis* törzsekre, amelyek az ötszénatomos cukrokat is jól metabolizálják.

Candida utilis törzsszel Csehországban is építettek egy nagy, 25.000 t SCP/év kapacitású üzem a szulfid lúg hasznosítására.

Finn szakemberek fejlesztették ki a finn fafeldolgozó iparra alapozva a Pekilo-eljárást, amelyben szulfid lúg szubsztráton tenyésztik az erre a célra szelektált *Paecilomyces varioti* törzset. A pentózokat a gomba nagy fehérjetartalmú sejttömeggé alakítja. Egy nagy, 360 m³-es keverős, levegőztetett fermentort működtettek folytonos üzemben, D = 0.2 h⁻¹ hígítási sebességgel. Ezzel évi 10.000 tonna biomasszát kaptak, aminek fehérjetartalma 55-60%. A fonalas gomba elválasztása a fermentlétől egyszerűbb, mint az élesztőké, mert nem kell centrifugálni, szűréssel is kinyerhető. A biomasszát Finnországban élelmiszerként engedélyezték.

Keveset tudunk a szovjet/orusz fermentációs technológiákról. Annyi bizonyos, hogy minden papír/cellulóz gyárhoz építettek egy SCP üzemet (kb. 30 db), amelyben *Candida* élesztőt szaporítottak takarmányozási célra. Az 1985-ös évben összesen kb. egy millió tonna terméket jelent.

Glükóz szénforrás

A glükóz túlságosan drága alapanyag a takarmánycélú egysejt-fehérje gyártásához. De ha humán étkezési célra termelik, akkor a magasabb eladási ár elbírja a nagyobb költségeket. Ez mutatkozik meg a Rank Hovis McDougall (RHM) Mycoprotein húshelyettesítő készítményénél. Az igény az Angliában élő, százazrekben mérhető vegetáriánus, elsősorban indiai populáció részéről merült fel. Számukra fejlesztették ki ezt húshoz hasonlóan rostos szerkezetű, nagy fehérjetartalmú készítményt. A rostos jelleghez inkább micélium szükséges, ezért ebben az esetben nem egy élesztőt, hanem fonalas gombát választottak. Az RHM mintegy 3000 törzset vizsgált meg, ezek közül bizonyult a legjobbnak a *Fusarium venenatum* (eredetileg *F. graminearum*) faj.

Adalék: a törzseket nagyon sok helyről begyűjtött talajmintákból izolálták. A „nyertes” törzs végül is egy Buckinghamshire-i kertből származott, ami mindössze négy kilométerre volt az RHM központi laboratóriumától.

A tápoldat élelmiszer minőségű glükóz szirupot, szervesetlen sókat és biotint tartalmaz. A fermentáció során a pH-t ammónia gáz (N-forrás is) adagolásával (a levegőztető rendszeren keresztül) 6-os értéken tartják. A fermentációt magas (kb. 40 m) air lift fermentorokban, folytonos üzemben ($D=0,2 \text{ h}^{-1}$) végzik. Állandósult állapotban 15-20 g/l sejt koncentrációt lehet elérni. A folytonos fermentációt 5-6 hétig tartják fenn, azután két hét tisztítási, karbantartási szünet következik.

A feldolgozás során egy hidrociklonos elősűrítés után az RNS tartalom csökkentésére hőkezelést iktatnak be. A levét 30 percig 64°C -on tartják, ezalatt a sejtek saját hőstabil RNÁ-ja lebontja a ribonukleinsavakat, az RNS-koncentráció 80 mg/g-ról 2 mg/g-ra csökkenthető. A keletkezett mononukleotidok kiáramlanak a sejtekből, a makromolekulák viszont bent maradnak. Ugyanakkor a sejtek proteázai inaktiválódnak, a fehérjetartalom nem bomlik, ezáltal stabilizálódik a termék. Ezután a micéliumot szűrőcentrifugával leválasztják, egy tésztaszerű masszát kapnak, amelyben a szárazanyag fehérjetartalma 45%. Ezt tojásfehérjével dolgozzák össze, ami „összeragasztja” a fonalakat és ezáltal javítja a textúrát. Az anyagot kb. 30 percig gőzben főzik, a kicsapódó, denaturálódó fehérjék megszilárdulnak. A lehűtés után ugyanúgy szeletelik, kockázzák vagy darálják, mint a húsokat. Záró lépésként megfagyasztják, a kialakuló jégkristályok alakítják ki a végső struktúrát.



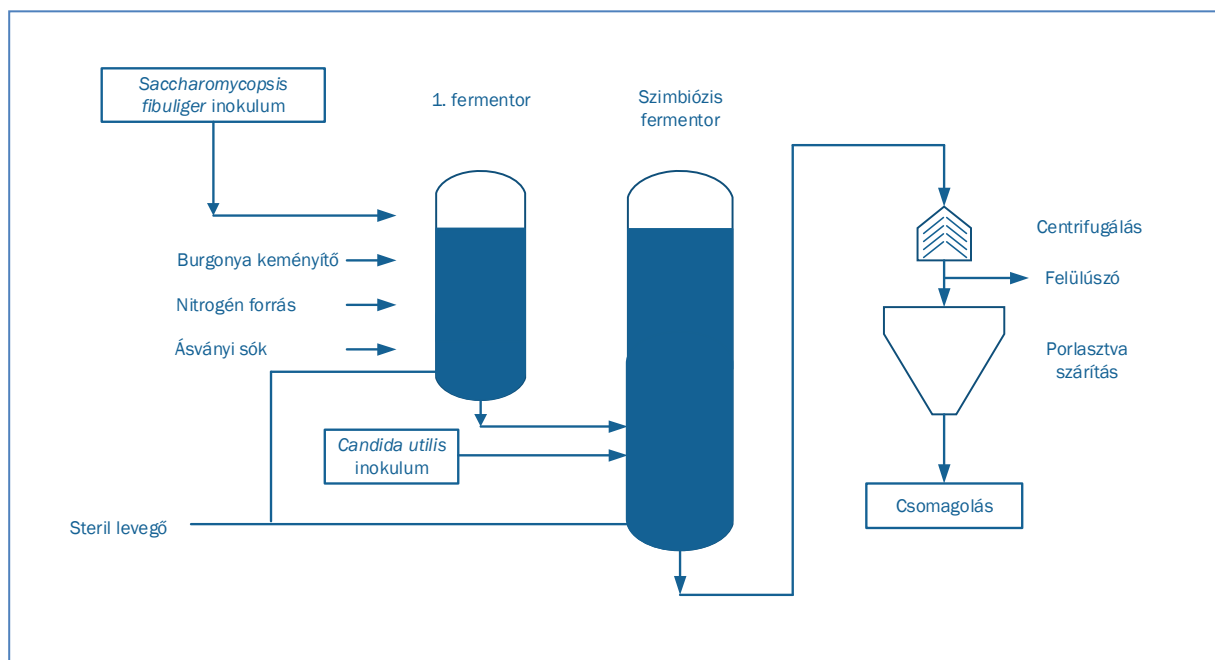
17. ábra Étkezési Quorn termékek

Sokféle félkész és késztermék termék formájában emberi fogyasztásra szánt húshelyettesítőkként Quorn néven hozzák forgalomba. A teljesen vegá étrenden élőknek kifejlesztettek egy tojásmentes változatot is, ebben egy burgonya frakció a ragasztó.

Külön történet az élelmiszerként való engedélyeztetés. Amikor belekezdtek a projektbe, még nem volt meg az engedélyezési protokoll, nem volt olyan hivatalos szerv, aminek a jogkörébe tartozott volna az engedélyezés. Ezek miatt 10 évbe telt procedúra, laboratóriumi, állati és klinikai vizsgálatok sorát végezték el, mire kiadták az engedélyt. A Quorn termékeket azóta is sokan támadják, de ez elsősorban piaci konkurenciaharc.

Keményítő szénforrás

Svédországban fejlesztették ki a Symba eljárást, amelyben burgonyakeményítóből két lépésben SCP-t állítanak elő. A tiszta, élelmiszer minőségű keményítő ennél az eljárásnál is túlságosan drága szubsztrát lenne, ezért a burgonya feldolgozás során keletkező hulladékokat (héj, nyesedék, mosóvíz) használják fel.



18. ábra Symba eljárás

A folyamat két olyan élesztőtörzs felhasználásával megy végbe, amelyek képesek szimbiózisban együtt élni. A *Saccharomycopsis fibuliger* (más néven: *Endomyces fibuliger*, *Endomycopsis fibuliger*) amiláz enzimet termel, ami cukrokká bontja a keményítőt, ezzel pedig lehetővé teszi a gyorsabban, jobb hozammal növekedő *Candida utilis* szaporodását is. Az első lépésben egyedül a *S. fibuliger*-t szaporítják, egy kisebb térfogatú reaktorban, sterilizált burgonyahulladékon, amit nitrogén és foszfor forrásként szervesen sókkal egészítenek ki. A részben elcukrosított szénhidrátot tartalmazó tenyészetet szivattyúzzák át a nagyobb, 300 m³-es második fermentorba. Itt oltják rá a *C. utilis* inokulumot, a két törzs kevert kultúrában növekszik tovább. Ez a folyamat „egyidejű elcukrosítás és fermentáció”-ként (SSF = simultaneous saccharification and fermentation) ismert. A *Candida* fokozatosan túlnövi az eredetileg nagyobb sejtszámú *Saccharomycopsis*-t, a tíznapos fermentáció végére a sejtömegnek már 90%-a *Candida*. A feldolgozás során szeparátor centrifugával elválasztják a biomasszát, majd szárítással konzerválják. A termék fehérjetartalma 45%, állati takarmányozásra használható.

Cellulóz, lignocellulóz

A bioszférában évről évre hatalmas mennyiségű cellulóz keletkezik. A természetben, a mezőgazdaságban és az erdőgazdálkodásban keletkező cellulóz a legnagyobb tömegű biomassza, sokszorosan meghaladja a keményítő mennyiségét.

A növényi anyagokból és fahulladékból származó cellulóz bősége miatt az egysejt-fehérje-előállításához vonzó alapanyagot jelent. A cellulóz hidrolízis után megfelelő szubsztrát lenne az SCP termeléshez, de a természetben általában ligninnel, hemicellulózzal, kombinálva képződik. A lignocellulóz szerkezetű anyag felhasználásához általában előkezelés szükséges. Ez lehet lúgos, vagy savas kezelés vagy gőzrobbantás is. Ezek költsége az intenzív fejlesztési munka ellenére is gazdaságtalanná teszi a hasznosítást.

Adalék: Jelenleg a lignocellulóz hulladékok egyetlen gazdaságos hasznosítása a gombatermesztés. A közismert csiperke (Agaricus bisporus) mellett nagy mennyiségben természetnek szii-takét (Lentinus edodes) és más ázsiai gombákat.

Ha a kinyert cellulózt szubsztrátként kívánják használni, azt kémiai- (savas hidrolízis) vagy enzimatis uton (cellulázok) még le kell bontani fermentálható cukrokká. Ma már az extracelluláris enzimekkel fermentációval előállított cellulázokat ipari méretben is gyártják.

A celluláz teljes bontásához legalább három enzim (endocelluláz, cellobiohidroláz, cellobiáz) együttes működésére van szükség.

Endo- β 1,4-glükánáz (endocelluláz, Cx enzim): ennek hatására az oldható cellulózból cellobióz és oligomerek keletkeznek.

Exo- β 1,4-glükánáz (cellobiohidroláz, C1 enzim): kristályos cellulózból a láncvégekről a C1 enzim cellobiózt hasít le.

β -1,4-glükózidáz (cellobiáz): a cellobiózt két glükózzá hidrolizálja.

Számos hatékony celluláz termelő törzset találtak, de a *Trichoderma viride* hosszabb ideje az általánosan használt enzimtermelő mikroorganizmus. A *Chaetomium cellulolyticum* egy másik hatékony cellulózbontó gomba, amely cellulóz szubsztráton gyorsabban növekszik, és 80%-kal több biomassza fehérjét képez, mint a *Trichoderma*, de a kinyerhető enzim mennyisége jóval kevesebb. Ez azt jelenti, hogy a *C. cellulolyticum* elsősorban SCP-termelésre alkalmas, míg a *T. viride* a cellulázok gyártásában használható.

A tiszta cellulóz bontása (pl. hulladék papír) enzimes bontása megoldható, de a valós, mezőgazdasági eredetű komplex alapanyagok gazdaságos hasznosítása még nem megoldott.

Számos helyen foglalkoznak a cellulóz tartalmú szilárd hulladékok átalakításával is. Ennek a technikának a rövidítése is SSF (solid state fermentation). Az alapanyagot (pl. szalma) silókban vagy nagyméretű zsákokban benedvesítik az inokulumot és a tápanyagokat (pl. ammónium sók) tartalmazó folyadékkal. A levegő hozzáférését biztosítják, és a gombafonalak néhány hét alatt átszövik a rostos anyagot. A kapott termékben a biomassza mellett jelentős a maradék növényi anyag mennyisége, de ez takarmányozási szempontból nem hátrány. *Trichoderma* törzsszel a szalma alapon fermentált takarmány adalék fehérjetartalma eléri a 15%-ot.

2.1.4.3. Egysejt-fehérje termelés kőolajszármazékokon

n-Alkánok

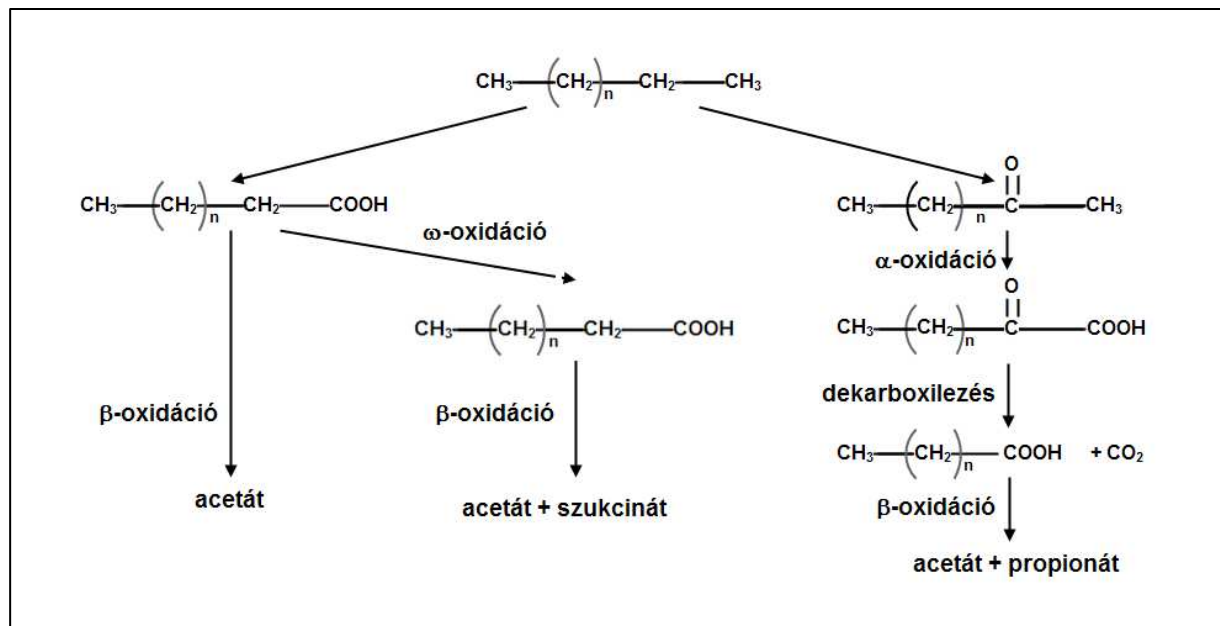
Az SCP-termelés szempontjából felmerült az élelmezési célra alkalmatlan anyagok közül a kőolajnak vagy származékainak átalakítása biomasszává. A második világháborútól az olajválságig terjedő évtizedekben a kőolaj ára nagyon alacsony volt, ami vonzóvá tette, mint fermentációs szubsztrátot, és nem csak az egysejt-fehérje gyártásánál. A nyersolaj feldolgozásánál a hosszabb láncú alkánokra (C₁₀-C₁₇ frakció, 10-20%) kisebb az igény (pl. kenőolajok, zsírok). A megmaradó paraffin vagy viasz frakciót vagy kisebb molekulákra tördelik (krakkolják), vagy a pakurával együtt elégetik. Így merült fel a biológiai hasznosítás lehetősége. Az első probléma, amivel szembe kellett nézni, az volt, hogy a mikrobák csak az egyenes szénláncú alkánokat

tudták hasznosítani, az elágazó láncokat nem, így ezek megmaradtak és szennyezték a terméket. A normál-frakció elválasztását molekulaszűrőkkel oldották meg, de még így is maradtak szennyezések, amelyek kellemetlen mellékízt okoztak és fennállt a karcinogén vegyületek (különösen a benzpirén származékok) veszélye is.

Elsőként tekintsük át, hogyan képesek a mikroorganizmusok az alkánokat hasznosítani. A szénhidrogének nem szokványos vegyületek a természetben, mégis számos törzsben előfordulnak olyan enzimrendszerek, amelyek képesek ezeket hasznosítani. A kulcslépés az első, oxidációs reakció, amelyben az addig kevésbé reakcióképes (paraffin = parum affinis) molekulába az első oxigén atomot beviszik. A továbbiakban a reakciósor becsatlakozik a zsírsav lebontás folyamatába. A támadáspont szerint két mechanizmust különböztethetünk meg. A terminális oxidációnál a láncvégi szénatomon, a szubterminális oxidációnál a másodikon indul reakció.

A terminális oxidációnál elsőként hidroxil csoport alakul ki, majd ezt az alkohol-dehidrogenáz és az aldehyd-oxidáz karbonsavvá oxidálja. Az így kapott zsírsav azután a β -oxidáció folyamatában acetyl-CoA-vá alakulva belép az anyagcserébe. A hosszú szénláncú alkánok esetében előfordulhat, hogy a folyamat mind a két láncvégen elindul (ω -oxidáció) és így dikarbonsav keletkezik. Ekkor a reakciósor végén szukcinát marad, ami a citrátkör természetes eleme.

A szubterminális oxidáció a második szénatomon (szekunder) alkohol létrejöttével kezdődik. Ez aztán ketocsoporttá oxidálódik. A láncvégi metil csoport ettől könnyebben támadhatóvá válik, további oxigén bevitelével α -keto-karbonsav alakul ki. Ez dekarboxileződik, széndioxid lép ki (analógia: a piruvát dekarboxilezése). Az így kapott zsírsav a β -oxidációban hasznosul.



19. ábra Az alkánok biológiai lebontási útvonalai

Mivel a kőolajban páros és páratlan szénatomszámú molekulák egyaránt előfordulnak, mindkét reakciósor végén a zsírsav lebontásnál előfordulhat, hogy legvégül három szénatomos propionil-CoA marad. Ez a biokémiában szokatlan ugyan, de a legtöbb sejt képes hasznosítani.

Az első alkán alapú SCP fermentációs eljárást a British Petroleum (BP) fejlesztette ki Franciaországban. Két élesztőtörzset, a *Yarrowia lipolytica*-t (régebben: *Candida lipolytica*) és a *C. tropicalis*-t találták alkalmasnak a gyártásra.

A fermentációs technológia kialakítása során különleges problémát jelentett, hogy négyfázisú rendszerben kellett dolgozni. A szokásos fermentáló-sejt-levegőbuborék hármas mellett jelen van a vízzel nem elegyedő olaj fázis is. A sejtek a vizes fázison keresztül érintkeznek a szén- és oxigénforrással, ez két elkülönült anyagtranszportot jelent. Mindkettőnél az a cél, hogy

az anyagátadás sebessége nagyobb legyen, mint a mikroba anyagcseréjének sebessége, így a sejtnövekedés ne kerüljön limitált állapotba. Ehhez viszont mindkét fázisnál nagy fajlagos felületre van szükség, azaz mind a buborékokat, mind az olajcseppeket erőteljesen diszpergálni kell. Az olajoknál valamelyes könnyebbséget jelent, hogy az olaj az élesztősejtek lipid részeiben (membránok, vakuólumok) jól oldódik, ezek mintegy kivonják, extrahálják az apoláris molekulákat a körülvevő vizes fázisból. A finom olajemulzió kialakításához felületaktív, emulzióképző és stabilizáló anyagokra is szükség van. Szerencsére maguk az élesztők is termelnek valamennyi detergens jellegű vegyületet, ezzel csökkenthető a vegyszerigény. Az olajfázis akkor hasznosul jól, ha a cseppek mérete nagyságrenddel kisebb (0,01-0,5 μm), mint a sejteké (5-10 μm).

Mivel a szubsztrát molekulában nincs oxigén, mint a szénhidrátokban, a tenyészeteknek nagyon sok oxigénre van szüksége. Az n-hexadékanon szaporított aerob mikroorganizmus egysejnyi biomasszára vonatkoztatott fajlagos oxigénigénye 2,5-szer nagyobb, mint a glükózon növekedett biomasszáé, eléri a 2,2 kg O_2 /kg biomassza értéket. Ennek biztosításához intenzív levegőztetésre van szükség. Használhatnak teljesen átkevert, turbinakeverős fermentorokat és airlift megoldásokat is. Ez utóbbiaknál magas készülékeket és túlnyomást alkalmaznak, ezzel javítják az oxigén oldhatóságát. A levegőztető rendszeren keresztül adják be a pH szabályozásához használt ammónia gázt is. Az alkánok energiataralma is jóval nagyobb, mint a szénhidrátoké, így a fermentáció hőtermelése is több. 1 kg SCP előállításához szükséges 1-1,2 kg alkán, elfogy 2,0-2,2 kg O_2 és 25-27.000 kJ hő szabadul fel. Ennek elvezetéséhez jókora felületű hőcserélőket kell beépíteni a készülékekbe.

A termelés nagy, több száz köbméteres fermentorokban folyik, általában folyamatos technológiával.

A sokkal jobb hozam előnyeit sajnos kompenzálja az, hogy a szénhidrogéneken az élesztők lassabban szaporodnak. Számszerűen:

– n-alkánál:	$\mu_{\text{max}} = 0,28$ 1/óra	$Y = 0,98$ kg/kg
– glükóznál:	$\mu_{\text{max}} = 0,62$ 1/óra	$Y = 0,51$ kg/kg

A kilépő fermentléből a sejtek kinyerésének első lépése centrifugálás, ekkor egy 15% szárazanyag-tartalmú levet kaptak, ezt azután bepárlással 25%-ig koncentrálták, végül porlasztva szárították.

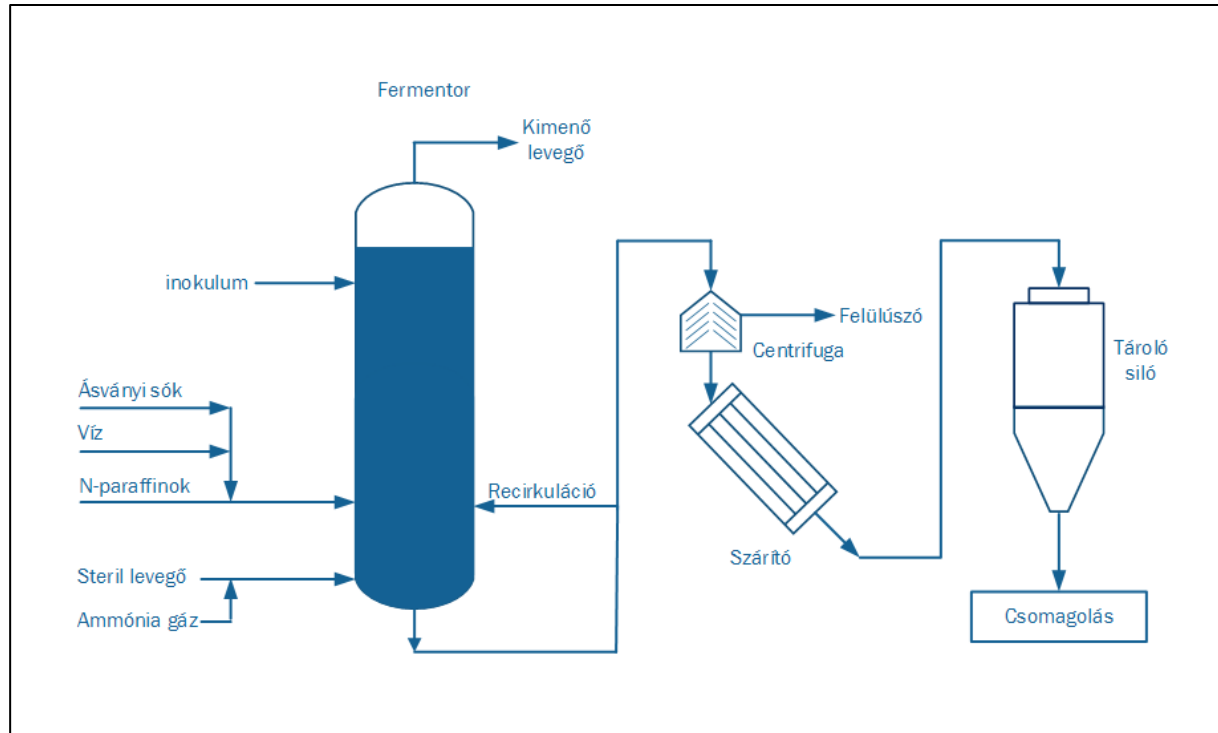
A BP által kifejlesztett terméket TOPRINA néven hozták forgalomba. Engedélyeztetése jelentősen elhúzódtott, mivel az 1960-as években még nem létezett az engedélyeztetési protokoll, és még az sem volt világos, hogy melyik intézménynek kellene ezzel foglalkozni. A Toprina-t így 12 éven keresztül vizsgálták, többek között az emészthetőségét, toxicitását és karcinogenitását. Végül takarmányadalékként engedélyezték, fehérje forrásként a halliszt, húsliszt és kazein helyettesítésére.

A BP az első, 4000 t/év kapacitású üzemet Grangemouth-ban (UK) építette fel. 1971-ben az Italproteine céggel Sarroch-ban, Szardínia szigetén építette fel SCP üzemét, amelynek kapacitása 100.000 t/év volt. 1973-ban már viszont be is kellett zárni. A kudarcnak gazdasági és társadalmi okai is voltak. Ebben az évben kezdődött az olajválság, a kőolaj árak a sokszorosukra emelkedtek, míg a szója árak éppen alacsonyok voltak. Másrészt bírálták a terméket magas nukleinsav tartalma és a gyártás környezeti ártalmai miatt.

Olaszországban, Japánban, Romániában más alkán bázisú technológiákat is kifejlesztettek, viszont mindig problémát okoztak a potenciálisan karcinogén maradékok, és a legtöbb üzem sohasem működött teljes kapacitással vagy be kellett zárni. Romániában létrehoztak egy üzemet 60.000 t/év kapacitással, de ez is csak a szocialista hiánygazdálkodás körülményei között és a saját román kőolaj termelésre alapozva tudott néhány évig működni.

Viszonylag keveset lehet tudni a szovjet/országi technológiákról. Termelési adat, hogy a szovjet időkben legalább hat üzem termelt olaj alapon kb. 100.000 t/év élesztő sejtömeget.

A fő ellenző Japán volt, az első ország, amely megtiltotta a petrolkémiai alapú fehérje gyártást. Ebben nyilván nagy szerepe volt annak, hogy Japán piaci áron kénytelen importálni teljes olajszükségletét, és arra törekednek, hogy ezt minél nagyobb hozzáadott értékű termé-



20. ábra Egysejt-fehérje gyártás n-paraffinokon

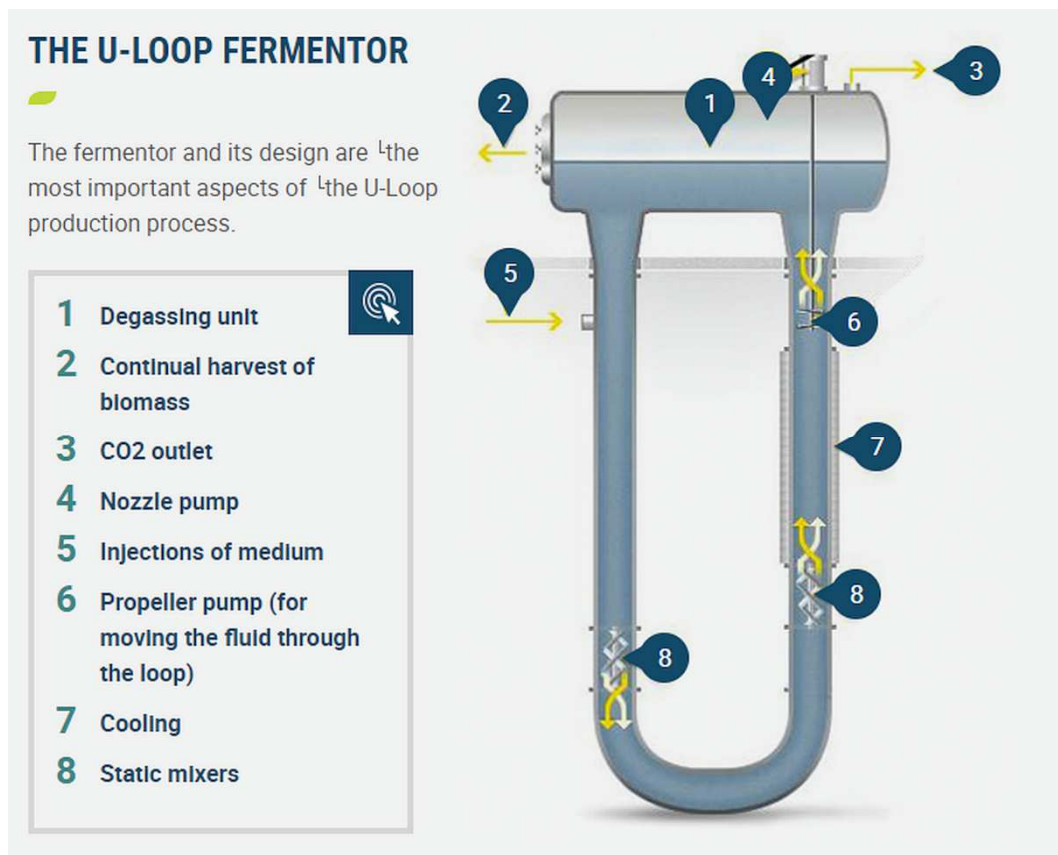
kekké dolgozzák fel. Olaszország 1977-ben állította le az SCP termelését alkánokból az olajárak emelkedése miatt. A szója fehérjeforrás tartósan versenyképesebbnek bizonyult. Manapság nincs olyan gyár, amely petrolkémiai alapon termel fehérjét.

Metán

A szénhidrogének közé tartozik, de a paraffinokhoz képest másképpen viselkedik és ezáltal más technológiát igényel a metán. Megfelelő mikroorganizmusok alkalmazásával ebből is lehet biomasszát, egysejt-fehérjét előállítani. A metilotrófok egyszerű, C1 (egyszénatomos) szubsztrátokon is képesek növekedni. A C1 vegyületekben nincs szén-szén kötés, pl. a metán (CH_4) vagy metanol (CH_3OH), de ide sorolható a dimetil-éter és a dimetil-amin is. Ezek között a metánhasznosítókat metanotrófoknak nevezik. Tovább szűkítve a kört léteznek szigorúan (strict) metanotrófok, olyan baktériumok, amelyek csak metán szénforráson élnek meg.

Technológiailag az előző fejezethez képest jelentő eltérés, hogy a metán gáz halmazállapotú, nem cseppek, hanem buborékok formájában van jelen a reaktorban. Oldhatósága vizes közegben szintén csekély. Kézenfekvőnek látszik, hogy a két betáplált rosszul oldódó gázt, a metánt és az oxigént együtt vigyék be és oszlassák el a rendszerben. A metán-levegő elegyek viszont tűz- és robbanásveszélyesek, így a technológiákban kerülendők. A másik alapvető különbség, hogy a levegő oxigéntartalma a fermentoron áthaladva nem fogy el teljesen, a kilépő gázban kétharmad, háromnegyed része még jelen van. Ugyanez a metánnál nem engedhető meg. Ha a kiengedett gázban metán marad, az egyrészt anyagi veszteség, másrészt megint csak tűz- és robbanásveszélyes keverék, harmadsorban pedig üvegház hatású gázként súlyos környezeti ártalmat okoz. A bevitt metánnak tehát a folyadékon áthaladva teljesen el kell fogynia.

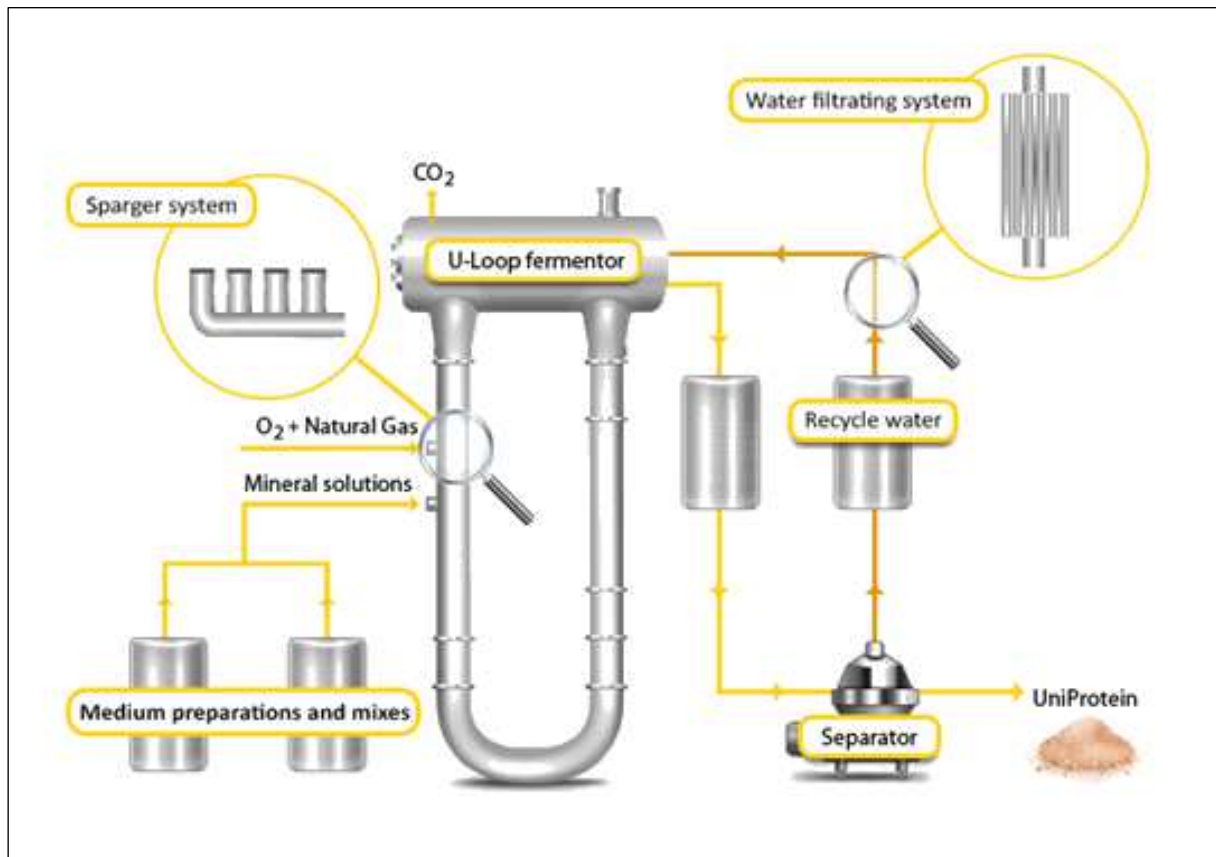
Ez nehezen oldható meg egy (közel) ideálisan kevert tartályreaktorban, ahol a koncentráció mindenhol azonos. Jobb megoldás a csőreaktor, ahol metán koncentráció a belépési ponttól a kilépésig fokozatosan csökken, végül elfogy. Tovább gondolva belátható, hogy az áthaladás során csak annyi biomassza képződik, amennyi a kevéske beoldódott metánból létre tud jönni. Egy áthaladás tehát nem hatékony, inkább cirkulációs reaktort érdemes kialakítani, ahol minden körülfordulásnál a telítési metán koncentrációnak megfelelő mennyiségű sejttömeg keletkezik. Megfelelő elrendezéssel elérhető, hogy a levegő és a metán gáz ne érintkezzenek egymással. Ez a folyamat is jelentős hő fejlődéssel jár, ezért megfelelő hűtőfelületet kell beépíteni a reaktorba.



21. ábra Az „U-loop” fermentor kialakítása

Ezen az elven alapul a dán Nozzle-U-Loop fermentor kialakítása. A gázok betáplálása a hurok felső pontján történik. A kényszeráramlás lefelé viszi el a buborékokat, és mire a felszálló ág tetején kilépnek, a metán elfogy és szén-dioxidra cserélődik. A készülékben nincs forgó keverő, a keringető szivattyú mellett a statikus keverő elemek biztosítják a két fázis megfelelő diszperzióját.

Erre a fermentor típusra alapozták az UniProtein eljárást. Fő nyersanyaga a földgáz, amelyet a *Methylococcus capsulatus* törzs szén- és energiaforrásként hasznosít. A hatékonyabb levegőztetés érdekében tiszta oxigént fúvatnak be és nitrogénforrásként ammóniát használnak. Emellett a tápoldathoz csak szervesetlen sókra van szükség. Minden vegyi anyag élelmiszer minőségű. A pH-t $6,5 \pm 0,3$ értéken tartják, és a hőmérsékletet 45 °C .



22. ábra A metán alapú egysejt-fehérje gyártás folyamata

A fermentációt folyamatos üzemben, $0,20-0,25 \text{ h}^{-1}$ hígítási sebességgel végzik. Az állandósult biomassza koncentráció $20-30 \text{ g szárazanyag/liter}$. A kilépő fermentlevet centrifugálásal mintegy tízszeresen, 22% -ra koncentrálják. Ezt követően mintegy 70 °C -ra melegítik. A folyamatban a biomassza inaktiválódik, és a sejtek lizálni kezdenek, ettől a fehérje hozzáférhetőbbé válik. Végül a biomasszát porlasztva szárítják. A vízigény minimalizálása és a szennyvíz mennyiségének csökkentése érdekében a centrifugákból származó felülúszót visszaviszik a fermentorba.

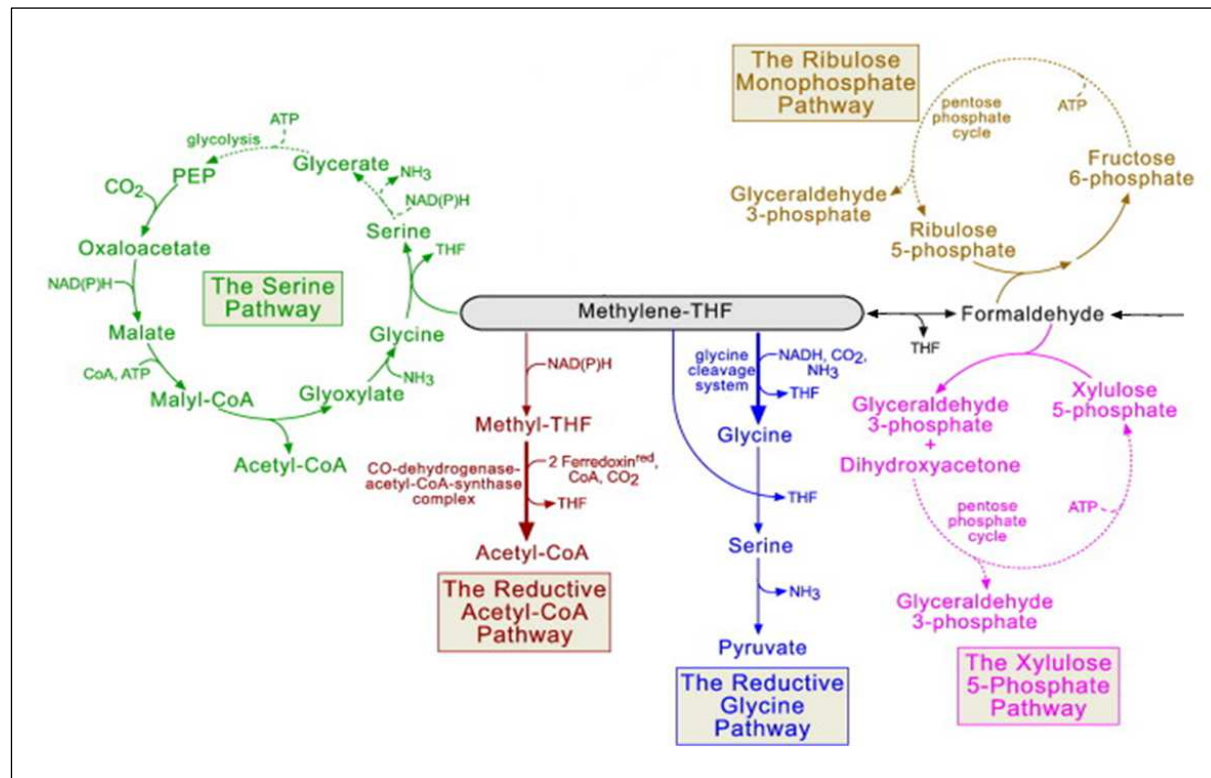
A produktivitás eléri a $4 \text{ kg/m}^3/\text{h}$ -t, ami mintegy kétszerese a hagyományos fermentorokban elérhető kihozatalnak.

2.1.4.4. Egysejt-fehérje termelés metanolon

A metán katalitikusan könnyen konvertálható metanollá, fermentációs hasznosítása kisebb oxigénigénnyel jár, nem kell olyan intenzív hűtés, és a metanol jól oldódik vízben, valamint a robbanás kockázata is sokkal kisebb. Kézenfekvő tehát a gondolat, hogy a metán helyett a valamivel kisebb energiataralmú, de sokkal jobban kezelhető metanolt használjuk szénforrásként az egysejt-fehérje gyártáshoz. A metanol kis mennyiségben, de előfordul a biokémiai folyamatok során, így a mikrobák enzimszisztémái „felkészültek” a hasznosítására. A baktériumok között obligát metilotrófokat is találunk: *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis* törzsek. Fakultatív metilotrófok minden nagy rendszertani egységben előfordulnak. Így a baktériumok között *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Protaminobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhodopseudomonas*, *Vibrio* fajok képesek a metilalkohol hasznosítására. Az élesztők között nem általános a metanol szubsztrát, a gyakran használt *Saccharomyces cerevisiae* és a *Candida utilis* például nem képesek ezen növekedni. Jól szaporodik viszont a *Pichia pastoris* és a *P. haplophila*, a *Candida boidinii*, a *Hansenula*

capsulata és a *Torulopsis glabrata*. A fonalas gombák között a *Paecilomyces* és a *Trichoderma* fajok bizonyultak alkalmasnak.

A metanol biokémiai hasznosításának első lépése mindenhol azonos. Az alkohol-dehidrogenáz enzim formaldehiddé oxidálja. Ez azonban nem jelenik meg szabad formában, hanem tetra-hidro-fólsavhoz (THF) kötve „aktív C1 egységként” sokféle biokémiai reakcióban vehet részt.



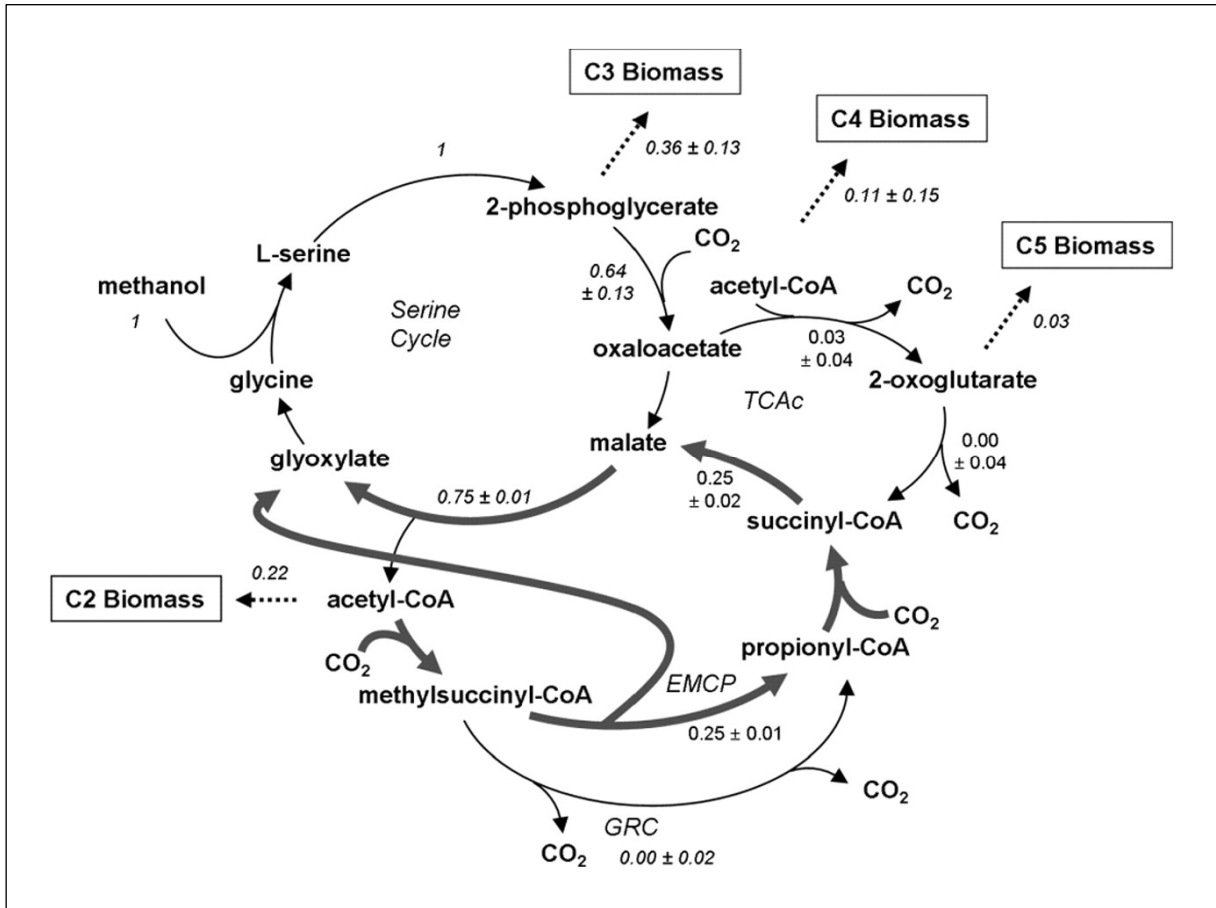
23. ábra A metanol hasznosításának biokémiai útvonalai

Az energiatermelő folyamat, a katabolizmus viszonylag egyszerű. A formaldehid hangyasavvá oxidálódik, majd ez szén-dioxiddá és vízzé alakul. Az anabolikus hasznosulásnak viszont ötféle változata is van, ezt, mutatja be (leegyszerűsítve) a 23. ábra.

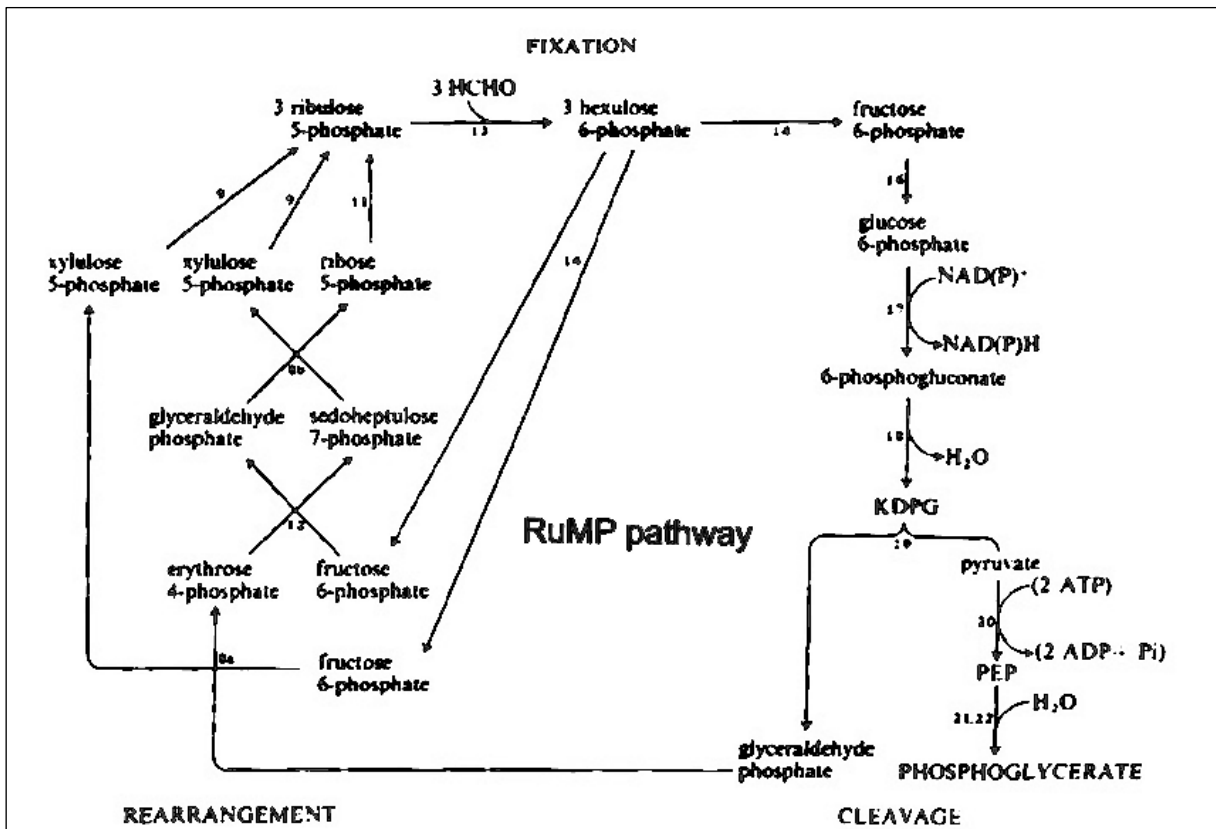
A **szerin út** kulcsenzime a szerin-transz-hidroximetiláz. A glicin szubsztráthoz kapcsolja az aktivált formaldehidet és ezáltal szerin keletkezik. Ez eddig egy aminosav termelő reakció, amit ténylegesen ki lehet használni szerin gyártásra. De a sejtek növekedése szempontjából érdekesebbek a mögötte lévő körfolyamatok, amelynek során a metanol szénatomjai beépülnek a sejt anyagaiba. A folyamatok nem egész számú sztöchiometriával jellemezhetők, a metabolikus fluxusok elemzése kimutatta, hogy C2, C3, C4 és C5-ös molekulák is átlépnek a sejt anyagcseréjébe. A képet bonyolítja, hogy a metanolból származó szén mellett több szén-dioxid fixálási lépés is működik, ami javítja a hozamot. Ezzel együtt a metanolra vonatkoztatott hozam csak 0,3 g/g körül van.

A metanol szerin úton hasznosító mikrobák azonosítását megkönnyíti, hogy a szilárd táptalaj felületén kinövő telepek általában rózsaszín pigmentet termelnek.

A **ribulóz-monofoszfát út** (Quayle-ciklus) kulcsenzime a hexulóz-foszfát-szintetáz, amely az öt-szénatomos ribulóz-foszfáthoz kapcsolja az aktív formaldehidet és így hexulóz-foszfátot hoz létre. Ez aztán fruktóz-6-foszfáttá alakul. Itt egy elágazás következik a reakcióutakban, az F6P molekulák három úton haladnak tovább. Egyik elhasad két három-szénatomos egységre, amelyek közül a foszfo-glicerát belép az anyagcserébe, ez a reakciósor nyeresége a sejt számára.



25. ábra A metanol hasznosulásának metabolikus fluxusai a szerin úton



24. ábra A ribulóz-monofoszfát körfolyamat lépései

A másik, a gliceraldehid-foszfát a másik két fruktózzal együtt a pentóz-foszfát ciklus reakcióin keresztül visszaépíti a kiindulási három ribulóz-5-foszfátot, így újraindulhat a ciklus. A körfolyamatban tehát három metanol felhasználásával egy foszfo-glicerát keletkezett. Ebben az anyagcsere-folyamatban nincs szén-dioxid fixálás, mégis jobb a hatásfoka, a hozam 0,5 g/g körül alakul.

ICI Technológia: Az Imperial Chemical Industries (ICI, brit vegyipari óriáscég), amely nagy mennyiségben gyárt metanolt, ezt választotta szubsztrátnak bakteriális SCP előállításához. Ennek érdekében elindítottak egy óriási R+D projektet.

Ennek egyik területe a törzs szelekciója és fejlesztése volt. Részletesen vizsgálták a metanolhasznosítók biokémiáját, tulajdonságait és rendszertanát. Végül a *Methylophilus methylotrophus* törzs mellett döntöttek. Ez a törzs a hexulóz-foszfát úton hasznosítja a metanolt, a hozam is kiemelkedő, 0,53 g/g. Gyorsan szaporodik, fajlagos növekedési sebessége eléri a $0,5 \text{ h}^{-1}$ -t is. Számos kedvező tulajdonsága mellett azonban volt egy hátránya is. A glutaminsav bioszintézise minden élőlényben azonos módon megy végbe: α -keto-glutársavban a keto-csoport transzaminálással aminosavra cserélődik. Az aminosav donor molekula viszont többféle lehet, egyes élőlények meg tudják oldani ammónium ionnal, míg mások aminosavakat igényelnek a reakcióhoz. A kiválasztott törzsnél is ez volt a probléma, a glutaminsav szintéziséhez glutamint igényelt. Ez megnehezítette, illetve drágává tette a fehérjeszintézist. Emiatt a törzset genetikailag átalakították, a saját glutaminsav szintézise helyett az *E. coli* enzimét vitték be, amely szervetlen (NH_4^+) ionnal alakítja ki a terméket.

A másik kiemelkedő műszaki teljesítmény a fermentor megtervezése és felépítése volt.

Egy óriási méretű air-lift reaktort terveztek, keverő nélkül, amelyben a felszálló levegő hurokáramlást idéz elő. Az air-lift csőben buborékok összeállását, koaleszcenciáját speciális kivitelezésű perforált tálcákkal akadályozták. A keletkező hőt a külső, leszálló áramláshoz épített hőcserélőkkel vezették el. Ez volt a világ legnagyobb aerob fermentora, a térfogata 3000 m^3 , ebben kb. 2000 m^3 volt a fermentálé mennyisége. A magassága 60 méter, az átmérője 7-11 m. A fejrész nagyobb átmérője az áramlási sebességet lelassítja, és csökkenti a kialakuló habréteget. A reaktor alján a nagy hidrosztatikai nyomás miatt igen jó az oxigén oldhatósága, ugyanakkor a levegő befúvatásához a kompresszornak le kell győznie ezt az ellenállást. A levegőztető rendszeren keresztül ammónia gázt is adagoltak a rendszerbe. Ez azonnal beoldódott a fermentáléba, és helyreállította a pH értéket (~ 7 értékre) és nitrogénforrásként is hasznosult. Külön megoldást igényelt a metanol beadagolása. Mivel a tenyészet igen gyorsan elhasználja a szubsztrátot, nincs idő az elkeveredésre. Emiatt nagyon sok szinten, nagyon sok ponton, összesen 8000 helyen vitték be a metanolt. Utólag kiderült, hogy még ez sem volt elegendő, nem tudták tartani a szükséges metanol koncentrációt, és ettől leromlott a hozam kb. 0,3 g/g-ra. Mivel a szén- és nitrogénforrást külön vitték be, a tápoldat csak ásványi sókat tartalmazott. A fermentációt 37°C -on, $\text{pH}=7$ -en vezették.

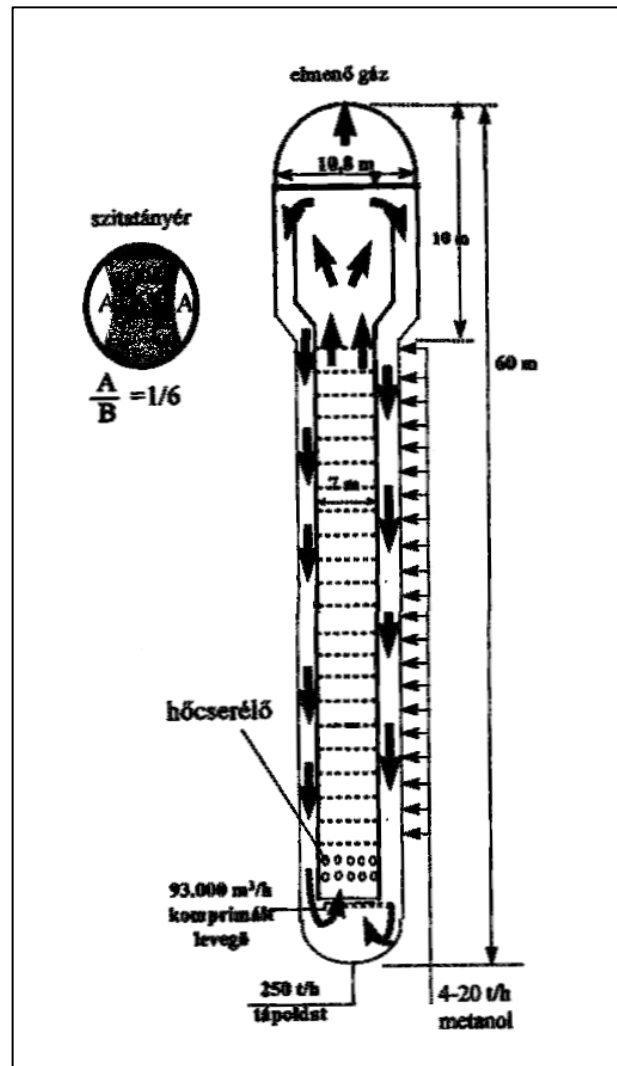
A berendezést folyamatos üzemben működtették, a hígítási sebességet $0,2 \text{ h}^{-1}$ -re állították be. A kilépő lé egy részét a biomassza eltávolítása után a betápláláshoz keverve visszavitték a rendszerbe. Így a maradék metanol és a sókat is hasznosítani lehet. Az állandósult (=kilépő) sejtkoncentráció 30 g/l . A rendszer produktivitása 4 g/l.h , ami összehasonlításban jónak mondható. Az üzem tehát évente 50-60.000 tonna SCP előállítására képes.

A lé feldolgozása során a sejteket savas közegben 70°C -on kezelik, ezalatt az RNáz enzimek hatására az RNS koncentráció lecsökken. Steril körülmények között centrifugálással elválasztják a sejteket, a felülúszó vizes oldatot visszatáplálják. A sejteket megszárazítják.

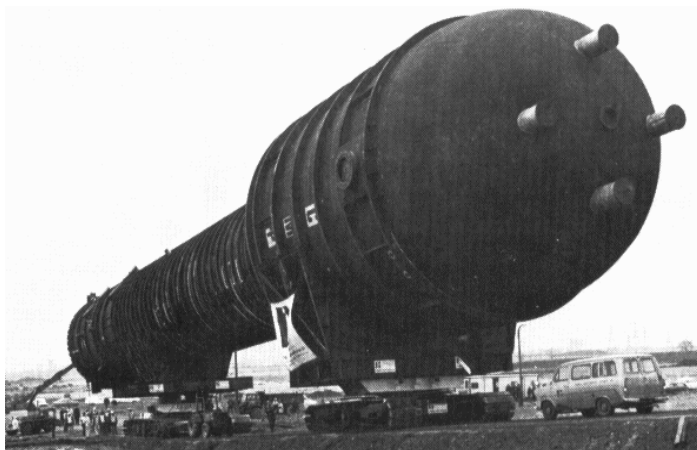
A technológiát 1979-80-ban helyezték üzembe, és egy 100 napos próbaüzemet végeztek el fertőződés nélkül. Ebben szerepe volt a megfelelő sterilizáción kívül a metanol szubsztrátnak (más mikroba mérgező, de legalább is nem tudják hasznosítani), és a nagy hígítási sebességnek – minden lassabban szaporodó mikroba kimosódik a rendszerből.

A terméket az ICI *Pruteen* néven állati takarmányként hozta forgalomba.

Sajnálatos módon mire az üzem megvalósult és működni kezdett, az árviszonyok megváltoztak. A termelt fehérje ára 600 USD/t körül alakult, a szójafehérje viszont 1980 után már csak a feleannyiba került. Ezek a gazdasági gondok ahhoz vezettek, hogy az ICI közös vállalkozást hozott létre az RHM-mel, hogy a fermentorban az állati takarmány *Pruteen* helyett az élelmiszerként eladható *Mycoproteint* (Quorn, *Fusarium SCP*, ld. korábban) állítsanak elő. Ez a műszaki csúcsteljesítmény, amit a Queens's Award-dal is elismertek, csak rövid ideig működött, a fermentort 1988-ban lebontották.



26. ábra Az ICI fermentor felépítése



27. ábra Az ICI fermentor szállítása és felállítása





28. ábra Az ICI fermentor bontása

A projekt harmadik területe az engedélyezés és az ehhez kapcsolódó biológiai vizsgálatok elvégzése volt. A Toprina-hoz hasonlóan ennek az anyaghoz is meg kellett találni az engedélyezési protokollt, sok toxikológiai, emészthetőségi, allergológiai vizsgálatot kellett elvégezni.

2.1.5. *Az egysejt-fehérje előállítás gazdasági helyzete*

Árucikként az SCP-nek versenyképesnek kell lennie az egyéb kereskedelemben lévő állati és növényi proteinekkel szemben az ár és tápérték szempontjából, valamint igazodnia kell az emberi és állati élelmiszerbiztonsági feltételekhez. A termelékenység, a hozam és az értékesítési ár azok a fő tényezők, amelyek befolyásolják a gyártás gazdasági helyzetét. A mikrobiális inokulumok, amelyeket bizonyos folyamatok elősegítésére használnak, általában nagyobb értékűek. Ebben az esetben az előállítási folyamat célja optimális hozam elérése olyan szaporodóképes sejtekből, amelyek meghatározott biológiai aktivitással rendelkeznek és jók a tárolhatósági jellemzőik. A *Saccharomyces cerevisiae* elsősorban ilyen mikrobiális inokulumnak tekinthető. Az inaktív, szárított sör-, vagy sütőélesztő szintén étkezési céllal használatos, mint vitamin- és nyomelem-forrás egyes speciális egészségügyi állapotokban. Számottevő mennyiségű élesztő-extraktumot állítanak elő sütőélesztőből, ízesítőanyagként és vitaminforrásként.

A cégek, mint a BP és ICI kezdeti érve az volt az SCP-gyártásba való bekapcsolódás mellett, hogy alacsony költségekkel nagy értékű fehérje állítható elő kőolajból az állati takarmányok kiegészítésére. A szándék az importált fehérjepótlók (pl. szójaliszt) helyettesítése volt. A szénhidrogén alapú egysejt-fehérje-gyártás bukásában az 1973-as drámai olajár-emelkedés játszotta a legfőbb szerepet, ami megemelte a betáplált nyersanyag- és energiaköltségeket, míg a mezőgazdasági termékek (pl. szójabab) ára csak kisebb mértékben emelkedett. Figyelembe

véve, hogy a nyersolaj ára 6-szorosára emelkedett 1973-ban és hogy az SCP előállítás teljes költségeinek 40-60%-át a szubsztrát beszerzése jelenti, érthető a negatív hatás.

A mezőgazdasági termények, amelyek az állati takarmányozás tekintetében az SCP fő versenytársai, képesek voltak piaci nyomásra a stabil ár fenntartására. Az emberi fogyasztásra szánt protein kiegészítő termékek ára sokkal magasabb, mint a takarmány fehérjéé, így nem okoz problémát, hogy a gyártási eljáráshoz konvencionálisabb és költségesebb szubsztrátokat (pl. glükóz) kell használni. Ezek a termékek jó húshelyettesítőként szolgálnak, amit a vegetáriánusok is fogyaszthatnak. A Quorn és a Spirulina márkanévű termékek régóta, stabilan jelen vannak a piacon.

A magas tőkeigény és a steril körülmények biztosítása éppen a fejlődő országok számára, ahol gyakori az élelmiszerhiány, teszi problémássá az egysejt-fehérje gyártás bevezetését. De az állati takarmányozás céljára, mezőgazdasági hulladékokon termelt SCP bizonyosan meg fogja találni a jövőben a helyét ezen országok gazdaságában.

2.1.6. *Termékminőség és -biztonság*

Az egysejt-fehérje a fehérje főkomponensen kívül zsírt, nukleinsavakat, szénhidrátot, vizet és ásványi anyagokat is tartalmaz (pl. foszfor és kálium). Az összetétel az adott mikroorganizmustól, valamint a táptalaj összetételétől függ. A nem-konvencionális élelmiszerekből felvett RNS mennyisége nem haladhatja meg a napi 5 g-ot, ugyanis az RNS-bomlásból származó purin vegyületek megemelik a plazma húgysav-koncentrációját, ami köszvényt és vesekövet idézhet elő.

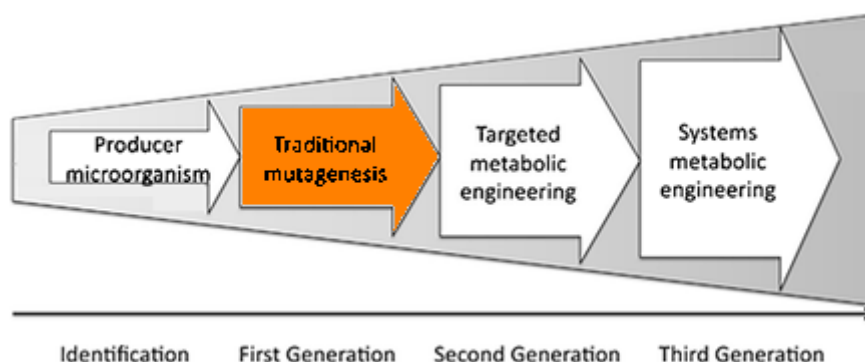
Ha az SCP-t sikeresen piacra kívánjuk juttatni, akkor a következő kritériumoknak kell megfelelni:

1. Fogyasztás szempontjából teljesen veszélytelen legyen.
2. Az aminosav-összetétel szempontjából a tápértéke legyen nagy.
3. A közvélemény által legyen elfogadott.
4. Funkcionálisan hasonlítson a legfontosabb közönséges élelmiszerekre.
5. A gazdasági megvalósíthatóság rendkívül komplex, még bizonyításra vár.

3. AMINOSAVAK, ANYAGCSERE MÉRNÖKSÉG

3.1.1. Anyagcsere mérmökség

Az ipari termelésnél 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. Ezt a célt a törzsfelállítás utóbbi száz évén belül a különböző évtizedekben egyre modernebb technikákkal érték el. Az első fázisban a klasszikus indukált mutációs + szelekciós technikát alkalmazták, akár célzottan, akár black box szemlélettel. A második fázisban a modern technológiák, mint a racionális anyagcsere- és géntechnológia jelentős előrelépést jelentettek a korábbi véletlenszerű mutációs módszerekhez képest. A közelmúltban a metabolomika, a flux balance elemzések (FBA) és metabolit fluxus elemzés (MFA) új lehetőségeket nyitott meg a termelőkéesség növelésében. A közeljövőben olyan újszerű megközelítésekre számíthatunk, amelyek a rendszerbiológia és a szintetikus biológia előnyeit együttesen aknázzák ki (systems metabolic engineering, SME).



29. ábra A törzsfelállítási módszerek fejlődése

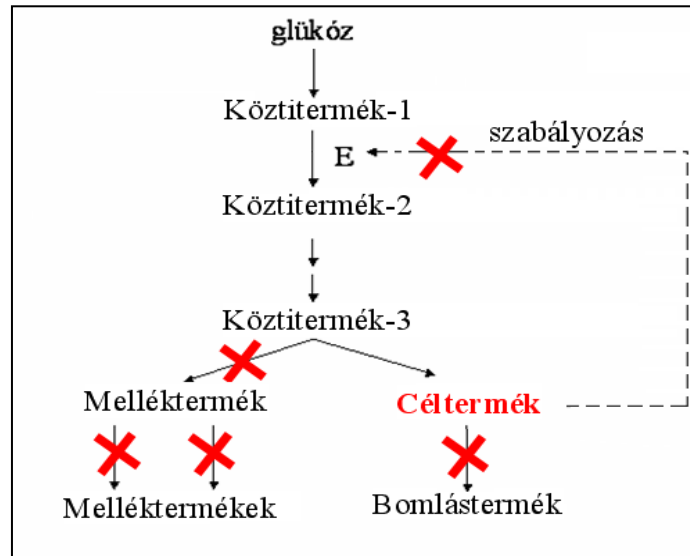
A primer metabolitokat termelő törzsek fejlesztése indult meg legelőször, így ezeknél elsősorban a klasszikus anyagcsere mérnökséget (classic metabolic engineering) alkalmazzák. Ennek eszköze a klasszikus indukált mutációs + szelekciós technika, amellyel sok megismételt lépésben fejlesztik a megfelelő 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 váltásszámú 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 kötőhelyhez, 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 kötőhelyhez 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. Ezeknél az antimetabolit rezisztens mutánsoknál a túltermelést fékező szabályozás nem működik, képesek a kívánt anyagot nagy mennyiségben felhalmozni.

30. ábra A klasszikus anyagcsere-mérnökség beavatkozási pontjai



3.1.2. Aminosavak gyártása

Az aminosavak tipikusan olyan elsődleges anyagcsere termékek, amelyek termelésénél anyagcsere-mérnöki beavatkozásokkal fejlesztették a termelő törzseket. Szemléltetésül néhány ipari aminosav termelő mutáns törzs genetikai jellemzőit mutatja a 3. táblázat:

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

3. táblázat Néhány, mutációval létrehozott aminosav túltermelő törzs

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

3.1.3. Az aminosavak felhasználása

Aminosavakat több célból termelnek.

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

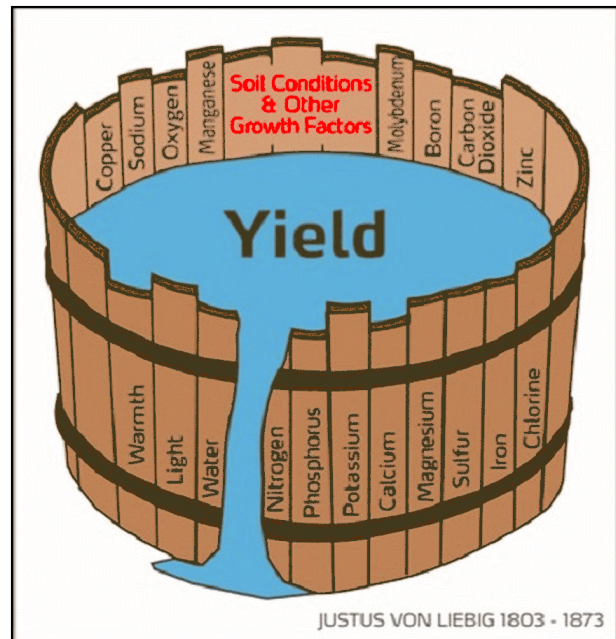
Édesítőszert (aszpartám, Asp-Phe-OMe) gyártanak az aszparaginsavból és a fenilalaninból.

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.”

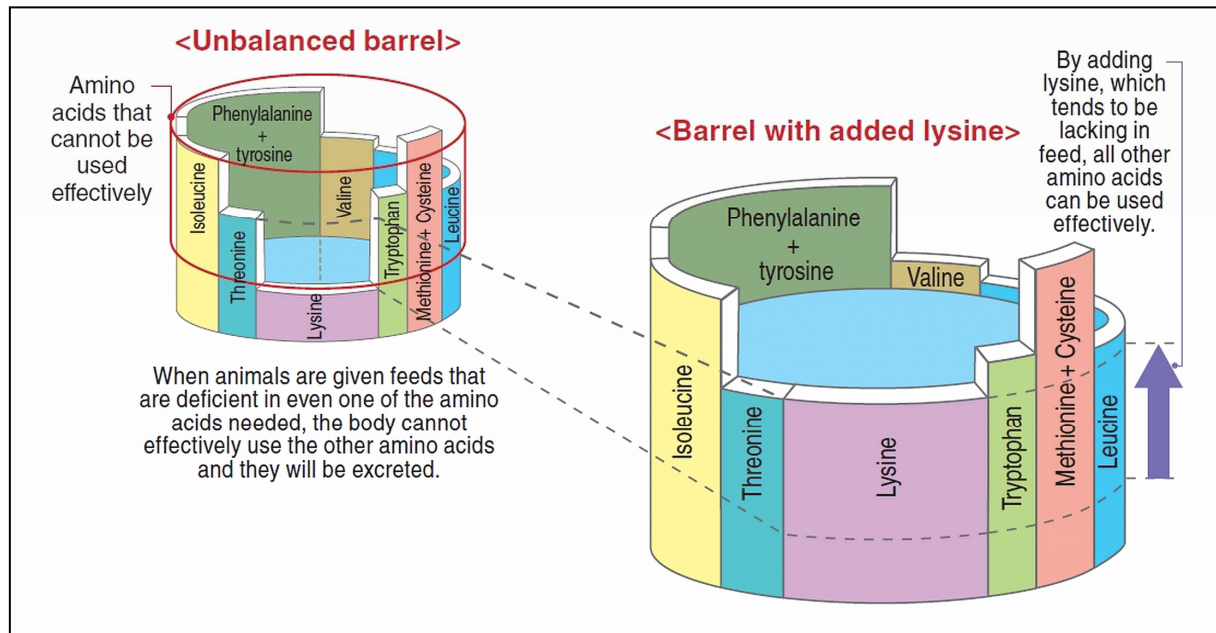
Ez érvényes a fehérjetartalomra, és a fehérjén belül az aminosav arányára is. Az esszenciális aminosavakat a táplálékkal kell bevinnünk a megfelelő mennyiségben. Ha egy komponensből is kevesebb van a kívánatosnál, az lefékezi a gyarapodást, és a többi tápanyag sem hasznosul megfelelően (analóg a mikrobanövekedésnél 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 környezetszennyezést 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 napraforgó dara, 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.



31. ábra Liebig minimum elvének szemléltetése



32. ábra Kukorica fehérje hasznosulásának fokozása lizin hozzáadásával.

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

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

3.1.4. Történet és piac

Az aminosav gyártás 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* törzsekből 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

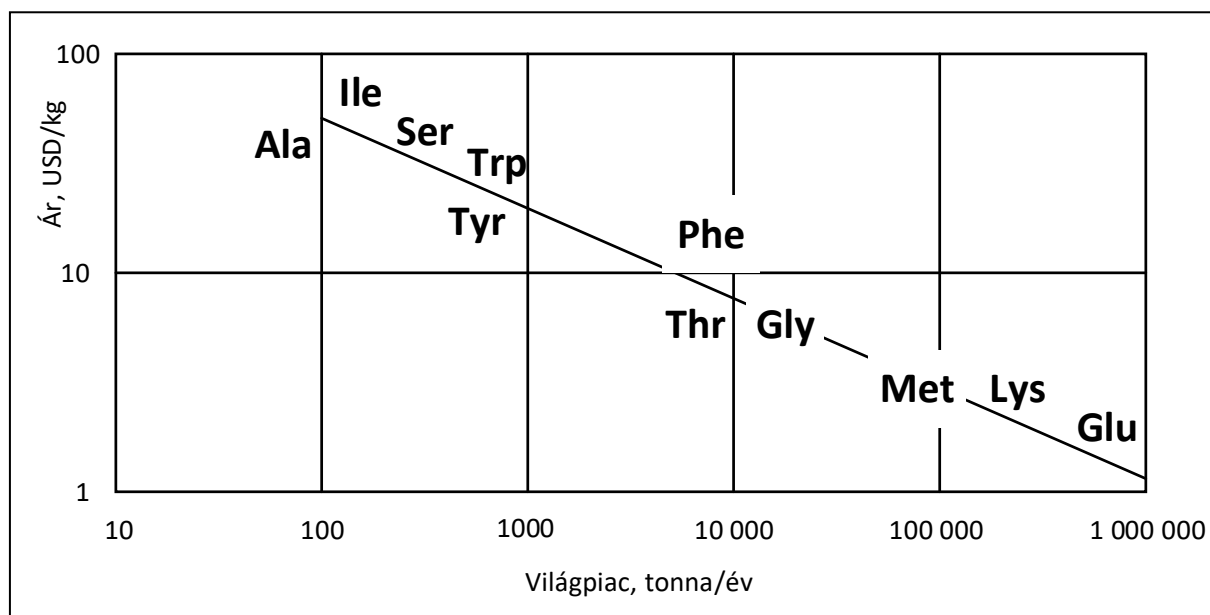
4. táblázat Az aminosav termelés megoszlása (1998)

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-Asparaginsav	Enzimes 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

5. 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.



33. ábra Az aminosav termelés léptéke és az árak összefüggése

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

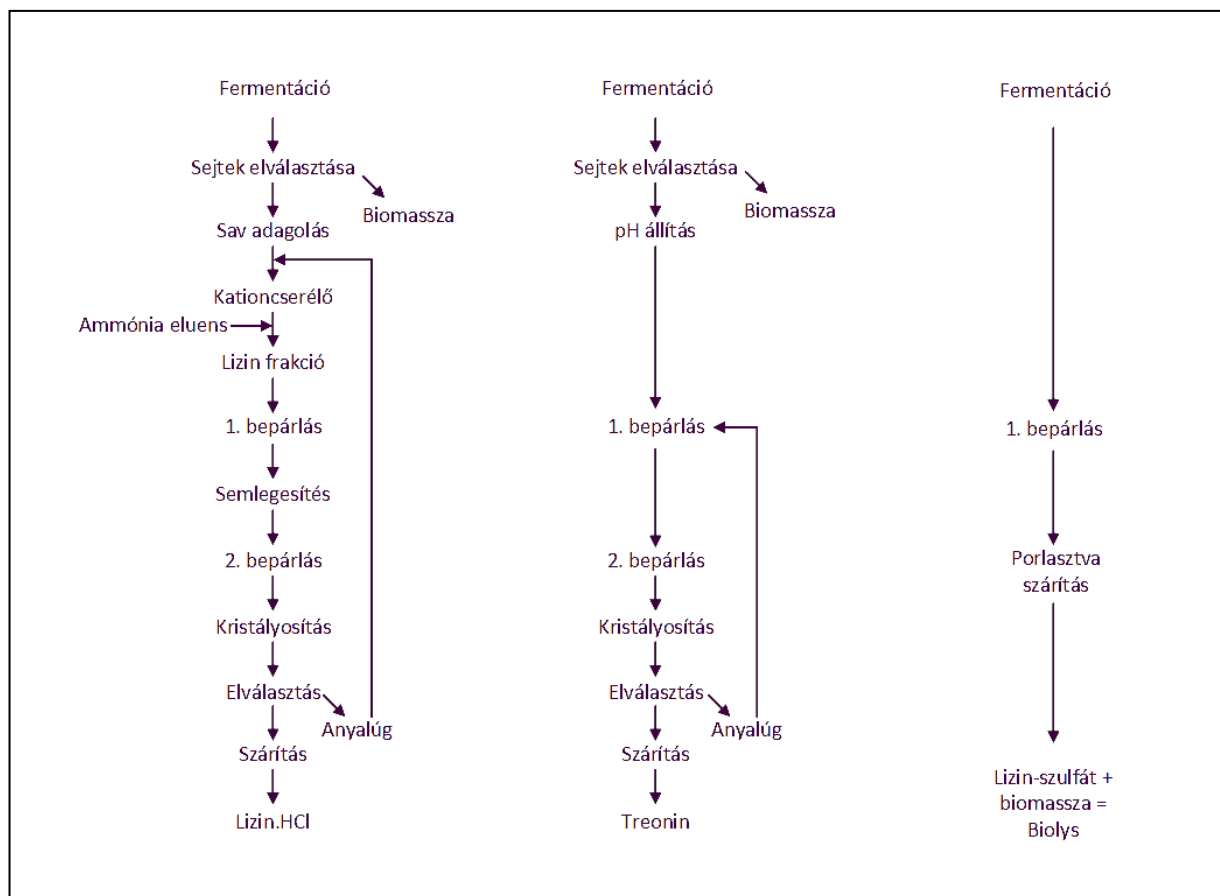
3.1.5. Aminosavak gyártása

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 rezolválni 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.

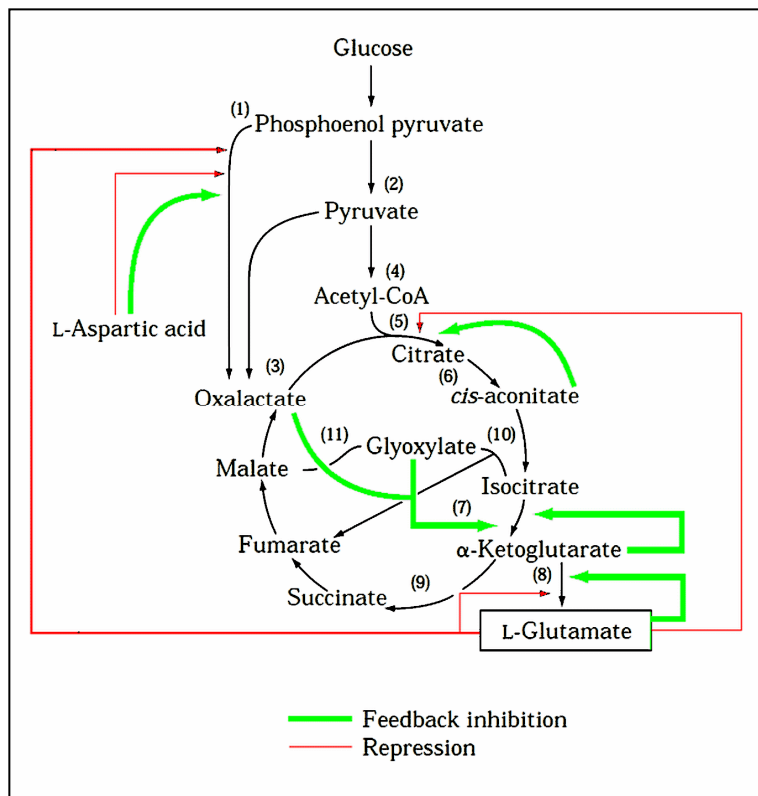
Biotranszformációval (enzimes, sejtes): csak egyetlen biokémiai reakció végrehajtása, amihez a szükséges enzimet nem mindig izolálják, hanem sokszor nyugvósejtes tenyészet formájában alkalmazzák (pl.: aszparaginsav).



34. ábra Aminosav feldolgozási műveletsorok

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. Aminosav termelésnél szabályozni kell a pH-t, amit a szokásos alkáli lúgok 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 védekezésésként 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.



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.

35. 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 acetil 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 $\mu\text{g/l}$, de mindenképpen 10 $\mu\text{g/l}$ alatt van. 30 $\mu\text{g/l}$ fölött a tenyészet a glutaminsav mellett/helyett már jelentős mennyiségű tejsavat termel.
2. Olajsav (telítetlen zsírsav) adagolása fokozza a permeabilitást.
3. Nem-ionos detergenssek, 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.

3.2.2. Fermentáció

A glutaminsav fermentációnál 100-200 g/l C-forrás bevitelt 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 ammónium sókat. A későbbiekben a nitrogén bevitel megoldható úgy, hogy a pH szabályozásra ammónia gázt illetve karbamidot használnak.

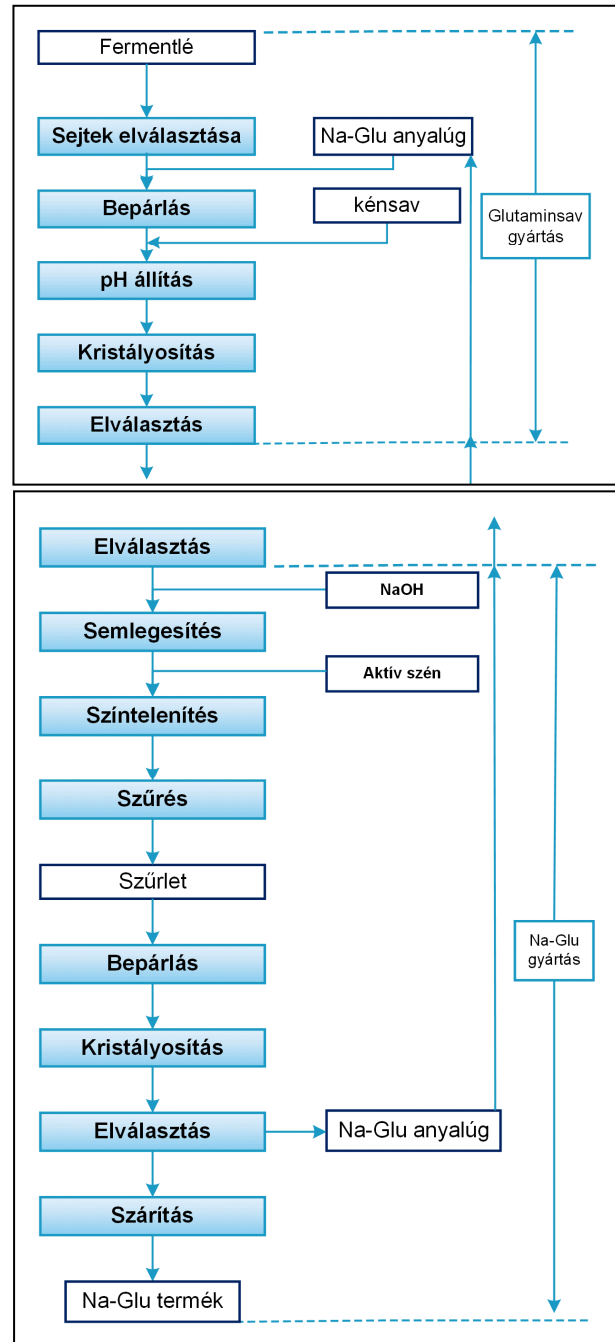
Túlságosan sok ammónia jelenlétében viszont a glutaminsav egy része glutaminná alakul át, ami rontja a kihozatalt.

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.

3.2.3. Feldolgozás

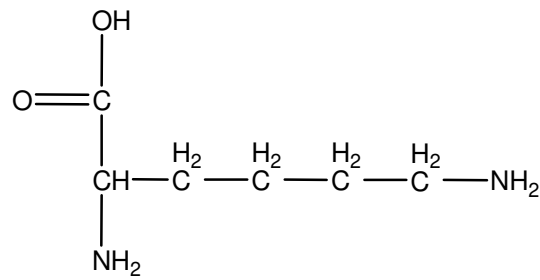
A fermentlé feldolgozása két szakaszra bontható. Előbb a kristályos glutaminsavat állítják elő, majd ezt mono-nátrium glutamátá alakítják. Mindkét folyamat kulcslépése a bepárlás, majd kristályosítás. Kénsavval beállítják az izoelektromos pontot, a glutaminsav disszociációja visszaszorul, ezáltal oldhatósága 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.



36. ábra Na-glutamát kinyerése fermentléből

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



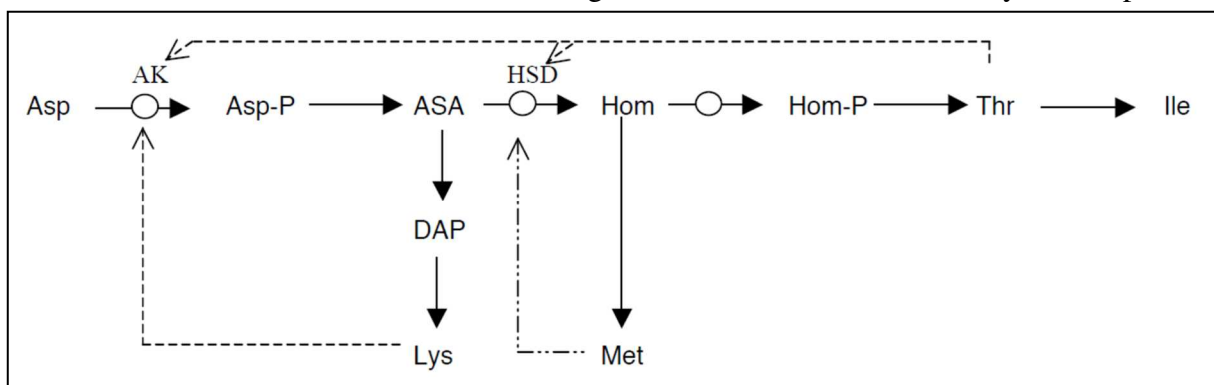
Hazánkban a takarmányozásban használatos gabonák, különösen a kukorica lizinben szegény (6. táblázat). A lizin hiánya korlátozza a többi komponens hasznosulását is, ezért célszerű kiegészítésként hozzáadni (32. ábra). Lizin kiegészítéssel az egy-gyomrúaknál (sertés, csirke) 15-20%-kal javul a takarmány-hasznosítás. Egy tonna lizin elegendő 70 tonna takarmány komplettálásához is.

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

6. táblázat Takarmányok lizin tartalma

3.3.1. Bioszintézis, anyagcsere-mérnökség

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



37. ábra Az aszparaginsav aminosav család bioszintézise és szabályozási mechanizmusai a *C. glutamicum*-ban

tokat. A sejtekben a lizin kétféle anyagcsereúton 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)-*rezisztensek*, azaz regulációs mutánsok.

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

A 38. 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.

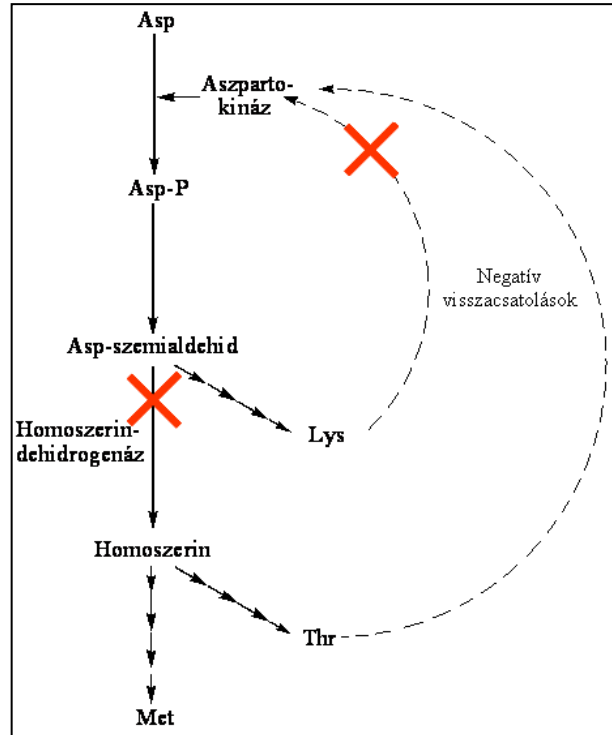
Lizint lehet még termelni *Candida periculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces lipolytica* fajokkal, de ezek intracelluláris lizint termelnek.

3.3.2. Lizin fermentáció

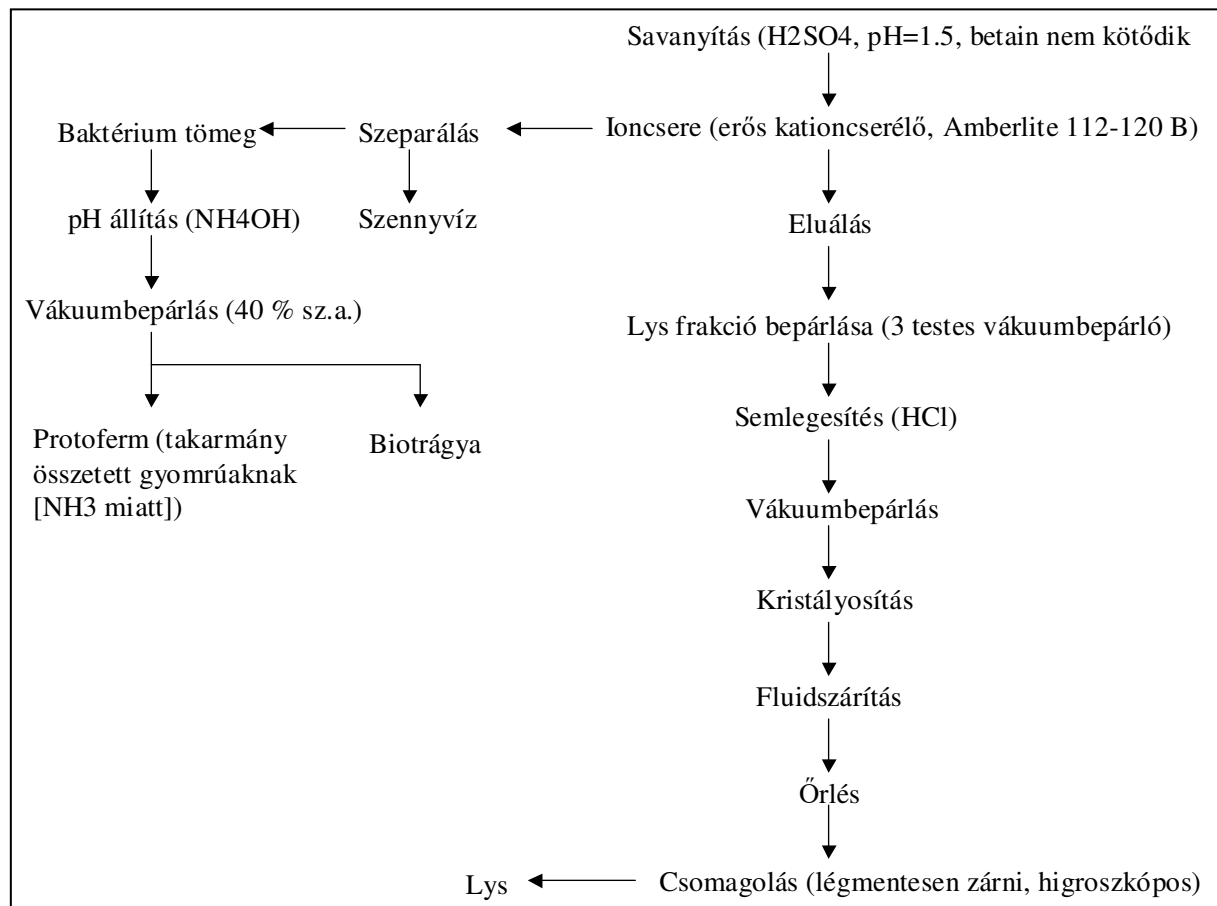
A lizin fermentáció az azonos törzs miatt sok szempontból hasonlít a Glu fermentációra. A C-forrás glükóz, melasz, alternatív megoldásokban ecetsav vagy paraffin lehet. A nitrogénforrásként ammónium sók, a pH szabályozáshoz használt ammónia jöhet számításba. A homoszerin, treonin és metionin szuboptimális koncentrációban jelen kell, hogy legyen (szójadara, kukoricalékvar 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: klóramfenikol, tetraciklin) továbbá felületaktív anyagoknak (kvaterner ammónium sók) is hasonló termelésfokozó hatásuk van. A lizin fermentációnál egy speciális fertőzésveszély áll fenn, lizindekarboxilázt termelő baktériumok jelenhetnek meg. Ezek kadáverinné (hullaamin) alakítják a megtermelt lizint. Ilyen törzsek pl. az *Escherichia coli*, *Clostridium welchii*, *Aerobacter aerogenes*. Tetraciklin adagolásával a befertőződés veszélye is csökkenthető.

A következő ábrán a lizin kinyerés és feldolgozás sémája látható.



38. ábra A lizin túltermelés érdekében végrehajtott anyagcsere módosítások



39. ábra A lizin feldolgozás lépéssora

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

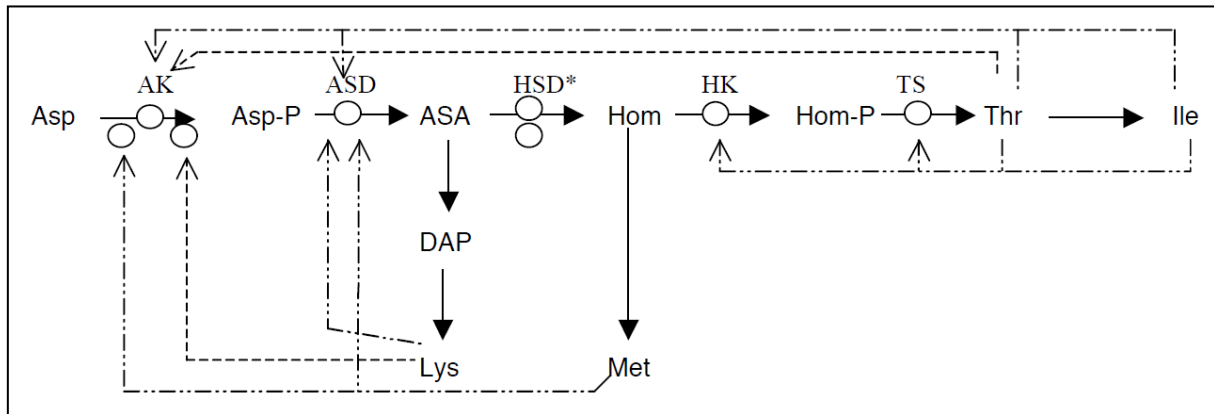
Magyarországon is működött egy lizin gyár Kabán, a Kyowa-Hakko cég 1991-ben telepített hazánkba egy 6000-6200 t/év kapacitású üzemet (Agroferm), ami manapság kis üzemnek számít. A lizin termelésnél árháború van, a világtermelés 3-400.000 t/év (leállított, üres kapacitások is vannak), ennek túlnyomó részét japán cégek, japán törzsszel 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 napraforgódara viszont lizinhiányos, így a lizinnek 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 fegyvereknek 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 szójahidrolizátumot 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) Evonik Agroferm néven termelt. Az üzemet végül sajnos gazdasági okok miatt 2018 április 30-án bezárták ☹.

3.4. Treonin előállítás

A treonint genetikailag manipulált *E. coli* törzssel állítják elő. A manipuláció a mikroba-törzsek racionális átalakításának iskolapéldája. A kiinduló törzseket, az L-treonin szerkezet-analókjára, az α -amino- β -hidroxi-valeriánsavra (AHV) rezisztens mutánsokat 1969-ben izolálta Shiio és Nakamori. Ezután több, ipari termelésben is alkalmazható mikroba-törzset 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 feed back 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.



40. 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 expresszálódik 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 anyagcsere-mérnökiség elveinek megfelelően melléktermék auxotróf és termékanalóg rezisztens mutánsokat szelektáltak.

A már említett AHV-rezisztens törzset, amelynél megszűnt az AK-I feed back inhibíciója, fejlesztette tovább minden próbálkozás. A további munka során izoleucin auxotróf mutánsokat izoláltak. Megszüntették az anaplerotikus PEP-karboxiláz enzim gátlását az aszparaginsav által. Kiiktatták 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* törzzsel 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 egyharmadát 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 idővesztést jelent két gyártás között a fermentor tisztítása, beszarzírozása, sterilizése, 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 sterilizálás.

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 alkáli lúgot, vagy ammóniagázt használnak. A gáznak az az előnye, hogy nem viszünk be vizet a rendszerbe, azaz nem hígítjuk még jobban a fermentlevet.

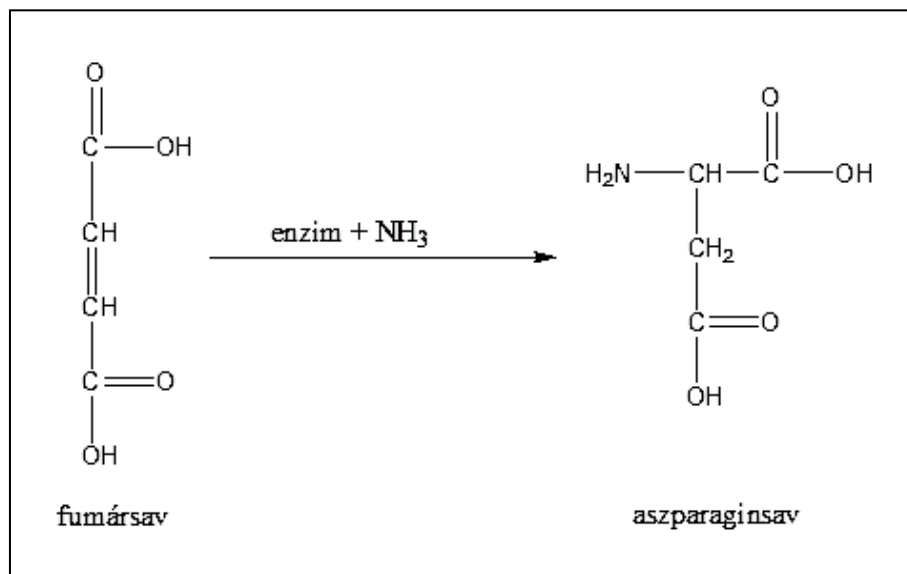
Magyarországon treonin gyártással az Agroferm (Kaba) cég foglalkozik. Az eredetileg 5-6000 tonna/év lizin gyártására épült üzem (1991, Kyowa Hakko, Japán), 2004-ban átvette a Degussa cég, és treonin gyártásra állította át. 2007-re a kapacitását 20.000 t/évre növelték, majd 2013-ban 30.000 tonnára bővítették.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

3.5. 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 fumarásvéből 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 citoplazma membrán 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*-ból származó immobilizált enzimmel aszparaginsavat termelni, míg a Mitsubishi 1986-ban kezdte el a termelést *Brevibacterium flavum* sejtuszpenzió többszöri újrafelhasználásával.

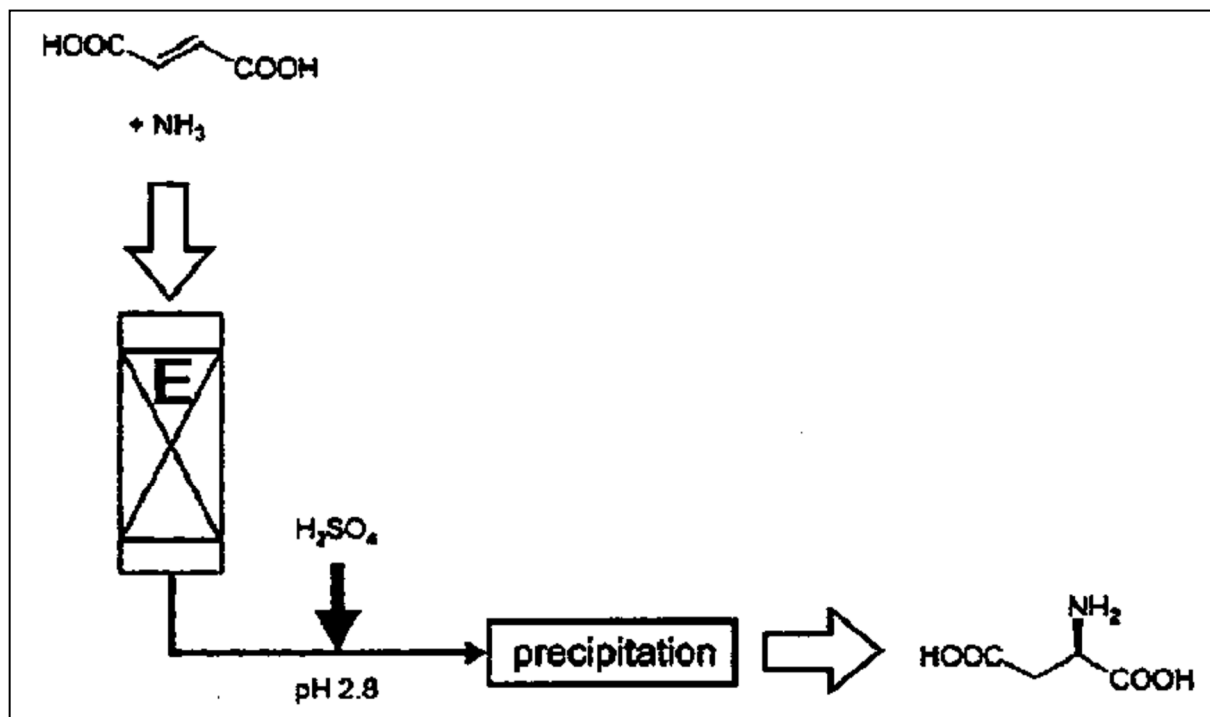
Az amerikai Biocatalytics cég *E. coli*-ból kinyert, immobilizált aszpartáz enzimet használ. A biokonverzió vizes fázisban, 37 °C-on (a *coli* szaporodási optimuma), 8,5-es pH-n játszódik le.



41. ábra Fumársav átalakítása aszparaginsavvá

MgCl₂ 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.

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.



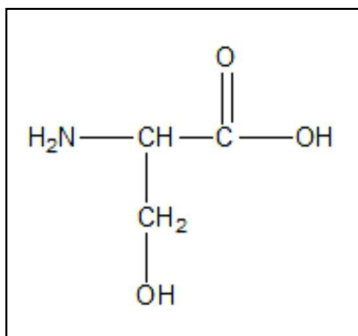
42. ábra Az aszparaginsav gyártás folyamatábrája.

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.

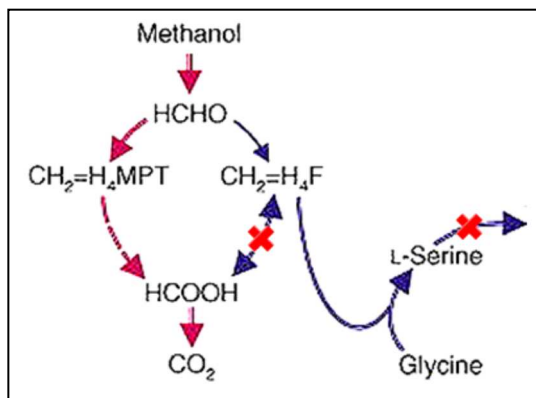
3.6. L-Alanin gyártás

Az alanin egyszerű szerkezetű molekula, szintetikusán is előállítható, de az racém keveréket ad, amit részolni 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).

3.7. Szerin előállítása



A szerint ipari mértékekben glicinből, főként fakultatív metilotrófokkal (pl. *Pseudomonas* törzssel) állítják elő. A fermentációnál glicint és metanolt adagolnak egyszerre (koszubsztrátok). Az anyagcsereben 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 sejtet.

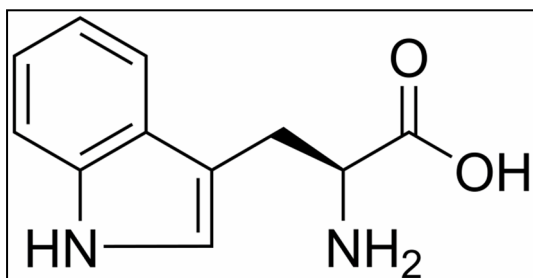


Bár a glicin fontos fehérjealkotó aminosav, a gyártáshoz szükséges koncentrációban toxikus a sejtekre. Ezért glicin-toleráns mutánsokat izoláltak és alkalmaznak.

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 egysejtfehérje termelésével foglalkozó fejezetet).

43. ábra A metanol hasznosítás szerin útja

3.8. 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 *Brevibacterium* törzsekkel. A három aromás aminosav bioszintézise az allostérikusan szabályozott elágazó

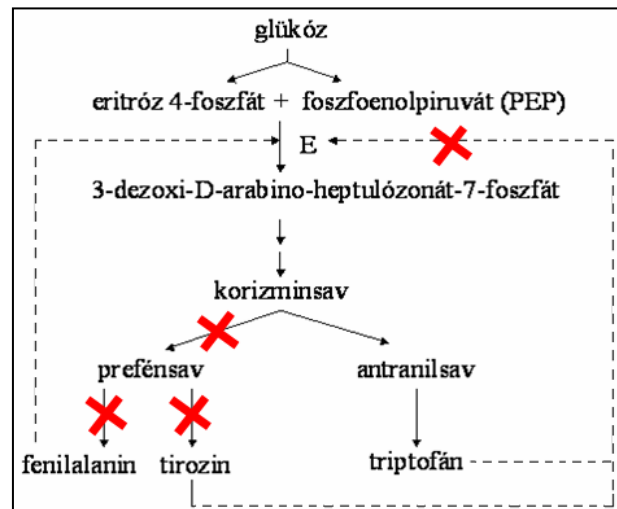
anyagcsereutak iskolapéldája. A cukorszarmazékokból induló bioszintézis közösen halad a korizminsavig, itt kettéválik. Az anyagfluxus egy része antranilsavon keresztül négy lépésben triptofánná alakul. A további mennyiségből prefénsav lesz, ami egy további elágazás után fenilalanint és tirozint ad.

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

- Phe^r, Tyr^r, (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.

44. ábra Triptofán túltermelő törzs anyagcserejének átalakítása

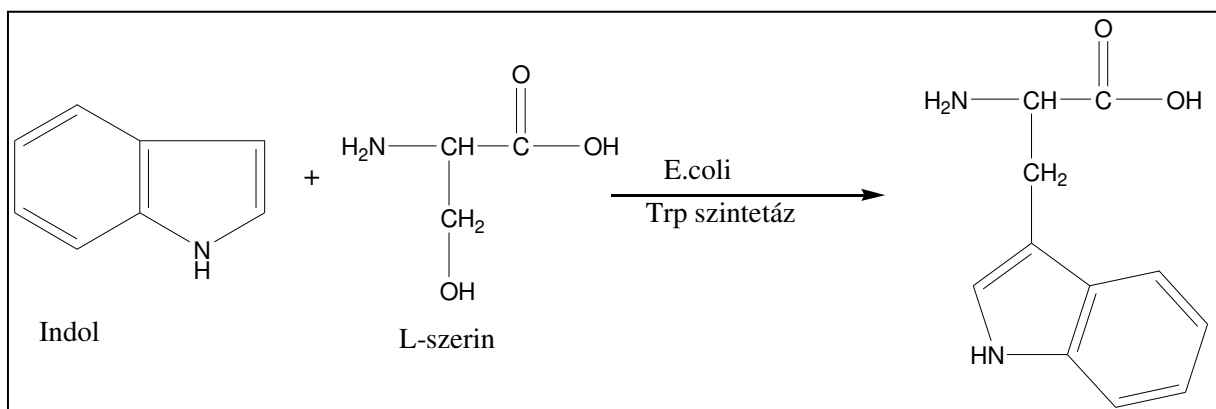


2. Prekurzoros bioszintézis: indol, vagy indol+glicin adagolásával.

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 prekursor mindegyikben szintetikusul előállított indol. Adagolhatjuk:

- Szerin termelő 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, méretek alapján adagolják, koncentrációját a 0,5 – 1,0 g/l-es tartományban tartják. Triptofánra el lehet érni az oldhatósági határt (~12 g/l)

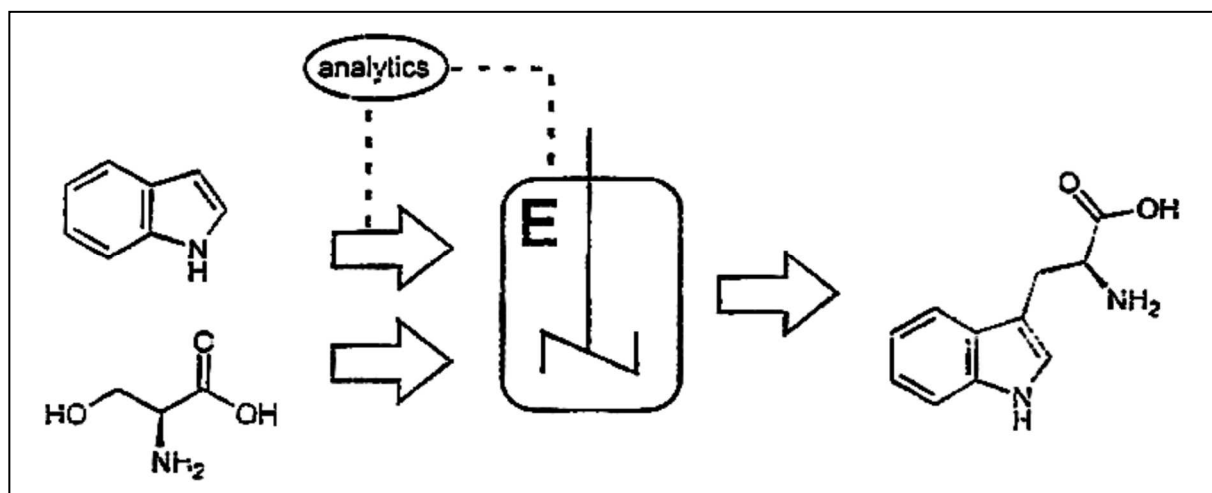


45. ábra A triptofán-szintetáz reakció

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 reakciósema 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 NH₄OH-dal szabályozzák, az indolt on-line analízis alapján adagolják.

Hat óra elteltével a levét 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)



46. ábra A triptofán előállítás enzimes konverzióval

A triptofán felhasználása:

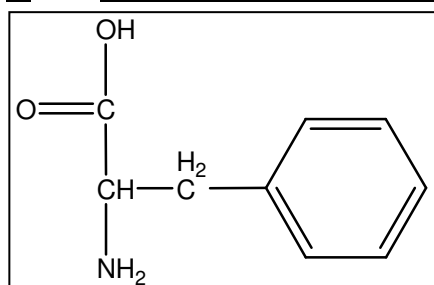
- esszenciális aminosavként tápszerekben és infúziós oldatokban adják;
- aktív gyógyszerkomponens, mert intermedierje a szerotonin anyagcserének, így altató, nyugtató, sőt antidepresszáns hatása van;
- gyógyszeripari alapanyag

3.9. L-fenilalanin termelés

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

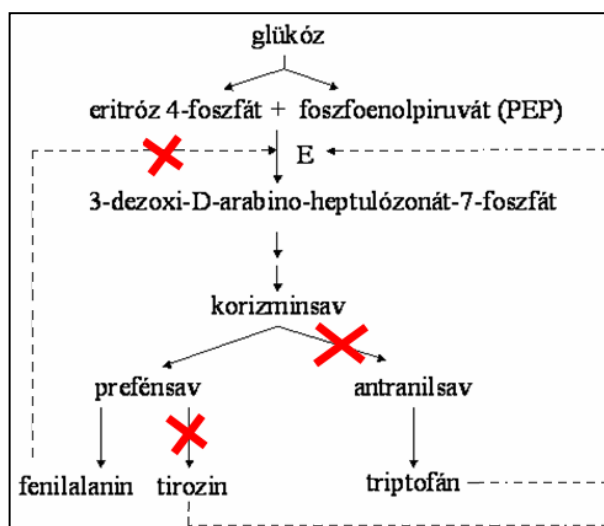
- de novo fermentációval és
- biokonverzióval.

1. A de novo fermentációs technológiánál



a *Corynebacterium glutamicum* vagy *E. coli* mutánsait használják. A triptofánnál leírtak szerint az aromás aminosavak bioszintézise összekapcsolódik, ugyanazt az ábrát használhatuk 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.

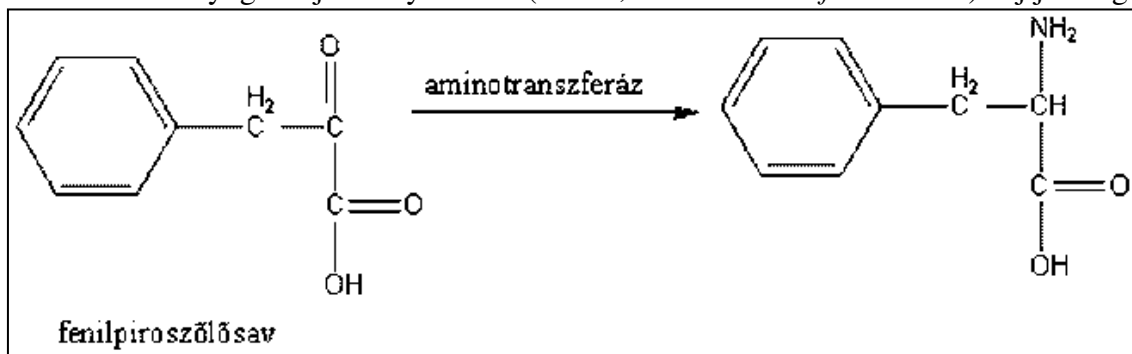


47. ábra Fenilalanin túltermelő törzs anyagcseréjének átalakítása

2/1. Biokonverzió fenilpiroszölősavból

Az aminosavak bioszintézisének egyik alapreakciója a transzaminálás, ahol az α -ketosav oxigénje aminosav csoportra cserélődik ki. A reakciónak számos változata ismert, ezek az átalakított aminosav szubsztráton kívül aminosav donorban 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 aminosav donorként (Glu, Asp).

Így tulajdonképpen egyik aminosavból hozzuk létre a másikat – nehéz gazdaságossá tenni. A reakciót nyugvósejtes tenyésztéssel (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*) hajtják végre.

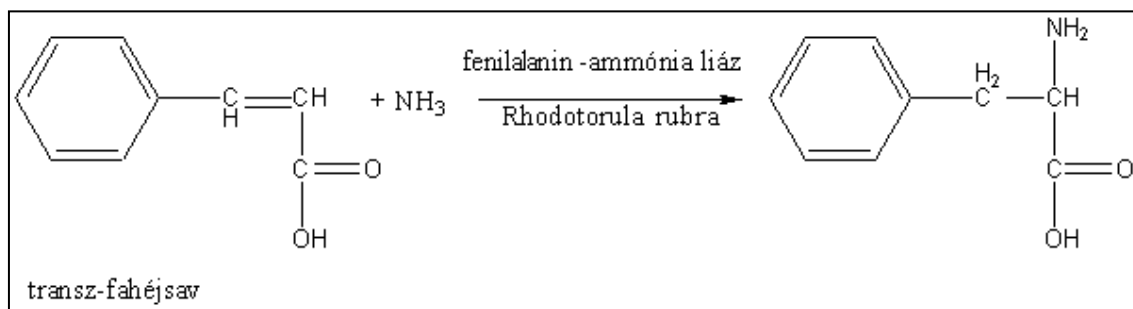


48. ábra Fenilalanin előállítása fenilpiroszölősavból

2/2. Biokonverzió transz-fahéjsavból

A szerves kémiából jól ismert addíciós reakció enzim katalízissal 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.

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 bevinni, erre olcsóbb megoldás, ha fehérje hidrolizátumot vagy szintetikus DL-fenilalanint adnak.



49. ábra Fenilalanin előállítása transz-fahéjsavból

Ha kialakult az enzim aktivitás, akkor bevisznek 25 g/l fahéjsavat ammónium-cinnamát formájában és 15% (!) 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 7. táblázat.

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.

	Fermentáció	Biokonverzió-1	Biokonverzió-2
Nyersanyag	glükóz	fenil-piroszőlősav	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
Amino donor	-	L-aminosav	NH ₃
Önköltség (\$/kg)	13	35	32

7. táblázat Fenilalanin termelő technológiák összehasonlítása

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

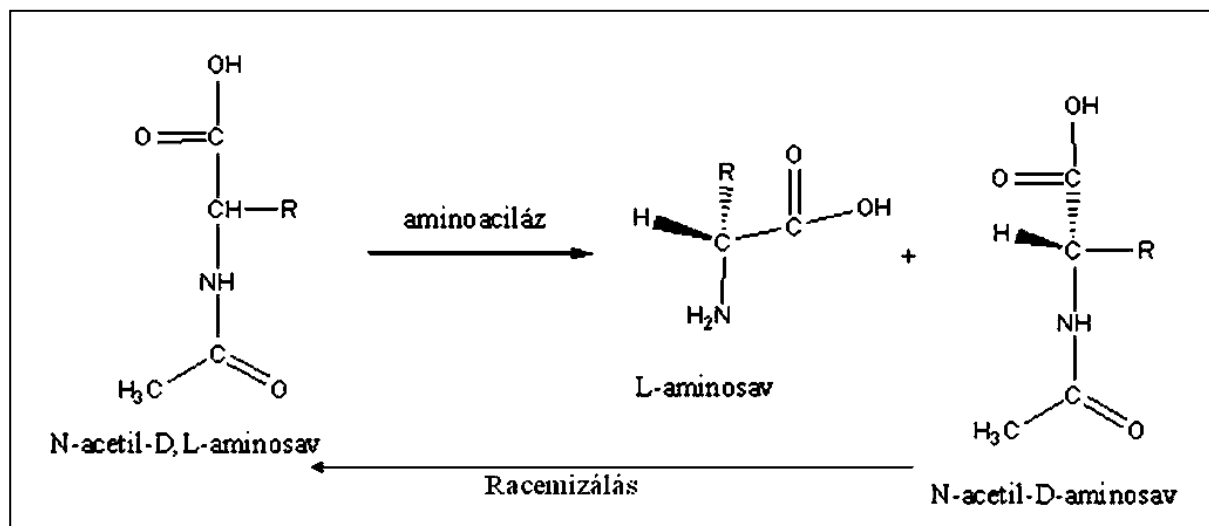
3.10. Reszolválás

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



50. ábra Aszimmetrikus hidrolízis

Ezek közül az aszimmetrikus hidrolízissel foglalkozunk, mert a szintetikusan előállított aminosavak (metionin, alanin, stb.) esetében ezt alkalmazzák. Ennek első lépéseként a racém aminosav keverékre olyan funkciós csoportot kötnek, aminek eltávolítása azután egy sztereoselektív enzimmel megoldható. Az általánosan alkalmazott származékképzés az N-acilezés (legegyszerűbben acetilezés), majd hidrolízis aminoaciláz enzimmel. Az aminoaciláz 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.

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

3.10.1. A metionin reszolválása (Degussa eljárás).

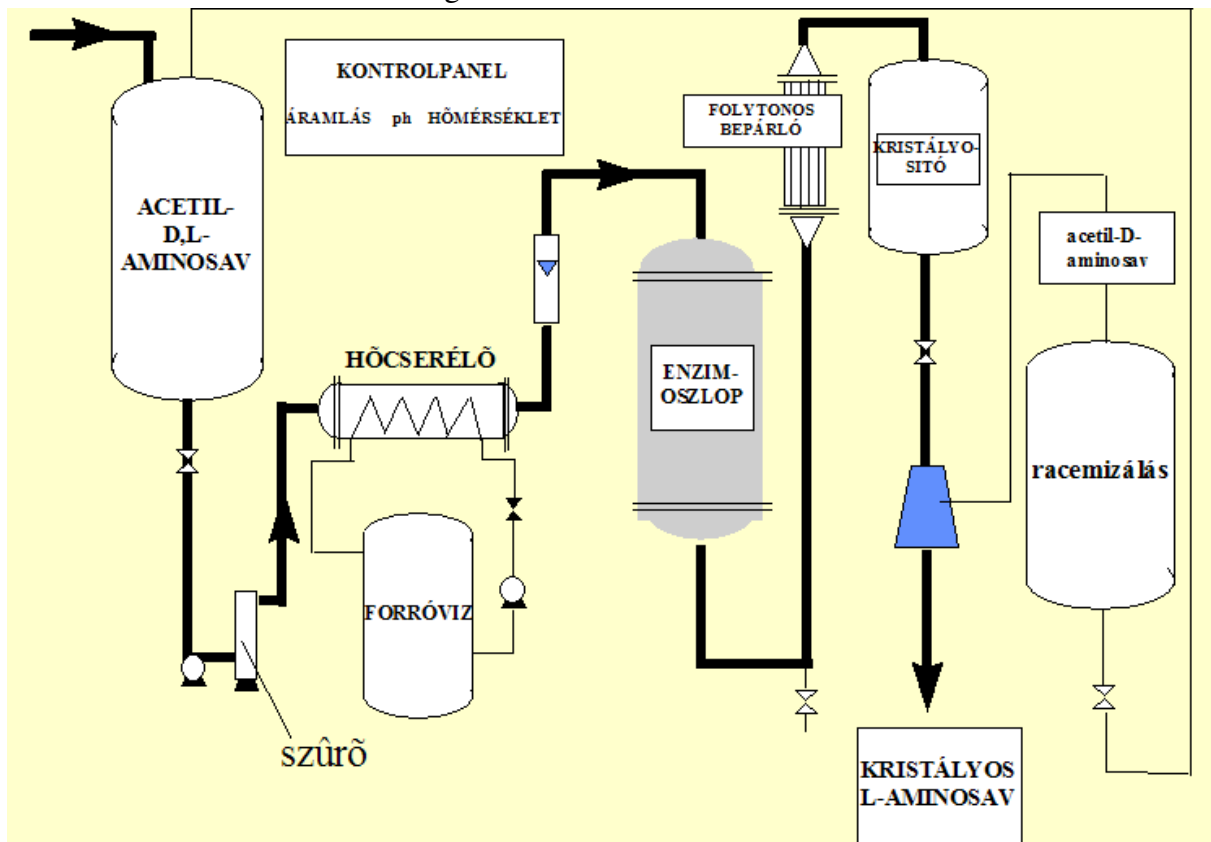
Az Evonik (régi nevén Degussa) nagy aminosav gyártó, fermentációsán és szintetikusan is gyárt aminosavakat. Eljárásukat alapvetően metioninra dolgozták ki, de működik más aminosavakra is (Ala, Phe, Val, Leu, Trp, Tyr).

A folyamatban acetyl csoporttal acileznek, a hidrolízist oldott enzimmel, semleges közegben (pH = 7,0), 37 °C-on végzik. Az enzim működéséhez Co²⁺ 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.

A Tanabe eljárás

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



53. ábra Tanabe eljárás rögzített enzimmel

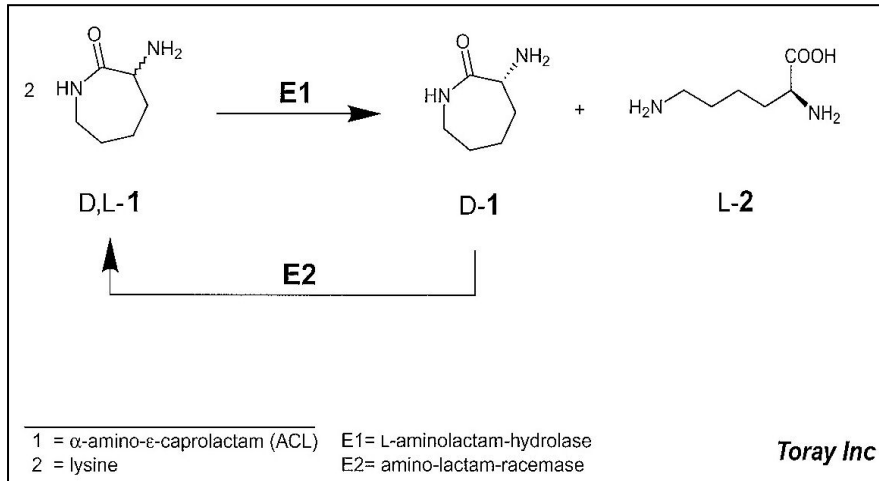
3.10.3. Lizin előállítása kaprolaktámból aszimmetrikus hidrolízissel

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

A kaprolaktám szintetikus intermedier, polikondenzációs műanyagok alapanyaga. Enzimes 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 enzimes 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:

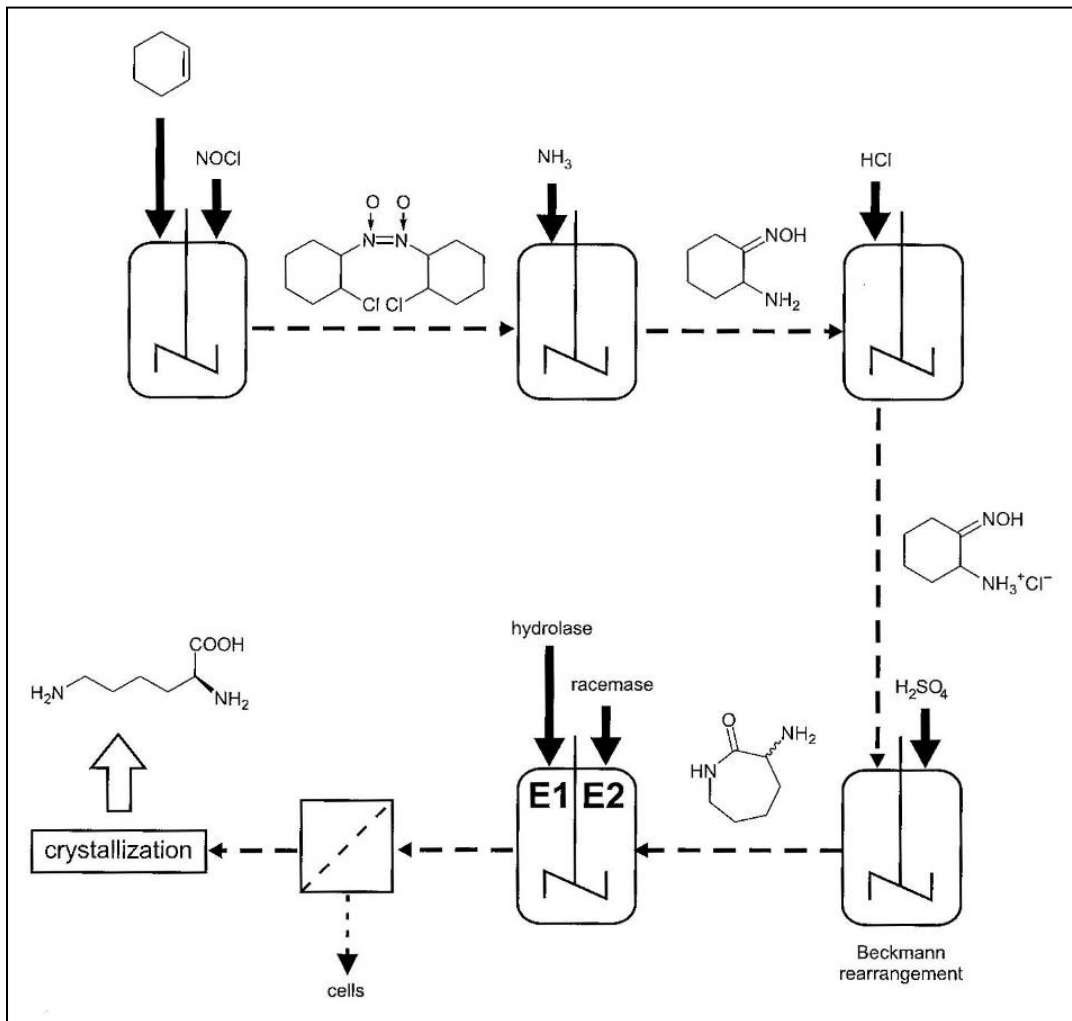
Candida humicola + *Alcaligenes faecalis* (alkálikus rothasztó, lúgos a közeg) vagy
Cryptococcus laurentii + *Achromobacter obae*

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.



54. ábra Lizin gyártás kaprolaktám aszimmetrikus hidrolízisével

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



55. ábra A félszintetikus lizingyártás folyamatábrája

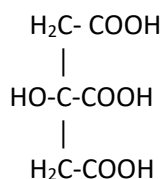
4. SZERVES SAVAK GYÁRTÁSA

A szerves savak globális termelését 2007-ben közel 16 millió tonnára becsülték, ebből kb. 2 millió tonna készült fermentációs eljárással. A szerves savak termelése évente kb. 5%-kal növekszik. A szerves savak a harmadik legnagyobb csoportot képviselik a fermentációs termékek között. A megújuló szénforrásokból mikrobiális folyamatokkal előállítható, sokféleképpen továbbalakítható platform molekulák jó példái a szerves savak. Hagyományosan ezeket egyes baktériumcsoportok (például ecetsav és tejsavbaktériumok) és fonalas gombák (például *Aspergillus niger*) felhasználásával termelik.

E savak elsődleges anyagcseretermékek, bioszintézisük az energiatermeléshez vagy a növekedéshez kötött. A savtermelés általában hiányos anyagcserét jelez – a szénforrás oxidációja nem megy végig szén-dioxidig és vízig. Anaerob organizmusoknál nem az oxidáció hiányos, hanem éppen a redukció áll meg karbonsav szinten, a molekula nem hidrogéneződik tovább oxo-vegyületté vagy alkohollá (tejsavas, kevertsavas erjedés).

4.1. CITROMSAV

A citromsav, a 2-hidroxi-1,2,3,-propántricarboxil sav a második legjelentősebb fermentált ipari termék az etanol után. Fehér, kristályos, kellemesen savanyú ízű anyag. Háromértékű karbonsav, sóinak nagy a pufferkapacitása, a három disszociációs lépcső miatt széles tartományban használható. Komplexképzésre hajlamos, ezáltal fémionok megkötésére alkalmas. Nem korrozív, de elég erős sav. Biológiaiag bontható, a citrát pufferek bepenészedésre hajlamosak. Vízben jól oldódik; oldata kellemes savanyú ízű.



Összegképlete: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ molekulatömege: 192 g/mól, 36 fok alatt egy kristályvízzel kristályosodik.

4.1.1. Előfordulása

A trikarbonsav (vagy Szent-Györgyi-Krebs) ciklus része, ezért szinte minden sejtben előfordul. Egyes citrusfélék (lime, citrom) félig érett termésében a szárazanyagnak akár a 8%-át is elérheti a citromsav tartalom, a XX század közepéig ebből nyerték ki nagyobb mennyiségben.

4.1.2. Felhasználás

Élelmiszeripar: élelmiszerekben elsősorban savanyúságot szabályozó anyagként, ízesítőszerként alkalmazzák (sav-cukor arány beállítása) E330 kódnéven. A létrehozott savas közeg tartósít, lassítja az élelmiszerek romlását. Emellett antioxidánsként is használják, bár önállóan nincs ilyen hatása, de elősegíti a többi antioxidáns hatását. Gyümölcsök esetében késlelteti az oxigén hatására történő elszíneződést. Napi maximum beviteli mennyisége nincs korlátozva.

Adalék: A citromsavat az élelmiszeriparban széles körben használják, mint sokoldalú, többfunkciós élelmiszeradaléket. Teljesen biztonságos, korlátozás nélkül megkapta a GRAS (generally recognised as safe) minősítést. Ételekben és italokban savanyító, tartósító, pH szabályozó, ízfokozó, kelátképző, stabilizáló és antioxidáns adalékként szolgál. Nagyon jól oldódik, így tömény szirupokban is alkalmazható. A citromsavat és más szerves

savakat sok élelmiszer sav-cukor arányának (pontosabban a savanyú és édes íz arányának) beállításához használják. Az ízek arányát optimálják az üdítőitalok, gyümölcs- és zöldséglevelek, lekvárok, szörpök, cukorkák, egyes fagyaltok, bor és a boralapú italok, almabor és konzerv gyümölcs készítésénél. Mivel a citromsav sok gyümölcs természetes összetevője, jól illeszkedik az ízek közé és hatékonyan hozza ki az aromákat. A nátrium-citrát forma szerepe is hasonló egyes italokban, különösen a citrom és lime alapúakban. Kelátképzőként megköti a fémionokat és ezzel megakadályozza a fémkatalizált barnulási és ízromlási folyamatokat. Lecsökkenti a pH-t, ezzel késlelteti a romlást okozó organizmusok növekedését.

A pH csökkentése megváltoztatja az élelmiszerek tulajdonságait, ezzel a feldolgozási paramétereket, például a főzési időt és hőmérsékletet. Az alacsony pH a legtöbb enzim aktivitását is lecsökkenti, ezzel is lassítja a romlási folyamatokat. 0,1-0,3% citromsav hozzáadása megakadályozza a fagyasztott és konzerv gyümölcsök és zöldségek színének és ízének romlását. Ha friss zöldségeket 1-2%-os citromsav fürdőbe merítenek 30 másodpercre, az 2-4 órával késlelteti barnulást. A lekvárok, zselék és édes töltelékek készítésénél a citromsav tartósítószerként szolgál. Az alacsony pH, 3,0-3,5 alatt a zavarosságok okozó pektineket kicsapja.

A nátrium-citrátot is széleskörűen alkalmazzák, például tejtermékekben. Stabilizálja az emulziókat, megakadályozza a zsír elválását. A sajtoknál javítja és egységesíti textúrát, csökkenti ragadóságot az íz befolyásolása nélkül.

Gyógyszeripar: elősegíti a kalcium és vas bevitelét citrát komplex formájában, Na-sója véralvadást gátló hatású (megköti a kalciumot a vérből), kozmetikumokban tartósítószerként is használják.

Műanyagipar: citromsav észterek: lágyítók (vinil- és cellulózgyantákhoz)

Fémipar: felületek tisztítása, rozsdamentesítés, passziválás (salétromsav helyett, ahol ez nem alkalmazható), galvánizáló fürdők adaléka.

Tisztító- és mosószeresek: víz lágyítására használják polifoszfátok helyett, mert nem okoz eutrofizációt (a foszfát alapú vízlágyítókat egyes országokban be is tiltották).

4.1.3. Története

A citromsavat először Scheele izolálta citromléből 1784-ben. A következő 100 évben az olaszok a citrom szállításával gyakorlatilag monopolizálták a termelést és ettől a termék drága maradt. Kivonása az éretlen citromból a XX század közepéig gazdaságos technológia volt. Egy tonna citromsavat kalcium-só formájában 40 tonna citrom préslevéből nyertek ki. Wehmer 1893-ban véletlenszerűen észlelte, hogy a citrus növényeken élő egyes fonalas gombák citromsavat termelnek. Egy kalcium-oxalátot előállító törzs tenyésztésében melléktermékként észlelte a citromsav megjelenését. Wehmer felfedezésének gyakorlati jelentőségét felismerve később főtermékként citromsavat termelő gombákat keresett és talált, majd ezeket a mikroszkópos gombákat új genus-ként, a *Citromyces* nemzetség tagjaiként írta le 1903-ban. A részletes rendszertani vizsgálatok később kiderítették, hogy a törzsek valójában a *Penicillium* nemzetségbe sorolandók.

1913-ban Zahorsky jelentette be az első *Aspergillus niger*-rel végzett citromsav termelésre vonatkozó szabadalmat.

1917 A citromsav termelés ipari megvalósíthatóságát biztosító felfedezés Currie nevéhez kapcsolódik. Az *Aspergillus* nemzetség savtermelő képességét vizsgálva megállapították, hogy ezek a gombák savanyú kémhatású táptalajon is növekednek, és ez a savanyú környezet a citromsavképződésnek is kedvez. Ilyen savanyú (pH=1,5-2) körülmények között a baktériumos fertőzés már nem zavarhatja a folyamatot, sőt pH=2 alatt, a növekedés részleges gátlása fokozza is a citromsav képződést. Az optimált és nagyipari méretben is biztonságosan megvalósítható technológia felületi tenyésztésben viszonylag rövid idő (1-2 hét) alatt a szénhidrát tartalomra számolva 60 % feletti citromsav hozamot eredményezett.

1919-ben készült el az első citromsavat termelő üzem Belgiumban. Ezt követte a Pfizer üzemének a felépítése az USA-ban Currie eredményei alapján (1923). Angliában a Rowntree Ltd. - saját szabadalmát használva - 1927-ben indította meg a citromsavtermelést.

1928-ban melaszt hasznosító eljárásra épült üzem Csehországban, Kaznejevban, német szabadalom alapján. Ez azonban új nehézségeket is okozott a melaszban lévő fémionok zavaró hatása miatt. Erre talált megoldást Leopold, aki a káros vas ionokat K-ferrocianiddal kötötte meg.

Később nagy kapacitású citromsav üzemek épültek Németországban, a Szovjetunióban és más európai országokban. Ezek az üzemek mind felületi tenyésztéssel termelték a citromsavat, mégpedig olyan olcsón, hogy a citromléből történő citromsav előállítás elsorvadt. Az olcsó ipari termék már nem csak az élelmiszeriparban, de az ipar más területén is felhasználásra került.

A második világháború után fokozódott az érdeklődés a citromsav iránt. A piac igényeit csak újabb üzemek építésével lehetett kielégíteni. Ezek az üzemek azonban már új technológiát alkalmaztak, a szubmerz, levegőztetett eljárást (1950-ben Perquin, Kluyver Laboratory)

A foszfát limitáció hatását, illetve annak megszüntetését hazánkfia, Szűcs János írta le, igaz, az Egyesült Államokban (1944-48).

Érdekes kitérő a technológiai fejlesztésben, hogy a cukor helyett n-paraffinon (kőolaj alapon) is megoldották a citromsav gyártást, *Candida lipolytica* törzs alkalmazásával. Termelő üzemet is építettek Szardínia szigetén, de a kőolaj árának növekedésével a gyártás gazdaságtalanná vált.

4.1.4. Termelés

A citromsav termelési volumenének intenzív növekedését mutatja be az alábbi adatsor:

8. táblázat A citromsav termelés növekedése

Évszám	termelés, t/év
1929	5 000
1953	50 000
1976	200 000
1980	350 000
2007	1 600 000
2014	1 850 000

A világon évente mintegy 1,85 millió tonna citromsavat termelnek, ezen belül 1,05 millió tonna származik Kínából. Magyarországon 2014. szeptember 9-én tették le a Szolnokon épülő citromsav gyár alapjait, ahol 60 ezer tonna terméket kívánnak előállítani. A Kazincbarcikán épülő gyárban évi 100 ezer tonna előállítását tervezik. Az üzemek elkészülte esetén a világtermelés 8%-a származik majd Magyarországról.

A piacvezető Kínán kívül ott vannak a piacon a történeti részben említett országok és cégek:

USA: Pfizer, Miles Lab

Anglia: Sturge Ltd.

Belgium: Citrique Belge (Hoffmann La Roche)

NSZK: Benckiser, Boehringer

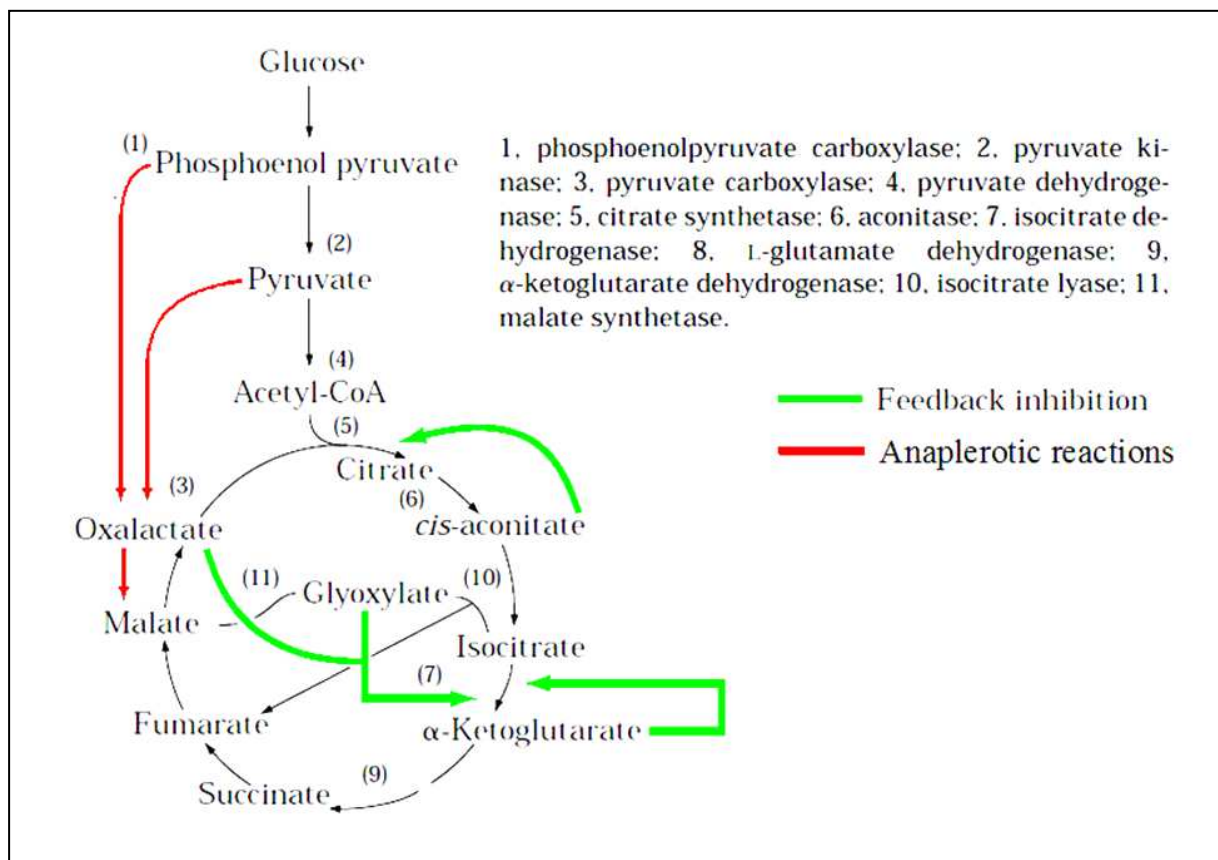
Ausztria: Jungbunzlauer

Olaszország, Spanyolország, Törökország, Lengyelország, Jugoszlávia

4.1.5. Bioszintézis

A citromsav a citrátkör indító lépésének terméke: oxálacetátból és acetyl-CoA-ból alakul ki. A körfolyamatban a citrát molekula tovább alakul és az acetyl csoporttal belépett két szénatom szén-dioxidok formájában lép ki a rendszerből. A gyártás célja viszont az, hogy a citrát ne alakuljon tovább, hanem lépjen ki a mitokondriumból és a sejtéből is, és nagy mennyiségben halmozódjon fel a fermentáléban. A citromsav elvonásával viszont a citrátkör nem zárul, nem alakul ki az oxálacetát templát a következő ciklus indításához. Ezeket az intermediereket az anyagcsere más folyamataival kell pótolni a sejtnek, ezeket a folyamatokat nevezzük anaplerotikus, vagy feltöltő anyagcsereutaknak. Ezek foszfo-enolpiruvátból és piruvátból szén-dioxid fixálással karboxilezve állítanak elő oxálacetátot illetve malátot.

A szén-dioxid anaplerotikus megkötését a piruvát karboxiláz enzim katalizálja. Az enzim eukariótákban jellemzően a mitokondriumban található, de az *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.



56. ábra A citrátkör az anaplerotikus utakkal

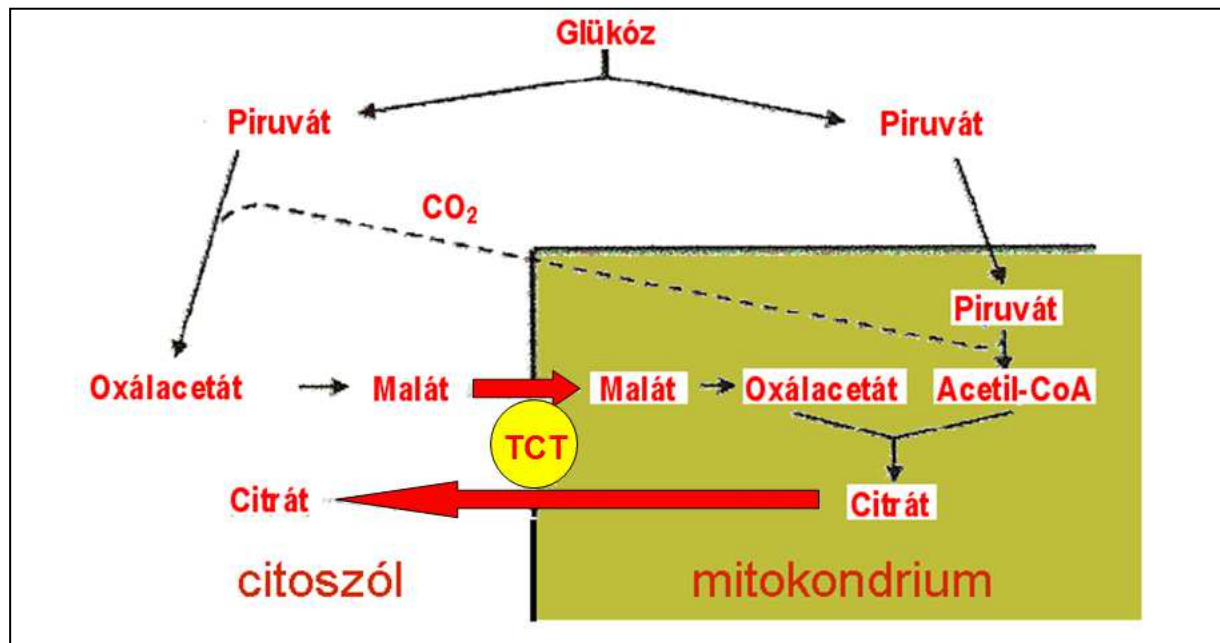
Az egy molekula glükózból képződő két piruvát molekula sorsa a szén-dioxidon keresztül kapcsolódik össze. A dekarboxilezéssel felszabaduló szén-dioxid felhasználódik az oxálacetát képződésénél. Így a kiindulási glükóz molekula mind a hat szén atomja bekerülhet a citromsavba.

A citoszolban található malát dehidrogenáz enzim jóvoltából az oxálecetsav maláttá (almasavvá) alakul. Ez a citrátkör szempontjából visszafelé menő reakció. A reakció NADH-igényét a glikolízis fedezi. Az *A. niger*-ben tehát a glikolízis végterméke a citoplazmában nem piruvát, hanem malát.

Az eddig tárgyalt primer metabolitok esetében indukált mutációval állították meg az anyagcsere-folyamatokat, hiánymutánsok létrehozásával kényszerítették ki a céltermék felhalmozódását. A citromsav esetében erre nincs szükség, a citromsav-ciklus összes génje és a róluk átíródó enzimek is hibátlanul működnek túltermelő körülmények között is.

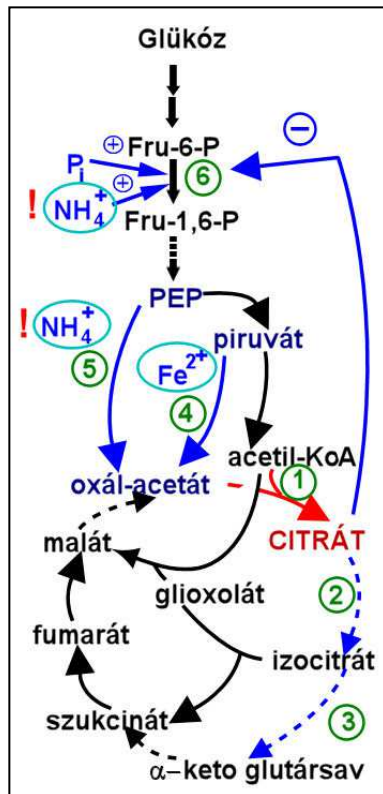
Az *A. niger*-ben a túltermelést más mechanizmus okozza: a mitokondrium membránjában megtalálható egy trikarbonsav karrier enzim, mely antiporttal szerves savakat cserél ki a mitokondrium és a citoszol között. Működéséhez egy szerves savat igényel viszonylag magas koncentrációban, emiatt általában inaktív. Az *A. niger*-ben azonban cserepartnerként szolgál az a malát, ami az anaplerotikus reakció termékeként feldúsul a citoplazmában. A malát hatására a transzporter aktiválódik és kiviszi a citrátot a mitokondriumból. Összehasonlítva az akonitáz és a transzporter reakciósebességét, ez utóbbi nagyságrenddel gyorsabb, így a citromsav nagy részét kiviszi a mátrixból. A cserébe bevitt malát pedig oxálacetáton keresztül citromsavvá alakul.

A citromsavon kívül melléktermékek is megjelenhetnek. Az oxálecetsav a sejtben elbomolhat oxálsavra és ecetsavra. Emellett az *A. niger* mindig termel glükóz-oxidázt, amely a nagy koncentrációjú glükózból és oxigénből glükonsavat képez (lásd a glükonsav fermentációnál).



57. ábra A citrát kilépése a mitokondriumból antiporttal

A megtermelt és a citoplazmába transzportált citromsavat ki is kell vinni a sejtől, ráadásul úgy, hogy a koncentráció a fermentáléban sokkal nagyobb (10-12%), mint a citoplazmában. Ennek megfelelően a citromsav aktív transzporttal, energia befektetésével lép ki a sejtől. Rásegít a folyamatra a nagy különbség a lé (pH=2) és a citoplazma (pH=6-7) aciditása között. A permeázok a kétértékű citrát²⁻ aniont szállítják megfelelően (ez van túlsúlyban a sejtben), míg a kívül, a savas közegben megjelenő, kevésbé disszociált formákat sokkal lassabban. Emellett a citrát-permeáz enzimek Mn²⁺ iont igényelnek, pontosabban a citromsavat kizárólag Mn²⁺ komplex formájában képesek importálni, így Mn²⁺ ion hiányában a permeáz működése egyirányúvá (export) válik. Ezért az ipari fermentációs technológiákban mindig nagyon alacsonyan tartják a mangánion koncentrációt (<2µg/l). Ugyanakkor a mangánhiány fokozza a fehérjék lebomlását, megváltoztatja a lipid bioszintézist, a sejtfa szintézisét, összetételét és morfológiáját is.



58. ábra A citromsav bioszintézist befolyásoló anyagok

4.1.6. Anyagcsere szabályozások

A klasszikus anyagcsere-mérnökség első lépése a reakcióutak, az egymást követő lépések, közttermékek feltérképezése volt. Ennek alapján döntötték el, hogy mely lépéseket célszerű genetikai beavatkozásokkal lezárni, korlátozni vagy de-represszálni. A vizsgálatok következő foka az egyes enzimek tulajdonságainak felderítése, a befolyásoló anyagok, ionok azonosítása. Ennek ismeretében a tápoldat összetételét úgy állíthatjuk be, hogy az enzimaktivitásokat a termékézés fokozása érdekében növeljük, vagy csökkentjük. A tápanyagok koncentrációjának beállításával szabályozhatjuk a folyamatot. Az 3. ábrán láthatók az anyagcsere térkép legfontosabb elemei. Az enzimek számozása:

- 1) Citrát szintetáz – ennek aktivitása legyen nagy
- 2) Akonitáz – ez a citromsavat tovább alakítja, tehát működését le kell lassítani. Mivel a kofaktora a Fe ion, ennek koncentrációját csökkentve az enzim aktivitása csökken.
- 3) Izocitrát dehidrogenáz – ez is a citromsav továbbalakítását katalizálja, így a gyártás szempontjából kedvezőtlen.

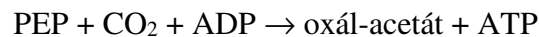
Anaplerotikus reakciók:

- 4) Piruvát karboxiláz:
szén-dioxid fixálással a piruvátból malátot hoz létre:



Ez az enzim Mg^{2+} , Fe^{2+} és K^+ ionokat igényel, azaz a vas ionra itt szükség van, nem lehet teljesen elvonni a fermentléből.

- 5) PEP karboxiláz:
analog módon a C3 egységből szén-dioxid fixálással C4-et hoz létre. Lényeges különbség, hogy míg az előző reakció ATP-t fogyasztott, ez viszont ATP-t termel.



Működéséhez ennek az enzimnek is ionokra (Mg^{2+} , K^+ és Mn^{2+} és ammónium ionra) van szüksége. Így a mangán jelenlétét sem lehet a nullára csökkenteni, parányi, nyomnyi koncentrációban szükség van rá. Az ammóniumion hatása jelentős, ügyelni kell rá, hogy a tenyészet ne kerüljön nitrogén limitbe.

- 6) Foszfofruktokináz

A glikolízis kulcsenzime, a második ATP itt lép be a folyamatba. Evolúciós célszerűség, hogy ha nincs szükség a glikolízis intenzív működésére, akkor a folyamat lefékeződjön. Ne használjon fel a sejt sok ATP-t, ha van elegendő későbbi intermedier. Így a nagy citromsav koncentráció gátolja a foszfofruktokinázt (feed back inhibíció). Ugyanakkor a nagy foszfát és ammóniumion koncentráció kompenzálja ezt a gátlást, mégsem fékeződik le a glikolízis, ezzel a citromsav termelés. Azaz e két ion koncentrációját a folyamat során végig magasan kell tartani.

4.1.7. Termelő törzsek

Gyakorlatilag az összes citromsavat az *Aspergillus niger*, és a hozzá nagyon hasonló *A. wentii* törzssel termelik. Emellett az elmúlt száz évben kidolgoztak *Penicillium citrinum*, *Candida lipolytica* (n-paraffinon), *C. guilliermondii*, *Trichoderma viride* (cellulózon, Kyowa Hakko, J) törzseken alapuló eljárásokat is, de ezek már nem használatosak.

A törzsekkel szemben követelmény, hogy elnyomható legyen az izocitromsav, és glükonsav termelés, valamint működjenek az anaplerotikus reakciók.

A termelő törzsek, változatok screenelésénél a szokásos szelekciós módszerek:

- pH indikátort kevernek az agarba – a színváltozás jelezi a savtermelést;
- a tápoldat pH-ját eleve 1,4–2,0-re állítják be, illetve 20 %-os citromsav oldatot használnak – ilyen extrém körülmények között csak jó termelő törzsek nőnek ki;

4.1.8. Tápoldat

4.1.8.1. Szénforrás

Szénhidrátok: könnyen metabolizálható cukrok, glükóz, fruktóz, szacharóz, vagy az olcsóbb melasz, keményítő hidrolizátum és hulladék szénhidrát tartalmú anyagok.

Az elméleti hozam száz százalék fölötti, glükózra nézve, móltömegekkel: $192/180 = 107\%$, szacharózon 112% ($2 \cdot 192/342$), a valós hozam a sejttömeg képződés és a fenntartási energiáfordítás miatt csak maximum 92% .

Az önköltség szempontjából kritikus tényező a nyersanyag és az előkezelés költsége. A szacharóz a legalkalmasabb szénforrás, de tesztelték a melaszt, a keményítő- és cellulóz-hidrolizátumot, és trópusi gyümölcsök hulladékait (kakaó, banán, szója és ananász).

Az olyan komplex, tisztítatlan nyersanyagok, mint a répa- és cukornád melasz, a nyers keményítő, keményítő hidrolizátum, nyerscukor előkezelést igényelnek. A melasz kiváló szénforrás, szacharóz tartalma $40\text{--}50\%$ és nitrogén tartalma is elegendő. De problémát jelent, hogy általában jelentős mennyiségű, a répa által a talajból fölvevett fémiont, például a kritikus Fe, Mn és Zn ionokat tartalmaz. Ráadásul a melaszok minősége és összetétele változó.

A fémionokat például ioncserével lehet eltávolítani, de ekkor számolnunk kell azzal, hogy a gyanta kapacitása a gyorsan kimerül más ionok megkötésével.

A fermentáció során a vasionok koncentrációját alacsonyan lehet tartani nátrium- vagy kálium-ferrocianid hozzáadásával. Más hasonló ferro- vagy ferricianid sók is megfelelők, adagolásuk történhet oltás előtt vagy később, a termelő tenyészethez. Ezek a sók összetett anionokat alkotnak a vas ionokkal. A komplexek kicsapódnak, pontosabban oldatósági szorzatuk egy nagyon alacsony vasion koncentrációt állít be.

Szénhidrogénekből (C_9 – C_{30} n-paraffin frakció) *Candida lipolytica* törzssel jó konverzióval (145% , g citromsav/g paraffin) lehet citromsavat gyártani, de technikai és gazdasági okok miatt az eljárás versenyképtelenné vált. Probléma az alkánok rossz vízdoldhatósága (emulzió képzés) és a nagyobb arányban keletkező izocitromsav. Emellett meg kell szabadulni a szénhidrogén nyomoktól, mert egyesek karcinogének. Az olcsó kőolaj idején, a múlt század hatvanas-hetvenes éveiben gazdaságosan működő gyárat építettek Szardínia szigetén, de az olaj árának ugrásszerű növekedésével az üzemet be kellett zárni.

4.1.8.2. N-forrás

A törzs egyformán jól hasznosítja a szerves és a szervetlen nitrogén forrásokat: az ammónium és nitrát sókat, karbamidot, a melasz nitrogén tartalmú vegyületeit. A szabályozó mechanizmusoknál már említésre került, hogy az NH_4^+ ionok adagolása növeli a foszfo-fruktokináz aktivitást ezzel serkenti a sejtek növekedését és fokozza a citromsav termelést. Az anyagcsere során az ammónia elfogyasztásával a közeg savanyodik - ez fokozza a citromsav képződést,

valamint a pigment és nyálkaképződés is csökken. Ettől tisztább a termék, egyszerűbb a feldolgozás.

P-forrás: az oldható foszfátok deregulálják a foszfo-fruktokinázt, felpörgetik a glikolízist, ezzel elősegítik a citromsav és oxálsav képződést.

4.1.8.3. Nyomelemek:

A Fe, Mn és Zn ionoknak szabályozó hatásuk van a citromsav termelésben kritikus enzimekre. A vasion koncentrációt egy optimális sávban kell tartani, mert egyrészt:

- ha kevés a vas, akkor lassú a növekedés, a cukorfelhasználás és a piruvát-karboxiláz aktivitása csökken;
- másrészt a nagy koncentráció sem jó, mert a vas az akonitáz kofaktora is, a citromsav továbbalakulását fokozza

Az optimális koncentráció a szaporodási szakaszban ~2000 µg Fe/liter, később, a savtermelő szakaszban viszont csak 50-200 µg/l. Melasz szénforrás estében a vastartalmat ioncserével csökkentik. Menet közben a vasionokat K-ferrocianid hozzáadásával lehet megkötni. Ez komplex formában megköti a vasat, és a komplex disszociációs állandója olyan kicsi, hogy a szabad ion koncentráció közelítőleg a kívánt zónába esik. A fémion koncentráció szempontjából fontos a készülékek anyaga is. Ha a fermentor nem jó minőségű rozsdamentes acélból készült, akkor a sav hatására vas és más fémionok oldódnak ki a falából, ami tönkreteszi a fermentációt. A vasionok hatását bizonyos mértékig ellensúlyozni lehet metanol adagolással.

A Mn ion a már tárgyalt módon vesz részt a citromsav importjában, jelenlétében a megtermelt és kiválasztott termék visszaáramlik a sejtbe, ezért is fontos a Mn-szintet 2 µg/l alatt tartani. A melaszt például Mn-mentesíteni kell (ioncserével, a Fe eltávolítással együtt). A mangán káros hatását ellensúlyozni lehet kis mennyiségű rézion adagolásával.

A nyomelemek koncentrációja és aránya befolyásolja a gombafonalak morfológiáját, a pelletképződést is.

4.1.9. Technológiák

Ipari méretekben a citromsavat felületi, szubmerz, és szilárd fázisú fermentációval gyártják. A tápoldat főkomponense valamilyen szénhidrát, kiegészítve szerves vagy szerves nitrogén forrással és megfelelően összeállított ásványi sókkal.

4.1.9.1. Felületi fermentáció

Ez volt az első ipari gyártás, amit 1920 körül dolgoztak ki. Annak ellenére, hogy azóta kifinomultabb és hatékonyabb technológiákat fejlesztettek ki, ezt még mindig alkalmazzák a meglévő üzemekben, mert az energia költségek alacsonyabbak, mint a szubmerz eljárásnál. Ugyanakkor az élőmunka igény viszont magasabb. A jelenlegi gazdasági helyzetben egy új üzem létesítése erre a technológiára nem gazdaságos. Sok technológiai részletet szabadalmaztattak, illetve titokban tartanak. A felületi fermentációnál a micélium sekély tálcákban lévő tápoldat felületén alkot szövedéket. A tálcák felülete 5-8 m², a tápoldat 5-20 cm-es réteget alkot benne. Anyaguk tisztaságú alumínium vagy rozsdamentes acél, mert a savas közeg más fémekből a fermentációra káros fémionokat old ki.

A tálcákat egymás fölött állványokon helyezik el olyan kamrákban, amelyek kialakítása lehetővé teszi a közel aszeptikus (az adott folyamatra ártalmas mikrobaaktól mentes) működést. A tálcák egymás fölött, egy sterilen zárt, de állandó levegő befúvatással ellátott kamrában helyezkednek el.

Cukor szénforrásnál a koncentrációt 20-25%-ra állítják és a tálcákba való kitöltés után a citromsav termelő gombatörzsek spóráival beoltják. A kezdeti pH-t általában 3,5-re állítják, mivel ilyen körülmények között a befertőződéstől nem kell tartani és az oxalát képződése minimális.

Melasz szénforrás használata esetén a tápoldatban hígítással 15% erjeszhető cukor koncentrációt állítanak be. A fémionokat eltávolítják és a tápközeget általában forralással sterilizálják. A folyadékot lehűtés után a tálcákba szivattyúzzák.

Az oltás megoldható közvetlenül spóra szuszpenzióval (100-150 mg spóra/m²) vagy a levegővel befúvatott spórákkal. A nagy spórakoncentráció az oltásnál lerövidíti a termékképzés előtti növekedési szakaszt és a morfológiát inkább a fonalas növekedés irányába tolja el a pellet képződés rovására.

Sok törzsnél a sporuláció fellépése csökkenti vagy gátolja a citromsav képződést. Ennél fogva a körülményeket úgy állítjuk be, hogy a micélium hosszabb ideig növekedjen a spórázás megindulása nélkül. Ez az ammónium ion koncentráció növelésével és nemionos detergenssek hozzáadásával érhető el. A folyamat általában 8-12 nap alatt játszódik le. A lé feldolgozásának első lépése a micélium elválasztása a folyadéktól.

Félfolytonos fermentációnál friss tápoldatot adnak a micélium szövetekhez, ezáltal csökkentik a lag szakasz hosszát az egymást követő ciklusokban. A micélium ismételt használata attól függ, hogy a törzs mennyire hajlamos autolízisre az elsődleges növekedési fázisban.

Érdekes változata a felületi technológiának a többlépcsős fermentáció. Ennél a lé az egymás fölötti tálcák között gravitációsan folyik lefelé és a legalsóról elvett levet dolgozzák fel.

A tálcák között folyamatosan steril levegőt fúvatnak át. A levegőztetésnek az oxigénellátáson túl több funkciója is van, így elviszi a termelt széndioxidot és hőt. A befújt levegőt nedvesítik, mert különben jelentős mennyiségű páráat visz magával, és ezáltal jelentőssé válik a bepárlódás, két hét alatt akár a víz 30-40%-a is elpárologhat.

A konverzió hatásfoka cukorra számolva 65-75 %, a „reaktor” produktivitása 7-8 kg citromsav/m³*nap. Alacsonyabb, mint a szubmerz eljárásnál, de a költségek is kisebbek.

4.1.9.2. *Szilárd fázisú fermentáció*

A szilárd fázisú fermentáció (solid state fermentation, SSF) a környezet szempontjából előnyös, mert csökkenti a hulladék kibocsátást. A különböző mezőgazdasági és ipari szénhidrát-tartalmú hulladékok hozzáadott értéket tartalmazó termékekké alakíthatók. Ez egy egyszerű technika, mellyel a szilárd hulladék anyagokat, mint a rostok, szalma, korpa stb. szubsztrátként hasznosítjuk egy vagy több cellulózbontó törzs szaporításához. A megfelelő termelékenységhez meg kell oldani a megfelelő levegőztetést, ezzel a metabolikus hő eltávolítását és a páratartalom szabályozását. Nagyon fontos a szemcseméret a megválasztása. Kisebb részecskeméret növeli a kitermelést és csökkenti fermentációs időt. Az SSF kultúrák nem érzékenyek a fémionokra, ezek nagyobb koncentrációban sem zavarják a citromsav termelést.

Az SSF fermentációkat legtöbbször tálcákon hajtják végre. A szilárd anyagot gőzzel sterilizálják, majd a felületére permetezik a spórákat. A tenyészetet 10-15 napig nevelik a szubsztrát bonthatóságától és a lebontási sebességtől függően. A penészgombák már a spórák csírázásától kezdve extracelluláris enzimeket, például cellulázokat és amilázokat választanak ki. Ezek a szilárd szubsztrát szénhidrát tartalmát monoszacharidokká bontják és ebből alakul ki a citromsav. Különleges szubsztrát a cukornád baggassz, a cukros lé kipréseleése után megmaradó növényi szár, ami még szacharózt, azaz könnyen bontható cukrot is tartalmaz, ami könnyen citromsavvá alakítható.

4.1.9.3. *Szubmerz fermentáció*

A világ citromsav termelésének túlnyomó részét szubmerz fermentációval állítják elő. Ennek számos előnye van a felületi vagy az SSF tenyésztéshez képest, így kisebb a munkaerő-igény, nagyobb a konverzió és a produktivitás, kevesebb a befertőződés, stb.

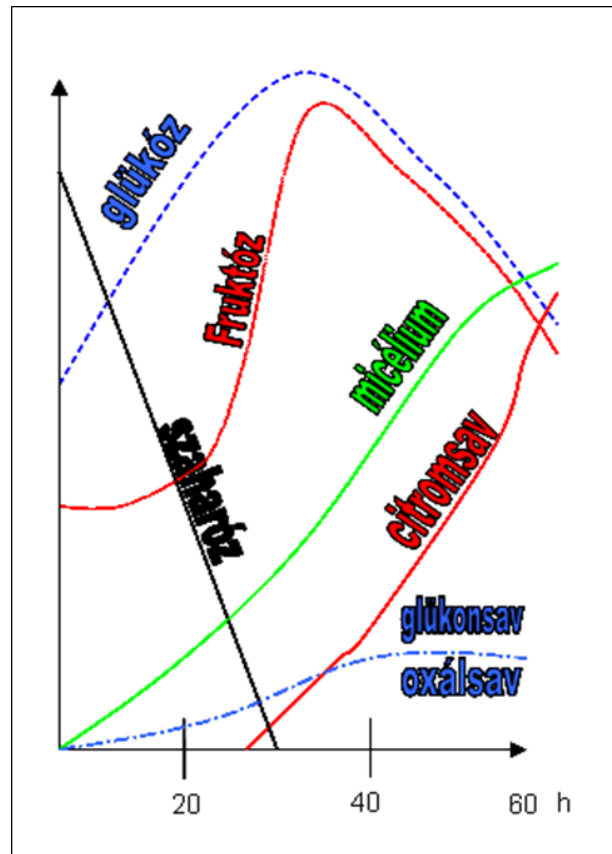
Ipari léptékben az *Aspergillus niger* törzseket használják citromsav termelésre. Szubmerz tenyészetben szigorúan szabályozott környezeti körülmények között, pelletes formában szapo-

rítják. A tápoldat jellemzően 15-20% fémion-mentesített cukrot tartalmaz, ami általában melasz, szacharóz, glükóz vagy fruktóz. Nitrogén forrásként ammónium-szulfátot vagy ammónium-nitrátot használnak, és ezek koncentrációját pontosan az optimális értékre állítják. A nyomelemek koncentrációját is pontosan be kell állítani, különösen a vas, cink, réz és mangán ionokét. Kritikus a mangánion koncentrációja, ezt 2 µg/l (2 ppb = 2 parts per billion) alatt kell tartani.

A fermentor beoltása történhet konidiummal (spórákkal) vagy vegetatív sejtekkel (pellet). Ez utóbbi esetben a lag szakasz és az egész fermentáció mintegy 12 órával lerövidül.

A fermentációs idő a szénforrástól függ, lehet 5-8 nap, de elnyúlhat 10-15 napra is. A fermentáció során előbb egy növekedési szakasz figyelhető meg, a cukorhasznosítás a sejtömeg növekedését szolgálja (2-3 nap pelletképződés). Azután a termékképzési fázis (5-8 nap) során az intenzív citromsav termelés mellett csak kis sejtnövekedés észlelhető. Hossza függ a cukor koncentrációtól, adagolástól, a használt törzstől. Az átállásnál K-ferrocianid betáplálással csökkentik le a vasion koncentrációt.

Az ábrán láthatók a citromsav fermentáció egyes paramétereinek időbeli változásai. A szacharóz invertálódása mintegy 30 óra alatt végbemegy. A felszabaduló glükóz koncentrációja eddig a pontig emelkedik, ezután csökken. Az invertálódással képződő fruktóz átmenetileg eltűnik a diagramról, mert polimerizálódik a transz-fruktoziláz enzim hatására, majd visszaalakul és görbéje a glükózéval együtt halad. A micélium és a melléktermékek koncentrációja egy inflexiós S-görbe mentén növekszik. A citromsav csak az első 30 óra után jelenik meg, ezután meredekebben növekszik, mint a sejtömeg.



59. ábra A citromsav fermentáció lefutása

4.1.9.4. Fermentációs paraméterek

Az *Aspergillus niger* citromsav termelését jelentősen befolyásolja a pH. Jelentős mennyiségű citromsav csak pH=2,5 érték alatt halmozódik fel. A külső pH-nak (~2) csak kis hatása van a citoszol pH-jára (~7). A sejtek elviselik, sőt aktív transzporttal létrehozzák ezt a nagy koncentráció különbséget.

A fermentálé pH-ját 1,5 és 2,8 között szabályozzák. Melasz alapú tápoldat esetén inkább a felső határ közelében. Magasabb pH-n melléktermékek, oxálsav és glükonsav képződnek. A pH=3-6 közötti zónában a citromsav mellett oxálsav és glükonsav is keletkezik. Semleges közeli pH-n már az oxálsav dominál. Az extracelluláris glükózoxidáz enzim pH=5 alatt jelentősen veszít aktivitásából, pH=3-nál teljesen inaktíválódik. Eszerint a pH-t gyorsan három alá kell csökkenteni. A cukoralapú tápoldatoknak alig van puffer hatása, a termelődő sav hatására a fermentálé gyorsan lesavanyodik. A melaszban lévő szerves anyagoknak viszont jelentős a puffer kapacitása, a pH kevésbé csökken. Melasz alapú tápoldatoknál emiatt kénsavval viszik le a pH-t.

Adalék: minden más szerves sav fermentációs előállításánál a keletkező savat közömbösíteni kell, mert a sejtek nem viselik el a savas közeget. A citromsav az egyetlen kivétel, ahol nem lúggal, hanem savval szabályozzák a pH-t.

A hőmérsékletet 28-33 °C tartományban szabályozzák. Efölött megnövekszik az oxálsav képződés, alacsonyabb hőfokon pedig lelassul a folyamat. A citromsav termelése jelentős hőfejlődéssel jár, a fermentlé melegszik. A hő elvonására nagy hűtőfelületeket kell beépíteni a fermentorba.

Levegőztetés, oldott oxigén szint. A tenyészet oxigén igénye nem nagy, de nagyon érzékeny az oldott oxigén szint csökkenésére. Ha csak átmenetileg, néhány percre is a DO 20-30 relatív % alá csökken (például üzemzavar esetén), akkor a citromsav termelés megáll. A levegőztetés megnövelése után az anyagcsere, a sejtek növekedése újraindul, de a citromsav termelés nem, vagy csak nagyon kis sebességgel.

A levegőztetésnek az oxigénellátáson túl több funkciója is van, elviszi a termelt széndioxidot és hő egy részét. A túl nagy levegőáram ugyanakkor visszautíthat, mert egyrészt lecsökkenti az anaplerotikus reakciókhoz szükséges a szén-dioxid szintjét, másrészt erős bepárlódást idéz elő. A levegőt a keverős készülékekbe 0,5-1 vvm árammal táplálják be, de vésztartalékként tiszta oxigén befúvatását is lehetővé teszik. Az air lift fermentoroknál extrém nagy, 10 vvm betáplálást is leírtak.

A folyamat elején a csírázási-növekedési szakaszban kevesebb levegő is elegendő, később fokozni kell a levegőztetést.

Az oxigén bevitelét jelentősen befolyásolja a tenyészet morfológiája. Az *Aspergillus*-ok miceliális növekedésűek, a fermentlében gombafonalak tömege jelenik meg. A fonalak elhelyezkedhetnek rendezetlen szövedékben, ami az anyagátadást megnehezíti, illetve alkothatnak pelleteket. A pellet jelentése szemcse, azaz a fonalak kis gömböket alkotnak. Jellemző méretük 1-2 mm, bár laboratóriumban, rázatott tenyészetben akár ~1 cm-es csomók is előfordulnak.



60. ábra Pelletes növekedés rázott lombikban

A pelletes morfológia az anyag- és impulzusátadás (oxigénbevitel, keverés) szempontjából sokkal hatékonyabb és a fermentlé szűrése is egyszerűbb. A micélium morfológia alakulása a keverés intenzitásától, nyíróerejétől és a pH-tól egyaránt függ. A fonalak hossza pedig befolyásolja a citromsav termelést is. A rövidebb micéliumok több citromsavat állítanak elő.

A levegőztetési rendszerek közül mind a keverő nélküli torony fermentorokat (air lift, merülő sugaras), mind a kevertős fermentorokat alkalmazzák. A torony fermentorok célszerű magasság/átmérő aránya 4:1 -6:1 közé esik. Szerkezetük egyszerűbb, ezért nagyobb térfogattal építhetők (200-1000 m³).

Kontrollált körülmények között a glükóz átalakítása a citromsavvá 87-92%-os konverzióval megy végbe, a törzstől, a szénhidrát alapanyagtól, valamint a technológiai paramétereiktől függően. Az elérhető citromsav koncentráció 120-130 g/l (melaszon). A technológia produktivitása 0,67-0,75 kg citromsav/m³*h; azaz 16-18 kg citromsav/m³*nap, többszöröse a felületi eljárásnak.

4.1.10. Feldolgozás

A fermentlében a folyamat végén 10-13% citromsav halmozódik fel. A technológia második szakasza, a feldolgozás (downstream processing) a tisztított céltermék kinyerése. A műveletsorban meg kell szabadulni a szilárd fázistól (sejtek), a termékhez hasonló kis molekulájú szennyezésektől (pl. oxálsav) és nem utolsósorban a víztől.

4.1.10.1. *A micélium elválasztása*

A szűrhetőség szempontjából a pelletes szerkezet az ideális, a szuszpenzió newtoni folyadékként viselkedik.

A micéliumokat általában vákuum dob-szűrővel választják el. Ha szűrősegédanyagra is szükség van, az ásványi anyagok helyett gyakran növényi melléktermékeket (pelyva, szalmatörek) használnak.

4.1.10.2. *Oxalátmentesítés*

A citromsav-fermentáció során a leggondosabban vezetett fermentációs technológia mellett is mindig képződik kis mennyiségű oxálsav is. A szűrt fermentlé első kezelése ennek elválasztására szolgál. Az elválasztás elve azon alapul, hogy a kalcium-oxalát rosszul oldódik vízben, így az oxálsav mésztejjel reagáltatva lecsapható. A gondot az jelenti, hogy ugyanez igaz a citrátra is, abból is csapadék képződik. A megoldás a kalcium-hidroxid fokozatos hozzáadása, amivel mintegy „megtitráljuk” a fermentlevet. Kevés $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bevitelével az oxalát leválik, míg az egybázisú (mono-)kalcium-citrát (a hárombázisúval ellentétben) elég jól oldódik.

A vasat elvonó ferrocianidot is ebben a lépésben távolítják el. Feleslegben adott FeCl_3 -dal kék színű csapadék képződik. Ez a vegyület a fehér oxalát csapadékot kékes színűre festi.

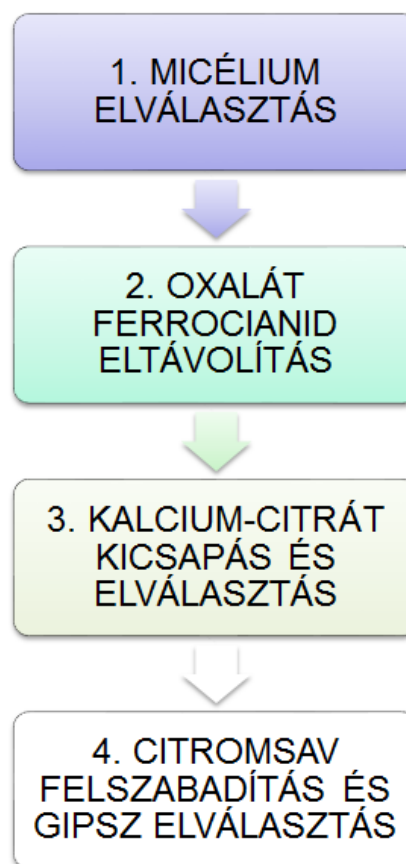
A csapadék kiszűrésére dob-szűrőt, nyomószűrőt vagy Funda-szűrőt alkalmaznak.

4.1.10.3. *A citromsav kicsapása*

A citromsav elválasztásának klasszikus módja a kicsapás kalcium-citrát formájában. Ehhez további mésztejet adagolnak az oldatba, ami teljes mértékben semlegesíti a savat, trikalcium-citrát képződik. A kicsapás mentét befolyásoló technológiai paraméterek:

- a citromsav koncentrációja,
- a hőmérséklet,
- a pH, és
- a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -adagolás üteme

A citromsav-koncentráció adott, ezen nem gazdaságos változtatni. A hőmérséklet hatása egyedi. A legtöbb anyag oldhatósága javul magasabb hőmérsékleten. A kalcium-citrát oldhatósága viszont maximumos függvény, magasabb hőmérsékleten újra csökken (9. táblázat).



61. ábra A nyers citromsav kinyerése

Hőmérséklet °C	oldhatóság g/100 ml
18	0,085
25	0,096
40	0,085
90	0,058 !!

9. táblázat A trikálcium-citrát oldhatósága a hőmérséklet függvényében

A maximális kihozatal érdekében a csapadékos levet forrón, 90 °C-on szűrik. Ezt elősegíti az, hogy a mész beoldásánál, illetve a közömbösítésnél jelentős mennyiségű hő szabadul fel, ami felmelegíti az oldatot. A szűrlet hőtartalmát hőcserélőkkel vissza lehet nyerni, és hasznosítani. A lecsapás hatásfoka semleges közegben a legjobb, ezért a 7 körüli pH beállítására törekednek, túlzott lúgosítás újra javítja az oldhatóságot. A reakcióhoz CaO-ra nézve 18-25%-os oldatot használnak, lassan beadagolva. Így nagyobb kristályok keletkeznek, amelyek kevesebb szennyezést visznek magukkal. A csapadékot a klasszikus vákuum dobszűrőn választják el.

4.1.10.4. Feltárás kénsavval

Gyengébb savat sójából egy erősebb savval lehet felszabadítani. A citromsav gyártási technológia esetében a kénsav a legmegfelelőbb, mert a melléktermékként keletkező gipsz oldhatatlan, könnyen elválasztható a citromsav oldattól. Sósav vagy salétromsav használata esetén a kalcium-klorid, illetve kalcium-nitrát oldatban maradna, és ez megnehezítené a citromsav ki-nyerését. A feltárás tömény (60-70%-os) kénsavval történik. Ez a koncentráció még nem oxidálja a szerves anyagokat, és ugyanakkor nem hígítjuk meg vele túlságosan az oldatot. A kénsavat a sztöchiometrikushoz képest kis feleslegben (+1-2 g/l) adagolják. A képződő gipszet ismét csak vákuum dobszűrőn szűrik le. A melléktermékként képződő kristályvizes gipsz mennyisége igen nagy, 1 tonna citromsav előállításával mintegy 1,4 tonna gipsz képződik. Hasznosítása, illetve elhelyezése egyre nagyobb problémát jelent.

4.1.10.5. Tisztítás adszorpcióval

A feltárással kapott citromsav oldat még színanyagokat és ásványi ionokat tartalmaz. Ezekről oszlopokban végrehajtott adszorpcióval szabadulhatunk meg. A színanyagokat aktív szénnel töltött oszlopon lehet megkötni. Az ásványi sók ionjait ioncserélő gyantákkal lehet eltávolítani, „flow through” technikával, azaz nem a főkomponenst kötjük meg a kolonnán, hanem a szennyezéseket. A termék átáramlik az oszlopon, nincs szükség elúcióra. Ipari léptékben nem egy-egy oszlopot telepítenek, hanem több tucat vagy akár száz, egyenként néhány köbméteres kolonnát kapcsolnak össze egy teleppé. Ezek egy része dolgozik, más részét egyidejűleg regenerálják, így lehet biztosítani a folyamatos üzemmenetet.

4.1.10.6. Koncentráció bepárlással

A tisztított citromsav oldat koncentrációja 200–250 g/l, ez még nem kristályosítható, tovább kell töményíteni. A koncentráció célszerű művelete ennél a termékénél a bepárlás. A biológiai anyagok esetében ritkán alkalmaznak bepárlást, mert a legtöbb ilyen anyag hőérzékeny. A citromsav-technológiánál kíméletesen, azaz alacsony hőmérsékleten, rövid tartózkodási idővel történik a bepárlás. Többfokozatú, többtestes vákuumbepárlót használnak, ahol az utolsó fokozatban a tömény oldat hőmérséklete nem haladja meg a 40 °C-ot.

4.1.10.7. Kristályosítás

A betöményített oldat lehűtve már tútelítetté válik, belőle a citromsav kristályosítható. A művelet kritikus paramétere a hőmérséklet. 36,5 °C alatt ugyanis a sav egy kristályvízzel, e fölött pedig vízmentesen kristályosodik. A citromsav-monohidrát jobban kezelhető, stabilabb és nem utolsósorban esztétikusabb anyag, ezért ennek létrehozására törekednek. A vákuumbepárlás után a ~40 °C-os oldatot 20-25 °C-ra hűtik, ebből válnak ki a kristályvizes kristályok. A citromsavgyártás olyan nagy léptékben folyik, hogy érdemes folyamatos kristályosítókat alkalmazni. Ezekben az állandósított körülmények hatására állandó tisztaságú és állandó méreteloszlású kristályok jönnek létre. A kristályok elválasztása és mosása általában szűrőcentrifugában történik. Az anyalúg még jelentős mennyiségű terméket tartalmaz, ezt visszavezetik a technológiába, a tisztítási lépések elé, és újra feldolgozzák.

4.1.10.8. Szárítás

A szűrőből kikerülő mosott kristályok felülete nedves. Ezt a maradék folyadékot

62. ábra Kristályos citromsav előállítása

szárítással távolítják el. Ez a folyamat is tulajdonképpen bepárlás, pontosabban a felületen lévő folyadék szárazra párolása. Alapvető különbség, hogy a szárításnál a hőközlésre meleg levegőt alkalmaznak. A művelet során újra jelentkezik a kristályvízvesztés veszélye. A száradó anyag hőmérséklete nem haladhatja meg a 36,5 °C-ot. Emiatt vagy vákuumszárítókat használnak, vagy igen nagy mennyiségű, közel szobahőmérsékletű levegővel szárítanak.



4.1.11. Melléktermékek, szennyvíz

A citromsav gyártási technológia sajnos sok járulékos anyag termelődésével jár, ezek hasznosításáról, elbontásáról vagy deponálásáról is gondoskodni kell. Ezek a tételek jelentősen befolyásolják a gyártás gazdaságosságát is. 1 t citromsavra számítva a következő anyagmennyiségekkel kell számolni:

Micélium: ~135 kg

Aspergillus niger biomassza, szűrősegédanyaggal keveredve. A sejtömeg 25-30% fehérjét és 15-20% szénhidrátot tartalmaz. Ugyanakkor jelentős mennyiségű nehezebben bontható sejtfa anyagot is van benne. Értékesíthető, ha takarmányadalékként tápokba keverik. Ennek viszont előfeltétele, hogy a szűrősegédanyag biológiai anyag (korpa, rost, törek) legyen, az ásványi segédanyagokat nem fogyasztják az állatok. A savanyú íz nem okoz gondot, azt szívesen fogyasztják (vö.: silótakarmány). Kevesebb hasznot hoz, ha a biomasszát biotrágyaként szántóföldekre szórják ki, ezzel javítják a talaj szervesanyag-tartalmát. Lúgos előkezeléssel a papír-ipar is használhatja a cellulóz alapanyagok mellett. Ha nincs más megoldás, biogázosítással fűtőgázt is elő lehet állítani belőle.

Gipsz: ~1,4 tonna

CaSO₄ x (1-2 H₂O), el nem bontható melléktermék. Az építőipar valamennyit felhasznál belőle, de ekkora mennyiséget nem képes felvenni. Ráadásul ez kristályvizes gipsz, ezt ki kell izzítani, hogy kötőképes legyen. Általában lerakóra kerül.

Szennyvíz: ~8 m³

Szárazanyagtartalma 5-6%, kémiai oxigén igénye igen nagy, KOI ≈ 50 000 mgO₂/l. Ezt szennyvíztisztítóban elbontani nagyon költséges. Célszerűbb inkább bepárlással feldolgozni, a szárazanyagtartalmat 65-70%-ra növelni. Ezt a koncentrátumot lehet takarmány kiegészítőként értékesíteni (pl. Citragil néven forgalmazzák). Az árbevétel nem fedezi a bepárlás költségeit, de kisebb a veszteség, mint a szennyvíztisztítás költsége.

Más lehetőség a szerves anyag hasznosításra az egysejt-fehérje előállítása. Erre a célra szelektált *Torula* élesztő szaporításával 14 kg/m³, azaz 112 kg/tonna takarmányélesztőt lehet előállítani.

Erre az anyagra is lehet biogáz gyártást alapozni. ANAMAT néven egy kombinált eljárást fejlesztettek ki, amely aerob és anaerob lépések után teljes mineralizációhoz vezet, gyakorlatilag mindent metánná, vízzé és szén-dioxiddá bont le.

4.2. ECETSAV GYÁRTÁS

A bor ecetesedése történelem előtti időktől ismert folyamat, egyidős a borkészítéssel. Ez a két folyamat a legősibb, spontán is végbemenő biotechnológiai eljárás: a must cukortartalma → borra erjed → a bor „megecetesedik” → borecet keletkezik. Az ecet tudatos gyártása és konyhai hasznosítása szintén ókori eredetű. Élelmezési célra évente 2-3 millió m³ ecet készül, aminek koncentrációja 10-15%, azaz ebben 300-400 ezer tonna tiszta ecetsav található.

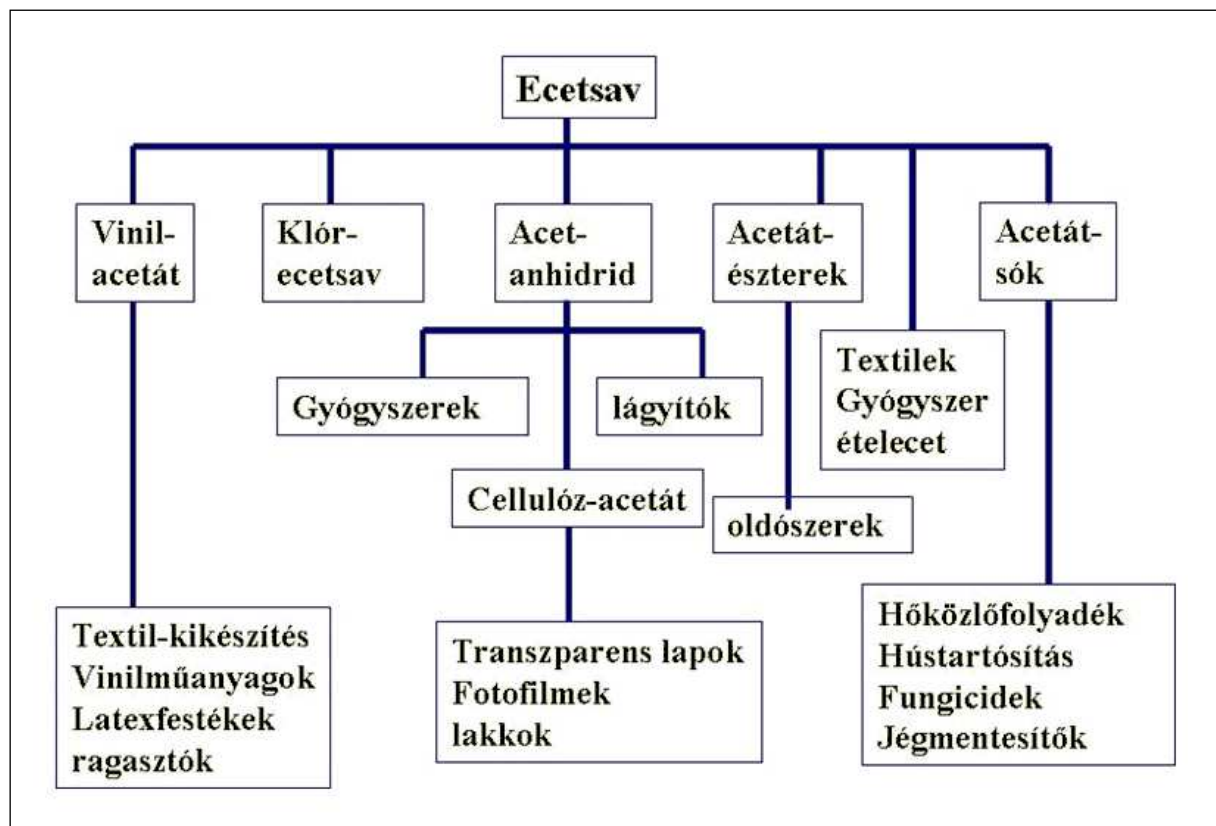
Vegyipari alapanyagként jelentős mennyiségű ecetsavat állítanak elő kémiai szintézissel is, mégis élelmiszeripari célra csak az ecetsav baktériumok által termelt, tehát biológiai úton nyert ecetet használják. A teljesség kedvéért tekintsük át, hogy milyen kémiai reakcióutakon lehet ecetsavat előállítani:

- Metanol karbonilezése
- Acetaldehid oxidációja
- Etilén oxidációja
- Fa száraz lepárlása

A kémiai szintézissel gyártott ecetsavat önmagában, erős savként is számos célra alkalmazzák, így fémfelületek tisztítására (erős, de nem korrozív sav), vízkőoldásra, stb. Kísérleti stádiumban van egy újabb nagy léptékű alkalmazás is, télen az utak jégmentesítésére a környezetszennyező sók helyett Ca- vagy Mg-acetátot szórnak ki.

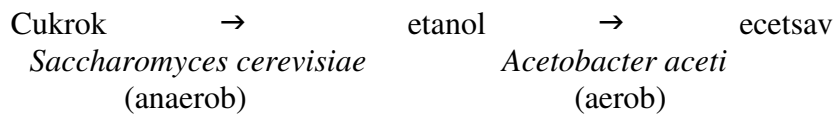
Vegyipari reakciók alapanyagként is nagyon szerteágazó a használata (63. ábra).

A biológiai úton termelt ecetsavat elsősorban az élelmiszeriparban hasznosítják, a savanyú íz beállítására, illetve tartósításra.

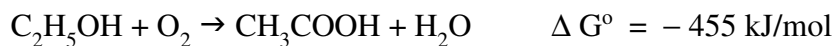


63. ábra Az ecetsav ipari felhasználása

A biotechnológiai úton az alapanyag etilalkohol, tehát tulajdonképpen két fermentációs lépés kapcsolódik össze.



Az ecetsav képződésének bruttó leírása:



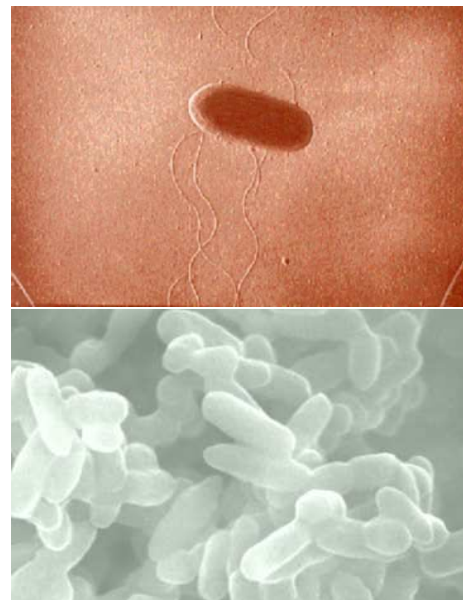
Az ecetsav baktériumok az alkoholt molekuláris oxigén felhasználásával ecetsavvá oxidálják.

4.2.1. Az ecetsav-baktériumok

Az alkoholt ecetsavvá oxidáló mikroorganizmusokat általában ecetsav-baktériumoknak nevezzük. Polimorf, Gram negatív baktériumok, sejtjeik ellipszoid vagy pálca alakúak; melyek egyenesek vagy enyhén hajlítotak; 0,6-0,8 µm hosszúak (=aprók); egyesével, párokban vagy láncokban fordulnak elő. Mozgásra képtelen és mozgásra képes formái is előfordulnak, poláris vagy peritrich flagellummal rendelkeznek. Obligát aerobok, bizonyos fajai pigmentet, míg más fajai cellulózt termelnek.

Az ecetsav baktériumok osztályozása

Az *Acetobacteraceae*-n belül 3 genus különíthető el: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Frateuria*. Ebner és Follman többször is megkísérelték az ecetsav-baktériumok osztályozását. A legfontosabb segítség a pontos taxonómia kialakításában a Gillis és De Ley DNS-rRNS hibridizációs tanulmánya. A legfontosabb következtetés, hogy a korábbi osztályozás alapján elkülönített két csoport, az *Acetobacter* és a *Gluconobacter* igazából közeli rokonságot mutat. Az *Acetobacter*-félék erősen savas közegben az ecetsavat túloxidálják CO₂-dá és vízzé, míg a *Frateuria* és a *Gluconobacter* család nem.



64. ábra Ecetsavbaktériumok



65. ábra *Gluconobacter*

Acetobacter

Frateuria

A törzsek izolálása és azonosítása sok problémával jár. Az ecetgyártásban mindig olyan ecetsav baktériumokkal dolgoznak, amelyek nem tiszta tenyészkultúrákból származnak. A fermentáció során használt baktériumokat nehéz taxonómiai osztályokba besorolni. A természetben (és az ipari félfolytonos/folytonos eljárásoknál is) vegyes kultúrákat alkotnak, sok, jelentősen eltérő altípussal és spontán hibridekkel. A fenotípusos megkülönböztetés is nehéz, mert egy faj különböző baktérium törzsei nem feltétlenül hasznosítják ugyanazt a szénforrást. Az *Acetobacter* törzs egy új fajt izolálták Németországban és Svájcban is, erősen savas fermentációkból. Ezt a fajt *Acetobacter europaeus*-nak nevezték el. Az összes vizsgált törzs, amit szubmerz fermentációból izoláltak csak kis mértékben mutatott DNS-DNS hasonlóságot a hagyományos *Acetobacter* törzsekkel. Viszont szignifikánsan meg lehet különböztetni az *Acetobacter europaeus*-t az *Acetobacter* nemzetség többi tagjától azért, mert ez a faj erősen toleráns 4-8%-os ecetsavra AE-agarban.

A törzseket szilárd és félszilárd táptalajon nehéz tenyészteni, folyadékban meg nehéz „szélesíteni”. Jelentős előrelépést értek el Japánban, ahol speciális dupla rétegű agaron tenyésztették ki a baktériumokat (*Acetobacter polyoxigenes*).

Az iparban használt ecetsav baktérium törzsek

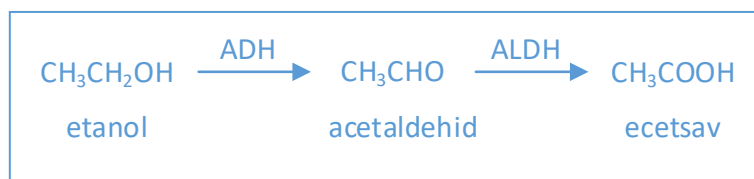
A fermentáció oltóecet beoltásával kezdődik meg, ez egy mikrobiológiailag meghatározatlan maradéka az előző fermentációnak. Ha megfelelő ecetsav toleranciájú és tápanyagigényű baktériumtörzsszel dolgozunk, évekig fenntartható a fermentáció anélkül, hogy félbeszakadna a folyamat vagy csökkenne a hozama, illetve a hatékonysága. Iparban használt törzsektől elvárt tulajdonságok:

- tolerálja a nagy ecetsav és alkohol koncentrációt
- kis tápanyagszükséglet
- ne lépjen fel túloxidáció
- magas hozamot produkáljon
- fágerezisztens legyen.

4.2.2. *Az ecetsav képződés biokémiája*

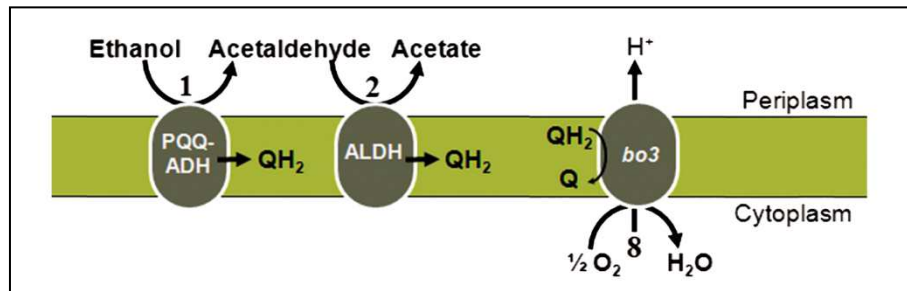
A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz).

Több ecetsav-baktériumból is sikeresen tisztítottak alkohol-dehidrogenáz enzimet, ilyen irányú kutatásokat főleg *Acetobacter aceti*, *A. rancens*, *G. suboxydans* baktériumokkal végezték. Az ADH proszтетikus csoportja PQQ (pirrolo-kinolin-kinon), ez veszi át a hidrogéneket.



66. ábra Az ecetsav képződése

Az enzimek a citoplazma membránba épülnek be. A hidrogéneket ubikinonnak adják át. Az ubikinol visszaoxidálása során a terminális oxidációhoz hasonlóan molekuláris oxigénnel víz képződik és proton exportálódik a periplazmikus térbe. A protonok visszaáramlásával a sejt ATP-t termel, így nyer energiát a folyamatból.



67. ábra Az ecetsav képződésének enzimeit és koenzimeit

4.2.3. Tápanyagok, szubsztrátok

A tápoldat fő komponense a tisztított és hígított etilalkohol. A legtöbb országban az ilyen célra szánt alkoholt denaturálják, az USA-ban etil-acetáttal, Európában pedig ecetsavval.

Az alkoholtartalmú tápoldatot cefrének nevezik. Az alkoholtartalmat térfogatszázalékban adják meg. Az oldat általában kis mennyiségben ecetsavat is tartalmaz, ezt vegyes százalékban (gramm ecetsav/100 ml oldat) mértékegységben fejezik ki. A két különböző mértékegységű koncentráció számértékének összegét összkoncentrációnak nevezik, ez közelítőleg megadja a teljes fermentáció alatt kinyerhető maximális ecetsav koncentrációt. Az eltérő mértékegységek látszólag értelmetlen használata azért praktikus, mert figyelembe véve a két anyag móltömegének és sűrűségének különbségeit az anyagok átalakulása során az összkoncentráció nem változik. Egy tf% alkoholból közelítőleg egy m/v% ecetsav keletkezik. A kinyert ecetsav koncentráció és az összkoncentráció hányadosa a hozam.

Az ecetsav fermentáció során az etanol teljes mennyisége ecetsavvá oxidálódik. Általában a kitermelés 95-98% körül szokott lenni, a maradék elveszik a kiáramló gázzal. Közben az esetleges egyéb szénforrás (pl. glükóz) oxidálódik, ennek termékei H₂O és CO₂.

Az étkezési ecetek gyártásánál a tiszta alkohol helyett különböző természetes, erjesztett, alkoholtartalmú leveket használnak nyersanyagként. A borecetnél bor, az almaecetnél az almabor az alapanyag. A maláta ecet az árpa vagy egyéb gabona forrázatának az alkoholosan erjesztett (sörszerű) levéből készül. A rizsecet pedig elcukrosított rizsből készül alkoholos és ecetsavas fermentációval.

A balsamecetek az ecet mellett sok cukrot (gyümölcslé, szirup) is tartalmaznak.



68. ábra Ízesítő ecetek

Szénforrások

Acetát

Az *Acetobacter* törzsek képesek a citromsav-cikluson keresztül hasznosítani az acetátot és a laktátot, de a túloxidáció minimalizálására törekszünk.

Cukrok (glükóz, szacharóz): könnyebben beépülnek a sejt anyagába, mint az acetát. Ezeket az ecetsav baktériumok a pentóz-foszfát úton hasznosítják. A fermentáció indításához kis mennyiségben adagolják.

Szén-dioxid

A sejtek igénylik szén-dioxidot a növekedéshez. A szén-dioxid asszimilálódik a sejt anyagába, a sejt széntartalmának ~0,1%-a ebből származik. Nagyon kis mennyiségű ecetsav is ebből a CO₂-ből származik.

Nitrogén-forrás:

Szerves szénforrás jelenlétében sok ecetsav-baktérium törzs képes ammónium ionokat is nitrogénforrásként felhasználni. Egyes törzseknek viszont aminosavakra is szüksége van.

Növekedési faktorok:

Egyes törzsek növekedési faktorokat/vitaminokat igényelnek (p-aminobenzoészav, niacin, tiamin, pantoténsav), illetve ezek jelenlétében jobban termelnek. Az *A. aceti* törzsnél halmozottan pozitív hatást érhetünk el glutation és Na-glutamát együttes adagolásával. A növekedési faktor szükséglet a szénforrás ellátástól függ.

Szervetlen sók

Természetes nyersanyagoknál általában nincs szükség további tápanyag hozzáadására. Bár az almaborban kevesebb nitrogéntartalmú vegyület van, de ez feljavítható ammónium-foszfát hozzáadásával. Néhány szőlőborhoz is szükséges ammónium-foszfátot adni az optimális fermentációhoz.

Tiszta alkohol alapú ecetsav gyártásnál mindenképp szükség van kálium, nátrium, magnézium, kalcium, ammónium (ammónium-foszfát formájában), szulfát és klorid hozzáadására. Ezen kívül nyomelemekre: vas, mangán, kobalt, réz, molibdén, vanádium és cink is szükség van. Kereskedelmi forgalomban található tápanyag keverékek további adalékokat is tartalmaznak, mint például szárított élesztőt.

Etanol

Az ecetsav-baktériumok károsodhatnak, ha a fermentáció során az összes etanol oxidálódik és az etanol tartalmú friss tápoldat hozzáadása nem történik meg időben. Az etanol hiánya a légzési lánc kiesése miatt az oxigénhiányhoz hasonlóan megzavarja a fermentációt. A kár mértéke a teljes koncentrációtól és az etanol hiány idejétől függ. A **túloxidáció** az a nem kívánatos reakció, mely során az ecetsav tovább oxidálódik és CO₂ és H₂O keletkezik. Ezt megelőzhetjük, ha az összkoncentrációt magas értéken tartjuk és az etanolt állandóan pótoljuk. Ennek érdekében célszerű az etanol koncentrációt folyamatosan mérni. A Frings cég által kifejlesztett Alkosens időkésés nélkül méri az etanolt a fermentáléban. A szenzor működése membrándiffúzió alapszik, ezért csak állandó hőmérsékleten ad megbízható eredményeket.

Oxigén

Az *Acetobacter*-ek obligát aerobok, a fermentáció során nagy mennyiségű oxigénre van szükség, ezért nagyon fontos a megfelelő levegőztetés. Kiterjedt kutatások bizonyítják, hogy a levegőztetés megszakítása a fermentációban zavart okozhat,



69. ábra Frings Alcosens

például az ecetsav koncentráció vagy a fermentációs sebesség csökkenését. Az oxigén ellátás zavara is éles esést okoz az oxidációs sebességben, illetve az enzimek aktivitásában. Minél hosszabb időre szakad meg a levegőztetés és minél nagyobb cefre összkoncentrációja, annál erősebb a hatás. Egy 11-12%-os összkoncentrációjú elegynél a 15-60 mp-ig tartó levegőztetés kimaradás ugyanakkora kárt okoz, mint az 5%-os összkoncentrációjú elegynél a 2-8 perces.

Ugyanakkor a levegő nagy térfogatárama sok illékony komponenst (ecetsav és etanol) visz magával, ezzel veszteséget okoz. Ezt úgy szokták csökkenteni, hogy az elmenő levegőt egy tartályban vízen buborékoltatják át, és az elnyeli az illó komponenseket. Az így kapott vizes oldattal készítik el azután a következő fermentáció tápoldatát.

4.2.4. Levegőztetési megoldások

Felületi fermentáció, Orleans-i eljárás

Régebben használták borecet készítésére, ilyen módszer az Orleans-i eljárás, ahol álló fahordóba vezették a bort, a hordó felső részében légzőnyílásokat alakítottak ki és szobahőmérsékleten állni hagyták. Az ecetsavbaktériumok a levegővel jutottak a bor felszínére és elkezdtek a borban lévő etilalkohol átalakítását ecetsavvá. A keletkező ecetsav elvezethető a hordó alsó részéből. Kiváló minőségű ecetet lehetett így előállítani.

Újabb típusú felületi fermentációknál egy sekély folyadékréteg felületén baktérium filmet alakítanak ki. A folyadékot (cefre) áramoltatják. A folyadék mélysége ~10 mm, az kifolyó ecetsav koncentrációja 5-6%.

Mozgócefrés fermentáció

A mozgócefrés fermentorok töltött oszlopnak tekinthetők, bennük bükkfa forgácsot, nyírfa gallyakat vagy kukoricacsutkát használtak hordozó anyagként. Az ecetsav baktériumok a töltet felületén telepedtek meg, biofilm alakult ki. Az alkoholtartalmú cefrét felülről locsolták a töltetre, ezzel egyidőben alulról a hézagokban felfelé áramoltatták a levegőt. A lecsorgó folyadékot újra rávezették a töltetre, recirkuláltatták (innen a mozgócefrés elnevezés), mindaddig, amíg az átalakulás teljesen végbe nem ment. Nagy, fából készült tartályokat (akár 100 m³) építettek erre a célra.

A belső tér nem steril, de a befertőződéstől védi az alkoholtartalom és a savas pH. Viszont a biofilmben gyakran megtelepszik egy nagyon specializálódott baktériumfaló fonálféreg, az „ecetangolna” (*Anguillula aceti*).

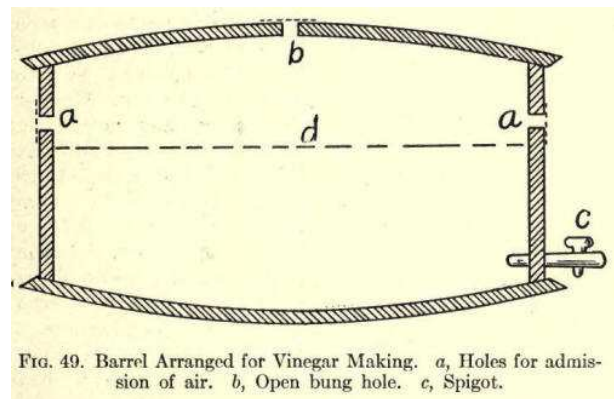
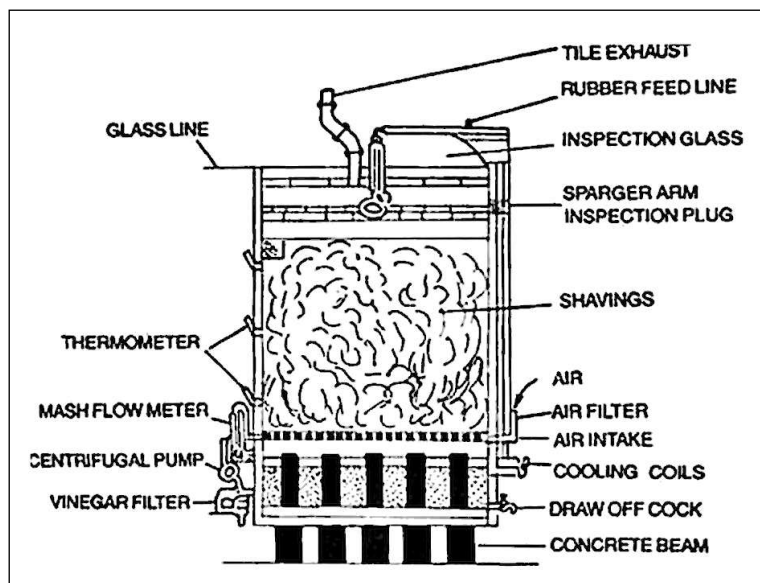


Fig. 49. Barrel Arranged for Vinegar Making. a, Holes for admission of air. b, Open bung hole. c, Spigot.

70. ábra Orleans-i ecetgyártás



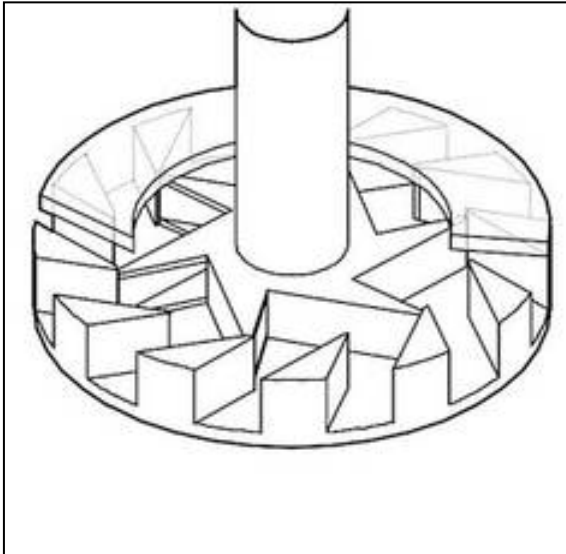
71. ábra Mozgócefrés ecetsav generátor

Szubmerz, levegőztetett fermentáció

A szubmerz fermentációknál intenzív levegőztetésre van szükség, keverős és air-lift megoldást egyaránt alkalmaznak. Különleges megoldás a Frings-acetátor (önbeszívó turbinakeverő).

Frings acetátor

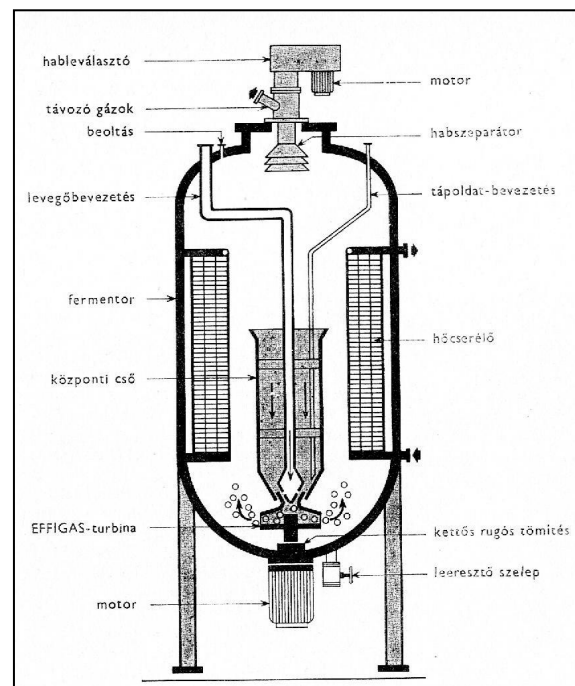
A Frings levegőztető önbeszívó rendszerű, nincs szüksége kompresszorra, a környezetből szívja be a levegőt egy szívócsövön keresztül. A motor alulról forgatja, és a levegőt felülről, a tengelycsövön át szívja be, és eloszlatja. Egy belső forgó- és egy külső állórészből áll. A for-



72. ábra A Frings turbina és turbinaház (forgó- és állórész) kialakítása

górész voltaképpen egy centrifugál-szivattyú, ami a tengelynél levegőt és fermentlevet szív be, a kerületén kilépő keverék átpréselődik a sztátor csatornáin, és erős vízszintes áramlás jön létre. A levegőztetés sebességét úgy kell megválasztani, hogy az a levegő egyenletes eloszlását biztosítsa a fermentor teljes keresztmetszetén. Mivel nem lehet teljesen kiküszöbölni a habképződést, az acetátor egy mechanikai habtörővel van felszerelve. A gyorsan forgó habtörő leválasztja a habból a folyadékot és visszaengedi a fermentorba. Az elpusztult baktériumok lízise során fehérjék szabadulnak ki, amelyek fokozzák a habzást. Mivel az intenzív levegőztetés okozza a habzást, ezért a habtörőnek a ciklus nagy részében működni kell.

A Frings Acetátor a legelterjedtebb eszköz ecet gyártására. 1996 végére 642 Acetátor működött a világ minden részén, teljesen automatizáltan, teljes termelése $1,5 \cdot 10^6$ m³/év ecet volt, 10%-os ecetsavra átszámítva. Energia fogyasztása 400 Watt.h/liter etanol, kitermelése 98% feletti.



73. ábra A Frings acetátor metszete



74. ábra Frings turbinák, motorral szerelve (katalógus fotó)

4.2.5. Technológiák

A szubmerz gyártásoknál félfolytonos és folytonos fermentációs technológiákat egyaránt alkalmaznak.

A 12-15%-os ecet gyártását félfolyamatos módszerrel végzik. Itt minden fermentációs ciklusnak azonos hosszúságúnak kell lennie. Amikor az alkohol koncentráció 0,05-0,3% közé csökken, a fermentlé egy részét eltávolítják a fermentorból, majd újratöltik 0-2% ecetsav tartalmú és 12-15% alkohol tartalmú cefrével. Az újratöltést lassan, erőteljes kevertetés és állandó hőmérséklet mellett kell végezni. A fermentor töltése során ugyanolyan összkoncentrációjú cefrét kell betölteni, mint az előző ciklusban, és közben kevertetni kell, mert a helyileg kialakuló nagy koncentráció károsíthatja a baktériumokat. A következő ciklus lag fázis nélkül indul el. Az állandó hőmérséklet érdekében a beadagolt cefrét elő kell melegíteni.

Egylépcsős félfolytonos

1994 óta lehetséges töményebb, 19%-os ecetsav gyártása módosított fermentációval. A cefrét és a többletalkoholt külön program szerint adagolják. Az előzőhöz hasonló kiindulási cefrével indítják a folyamatot, majd lassan adagolják a többlet alkoholt. Az alkohol adagolást addig folytatják, amíg el nem érik a kívánt (19%) összkoncentrációt. Az oxidáció végbemegy, és amikor az alkohol koncentráció lemegy nullára, a fermentlé egy részét lefejtik és a helyébe a hígabb cefrét táplálják be. Később újból alkohol adagolásával növelik az összkoncentrációt.

Kétlépcsős félfolytonos

A konzerviparban magas ecetsav tartalmú ecetre van szükség. A kétlépcsős folyamat során 15%-os és ennél nagyobb ecetsav tartalmú ecetet lehet gyártani. Amikor az első fermentorban az ecetsav koncentráció eléri a 15%-ot, a fermentlé 30%-át áttöltik a második fermentorba és az első fermentort újratöltik alacsonyabb összkoncentrációjú eleggyel. A második fermentorban folytatódik a fermentáció, az alkoholt lassan adagolják hozzá, amíg el nem érik a 18,5%-os összkoncentrációt és a konverzió majdnem teljes nem lesz, ekkor a levét lefejtik.

Folyamatos fermentáció

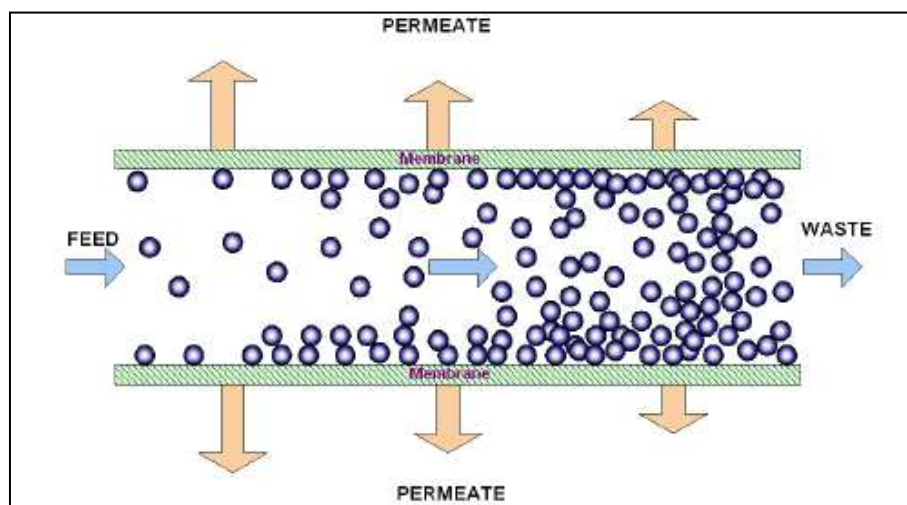
Az elérhető ecetsav koncentráció csak 9-10%, mivel meg kell találni a kompromisszumot a növekedés, a termékképzés, a sejt és a szubsztrát koncentráció között. Az állandósult állapotban a nagy ecetsav és kis maradék alkohol koncentrációra törekszünk, de az alacsony állandósult etilalkohol koncentráció viszont lecsökkenti a baktériumok fajlagos növekedési sebességét, ezzel a hígítási sebességet, azaz a kilépő termékáramot.

Kísérletek immobilizált ecetsav baktériumokkal

A mozgócefrés eljárás biofilmje is tulajdonképpen immobilizálásnak tekinthető, de pl. Japánban sok kísérlet folyik rizsecet vagy gyümölcsacet gyártására immobilizált ecetsav baktériumokkal. A rögzített sejteket félfolytonos fermentációban, airlift bioreaktorokban alkalmazták. Karragénan gél gyöngyökön immobilizált ecetsav baktériumokkal nagy fajlagos növekedési sebességet és respirációs aktivitást értek el. Más hordozó anyagoknál, mint a polipropilén rostoknál a 3%-os, míg méhsejt szerkezetű kerámia monolitnál maximum 4%-os ecetsav koncentráció érhető el. Kalcium-alginát gél gyöngyökkel fluidizált reaktorban pedig 3,5%-os ecetsav koncentráció nyerhető ki.

Feldolgozás

A fermentleából a sejtek eltávolításánál problémát okoz, hogy az *Acetobacter* sejtek nagyon aprók, centrifugálással, szűréssel alig választhatók el. Célszerűen membránszűréssel (mikroszűréssel) távolítják el, ehhez nem szükséges szűrési segédanyag.



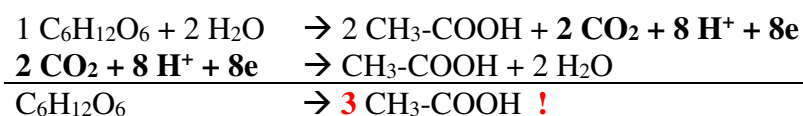
75. ábra Keresztáramú (cross flow) szűrés üreges szál (hollow fiber) modulban

Az ecetsav bepárlással töményíthető, de nem tisztítható, mivel a víz az illékonyabb komponens, elpárolgatásával az ecetsav és a nem-illó szennyezések koncentrációja nő (az ecetsav forrponjtja = 118 °C).

4.2.6. Homoacetogének

Új lehetőséget jelentett az ecetsav gyártásban a homoacetogének alkalmazása. A *Clostridiumok* között sok faj autotróf módon H₂/CO₂ vagy CO gázkeveréken is tud szaporodni. Egyes kemoautotróf reakciókra képes fajok a glükóz szénforrás mellett 2 CO₂-ből autotróf CO₂ fixálással egy új acetyl-CoA-t hoznak létre (termofil homoacetogének: *Clostridium thermoacetikum*, *Cl. thermoautotrophicum*). Ezek egy glükóz molekula felhasználásával három ecetsavat termelnek, ezért kapták a homoacetogén gyűjtőnevet.

A bruttó reakcióegyenlet:



A folyamat nyilvánvaló előnye a +50% hozam (100 g cukorból az elméleti hozam: 100 g ecetsav, ebből gyakorlatilag 90-95 g érhető el). A fermentort nem kell levegőztetni, viszont a szén-dioxid betáplálás lehetőségét meg kell oldani.

Hátránya viszont, hogy a törzsek növekedése, anyagcseréje lassú. Összehasonlító kísérleteket végeztek különböző fermentációs technikákkal.

A szakaszos fermentációnál a keletkező savat dolomittal (fő komponense: $MgCO_3$): semlegesítették. A nagyobb termékkoncentráció érdekében glükóz rátáplálást alkalmaztak, így 12%-os termékkoncentrációt is elértek.

Az aerob eljárásokhoz hasonlóan félfolytonos technikát is kidolgoztak, 50% lefejtési aránnyal.

A folyamatos fermentáció nagyobb produktivitást, de jóval kisebb termékkoncentrációt eredményezett.

A legnagyobb produktivitást egyfajta rögzített sejtes módszerrel érték el. Egy forgó dob felületén biofilmet alakítottak ki, amely csak periodikusan merült a fermentlébe.

Fermentáció típusa	Produktivitás ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	Ecetsav konc. ($g \cdot l^{-1}$)
Szakaszos, rátáplálással	0,9	120
Folyamatos	2,5	7
Folyamatos sejtviisszatáplálással	4	22
Forgódobos (biofilm) eljárás	10	37

10. táblázat *Homoacetogén technológiák összehasonlítása*

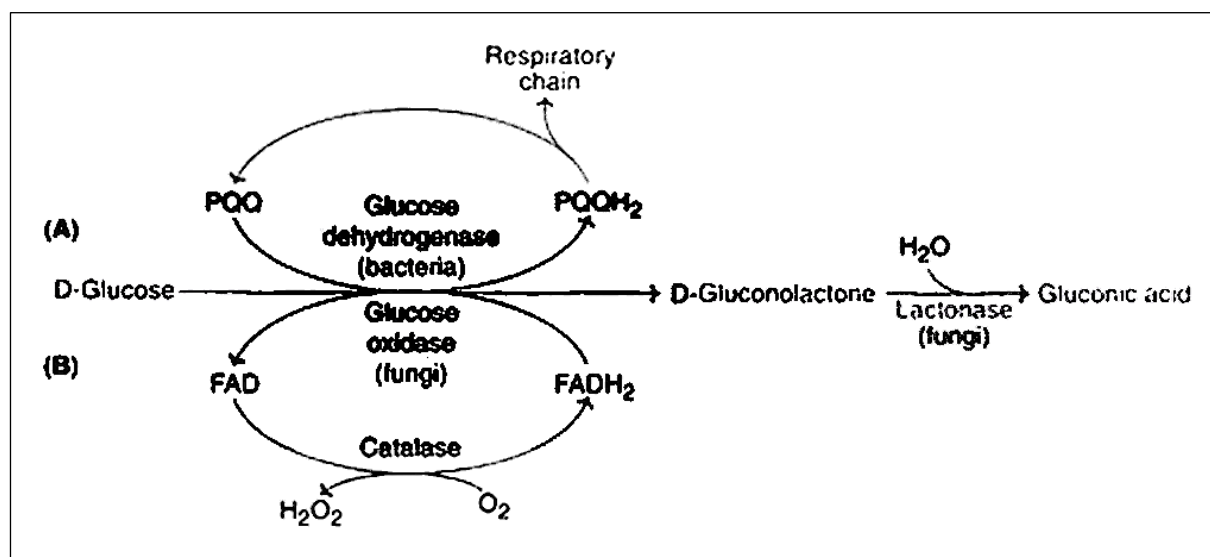
4.3. GLÜKONSAV GYÁRTÁS

A glükonsav egy gyenge szerves sav, piaca mintegy 100 000 tonna/év. Ebbe beleértendő a savon kívül a δ -lakton-, és a sók formájában eladott mennyiség is.

A glükonsavat glükózból gyártják, az aldehid csoport oxidációjával karboxilcsoport képződik. Bár ezt kémiai oxidációval is meg lehet oldani, a hozamok, és a szelektivitás miatt előnyösebb a biotechnológiai átalakítás. A folyamat inkább hasonlít **enzimes** átalakításra, mint egy de novo fermentációs folyamatra.

4.3.1. A glükonsav képződés biokémiája

Sokféle organizmus képes glükonsavat felhalmozni: egyes gombafajok, mint az *Aspergillus niger* vagy a *Penicillium luteum* vagy a baktériumok között a *Gluconobacter*, *Pseudomonas* vagy *Acetobacter* törzsek. A folyamat biokémiája eltérő a prokariótáknál és az eukariótáknál.



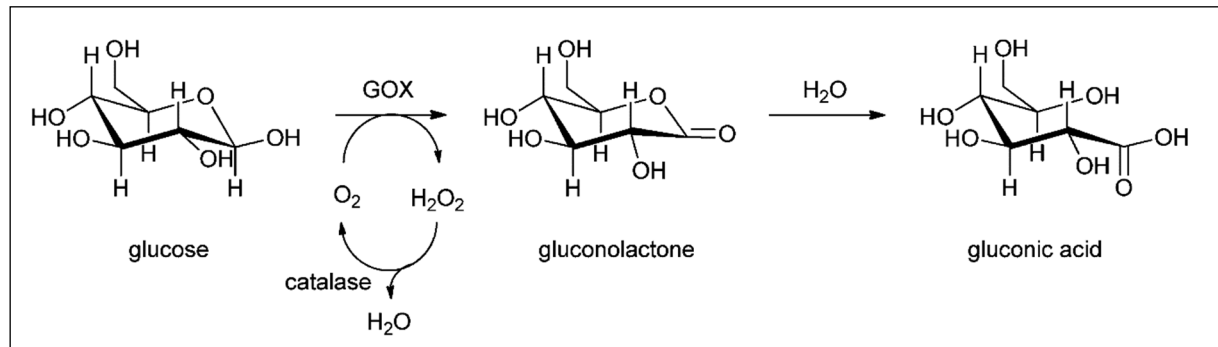
76. ábra A glükonsav bioszintézise *Gluconobacter suboxidans*-ban (A) és *Aspergillus niger*-ben (B)

PQQ = pirrolo-kinolin-kinon

A baktériumokban az oxidáció az ecetsavnál bemutatott módon, a citoplazmamembránban kötött D-glükóz-dehidrogenáz enzim által megy végbe. A hidrogén akceptor a PQQ, illetve a NAD⁺ vagy NADP⁺, amely a légzési láncnak adja át a hidrogéneket. A reakció terméke a D-glükono- δ -lakton, ami a fermentlébe kikerülve spontán hidrolizál glükonsavvá. A hidrolízis sebessége a pH-tól és a hőmérséklettől függ.

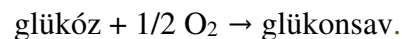
A megtermelt glükonsavat a sejt képes szénforrásként hasznosítani. Ez a pentóz-foszfát útvonalon történik, de ezt az utat a katabolit represszió (magas glükóz koncentráció, >0,5%) elnyomja. Tehát ha a technológiában nagy glükóz koncentrációt állítanak be, akkor glükonsav túltermelést lehet elérni. A folyamat hatékonyságát rontja, hogy a képződött glükonsav – a Bertrand-szabálynak megfelelően – tovább oxidálódik 5-keto-glükonsavvá. Ezt a második lépést a reakció körülményeinek szabályozásával vissza lehet szorítani (semleges pH, 37 °C), ill. elő lehet segíteni (savanyú pH, 25–30 °C), vagy CaCO₃-adagolással, mert az 5-keto-Ca-glükonát csaknem oldhatatlan, így az egyensúly erősen jobbra tolódik.

A fonalas gombákban a glükonsav kialakulása során két enzim működik. A D-glükózt a glükóz-oxidáz alakítja D-glükono- δ -laktonná, amit a laktonáz hidrolizál glükonsavvá. A glükonsav- δ -lakton ugyan spontán is hidrolizál glükonáttá, de az *Aspergillus*-okban egy specifikus lakton-hidrolizáló enzim működése is észlelhető.



77. ábra Glükonsav bioszintézise *Aspergillus*-okban.

A penészgombák glükóz-oxidáza egy homodimer flavoprotein. Az enzim kb. 10% szénhidrátot tartalmazó 186.000 móltömegű glikoprotein. Prosztetikus csoportként két kötött FAD-ot tartalmaz. A kofaktor visszaoxidálása hidrogén-peroxid képződése közben egy oxigén molekulát fogyaszt. Ezt a toxikus terméket a mikroorganizmusban működő kataláz elbontja. Így a nettó reakció:



Adalék: Több szerző a negyvenes évek elején ezt az enzimet. antibiotikumként írta le (notatin, penicillin B), mert megtévesztette őket a felszabaduló hidrogén-peroxid dezinficiáló hatása, ami kioltási gyűrűket eredményezett.

A FAD regenerálása során keletkező hidrogén-peroxid a glükóz-oxidáz erős inhibitora. Ezért a megfelelő kataláz-aktivitás is fontos a hatékony folyamat szempontjából.

Az *Aspergillus niger* glükóz-oxidázáról megállapították, hogy a D-glükóz β -anomerjét 150-szer gyorsabban képes oxidálni, mint az α -D-glükózt. Lehet, hogy a rendszer egy mutarotáz aktivitással rendelkező fehérjét is tartalmaz.

A glükóz-oxidáz másik szubsztrátja az oldott oxigén, ennek koncentrációja is befolyásolja a reakciósebességet. Az enzim Michaelis állandója (K_{mO_2}) néhány mg/liter, így atmoszférikus nyomáson az oxigén oldhatóságának tartományában van, tehát a reakciósebesség meg sem közelíti a v_{max} -ot. Emiatt a fermentorokban túlnyomást (pl. 3 bar) szoktak alkalmazni.

Az enzim meglehetősen hőérzékeny, 50 °C felett elveszti az aktivitását. Az optimális pH=5,5, alacsonyabb pH-n gyorsan inaktíválódik. Ezért a fermentlé pH-ját 4,5 és 6,5 között kell tartani.

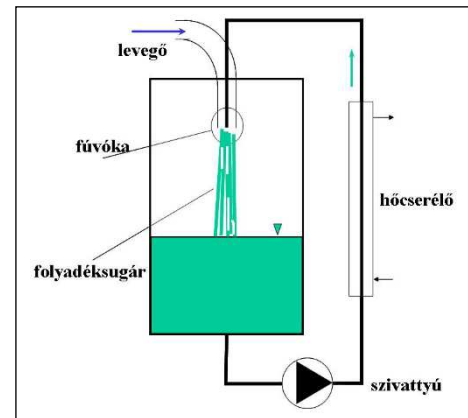
Az enzimet általában intracellulárisként írják le, egyes szerzők szerint a sejtek felületén, mások szerint a peroxiszómákban található, de kimutatták a szűrt fermentlében is.

A glükonsav termelés képessége minden bizonnyal evolúciós előnyt jelent. Egyrészt a pH gyors csökkentése akadályozza a kompetitív mikroorganizmusok szaporodását, másrészt a termelt glükonsav rosszul hasznosítható szénforrás a versengő mikroorganizmusok számára, de jó tápanyag az *A. niger*-nek.

4.3.2. Glükonsav fermentációs technológiák

A folyamat biokémiájának megfelelően a gyártási folyamat is kétféle: bakteriális és fungális lehet. Az *A. niger* alapú technológiák jóval elterjedtebbek.

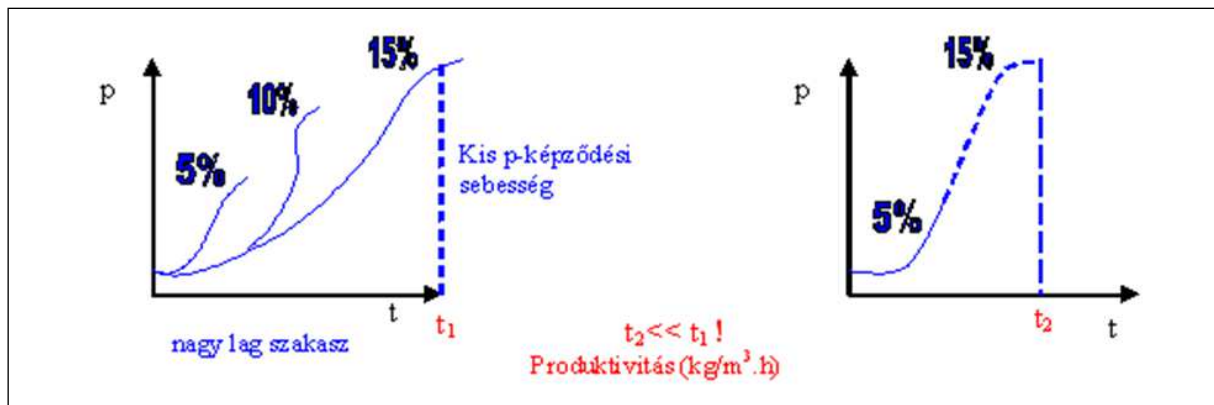
Érdekes technológiai változatot dolgozott ki az osztrák Vogelbush cég. *Acetobacter methanolicus* baktériumot használnak a glükonsav-fermentációhoz, egy speciális levegőztető rendszerrel. Első lépésként metanol szén/energia-forráson kemosztát folytonos fermentációval elszaporítják a mikroorganizmust, majd az összegyűjtött sejtömegeggyel egy külön bioreaktorban nagy glükóz koncentrációt fenntartva végzik a glükóz-glükonsav konverziót. A nagy glükóz koncentráció és a nagy sejtömeg (mint katalizátor) igen intenzív oxigébevitelt (levegőztetést) igényel, amit az ún. becsapódósugaras (Vb-IZ, plunging jet) reaktorral oldottak meg.



78. ábra Becsapódó sugaras levegőztető rendszer

Glükonsav termelés fonalas gombákkal

Az ipari fermentációt szubmerz körülmények között végzik, rendszerint *Aspergillus niger* törzsszel. A termelési paramétereket a glükóz-oxidáz enzim tulajdonságai határozzák meg. A folyamat tipikusan 5% glükóz – praktikusán keményítő hidrolizátum – koncentrációval indul. 15-20 órás kortól az átalakuló glükózt pótolva steril tömény glükóz oldatot adagolnak. Erre azért van szükség, mert a nagyobb cukor koncentráció esetén lassabban, hosszabb lag-szakssal indul el fermentáció.



79. ábra Indulási cukorkoncentráció hatása a glükonsav fermentáció lefutására

Kalcium-karbonátos közömbösítéssel így kb. 15% glükóz átalakítását lehet elérni 20 óra alatt. Nátrium hidroxid oldat adagolással, automatikus pH szabályozással viszont az átalakított glükóz össz mennyisége elérheti a 35 %-ot is.

A konverzió felpörgetése érdekében a sejtnövekedést célszerű korlátozni nitrogén- (20-30 mM) és foszfát-limit (80-90 mM) beállításával. A nyomelemek közül a mangán ionok jelenléte (1-10 mM) szükséges.

A reakció oxigénigénye igen nagy. Az oxigén koncentrációt intenzív levegőztetéssel (1 vvm) magasan kell tartani az egész folyamat során, amit gyakran a fermentor fejnyomásának jelentős megnövelésével (2-4 bar) biztosítanak.

Az oxidáció közben felszabaduló hő elvonása intenzív hűtést (nagy hűtőfelület, sok hűtővíz) igényel.

Az oxidáció során képződő glükonsavat semlegesíteni kell, mert $\text{pH}=4,5$ alatt leáll a savtermelés. A közömbösítés módja szerint többféle technológiát dolgoztak ki.

Kalcium-glükonát gyártás: a szükséges $\text{pH}=5-6$ tartományt kalcium-karbonát adagolásával biztosítják. A tápoldat 2,5% kalcium-karbonátot (mész-kölszét) tartalmaz. Ezt külön, vizes szuszpenzióban sterilizálva adják oltás előtt a táptalajhoz. A Ca-glükonát korlátozott oldhatósága miatt ezzel az eljárással csak kb. 15% cukrot lehetett átalakítani. Nagy előrelépést jelentett az a felismerés, hogy bórax jelenlétében az átalakítandó glükóz koncentrációja tovább növelhető akár 350 g/liter értékig. A bórx ugyanis akadályozza a kalcium-glükonát kiválását, a termék oldatban marad. Viszont élelmiszeripari hasznosításra készülő termék esetében a bórsav-észter toxicitása miatt bórax nem használható.

A nátrium-glükonát gyártás: a pH -t NaOH oldattal tartják 6,5 értéken. A nátriumsó sokkal jobban oldódik vízben, bórax nélkül is el lehet érni a 35 %-os koncentrációt.

A fermentáció mindkét esetben 90% feletti hozammal működik, előfordul 98% is. A fermentációs idők is rövidek, 24 és 60 óra közé esnek. Ezért nem meglepő, hogy a törzs fejlesztésével eddig nem sokan foglalkoztak.

Egyes gyártók *félfolytonos fermentációs* eljárással dolgoznak, azaz a szakaszos fermentációs ciklus befejezése után a tenyészet 1/4-1/5-ét a fermentorban hagyják, és friss tápoldattal töltik fel, így kezdenek egy újabb tenyésztési ciklust. (A folyamat 3-4-szer ismétlődhet.)

A szakaszos átalakítás végén is kiszűrt micélium tömeg ismételt felhasználható a folyamat katalizálására aktivitásvesztés nélkül. (Ebben az esetben valódi transzformációról, és nem növekedéssel kapcsolatos fermentációról van szó.)

4.3.3. A glükonsav izolálása fermentléből

A feldolgozás első lépése a sejtömeg elválasztása. A micélium jól szűrhető, pl. vákuum dobszűrőn elválasztható. Egyúttal az esetleg megmaradó mész-kölszét szemcséktől is megszabadulnak. A szűrletet aktív szénnel lehet deríteni, szinteleníteni. A további lépések már függenek a közömbösítésre használt bázistól.

Kalcium-hidroxidos technológia esetén mésztej hozzáadásával a pH -t 7,0-ra emelik, majd a levét kb. 20%-os koncentrációra bepárolják. Az oldatot $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtve a Ca-glükonát kikristályosodik. A kiválás határfokát javítani lehet vízzel elegyedő szerves oldószer, pl. alkohol hozzáadásával. A kristályokat elválasztják, majd szűrőn hideg vízzel mossák. Az anyalúg és a mosóvíz egy újabb aktív szenes tisztítás után visszavihető a bepárlóba. A kristályokat $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten szárítják.

A kalcium-glükonát maga is egy értékesíthető termék, de a piac nagyobb tömegben a nátriumsót és a szabad savat igényli. A Ca-glükonát kristályok tömény vizes szuszpenziójához számított mennyiségű kénsavat adva a glükonsav felszabadítható. Melléktermékként gipsz keletkezik, ami szűréssel elválasztható. A szabad sav vízben jól oldódik, akár 50 %-os oldat is készíthető belőle. Ebben a vizes oldatban a hőmérséklettől függő arányban egyidejűleg jelen van a szabad sav mellett a δ illetve a γ -lakton is. A tútelített oldatból $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt a szabad sav kristályosodik, $30-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ között a δ -lakton kristályosítható, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ felett pedig a γ -lakton válik ki. A termék tisztítása ismételt kalcium-glükonát képzéssel, majd aktív szenes derítést követő kristályosítással történik.

A nátrium-hidroxidos pH szabályozás esetén a sejtömeg kiszűrése után a pH -t NaOH-dal 7,5-re emelik, az oldatot aktív szénnel derítik, majd 45%-os koncentrációra párolják be. Ez a tömény oldat egyből dobszárítóra vihető, de így szennyezettebb marad a termék. Hűtéssel kikristályosítva tisztább anyagot kapunk. A nátriumsóból szabad savat ioncserével állíthatunk elő.

A kiszűrt biomassa nem csak takarmányozásra, biogázosításra használható, hanem az enzimek forrása is, belőle melléktermékként glükóz-oxidáz és kataláz enzim nyerhető ki.

Érdekeség: a glükóz-oxidáz enzim felhasználható a szubsztájainak eltávolítására élelmiszeripari termékekből.

A tojáslé porlasztva szárításánál problémát okoz a készítményben levő néhány ezreléknyi glükóz, amely melegen a fehérjével Maillard reakcióba lép, és ettől barna lesz a termék. A folyadékba glükóz-oxidázt, katalázt és egy kevés hidrogén peroxidot adva a glükóz eloxidálódik glükonsavvá, és elmarad a barnulás.

Más termékeknél a csomagolásba zárt oxigén jelenthet problémát (enzimes barnulás, pl. katecholok oxidációja kinonná). A zárt csomagolásba adagolt glükóz-oxidáz + kataláz felhasználja az oxigént és ezzel megakadályozza az elszíneződést. Gyümölcsök esetében nincs szükség glükóz hozzáadására, mivel ezekben mindig van kis mennyiségű szőlőcukor.

Az enzim specifikus működése miatt a glükóz kvantitatív mérésére is használható. Gyorsasága, megbízhatósága miatt ez a reakció analitikai módszerré fejlesztve bevonult a klinikai gyakorlatba is.

A technológia fejlesztésének egyik jövőbeni iránya a konverzió megvalósítása tisztított enzimekkel. Az enzim viszont intracelluláris, illetve sejtfalhoz kötött, ezért a kinyeréshez sejt-feltárás szükséges, ami a jelentősen megrágtítja a preparálást. Ma már nagyipari glükonsav technológiát is üzemeltetnek tisztított enzimes biokonverzióval (Argonne, USA), amelynek során rögzített glükóz-oxidáz enzimet használnak. A keletkezett savat nem semlegesítik klasszikus módszerekkel, hanem az enzimes reaktorba integrált elektrodiálízissel folyamatosan távolítják el a rendszerből.

4.3.4. A glükonsav felhasználása

A glükonsav nem-korrozív (nem-oxidáló) középértékű fémionokkal vízdoldható komplexeket képez, aminek révén a fémfelszín tisztítására, rozsdamentesítésére használható. Vizes (50 %-os) oldatát a tejipar használja a tároló edények, alumínium eszközök és a csőrendszerek tisztítására.

Fémkomplexei (Ca, Fe, Mg), jól felszívódnak, ezért ezeket állati takarmányba keverve is használják. A humán gyógyászatban a vas- és kalcium bevitel során is glükonsavat használnak ellen-anionként. Ezeket a vízdoldható komplexeket használja az építési-, textil-, detergens-, illetve gyógyszeripar is.

Az élelmiszerekben enyhe savanyú íze miatt használják. Kedvező toxicitási jellemzői miatt élelmiszerekben és üdítő italokban is alkalmazzák kiegészítőként. A mikrobiális glükonsav termelési eljárásokat az FDA is jóváhagyta. A δ -laktón savanyú ízhatása lassan alakul ki a hidrolízis során.

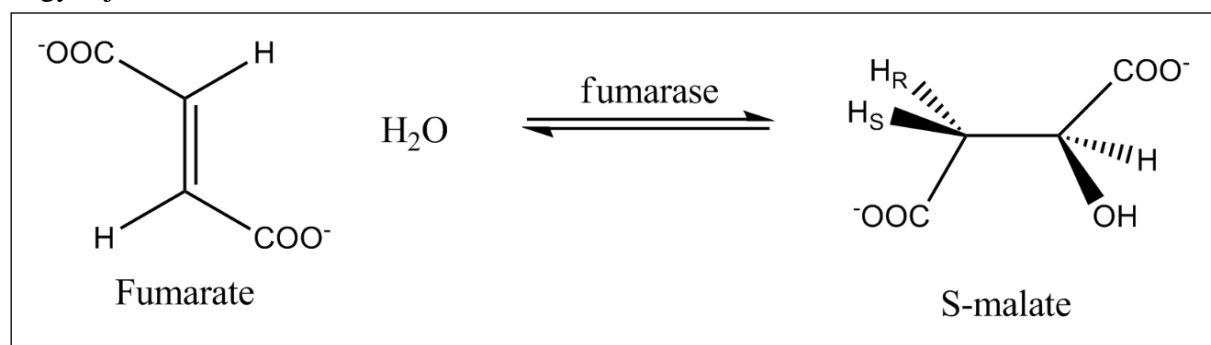
Japánban évente 3000 tonna laktont használnak fel csak a szójafehérje kicsapására.

4.4. Almasav gyártás

Az almasavat először éretlen almából izolálták, innen ered a neve is. A természetben az L-izomer fordul elő. Kémiai szintézissel, maleinsav vagy fumársav kémiai hidratálásával viszont racém keverék, DL-almasav keletkezik. Élelmiszeripari célra mindkét forma felhasználható, ízük azonos és egyformán biztonságosak. Az összes termelés kb. 65.000 tonna/év.

Az élelmiszerekben gyümölcslevek, szénsavas üdítőitalok és cukorkák ízesítésénél fanyar savanyú íze miatt az édes íz ellensúlyozására alkalmazzák. A kozmetikai iparban, a krémek és más készítmények pH-jának beállítására, alfa-hidroxi-karbonsavként hámlékozásra használják. Ezen kívül más iparágakban fémfelületek valamint textilszálak kezelésére is alkalmas. Az almasav igény megugrásával számolhatunk, ha ipari léptékben is megoldódik a biológiailag bontható poli-almasav műanyag gyártása és alkalmazása.

Az említett szintetikus gyártások mellett a fumársavból enzimmel katalizált konverzióval is gyártják.

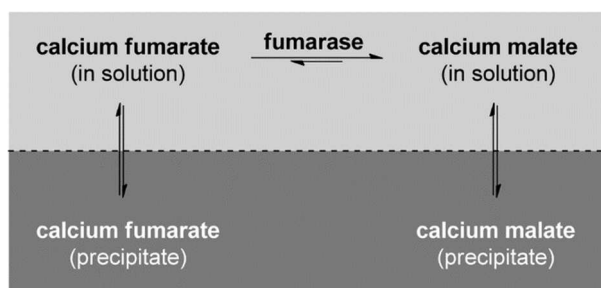


80. ábra A fumaráz reakció

Eredetileg a *Brevibacterium ammoniagenes*, később a *B. flavus* által termelt fumaráz enzimet kinyerés, tisztítás nélkül κ -carrageenan gélben rögzített sejtes formában használva 70%-os kihozatalt értek el. Az optimális pH = 8, a hőmérséklet: 25 °C (Tanabe Co., J).

Genetikailag módosított *Saccharomyces cerevisiae* sejteiben túltermeltették a fumarázt, és ezzel a konverzió elérte az egyensúlyi 85%-ot.

Ennél nagyobb, közel 100%-os kitermelés csak akkor érhető el, ha a terméket eltávolítjuk a rendszerből. Ez történhet membrános bioreaktorban, illetve csapadékképzéssel. A csapadékos eljárás (*Corynebacterium glutamicum* sejtuszpenzió, Amino GmbH, D) azon alapul, hogy mind a szubsztrát, mind a termék kalcium sója rosszul oldódik vízben, az oldhatóságuk kb. 1%. Ha a szilárd kalcium fumarátot viszünk be a rendszerbe, akkor az egyensúlyban lesz saját telített, kb. 1%-os oldatával. Ahogy az enzim átalakítja a fumarátot, az folyamatosan pótlódik a

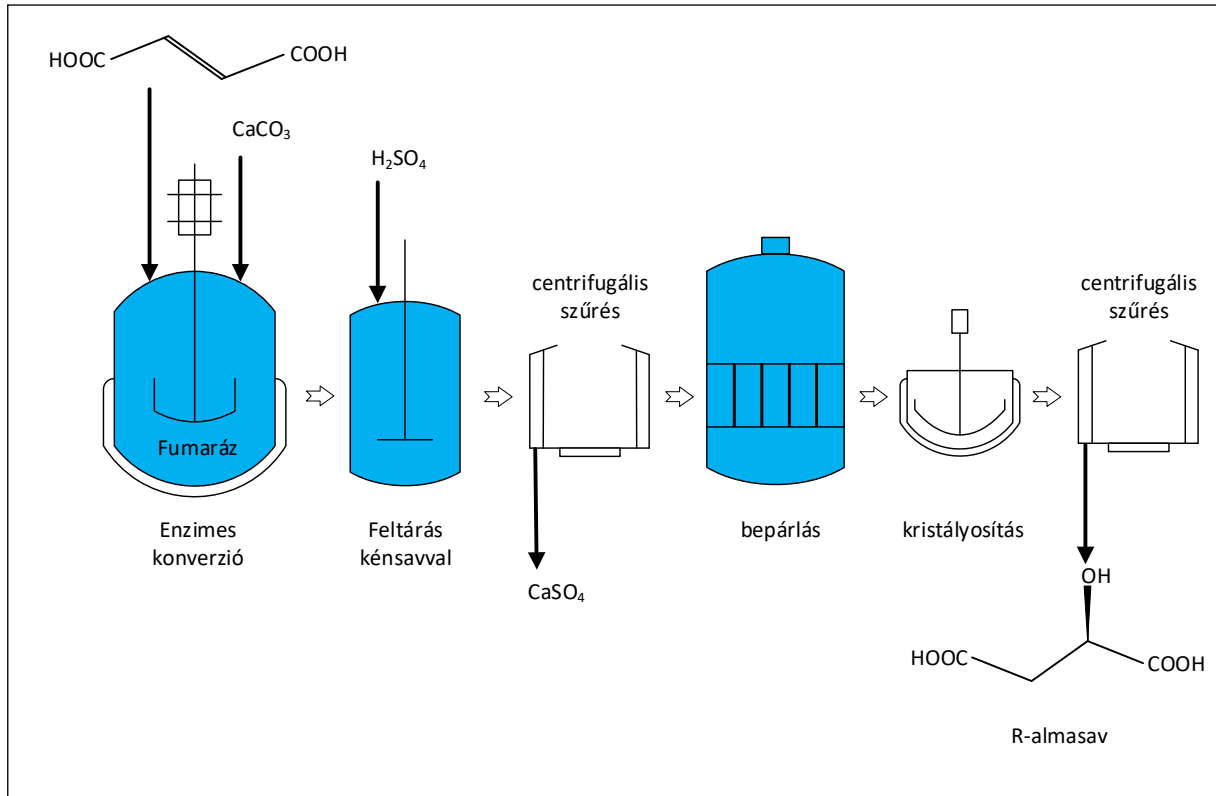


81. ábra Csapadékos almasav gyártás

kristályok feloldódásával. A keletkező malát viszont, amikor koncentrációja eléri az egy százalékos, kicsapódik. Így a folyamat egészen addig megy, amíg a szilárd szubsztrát el nem fogy. Az almasavat sójából kénsavval szabadítják fel, a kicsapódó gipszet leszűrik. A szűrletet be-

párlással töményítik, lehűtve a kikristályosodik az almasav. A nyersterméket szűréssel elválasztják, a szűrőn mossák és szárítják. Ha további tisztításra van szükség, akkor az anyagot újraoldják, ioncserével és/vagy aktív szénnel tisztítják, és újra kristályosítják.

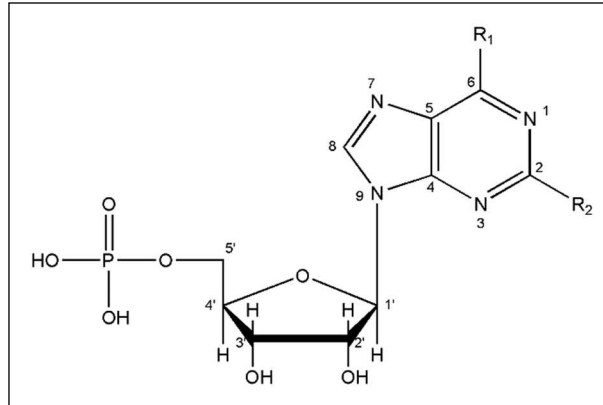
Foglalkoztak az L-almasav de novo fermentációs előállításával is. Az *Aspergillus flavus* jó termelőnek bizonyult, csak az a probléma, hogy mind a három négy-szénatomos dikarbonsavat (fumársav, maleinsav, almasav) túltermeli.



82. ábra A csapadékos almasav gyártási technológia lépései

5. NUKLEOTIDOK (NUKLEOZIDOK) ELŐÁLLÍTÁSA

A nukleotidok az aminosavakhoz és a szerves savakhoz hasonlóan elsődleges anyagcse-retermékek, kulcsfontosságú metabolitok a sejtek életfolyamataiban. Ipari fontossága az alábbi négy purin nukleotidnak van:



83. ábra A purin-nukleotidok szerkezete

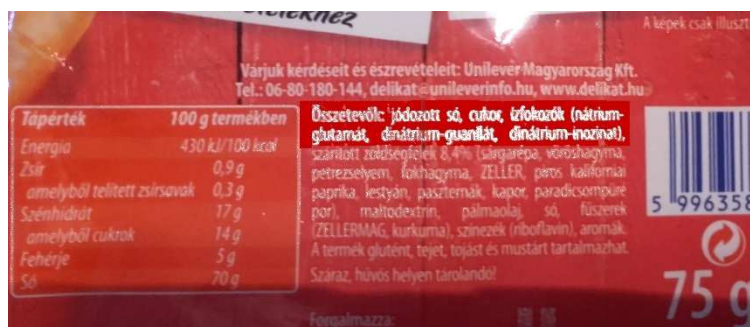
Nukleotid	R ₁		R ₂	Előfordulás
5'-AMP	-NH ₂		-H	DNS, RNS
5'-GMP	-OH		-NH ₂	
5'-IMP	-OH		-H	Intermedierek
5'-XMP	-OH		-OH	

11. táblázat A purin-nukleotidok szubsztituensei

5.1. A nukleotidok felhasználása

Ízjavító, ízfokozó szerek

A nátrium-glutamát és az 5'-ribonukleotidok együtt egy erős, gazdag ízérzést okoznak, ez az umami, vagy ötödik íz, amelyet az emberi nyelven lévő G-proteinfüggő heterodimer T1R1/T1R3 receptorok közvetítenek. A nukleotidok fokozzák az ízlelőbimbók reagálását az L-glutamátra, ezzel magyarázható az aminosav és a nukleotidok szinergikus hatása. Az 5'-GMP-nek, az 5'-IMP-nek és az 5'-XMP-nek nátrium-glutamáttal kombinálva már



84. ábra Guanin, inozin és Na-glutamát az ételízesítőben



nagyon kis mennyiségben (0,005 - 0,01%) is erőteljes ízfokozó hatása van.

Japánban a XVII. század óta használják az ún. *umami* ízű ételízesítőket (erjesztett, hidrolizált szója és egyéb termékek, bennük glutaminsav és más ízanyagok keletkeznek).

Ezeket az ízesítő kombinációkat a feldolgozott élelmiszerek széles skálájánál, leveseknél, mártásoknál használják.

Gyógyszerek

Származékaik antibiotikumok, citosztatikumok mellett alkalmazhatók, így a nukleinsav szintézis során fejtik ki hatásukat, antimetabolitként (8-azaguanin). Megtalálhatóak ezen kívül vírusok reprodukcióját gátló szerekben (ribavirin, acyclovir), valamint szívgyógyszerekben, izomerősítőkből is.

A nukleotidok piacán vezet az Ajinomoto Co. (Japán), piaci részesedése mintegy 40%. Versenytársai még a koreai a CJ Group és a Daesang csoport, Japánban a Kirin Kyowa Foods, és Kínában a Star Lake Bioscience. Az nukleotidok iránti igény a feldolgozott élelmiszerek piacával párhuzamosan növekszik.

	Felhasználás (t/év)	Funkció
IMP	20000	ételízesítő
GMP	10000	ételízesítő
Inozin	250	szívgyógyszer
ATP	60	izomerősítő, laborvegyszer

12. táblázat Nukleotidok felhasználása

5.2. A nukleotidok gyártása

Az nukleotidok ipari léptékű gyártása két úton valósítható meg. Az egyik út az RNS kivonása valamilyen biomasszából, majd lebontása hidrolízissel mononukleotidokig; a másik pedig a *de novo* fermentációs eljárás.

Az ipari RNS hidrolízis és direkt fermentációs technológia kialakítása 1959-1961-re tehető. Az Ajinomoto vállalat 1960-as alapítása óta gyárt ételízesítőként használt nukleotid-származékokat (nátrium-inozinát és nátrium-ribonukleotid); a szintén japán Kyowa Hakko vállalat 1966-ban alapította élelmiszer adalékokat gyártó részlegét, mely azóta is termel jellegzetes, *umami* ízű ételízesítőket.

5.2.1. Az RNS enzimes hidrolízise

Kézenfekvő gondolat, hogy valamilyen természetes sejtömegeből vonjuk ki a RNS-t, és ennek hidrolízisével állítsuk elő a mononukleotidokat. Az összetett szervezetek (növények, állatok) nukleinsav tartalma kicsi, így ezek nem jöhetnek számításba. A mikroorganizmusoknál az intenzív növekedés szakaszában viszont a fehérjeszintézis sok RNS (mRNS, tRNS, rRNS) közreműködését igényli. A fő rendszertani egységek sejtjeinek nukleinsav tartalmát hasonlítja össze a következő 13. táblázat. Érdemes összevetni az egysejt-fehérje (SCP) termelésnél vizsgált összetételekkel. Annál a technológiánál a nagy nukleinsav tartalom hátrány volt, itt viszont éppen ez a cél.

	DNS-tartalom (%)	RNS-tartalom (%)*
Baktérium	0,37 – 4,5	5 – 25
Élesztő	0,03 – 0,5	2,5 – 15
Penész	0,15 – 3,3	0,7 - 28

13. táblázat: Mikroorganizmusok nukleinsav tartalma

*: a jelzett RNS-tartalom 5%-a mRNS, 10-15%-a tRNS, 75-80%-a rRNS

Látható, hogy a baktériumok tartalmazzák a legtöbb nukleinsavat, de az apró sejt méret miatt a fermentlé biomassza tartalma sokkal kisebb, mint az élesztőknél. Ezért élesztőket (*Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*) alkalmaznak a technológiákban.

5.2.1.1. Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítása

Az élesztősejtekben jóval nagyobb mennyiségű RNS található, mint DNS, mert nemcsak az információátvitel a feladatuk, hanem szerkezeti anyagokként is funkcionálnak. A folyamat célja a „klasszikus” SCP-gyártással ellentétben olyan sejtömeg előállítása, melynek nagy a nukleinsav-tartalma. Ennek eléréséhez nem szükséges a genetikát befolyásolni, csak a célnak megfelelő, nagy RNS-tartalmú törzseket kell kiválasztani. A *Candida utilis* és a *Saccharomyces cerevisiae* jól ismert, könnyen kezelhető törzsek, használatuk élelmiszerekben is engedélyezett, szaporításuk, izolálásuk viszonylag egyszerű. A maximális RNS-tartalom eléréséhez figyelembe kell venni, hogy:

- a maximális szaporodási sebességhez tartozik a maximális fehérjeszintézis. Ez az exponenciális fázisban áll fenn, tehát a sejteket ebből a szakaszból célszerű elvenni, ennek is a végén, amikor már nagy a sejtkoncentráció. A szakaszos fermentáció produktivitása viszont gyenge, ezért érdemes más technikát alkalmazni. Félfolytonos, vagy folytonos fermentációval több biomasszát kaphatunk. A kemosztátot viszont nem lehet a μ_{\max} -nál üzemeltetni, csak szubsztrát limitben. Eszerint a hígítási sebességet a μ_{\max} alatt nem sokkal kell beállítani. Folytonos technológiával melasz, vagy szulfid-szennylég szénforráson 35 g/l SCP koncentráció érhető el, 10-15% RNS-tartalommal.
- az intenzív fehérjeszintézishez a C/N arányt célszerű alacsonyan tartani,
- a Zn^{2+} ion jelenléte is befolyásoló paraméter, ha az egyéb komponensekkel bevitt koncentráció nem éri el a 0,25 ppm-et, akkor adagolással ki kell egészíteni.

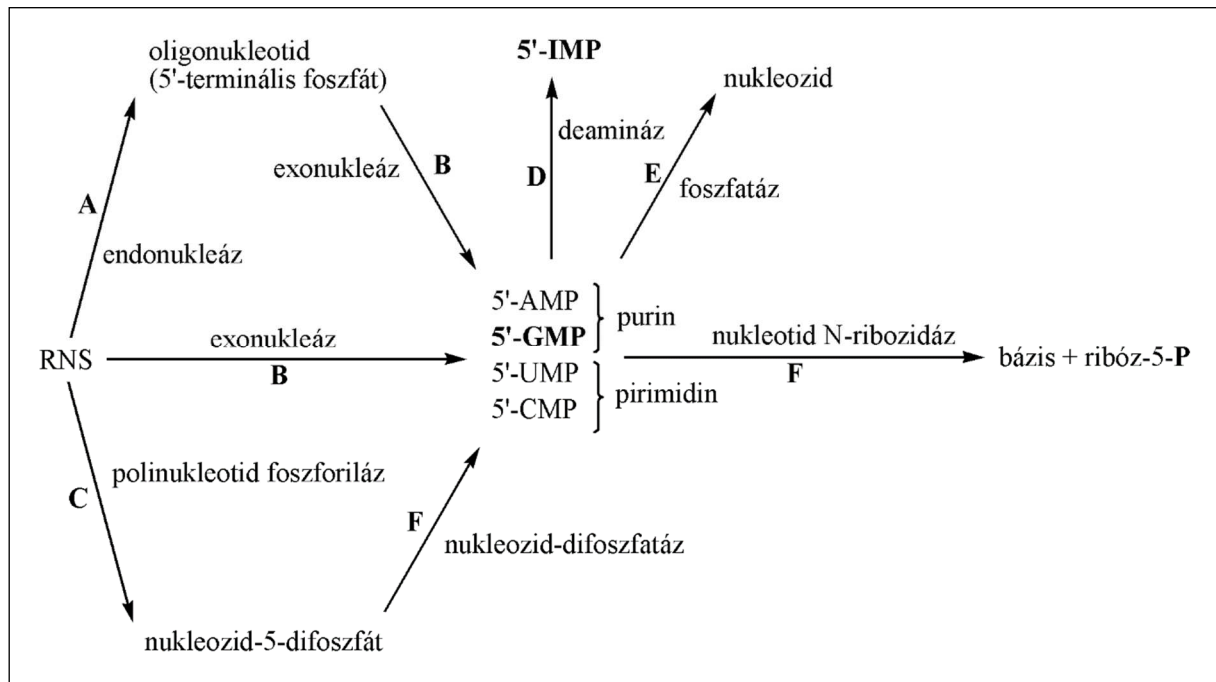
5.2.1.2. Az RNS kivonása

A nukleinsavak fehérjéknél nagyobb stabilitása kihasználható a nagy RNS-tartalmú élesztő nukleinsav-tartalmának kinyerése során. Tömény, 5-20%-os NaOH oldattal, 100°C hőmérsékleten, 8 órán át tartó forró lúgos főzéssel a nukleinsavak elérhetővé válnak. A DNS bomlékonyabb, mint az RNS, így az nagyobb mértékben bomlik a folyamat során.

Sejtfeltárás során a sejtek fehérjéi tönkre mennek, az RNS-tartalom nátriumsó formájában feloldódik, mert megszűnik a riboszómák kompakt szerkezete. A sejtfalmaradványok centrifugálással elkülöníthetők, majd a ribonukleinsavak savas közegben (sósav) szelektív kicsapással elválaszthatók. Etilalkoholos mosással, majd szárítással juthatunk az RNS-hez.

5.2.1.3. Enzimes hidrolízis (enzimtermelés, kinyerés)

A kinyert RNS-ből a nukleotidokat enzimes hidrolízissel állíthatjuk elő. A folyamatok az RNS molekula hidrolízisével indulnak, melyben exo- és endonukleázok egyaránt részt vesznek (A és B). A láncon belül hasító endoenzim oligonukleotidokat eredményez, az 5' végén fosz-



85. ábra Az RNS hidrolízis enzimjei

fátcsoporttal. A folyamatok az RNS molekula hidrolízisével indulnak, melyben exo- és endonukleázok egyaránt részt vesznek (A és B). A láncon belül hasító endoenzim oligonukleotidokat eredményez, az 5' végen foszfátcsoporttal. Ezeket az oligonukleotidokat további lépésekben végül mononukleotidokká hidrolizálják (B). A vegyes enzim preparátumok előállításához olyan mikroba törzseket (*Penicillium citrinum*, *Streptomyces aureus*) érdemes választani, amelyekben az A-D enzimek dominálnak.

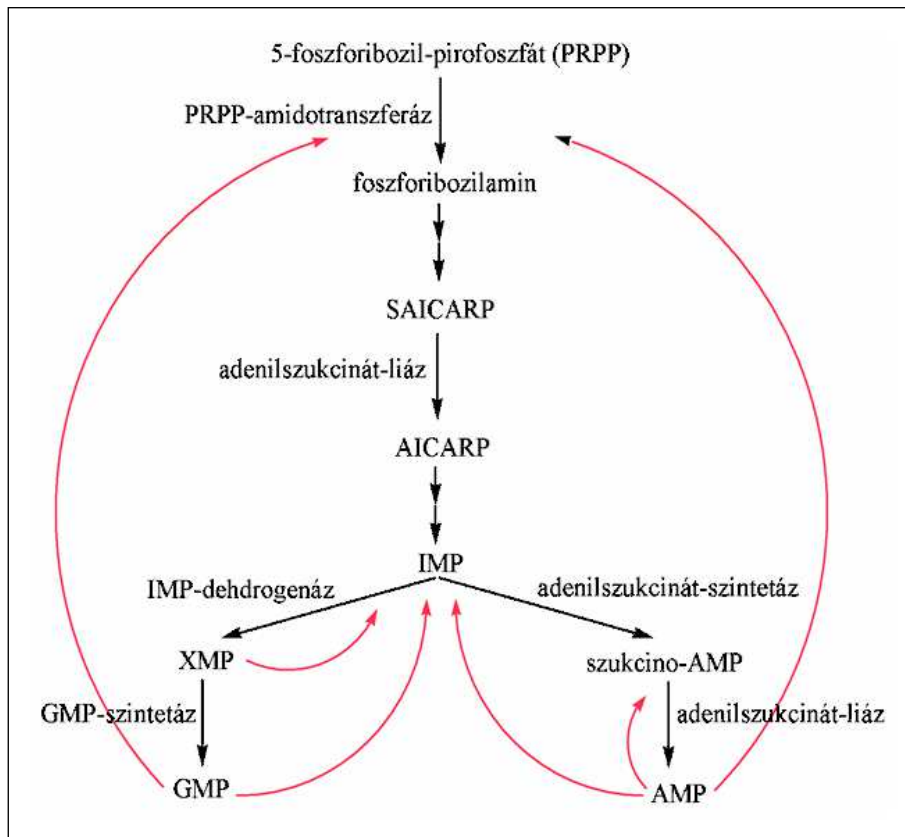
Az RNS molekula bázisösszetételétől függő arányban purin- és pirimidin-nukleotidok képződnek. Ezeket ioncserélőn vagy metanolos frakcionált kicsapással lehet szétválasztani. Az IMP kialakításához az AMP molekulákat *Aspergillus oryzae* enzimmel dezaminálják (D). Az 5'-mononukleotid-foszfátok bomlását nukleozidokká (E) a foszfatáz enzim gátlásával akadályozzák meg (a folyamat hőmérsékletén, azaz 65 °C-on a foszfatáz enzim inaktíválódik, hőmérsékleti optimuma csak 45°C).

Az ipari gyártás során a hidrolízist 2%-os RNS-oldatban végzik, pH=5 mellett, 4 órán keresztül, 65°C-on. Egyes gyártók immobilizált enzimekkel is dolgoznak.

5.2.2. De novo fermentáció

A másik lehetőség a nukleotidok vagy nukleozidok közvetlen fermentációs előállítása. Nukleozidok termelése esetén a foszforilezést a fermentáció után kell elvégezni, ez megoldható kémiai úton (foszforil-kloriddal) vagy enzimatikusan.

A nukleotidok ugyanúgy elsődleges anyagcseretermékek, mint az aminosavak, vagy a szerves savak. Azaz bioszintézisük ismeretében ugyanúgy alkalmazhatjuk a klasszikus és a modern anyagcsere-mérnökség módszereit. Ehhez előbb meg kell vizsgálnunk a bioszintézis utak és a szabályozási mechanizmusok térképét. Mivel az élelmiszeripar a purinvázak nukleotidokat igényli, ezért ezek képződésére koncentrálunk. A purin vázak felépítése egyszerű metabolitokból (pl.: glicin, fumársav) indul ki. Innen egy tízlépéses folyamat vezet az IMP-molekulákhoz,



86. ábra A purin-nukleotidok bioszintézise és ennek szabályozása *Bacillus subtilis* törzsbén
 Rövidítések: SAICARP: 1-(5'-foszforibozil)-4-(N-szukcinokarboxamid)-5-aminoimidazol,
 AICARP: 5-amino-1-(5'-foszforibozil)-imidazol-4-karboxamid

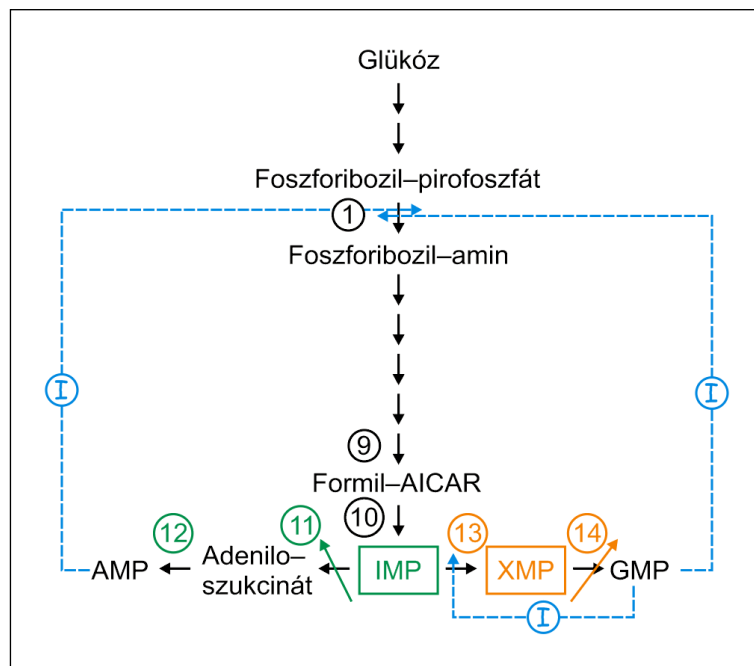
melyek AMP-vé vagy GMP-vé alakulhatnak. Az IMP szintézisében hat enzim vesz részt, melyek közül három többfunkciós, több reakciót is katalizálhat. A purinváz kialakulásához a szintézisbe belépő aminosavak járulnak hozzá, egy-egy újabb csoport hozzáadásával.

Az IMP, AMP, GMP, XMP metabolitok bioszintézisének szabályozása összetett, többszintű feed back inhibíció. A túltermelés megakadályozásában nem csak a végtermékek, hanem az előttük lévő intermedier is részt vesz.

Az anyagcsere-mérnökség célja, hogy a sejt által termelt utolsó intermedier az IMP legyen, a további anyagcsereutakat elzárják, valamint a feed back szabályozásokat is kiiktassák. A szabályozási térképen látható, hogy az IMP utáni metabolitoknak van szabályozó szerepe. Ha viszont az IMP-t nem engedjük tovább alakulni, akkor nem képződnek szabályozó hatású molekulák sem, így ezzel a kérdéssel nem kell foglalkozni. A sejt életfunkcióinak fenntartásához azonban kis mennyiségben szükség van AMP-re és GMP-re, ezért ezeket az anyagokat a kis mennyiségben be kell vinni táptalajba. Célszerű „szivárgó” (*leaky*) mutánsokat izolálni, amelyekben csökkent aktivitással termelik az AMP-t és GMP-t, így ezeket a tápanyagokat mégsem kell beadagolni.

5.2.2.1. Mutációs beavatkozások IMP- és XMP-termelő törzseknél

Az inozin-monofoszfát (IMP) és a xantozin-monofoszfát (XMP) előállítása ugyanazon az útvonalon történik. A klasszikus mutációs anyagcsere-mérnökséggel irányíthatjuk a metabolikus fluxust: a megfelelő anyagcsereutak blokkolásával (11 ill. 14) és az AMP ill. GMP koncentráció alacsony értékén tartásával elérhető, hogy a folyamatok a megfelelő irányban menjenek végbe.



87. ábra IMP és XMP előállítása anyagcsere mérnöki beavatkozásokkal

Annak érdekében, hogy az AMP ill. GMP képződés ne fogyassza az intermediereket, auxotróf mutánsokat hoznak létre, amelyekben a 11 ill. 14 jelzésű lépések nem működnek. A két nukleotid hiányában viszont fontos, hogy a fermentációs tápoldat nukleotidokat tartalmazzon. Megfelelő komponens pl. az élesztőkivonat vagy a húskivonat (de a kukoricalekvár pl. nem jó).

A törzsfeljesztés alanyául a japán kutatók a *Brevibacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, a kínaiak *Bacillus subtilis* és *B. licheniformis* a törzseket választották. A létrehozott törzsek mutációs jellemzői:

XMP termelés: 11 és 14 mutáció + AMP és GMP kis koncentrációban (~19 g/l XMP)

IMP termelés: 11 mutáció: a SAMP-szintetáz enzim hiányzik, ezek a törzsek AMP-re auxotróf tulajdonságúak. + AMP kis koncentrációban szükséges (az érintetlen GMP szintézis termeli a GMP-t, de a sejt saját szabályozása miatt lecsökken az IMP → XMP átalakítás katalízisét végző enzim aktivitása, ez alacsonyan tartja a koncentrációt).

A sejt citoplazma membránja permeábilis 5'-IMP-re, a termék extracelluláris.

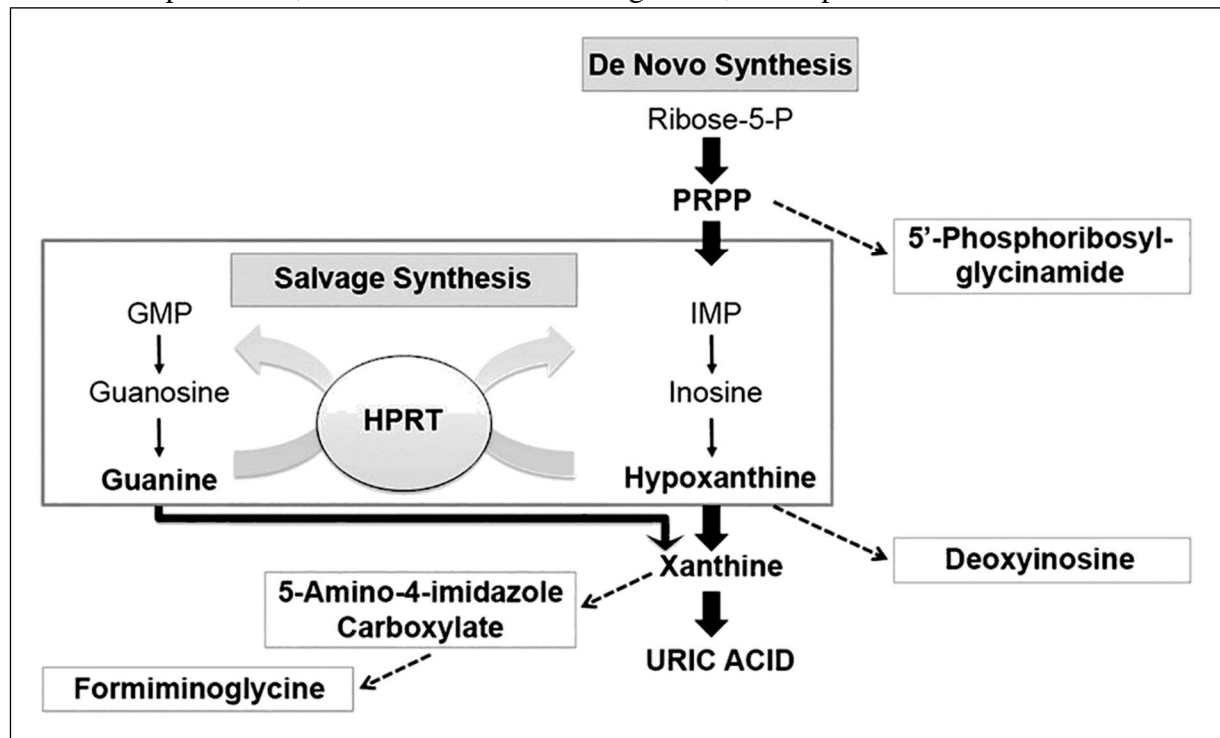
Törzs, mutáns neve	Genetikai azonosító	5'-IMP hozam (g/l)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ade ⁻ Nuc ⁻	0,6
A-1-25	Ade ⁻ 6MP ^r	2,0
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>		
KY 7208	Ade ⁻	5,0
KY 13102	Ade ⁻	12,8
KY 13105	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen	19
KY 13369	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen, Gua ⁻	20-27-39

14. táblázat: Mutáns törzsek 5'-IMP hozamai

Ade⁻: adeninra auxotróf, Gua⁻: guaninra auxotróf, Nuc⁻: nukleotidáz-negatív (nem bontja le a terméket), 6MP^r: 6-merkaptopurin-rezisztens (antimetabolit)

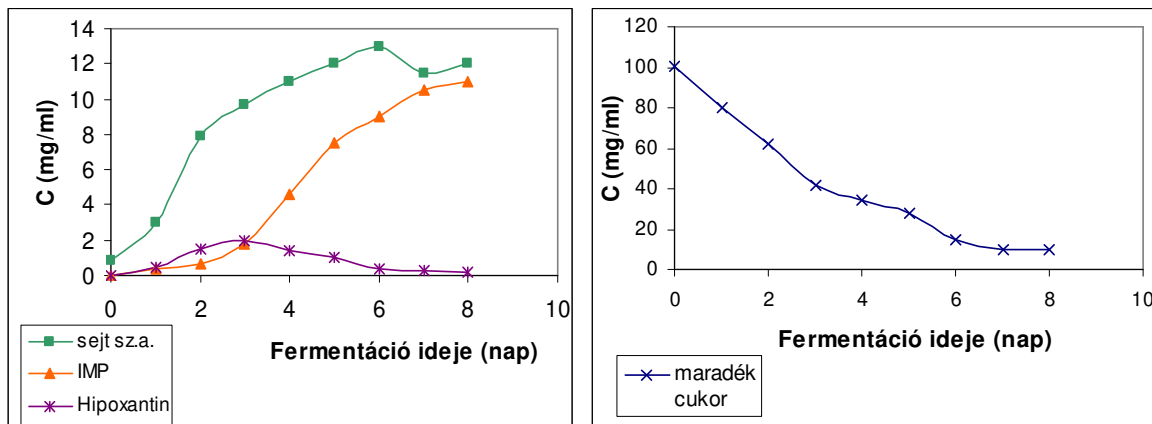
A fermentáció során lényeges a megfelelő foszfát, Mg- és Mn-koncentrációk beállítása.

Az anyagcsereutak módosításánál eddig nem foglalkoztunk a termékek, a nukleotidok továbbalakulásának lehetőségével. A bontási útvonal a hipoxantinon keresztül a húgysavhoz vezet 88. ábra. Ennek következtében a termelődő IMP egy része hipoxantinná alakul. Ez azért nem okoz különösebb problémát, mert idővel a reakció megfordul, és a hipoxantin visszaalakul IMP-vé.



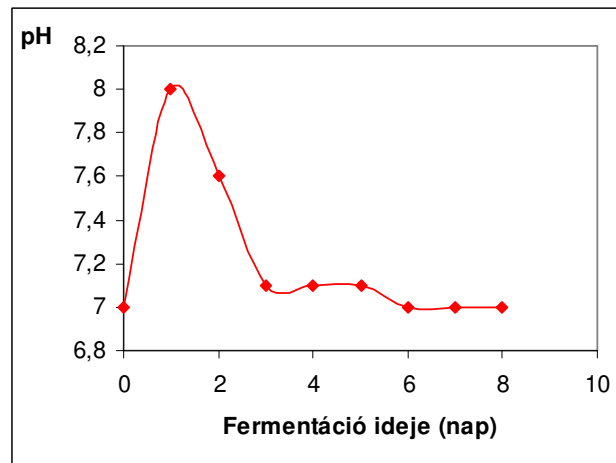
88. ábra A purinvázis vegyületek lebontási útvonala

A fermentáció első 2-3 napján megfigyelhető a hipoxantin-képződés, de ez a továbbiakban megszűnik.



89. ábra *B. ammoniagenes* KY 13102 törzssel végzett 5'-IMP fermentáció lefutása

A fermentációs technológiában szokatlan jelenség, hogy a folyamat indulásánál nem savtermelés észlelhető, hanem a pH emelkedése, ami azután az exponenciális fázis után visszatér a semleges értékre.



90. ábra pH-változás az IMP fermentáció során

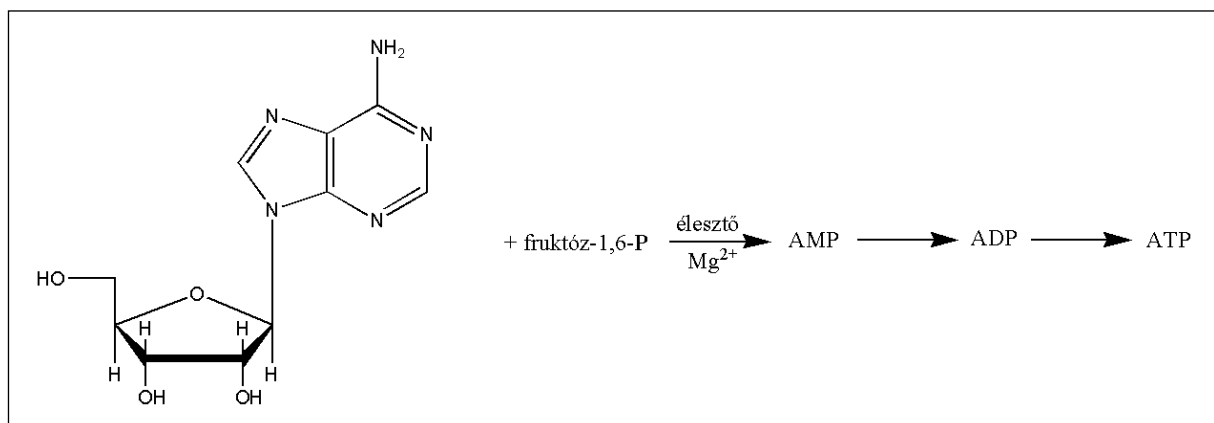
A klasszikus mutációs módszerek mellett a modern genetikai módszereket is bevetették a törzsjavítás érdekében. A vizsgált organizmusok közé bevették az *E. coli*-t is. Az enzimek kiejtése mellett gyakran építették be a deregulált promótereket, amelyek egész enzimsoportok termelését tették konstitutívá. Mindezzel együtt ezek a törzsek sem tudták meghaladni a 40 g/l termékkoncentrációt. Az előnyük abban nyilvánul, hogy ezt fele annyi idő alatt, 3-4 nap alatt termelik meg.

5.3. ATP-bioszintézis

Az ATP-t történetileg előbb szervextrakcióval, ló izomból állították elő, de fél évszázada már biokémiai úton gyártják. Ezt az eljárást magyar kutató, Gánti Tibor dolgozta ki.

Adalék: Gánti Tibor nem kutatóintézetben dolgozott, hanem a REANAL Finomvegyszergyárban. Zseniális ötletei mellett kidolgozta az élő rendszerek működését reakciókinetikai elveken leíró chemoton elméletet. Könyvét angol nyelven többször is kiadták.

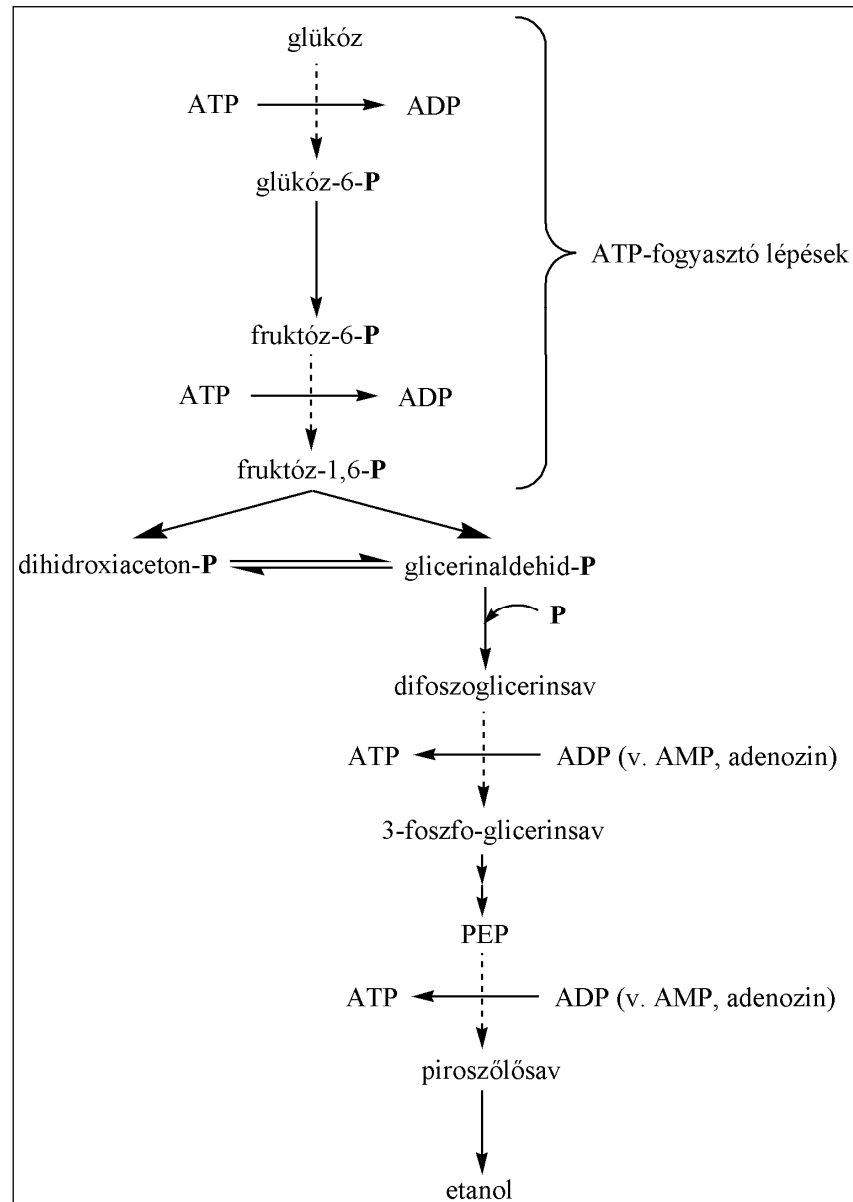
Az eljárás lényege az, hogy a glikolízis ATP-t fogyasztó lépéseit átugorják, és csak a reakciósor második felét, az ATP termelő lépéseket működtetik. Ezt úgy valósítják meg, hogy a glikolízis egy közttermékét, a fruktóz-1,6-biszfoszfátot és adenozt adagolnak az élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*). Ezzel közel 100%-os P/O hányados érhető el. A szubsztátokat szintetikusán állítják elő. Az élesztő további életfolyamatait igyekeznek leállítani, anaerob körülmények között, nyugvó sejtekkel végzik a konverziót.



91. ábra Ipari ATP előállítás élesztővel

Jelenleg a világ termelése évente körülbelül 5 tonna, túlnyomó részét a Gánti eljárás alapján Kínában állítják elő, egy 300 literes, immobilizált élesztő sejteket tartalmazó reaktorban.

Biokémiai reakciókban kosubsztrátként alkalmazzák, de gyógyszerként, szívizom-erősítőként is használatos (Atrifos, Reanal).



92. ábra ATP anyagcsere a glikolízis folyamatában

6. VITAMINOK

A vitaminok olyan mikrotápanyagok, amelyek parányi mennyiségük dacára nélkülözhetetlenek az anyagcserében. Ezeket az emlősök, így az emberi szervezet sem képes előállítani, ezért a táplálékkal kell bevinni. Forrásaik a táplálékláncban a növények és a mikroorganizmusok, ezek látják el az állatvilágot. Kis molekulájú anyagok, általában valamely enzim kofaktoraként működnek. Táplálkozás-élettani szerepük miatt felhasználásuk egyre növekszik a takarmányok és élelmiszerek komplettálásában, az élelmiszer technológiában, mint színező és antioxidáns adalékok, valamint a gyógyszerként. Emellett számos kozmetikum és vegyi termék tartalmaz vitamin adalékot.

Jelenleg a vitaminok egy részét kémiai szintézissel állítják elő, másokat biomasszából extrahálnak. Ezek mellett, illetve helyett terjednek a versenyképes biotechnológiai eljárások. Ezeknek kisebb az energiaigénye, kevesebb az ártalmatlanítandó hulladék, és kevesebb az élelmiszerbiztonsági szempontból veszélyes vegyszermaradék. A termelő organizmus szempontjából a vitaminok elsődleges anyagcseretermékek. Ebben a fejezetben a biotechnológiai úton gyártott vitaminokra koncentrálnak. Ipari méretekben azonban csak a B₁₂ és B₂ vitaminok fermentációs előállítására gazdaságos, illetve a C-vitamin gyártás lépései között szerepel egy bio-konverziós lépés.

6.1. B₁₂-vitamin (kobalamin)

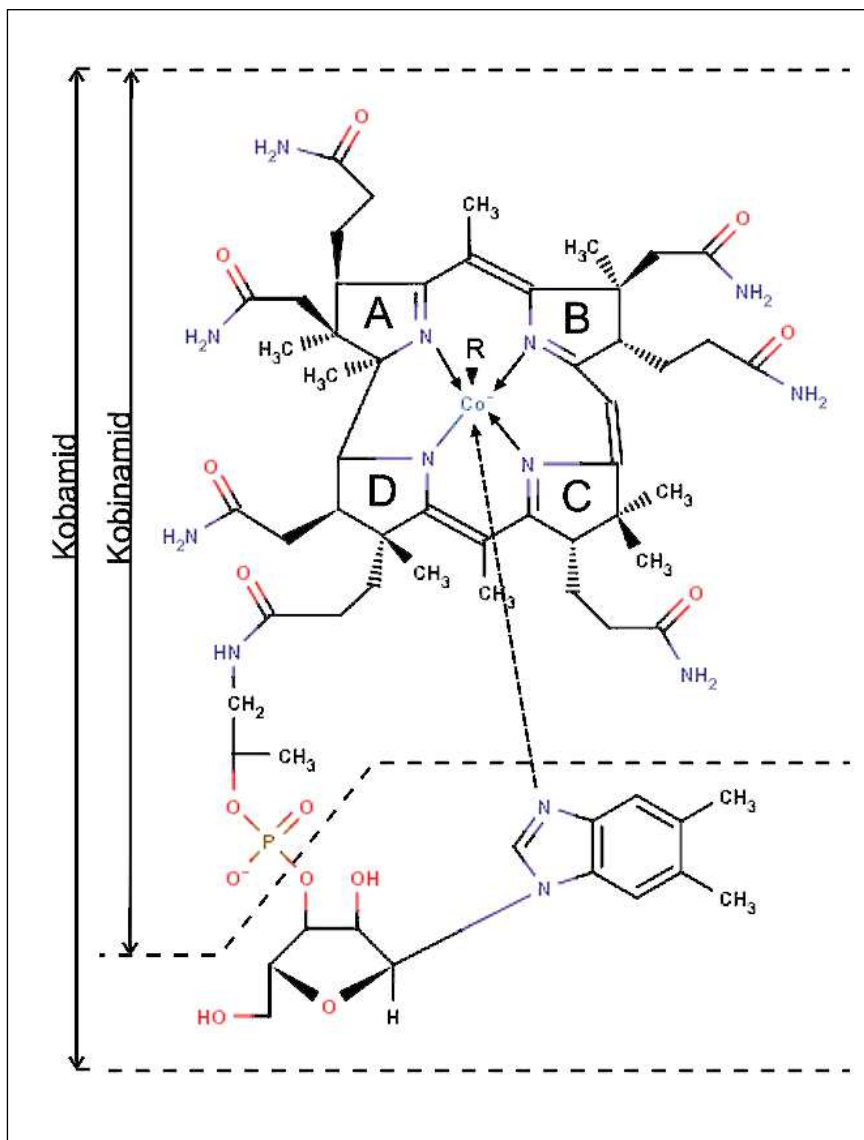
Az anyagcserében nélkülözhetetlenek az ún. C1-átvivő molekulák (metil-terahidrofolát, betain, metil-B₁₂, S-adenozil-metionin) amelyek egyszénatomos egységek (metil-, metilén-, metenil-, formil-, és formimino-csoportok) szállításában vesz részt. A B₁₂-vitamin két fontos enzim, a metionin-szintáz és a metil-malonil-CoA-mutáz működéséhez szükséges. Az ember számára a napi igény parányi, 1 µg/nap, de a hiánya a halálhoz is vezető vészes vérszegénységet (anemia perniciosa) okozza.

Adalék: Nobel díjak sora: az 1920-as évekig halálos betegségnek számító vészes vérszegénység gyógyítója két orvos volt, George Richards Minot és William Perry Murphy. Rájöttek, hogy ha betegek nagy mennyiségű marhamájat esznek, azzal a betegség kordában tartható. 1926-os felfedezésükért 1934-ben Nobel-díjat kaptak. Az 1930-as évek folyamán a kutatók világszerte próbálták izolálni a májban található gyógyító hatóanyagot, melyről úgy hitték, hogy egy B-vitamin, ezért a B₁₂ nevet adták az anyagnak, jóval az izolálása előtt. 1934-ben Ricke és Smith májból izolálták a vészes vérszegénységet gyógyító vitamint. A vitamint először kristályos formában 1948-ban állították elő mg-os mennyiségben, mintegy hat tonna máj feldolgozásával. A B₁₂-vitamin szerkezetének felderítésében nagy szerepet játszott Dorothy Hodgkin munkája, melyért 1964-ben kémiai Nobel-díjat is kapott.

A vitamint élelmiszerekből vesszük fel (máj, vese, szív, hal, tojás, tejtermékek). A B₁₂-vitamin felszívódása a táplálékból a gyomor nyálkahártyája által kiválasztott glikoproteinhez (intrinsic faktor) kapcsolt formában megy végbe a vékonybél alsó szakaszán. Az esetek gében vitaminhiány akkor lép fel, ha nem képződik a kobalaminokat szállító intrinsic faktor. A vitamint az emberi szervezetben a vastagbélben élő mikroflóra is képes termelni, de onnan nem tud felszívódni, mert ott nincs jelen sem a szükséges faktor, sem a felszívó transzporter.

6.1.1. Felépítés, szerkezet

B₁₂-vitamint négy pirrol gyűrű építi fel (korin gyűrű), amelyhez hasonló szerkezetet a klorofillban, illetve a hemoglobin hem egységében találhatunk. A molekula centrumában egy kobalt iont találunk, amelynek elektronjai hibridizálódva hat irányban képesek kötések létesíteni. Ebből négy a pirrol gyűrűk, egy pedig az 5,6-dimetil-benzimidazol nitrogénjéhez kötődik, a hatodikhoz kapcsolódnak a cserélhető csoportok. Az anyagcserében hidroxikobalamin keletkezik, ezt a feldolgozás során cianid csoportra cserélik, mert ez a forma stabilabb.



R oldallánc	Származék neve
<ul style="list-style-type: none"> — CN — OH — CH₃ 	<p>B₁₂-vitamin (cianokobalamin) B_{12c}-vitamin (hidroxikobalamin) metilkobalamin</p> <p>koenzim B₁₂ (5'-dezoxiadenozil-kobalamin, kobamamid)</p>

93. ábra A kobalamin származékok szerkezete

Az apró kis funkciós csoportok helyére beköthet a nagyméretű 5'-dezoxi-adenozil molekula-rész is, ezt a formát nevezik kobamamidnak.

6.1.2. Bioszintézis

A B₁₂-vitamin bioszintézise kezdetben a porfirinekkel és klorofillal közös utat követ. A teljes, de novo szintézisben több mint harminc gén vesz részt. A fokozatosan épülő vázhoz glicin, 2-amino-propanol, és treonin szükséges, ezeket prekursorként adagolva fokozható a vitamin szintézis. A központi kobalt ion biztosítására kb. 20 mg/liternyi kobalt-kloridot is be kell vinni.

Több mikroorganizmus összehasonlító vizsgálata kimutatta, hogy két különböző szintézisút létezik. Az aerob, pontosabban oxigén-függő út a *Pseudomonas denitrificans*-ra és hasonló mikrobákra jellemző. Az anaerob, avagy oxigén-független utat a *Propionibacterium shermanii*, a *Salmonella typhimurium* és a *Bacillus megaterium*-ban azonosították.

6.1.3. Előállítás

A B₁₂-vitamin előállítására többféle eljárás és többféle mikroorganizmus használatos.

mikroorganizmus	szénforrás	fermentációs körülmények	B12 termelés (mg/l)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	glükóz	anaerob, 5,6-dimetil-benzimidazol	206
<i>Rhodopseudomonas protamicus</i>	glükóz	5,6-dimetil-benzimidazol	135
<i>Propionibacterium shermanii</i>	glükóz	5,6-dimetil-benzimidazol	60
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	szacharóz	aerob, betain	60

15. táblázat B12 termelő törzsek

6.1.3.1. B12 fermentáció *Propionibacterium* törzsekkel

A táblázatban is látható, hogy a *Propionibacteria* fajok képesek sejtjeikben intracellulárisan a legnagyobb mennyiségben B12 vitamint felhalmozni. A legszélesebb körben a *Propionibacterium shermanii* valamint a *Propionibacterium freudenreichii* törzset használják. Ezek a sejtekben tartják a termelt vitamint, de a fermentlébe ürítik a termelt propionsavat és ecetsavat. A használt törzsek mind mikroaerofilek, és a nagy B12 hozamok csak nagyon alacsony oxigén koncentráció mellett alakulnak ki.

A dimetil-benzimidazol (DMBI) bioszintézise azonban oxigént igényel. Ezért a fermentációt két szakaszra osztják. Az első három napon a fermentációt anaerob módon vezetik, ezalatt termelődik a kobamid, a vitamin molekula nagyobb része. Ezt követően 1-3 napos kis intenzitású levegőztetéssel érik el a DMBI termelést és két molekularész összekapcsolódását. Emellett meg kell oldani a keletkezett propionsav semlegesítését, a pH-t végig hetes értéken kell tartani. Ez jelentős mennyiségű lúgot igényel, mivel a termelt sav koncentrációja a tíz százalékot is elérheti. A baktériumok nem érzékenyek a szubsztrát inhibícióra, egyesek 17 %-os cukoroldatban is növekednek és termelnek. Ugyanakkor a termékinhibíció lép fel, a sok propionsav gátolja a tenyészet anyagcseréjét. Ennek megszüntetésére több mérnöki megoldást is találtak. A savakt el lehet távolítani a rendszerből mikroszűréssel, hollow fiber modulokon keresztül. Ez egyúttal sejtviisszatartást is eredményez, amittől megnő a reaktorban az aktív sejtek száma, ami megnöveli a produktivitást. Más megoldás a levegőztetett és nem levegőztetett szakaszok váltogatása. Optimális esetben (pl. 6 órás levegőztetés) a propionsavat felhasználják a sejtek, míg a vitamin szintézis folyik.

A harmincgénes bioszintézis dacára minden korban megkísérelték a törzseket genetikailag feljavítani. A random mutációk, a rekombináns technikák és a metabolikus fluxusmérnökség mind javított valamennyit a törzsek termelőképességén.

6.1.3.2. *B12 fermentáció Pseudomonas denitrificans törzssel*

Elsőként a Merck gyógyszergyár szabadalmaztatott fermentációs eljárást a B12 vitamin gyártására az 1950-es években. Ők a *Ps. denitrificans* törzset használták.

Évtizedekkel később a törzs genetikai feljavítása során nem egyesével manipulálták a géneket, hanem egész, nyolc génből álló operont amplifikáltak multikópiás plazmidokkal. Több gén heterológ kifejezését oldották meg, átveve *Methanobacterium ivanovii*-ből és *Rhodobacter capsulatus*-ból.

Ennél a mikrobánál a kobalamin szintézis a sejtszaporodással párhuzamosan folyik. A folyamat aerob, de a vitamin termelése alacsony oldott oxigén koncentrációnál gyorsabb. A fermentlébe prekuzorként DMBI-t és kobaltsókat adagolnak. Az optimális hőmérséklet 30 °C, a pH-értéket pedig 6-7 között kell tartani. A szakaszos fermentáció ciklusa rövid, a folyamat 2-3 nap alatt végbemegy.

6.1.3.3. *B12 fermentáció Rhodopseudomonas protamicus törzssel*

Ez voltaképpen mesterséges törzs, a kutatók a *Protaminobacter ruber* (más néven *Pro-pionibacter ruber*) és a *Rhodopseudomonas spheroides* protoplaszt fúziójával hozták létre. Az alapgondolat az volt, hogy a *Rhodopseudomonas* fotoszintézisre képes törzs, anyagcseréjében megtalálhatók a bakterioklorofill bioszintézis génei/enzimei. Ennek első lépései (az uroporfirinogén-3-ig) közösek a B12 szintézis lépéseivel, és az így termelt metabolitok „eltéríthetők” a vitamin termelés irányába. A létrehozott törzs segítségével versenyképes, 120-150 mg/l termékkoncentráció érhető el.

6.1.3.4. *B12 fermentáció metanolhasználó baktériumokkal*

Felmerült az a lehetőség, hogy a más fermentációs technológiákban melléktermékként képződő biomassza vitamin tartalmát is ki lehetne nyerni. Megvizsgálták például a szennyvíz eleveniszap B12 tartalmát, és az anaerob rothasztókban lévő iszapban találtak 2-5 mg/kg vitamint. Ezeket a törzseket különböző szénforrásokon tartva kiderült, hogy a metanolon megsokszorozódik a kobalamin termelés. Ez biokémiailag magyarázható, hiszen a B12 egy C-1 átvívő kofaktor, bekapcsolódhat a metanol anyagcserébe is.

A szennyvíz iszap vegyes kultúrát félfolytonos anaerob tenyésztésben fokozatosan metanol szénforrásra állították át. Hosszabb adaptációs időszak után létrejött egy állandó keverék-tenyészet, mely két-három B₁₂ termelő és emellett három-négy „szimbionta” törzsből állt. Megkísérelték az egyes törzseket izolálni, és tiszta tenyészetben, steril fermentációban tenyészteni, de a termékképzés mindegyiknél elmaradt a vegyes kultúrától.

A folyamat nagyon olcsó, mert az eljárás anaerob (nincs szükség levegőztetésre), nem steril, közönséges vaslemez tartályokban, akár 1000 m³-es léptékben is kivitelezhető, keverési igénye minimális (naponta négyszer negyedóra). A félfolytonos eljárás során naponta a fermentlé 10%-át cserélik le. A befertőződés veszélye csekély, mert a kizárólagos szénforrásként adott metanol sterilizáló hatást is kifejt. Ez tette gazdaságossá a viszonylag alacsony hatóanyag koncentráció (35 mg/kg) ellenére is.

Adalék: a Richter Gedeon Rt (korábban Kőbányai Gyógyszergyár) ezzel a technológiával a világpiacon is számottevő mennyiséget termelt. Az 1950-es években a világtermelés (700 kg) felét hazánkban gyártották (362 kg). A dorogi gyáregység üzembe helyezésével (4x1500 m³ fermentációs kapacitás) tovább növelték a termelést, 1977-ben már egy tonnát gyártottak (a világpiacon ekkor már 10 tonnára növekedett). Az üzem az ezredfordulóig működött, de ekkor már annyira elhasználódott, hogy a felújítása nem lett volna gazdaságos.

6.1.3.5. *Feldolgozás*

A feldolgozás első lépése a fermentlé hőkezelése. Ez 10-30 perces forralás, 80-120°C-on, 6,5-8,5 pH-n. Ettől a sejtek feltárodnak és a kiáramló vitaminnak köszönhetően vörösre festik a fermentlevet. Az így kapott termék az instabil hidroxikobalamin, melyet melegen 1 g/l káli-

um-cianid hozzáadásával átalakítanak a stabilabb ciano-kobalaminná. A sejtömeget kicsapással vagy centrifugálással elválasztják. A további tisztítás csapadékos és/vagy kromatográfiás lépésekkel történik (az átlátszó falú oszlopon jól követhető a vörös színű B₁₂-vitamin haladása). A terméket kétféle tisztasági szinten forgalmazzák. A kb. 80%-os anyagot takarmányozási célra használják, humán felhasználásra tovább kell tisztítani 96-98%-ra.

6.1.4. Felhasználás

A B₁₂ nagyobb részét takarmányok komplettálására használják, egy-gyomrúak (sertések és szárnyasok) tenyésztése során alkalmazzák. Növényi takarmányok kiegészítője, így felhasználásával állati fehérjét lehet megtakarítani, illetve növényi fehérjékkel helyettesíteni. Sertés és csirketápok esetében 10-15 mg B₁₂-vitamint adagolnak 1 tonna takarmányhoz.

A vészes vérszegénység manapság igen ritka kórkép, de megelőzőképpen számos gyógyszerkészítménnyel visznek be B₁₂ vitamint az emberi szervezetbe.

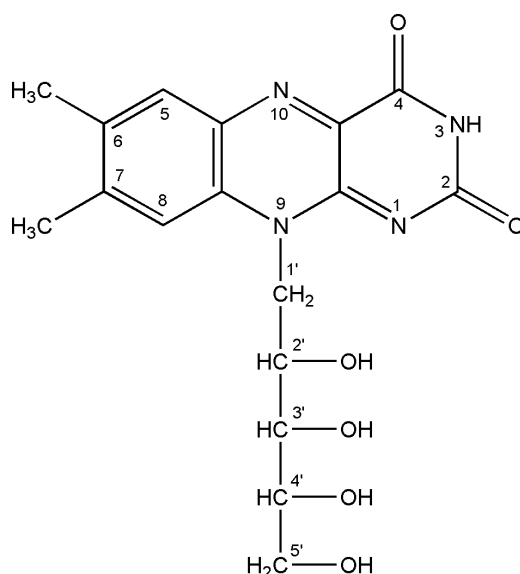
A B₁₂ éves piaca mintegy 10-12 tonna, beleértve a különböző vitaminformákat (ciano-kobalamin, hidroxikobalamin, koenzim B₁₂, metil-kobalamin).

6.2. B₂-vitamin (riboflavin, laktoflavin)

1933-ban György Pál és Richard Kuhn izolálták, azonosították tejsavóból, majd 1935-ben Kuhn és Karrer a vitamin szerkezetét is felderítették. A vitamin nevét színéről (flavus = sárga) és a kémiai szerkezetét alkotó ötszénatomos molekuláról kapta.

A riboflavin egy alloxazin származék, melynek redukált formája színtelen, oxidált formája vöröses-barnás színű. A flavin-mononukleotid valójában riboflavin-foszfát, amelyben a cukoralkohol ötödik szénatomjához egy foszforsav kapcsolódik. A flavin-adenin-dinukleotid (FAD) egy adenilsavval kapcsolódó riboflavin-foszfát.

Megtalálható a tejben, májban, vesében, tojásban, azonban csak a tejben fordul elő szabadon a riboflavin, egyéb élelmiszerekben kötött formában, flavoproteinként. A riboflavin sok humán- és állatgyógyászati készítmény alkotóeleme, hiánya növekedésviart, bőrgyulladást (dermatitis) és szemkárosodást okozhat, ezért javasolt vitaminban dúsított kenyér (B₂, B₁, nikotinsav) fogyasztása.



94. ábra: A B₂-vitamin szerkezete

6.2.1. Gyártások

Kémiai szintézissel: de ez soklépéses, számos anyagot igénylő, és sok mellékterméket adó folyamat, emiatt visszaszorult.

Kémiai + biotechnológiai vegyes eljárással: a D-ribóz molekularészt fermentációval állítják elő (glükózból *Bacillus pumilus* segítségével), és ezt kapcsolják össze a szintetikus alloxazin vázzal.

De novo fermentációval: több, egymástól nagyon távol álló törzset is sikerült genetikailag úgy manipulálni, hogy gazdaságos mennyiségben (kb. 15 g/l) riboflavint akumuláltak a fermentációban. Manapság minden nagy gyártó fermentációs eljárást használ. A világpiacon mintegy féltucatnyi termelő cég van jelen, ezek mindegyike kifejlesztette a saját termelő törzsét. Nem került be a táblázatba, de létrehoztak olyan *Lactococcus lactis* törzset is, amely mind riboflavinra, mind folsavra túltermelő.

Törzs	titer g/l	ferm. idő, óra
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2,5	
<i>Ashbya gossypii</i> (BASF)	6,5-15	168
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	17,4	72
<i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168 (DSM)	15	48
<i>Bacillus subtilis</i> (VNII304, orosz)	4,5	25
<i>Bacillus subtilis</i> Y32 (kínai)	3	72
<i>Bacillus subtilis</i> RH33 (kínai)	12	

16. táblázat Riboflavin termelő törzsek

6.2.1.1. Riboflavin termelés *Ashbya gossypii* törzsszel

Időben elsőként az iparban két fonalas gombával foglalkoztak. Kezdetben *Eremothecium ashbyii* törzsekkel végezték a fermentációt, majd egy hasonló, de genetikailag stabilabb törzssre, az *Ashbya gossypii* törzssre dolgoztak ki fermentációs eljárást.

A legtöbb mikroorganizmusban a vas ionok több ponton is gátolják a riboflavin bioszintézisét. Az *Eremothecium ashbyii* és *Ashbya gossypii* törzsek viszont vasionok jelenlétében is termelik, sőt túltermelik a vitamint.

A tenyészet levegőigénye kicsi (0,3 vvm), a fermentációs idő hosszú (7 nap). A különféle szénforrások (pálmaolaj, kukorica lekvár, glükóz, melasz, savó) közül a melasz és növényi olaj kombinációjával lehet a legnagyobb, 15 g/l-es koncentrációt elérni. A fermentáció három szakaszra osztható. Az első, szaporodási fázisban piruvát termelés és ennek megfelelően a pH csökkenése jellemző. A második időszakban a tenyészet spórasodik, a piruvát felhasználódik, és az ammónia felszabadulása megemeli a pH-t. Végül gyors riboflavin képződés jelentkezik, de ez a termék FAD és FMN formájában a sejtekhez kötődik.

6.2.1.2. Riboflavin termelés *Bacillus subtilis* törzsszel

Mivel ez a törzs prokarióta, a biokémiai anyagcsereutakat egyszerűbben lehetett vizsgálni és módosítani. A riboflavin bioszintézisét megvizsgálva kiderült, hogy a szükséges enzimek egyetlen, mintegy 4,3 kb-nyi operonon helyezkednek el. A génamplifikáció és a szabályozási régiók kicserélése egy erős konstitutív promotérral (SPO-1 fág) megnövelte a riboflavin termelést. A túltermelést megakadályozó szabályozást antimetabolit (roseoflavin) rezisztens mutánsok izolálásával kerültk meg.

A fermentáció oldalán a számítógépes irányítás növeli a technológia hatékonyságát. A cukor rátáplálás és a pH szabályozás fuzzy logic alapú automatizálását elsőként a japánok oldották meg.

6.2.1.3. *Riboflavin termelés Corynebacterium ammoniagenes törzssel*

A törzs termelőképességét rekombináns DNS-technikával növelték meg. Megkeresték a *C. ammoniagenes* legerősebb promóterét (P54-6), és ezt építették be az operon elejére. Ettől a termelő enzimek aktivitása 2,4-44-szeresére emelkedett. (Az első lépés a leglassabb, a sebesség-meghatározó.)

Technológiai paraméterek

A fermentációs upstream technológiák minden esetben steril, szubmerz, aerob eljárások. Nagy mennyiségű, könnyen metabolizálható cukrot (glükóz, melasz) adnak szénforrásként, rátáplálásos technikával. A szénforrás hasznosulása a vitaminra nézve gyenge, tömegre számolva 5-10% körüli.

A riboflavin oldhatósága rossz, vizes közegben csak 80-100 mg/l. Emiatt megtermelt és kiválasztott riboflavin a fermentleiben sárgás, tús kristályok formájában kiválik. Az elérhető termék koncentráció 15 g/l körül van. Egy kínai közlés beszámol 25-30 g/l-es technológiáról, 48 órás fermentációs idővel, de ezt a kiugró adatot más információk nem támasztják alá.

Feldolgozás: a sejteket hőkezeléssel előlik, majd differenciál-centrifugálással elválasztják a sejtömeget és a sárga tús kristályokat. Meleg savas mosással 96%-os tisztaságú termék állítható elő. Átkristályosítással 99%-os, élelmiszer minőségű terméket kaphatunk.

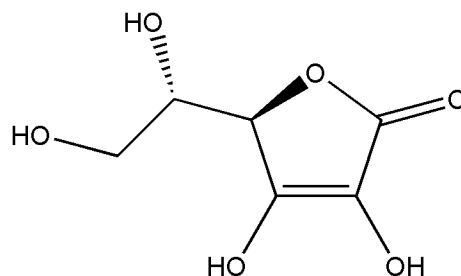
A riboflavin éves piaca kb. 4000 tonna, ennek mintegy 70%-a kevésbé tisztított, porlasztva szárított takarmány adalék.

6.3. C-vitamin (L-askorbinsav)

A vitamint Szent-Györgyi Albert izolálta 1928-ban, majd munkásságát 1937-ben orvosi és élettani Nobel-díjjal ismerték el.

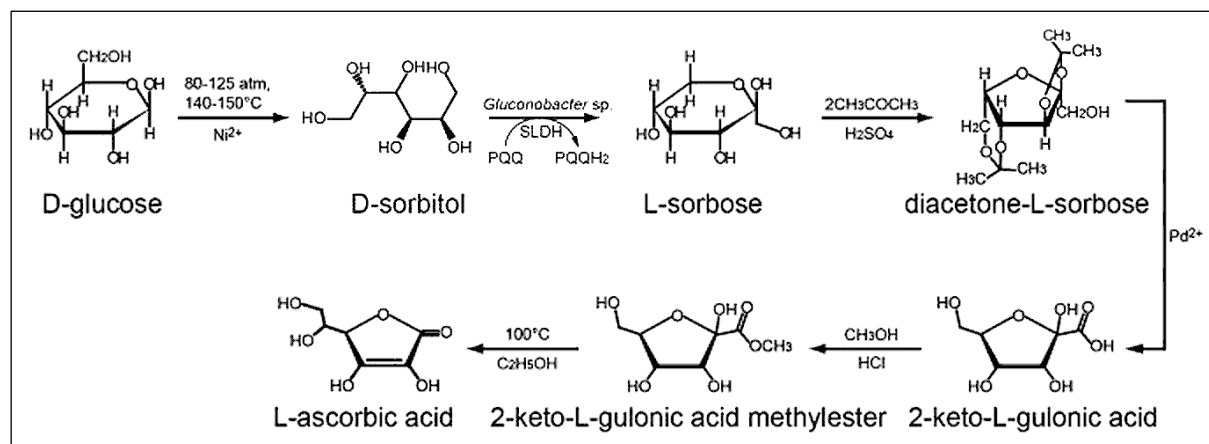
A vízdoldékony, erősen redukáló vegyület szervezetünkben rendkívül fontos antioxidáns, emellett számos reakciót segít elő különböző biokémiai folyamatokban.

Az L-askorbinsav a legtöbb élő szervezet számára egy fontos metabolit, de a többi vitaminnal ellentétben a legtöbb állati szervezet képes a C-vitamin előállítására. Kivételnek számít, hogy az ember és néhány más faj (pl. a tengerimalac) nem képes szintetizálni, a táplálékkal kell bevinni.



95. ábra Az L-askorbinsav szerkezete

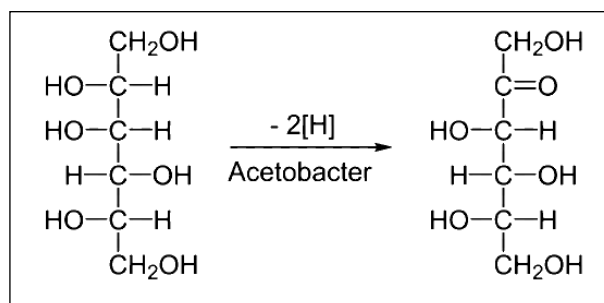
Aszkorbinsav legfontosabb feladata, hogy megvédje a sejteket a káros oxidáló hatású anyagoktól. Az élelmiszerekben részben vitamin adalékként, részben antioxidánsként használják. Szerepe van emellett a kötőszövetek megfelelő újraképződésében, molekuláris szinten a kollagén érésében. A kollagént alkotó prolin molekulák hidroxiprolinná való átalakulásához nélkülözhetetlen. E hatása miatt kozmetikumokban is alkalmazzák.



96. ábra A Reichstein eljárás

Jelenleg a kereskedelmi forgalomba kerülő L-aszkorbinsav túlnyomó részét a D-glükózból kiinduló Reichstein eljárással gyártják. A Reichstein eljárás öt kémiai és egy biokonverziós lépésből áll. A konverzió során a D-szorbítot oxidálják L-szorbózzá *Acetobacter suboxydans* segítségével. A szorbózt kénsavas vízelvonással két aceton molekulával kondenzáltatják. A diacetonidat palládium katalizátorral 2-keto-gulonsavvá alakítják. Ebből további két kémiai lépéssel kapják az aszkorbinsavat.

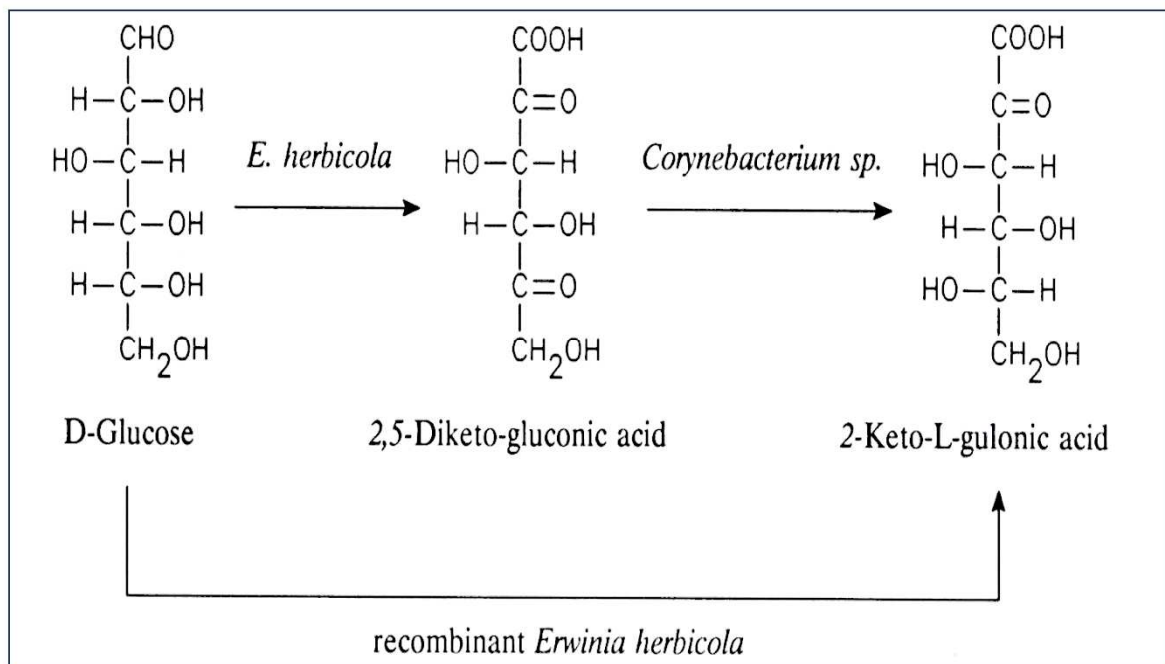
Az enzimés átalakítás a maga idejében (1934) nagyon nagy előrelépésnek számított, mivel az enzim célzottan, régiószelktíven csak egyetlen hidroxil csoportot oxidált. A reakció a Bertrand szabály iskolapéldája, a reakció csak olyan szubsztráton, illetve régió megy végbe, amelyben három vicinális OH csoport sztereokémiaiilag egy irányba mutat (sztereo-cisz helyzet). A három alkoholos OH közül a középső oxidálódik ketocsoporttá, így jön létre a szorbóz.



97. ábra Szorbít – szorbóz oxidáció

A Reichstein technológia azonban több magas hőmérsékletű és/vagy nyomású lépést tartalmaz, környezeti szempontból káros vegyszereket használ, és az eredő hatásfoka alig haladja meg az 50%-ot. Emiatt próbálkoztak egyszerűbb, több biotechnológiai lépést alkalmazó technológiákkal is. Az utolsó két lépést nem lehet kikerülni, de a 2-keto-gulonsav előállítására több biokonverziós technológiát is kidolgoztak.

A 2,5-diketo-L-gulonsav útvonal két egymás utáni mikrobiális reakciót használ a 2-keto-L-gulonsav kialakítására. Az első lépésben a kiindulási D-glükózt egy *Erwinia* sp. törzs oxidálja 2,5-diketo-L-gulonsavvá, majd a második lépésben ezt egy *Corynebacterium* törzs 2-keto-L-gulonsavvá redukálja. Ez jóval praktikusabb folyamat, mint az előző, mivel a négy lépés helyett csak kettő szükséges, mindkettő jó hozammal működik és a durva kémiai lépések elhagyhatók. Ezt a transzformációs útvonalat továbbfejlesztették úgy, hogy heterológ expresszióval egyetlen törzsben egyesítették az enzimeket. Így a D-glükóz a genetikailag módosított törzsek használatával közvetlenül, egy lépésben átalakítható 2-keto-L-gulonsavvá.



98. ábra C-vitamin gyártás rekombináns *Erwinia herbicola* törzsszel

A világpiac évente 60-70.000 tonna, a növekedési ütem kb. 3 %-os. Ennek a mennyiségnek mintegy a felét forgalmazzák vitaminként gyógyszerekben és élelmiszerekben, a másik felét antioxidánsként és adalékként egyéb termékekben.

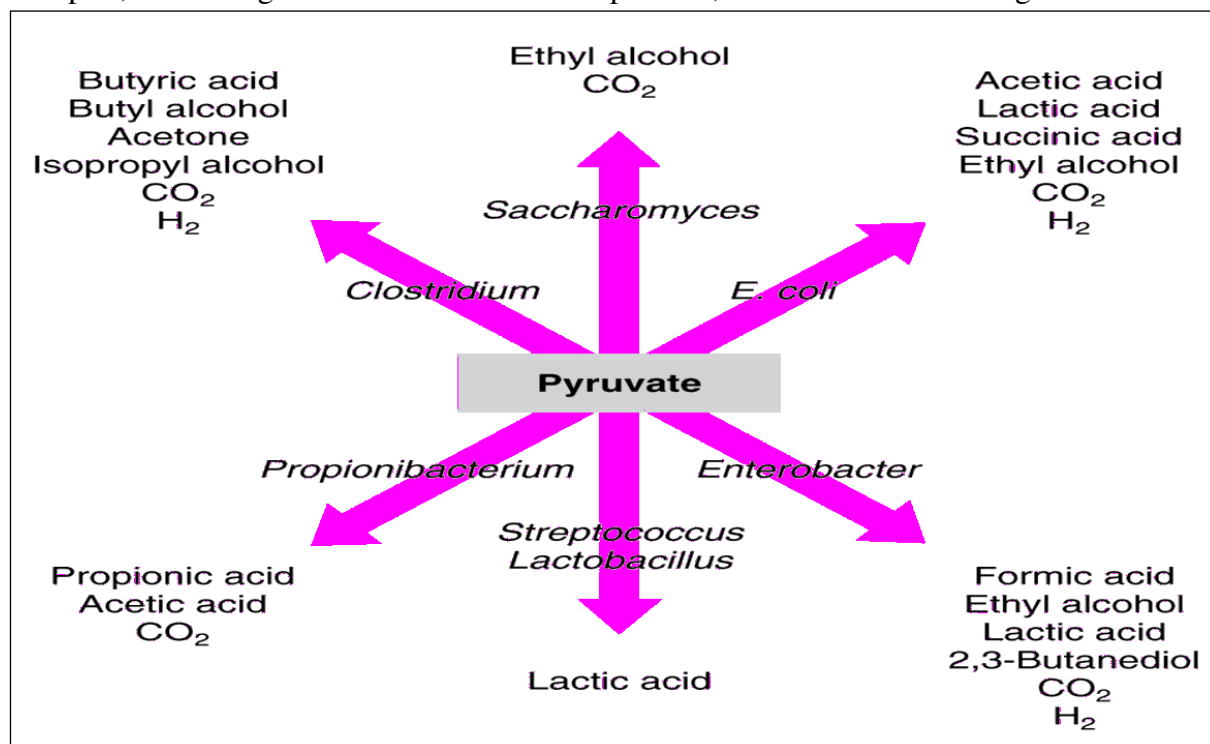
7. ANAEROB TECHNOLÓGIÁK

Anaerob technológiák = erjedési iparok

Az erjedés a heterotróf mikroorganizmusok anaerob energiatermelő folyamata, amely a szénhidrátok ill. egyes származékaik egy vagy több szén-szén kötésének hasításával és az oxigénatomok átrendeződésével jár. A heterotróf mikroorganizmusok energiatermelése anaerob körülmények között erjedéssel történik.

Adalék: a fermentáció (fermentation, Gährung) szó eredetileg csak ezt az anaerob folyamatot jelentette. A XX. században a biotechnológia kialakulásával és térhódításával viszont a jelentés eltolódott, az aerob mikrobiális folyamatokat is így nevezzük.

Az anaerob anyagcserének sokféle reakciója és terméke van, de néhány közös szabályszerűséget megfigyelhetünk. A szénhidrátokat hasznosító glikolízis anaerob ATP-termelő folyamat, tehát oxigén nélkül is működik. Végterméke a piruvát és a NAD-hoz kötött hidrogének. Ez utóbbiak okozzák a nehézséget, ezeket kell valahová deponálni, hogy a koenzimek újra felhasználhatók legyenek. Ez az a természetes folyamat, amit az ipari enzimes reakciónál „koenzim regenerálás” néven tudatosan, tervezetten alkalmazunk. Sokféle molekula lehet hidrogén akceptor, ennek megfelelően sokféle termék képződhet, akár molekuláris hidrogén is. A külön-



99. ábra Az anaerob termékek sokfélesége

böző anyagcseréjű mikrobák más-más termékeket hoznak létre (99. ábra).

Ha ebben a fázisban megállítjuk a folyamatot, sokféle hasznos terméket kaphatunk. Továbbvive viszont a metanogén fázisba jutunk, ahol már csak metán, szén-dioxid és szervesetlen anyagok maradnak.

Anaerob technológiákkal nagyipari léptékben állítanak elő olyan tömegtermékeket, mint

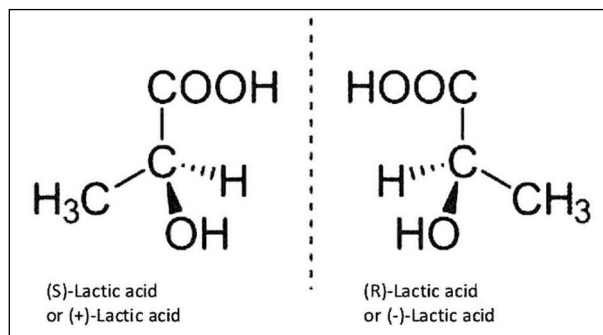
- Etanol
- Biogáz
- Tejsav
- Aceton-butanol-etanol elegy
- Dextrán
- B12 vitamin

Az etanol és a biogáz gyártás más tantárgyak anyaga, ezért itt nem foglalkozunk vele. A B12 vitamin fermentáció az előző „Vitaminok” fejezetben szerepel, a dextrán gyártás pedig később, a mikrobiális poliszacharidok között kerül sorra. Így csak két technológia marad, a tejsav és az ABE gyártás.

7.1. Tejsav gyártás

7.1.1. Tulajdonságok

A tejsav optikailag aktív vegyület, két izomer, az L(+) és a D(-) formájában, illetve a kettő racém elegyként (DL tejsav) fordul elő a természetben. A forgatás iránya megfordul, ha a szabad savból észter vagy kétértékű fémsó képződik.

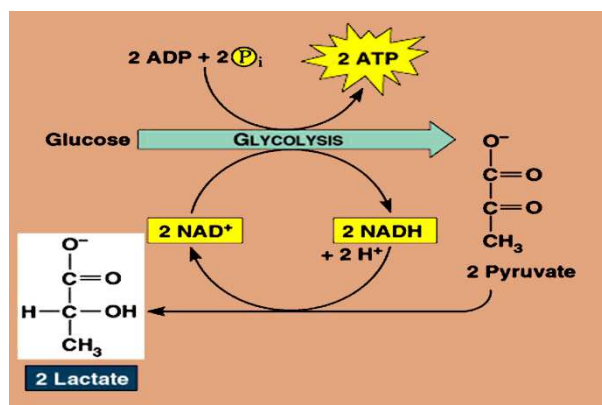


100. ábra A tejsav optikai izomerei

Érdekes jelenség, hogy az izomerek olvadáspontja jelentősen különbözik. A tiszta izomereknél 53 °C, a racém keveréknél viszont csak 16,8 °C. Vízzel korlátlanul elegyedik, forrpointja magas (~228 °C), ezért vákuumban kell desztillálni (fp.: 0,5 Hgmm-nél 82 °C, 14 Hgmm-nél 122 °C).

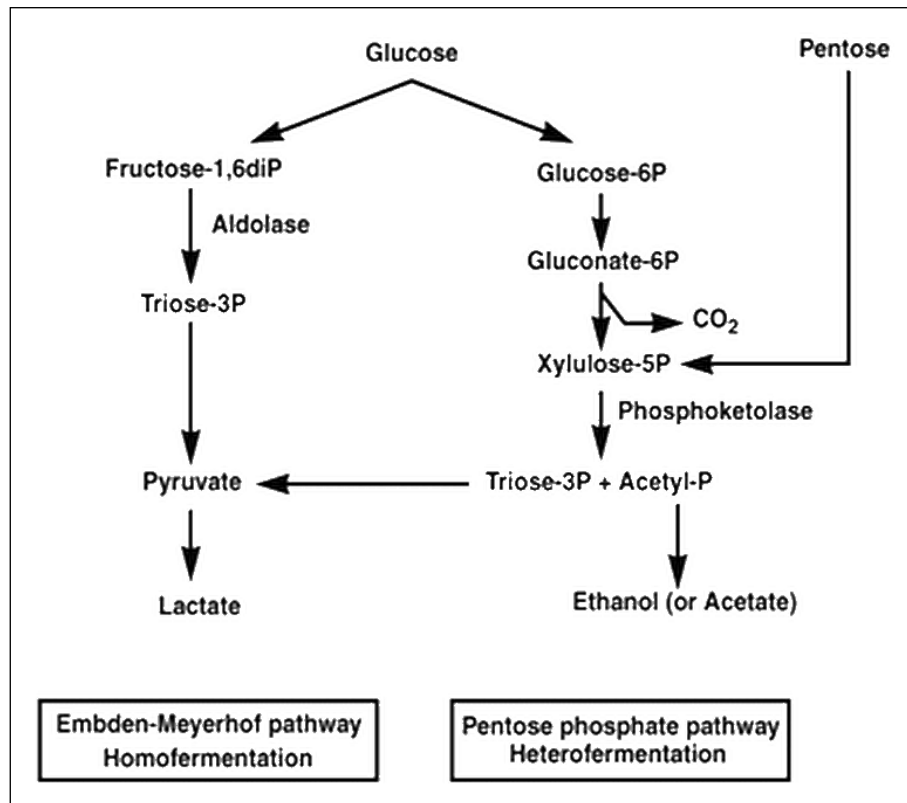
7.1.2. Bioszintézis

Az (L)-tejsav tipikusan az anaerob anyagcsere terméke, a piroszőlősav hidrogénezésével keletkezik. A tejsavas erjedés esetén a tejsav-dehidrogenáz egy NADH és egy proton segítségével a piruvátot laktáttá redukálja.



101. ábra A tejsav képződés a glikolízishez kapcsolt reakció

A tejsav termelők anyagcsereje nem egységes, két alaptípusba sorolható. A különbség abban áll, hogy a kiindulási hexózból különböző úton jutnak el a piruvátig.



102. ábra A homo- és heterofermentatív tejsav képződés

A homofermentatív törzsek egy hexózból két tejsavat képeznek, melléktermék nélkül, míg a heterofermentatívok csak egy molekula tejsavat termelnek, mellette egy kétszénatomos egységet (ecetsavat és etanolt) és egy szén-dioxidot.

A heterofermentatív törzsekben az aldoláz enzim hiányzik, és emiatt a tejsav mellett számottevő mennyiségben etanol és ecetsav is képződik. Ez esetben a glükóz a pentóz-foszfát úton hasznosul, és a xilulóz-5-foszfátból csak egy piruvát lesz, mellette egy acetát és egy szén-dioxid. A homofermentatív törzsekben glikolízis jól működik, ezért elméletileg 1 mól hexózból 2 mól tejsav jöhet létre. A gyakorlatban ez az arány valamivel kevesebb, de a hozam a 90% fölötti.

A tejsav termelésnél termékkihibíció érvényesül. A nem-disszociált tejsav fejt ki gátló hatást, a disszociált nem. Tehát savas közegben lelassul a fermentáció, de ha közömbösítjük a savat, akkor ez a hatás nem lép fel.

Anaerob viszonyok között a keletkezett laktát kidiffundál a citoplazmamembránon át a környezetbe.

7.1.3. A tejsav termelő törzsek

A szénhidrátokat tejsavvá lebontó baktérium nemzetségek és fajok a Bergey's Manual szerint a következő csoportokra oszthatók:

17. csoport: Gram pozitív coccusok: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pedicoccus*, *Saccharococcus*, *Streptococcus*;

18. csoport: endospóráképző Gram pozitív pálcák és coccusok: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*;

19. csoport: normál, nem spórázó Gram pozitív pálcák: *Lactobacillus*

A tejtermékek (joghurt, kefir, sajtok) előállításában nagyon sok faj, jellemzően vegyes kultúrában részt vesz, de a tejsav gyártásánál a *Lactobacillus*-okat használják, mert ezek jóval savtűrőbbek, mint a többi tejsav baktérium.

A tejsav termelő törzsek kiválasztásánál a fermentációs technológia mellett figyelembe kell venni a downstream lépéssort is. A keletkezett tejsavat közömbösíteni kell, mert az alacsony pH értéket (általában 4,5 alatt) a tenyészet nem viseli el. Így viszont nem szabad savat kapunk, mint a citromsavnál, hanem sót, alkáli-, ammónium- vagy kalcium-laktátot. Ennek az elválasztása és a szabad sav felszabadítása problémás, berendezés és költségigényes. Ez rányomja a bélyegét minden baktériumos eljárásra. Ugyanez érvényes a fonalas gombákra is. Több gombanemzetség is termel tejsavat, pl. a *Rhizopus*, *Mucor* és *Monilia*, ám az *Aspergillus*ok, *Fusarium*ok és *Penicillium*ok nem. Egyes *Rhizopus* fajok fermentációs szempontból gazdaságosabban termelik a tejsavat, mint a baktériumok. Egyrészt képesek keményítőtől is tejsavat előállítani hidrolizáló enzimrendszerük segítségével, másrészt az olcsóbb szerves nitrogén forrásokat is tudják hasznosítani, valamint nem igényelnek aminosav és vitamin-kiegészítést sem. Anyagcseréjük elméletileg 1,5 mol tejsavat ad 1 mol glükózból, ami viszont több mellékterméket jelent. De ezek az aerob törzsek is savérzékenyek, a feldolgozásnál ugyanazok a problémák merülnek fel.

Megoldást jelent a genetikailag manipulált élesztők (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia*) alkalmazása. Több ponton is meg kellett változtatni a törzsek anyagcseréjét, ki kellett ütni az etanol termelés három lépését és be kellett építeni a piruvát-laktát reakciót. Így akár pH=1,5-en is lehet fermentálni, elég az ásványi sókból összeállított tápoldat, és szabad savat kapunk. A nagy cégek között a Cargill és a Corbion már több mint egy évtizede élesztővel termelik a tejsavat, de mások megmaradtak a tejsavbaktériumok mellett.

A *Lactobacillus*-ok között homo- és heterofermentatív fajok egyaránt előfordulnak. A legtöbb törzs az egyik tiszta enantiomert termeli, de néhányban racém keverék képződik. Ezekben mindkét sztereospecifikus laktát-dehidrogenáz enzim megtalálható. Többségében az L(+) tejsavat gyártják.

Baktérium	anyagcsereút	enantiomer	szénforrás
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> korábban <i>L. bulgaricus</i>	obligát homolaktikus	D(-)	laktóz, savó, permeátum
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> korábban <i>L. delbrueckii</i>	homolaktikus, indukálható heterolaktikus	L(+)	glükóz, szacharóz, burgonya
<i>Lactobacillus helveticus</i>	obligát homolaktikus	DL	laktóz, permeátum
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	obligát homolaktikus	L(+)	keményítő
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	obligát homolaktikus	DL	keményítő
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> és ssp. <i>rhamnosus</i>	homolaktikus, indukálható heterolaktikus	L(+)	laktóz, savó
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> és ssp. <i>cremoris</i> korábban <i>Streptococcus lactis</i>	obligát homolaktikus	L(+)	laktóz, permeátum
<i>Streptococcus thermophilus</i>	obligát homolaktikus	L(+)	laktóz

17. táblázat A tejsav termelő törzsek jellemzői

Az ipari termelő törzseknél alapvető követelmény a savtolerancia (pH=4,4-ig) és a bakteriofágokkal szembeni ellenálló képesség. A fágok igen nagy károkat okozhatnak a tenyészetekben, ezért kulcskérdés a genetikailag rezisztens vonalak szelekciója.

7.1.4. A tejsav termelő törzsek tápanyagigénye

Az alkalmazott szénforrás faj-, esetenként törzsfüggő: glükózból, laktózból, maltózból, sőt keményítőből is képesek tejsavat erjeszteni.

A tejsav baktériumok anyagcseréje több ponton hiányos. Nem képesek a citokróom és a porfirin (légzési lánc részei) létrehozására, a proton-gradiensek segítségével nem tudnak ATP-t létrehozni, azt főként a glikolízisból nyerik. Nem tudják hasznosítani a szerves nitrogén vegyületeket, komplex, szerves nitrogén forrást igényelnek. Emellett szükségük van vitaminokra, purin és pirimidin bázisokra.

Adalék: Érdekes jelenség, hogy ezek a törzsek ilyen hiányos anyagcserével fenn tudtak maradni az evolúciós túlélési versenyben. Meg tudták találni azokat az élőhelyeket, ökológiai fiülkéket, amelyekben komplex tápanyagokhoz juthattak (pl. növényi nedvek – ld. silózás). Savtermelésük ugyanakkor versenylőnyt jelent a többi baktériumfajjal szemben.

A tejsav baktériumok mindegyike képes a laktózt felvenni és hidrolizálni, majd a galaktózt hasznosítani.

7.1.5. A tejsav fermentáció

A teljesség kedvéért említsük meg, hogy a tejsav előállításra létezik szintetikus vegyipari technológia. Acetaldehid és hidrogén cianid reakciójával laktonitril keletkezik, majd ezt erős savval tejsavvá hidrolizálják. A kapott termék racém, ami korlátozza a felhasználhatóságát, másrészt a rendkívül mérgező alapanyag miatt különlegesen kialakított üzemre van szükség. A világ tejsav termelése viszont nagyrészt (~70%) biotechnológiai eredetű. A tejsavas erjedés spontán módon is végbemegy, a háztartásokban empirikus módon évezredek óta alkalmazzák. Ilyen folyamat a

- káposzta savanyítás
- aludttej, kefir, joghurt, gyártás
- kovászolás
- kovászos uborka készítés

Az ipari fermentációs technológiákra jellemző a nagy szénforrás koncentráció (120-150 g/l). A tápoldatban komplex nitrogén tartalmú komponenseket adnak a tejsav baktériumokra jellemző vitamin- és aminosav auxotrófiák miatt, mint pl. a kukoricalekvár, maláta kivonat, szója kivonat. Jó tápanyag a melasz is, de a benne lévő egyéb anyagok megnehezítik a termék tisztítását a feldolgozási szakaszban, ezért nem terjedt el. Savó szénforrás esetén a tejcukor mellett oldatban lévő egyéb komponensek nagyrészt fedezik a baktériumok tápanyag igényét. Ugyanakkor a túlzott sejtnövekedés lelassítására nitrogén- és/vagy foszfor limitációt állítanak be.

A fermentációt magas hőmérsékleten (40-60 °C) vezetik. A fermentorok szinte tetszőlegesen nagy méretűek lehetnek (akár több száz m³), mivel a technológia anaerob, nem kell levegőztetni. A savtartalom miatt a készülékeket rozsdamentes acélból kell készíteni. Egy minimális keverésre szükség van, de ez csak a fermentlé homogénizálására, az ülepedés megakadályozására szolgál. A keletkező tejsavat közömbösíteni kell, mivel a savas közeg károsítja a sejteket. Erre többféle megoldást alakítottak ki.

- CaCO₃ (mészköliszt) a tápoldatban. Ez a megoldás nem igényel pH mérést és szabályozást, kémiai automatizmussal történik, de plusz egy szilárd fázist visz be rendszerbe, ami problémákat okozhat.
- Alkáli lúgok adagolásával. Ehhez szükség van pH mérő elektródra és szabályozó rendszerre, valamint jelentősen hígítja a fermentlevet.
- NH₃ gáz befúvatásával. Az ammónia azonnal beoldódik a lébe, és ammónium-hidroxidként reagál a tejsavval. Ez drágább, mint az alkáli lúgok, de nem hígítja a fermentlevet.
- Magnézium-oxid vagy -hidroxid adagolásával.

A sterilitás megőrzésére nem kell nagy gondot fordítani. Az oxigénhiány, a savas közeg és a magas hőmérséklet együttesen kedvezőtlen környezet a legtöbb gyorsan növvő mikroorganizmus számára.

A fermentáció időtartama 2-4 nap. A folyamat végén el lehet érni a 12-15%-os tejsav koncentrációt, de ennek határt szab a kalcium-laktát oldhatósága. A keletkezett biomassza a beadott cukor súlyának kb. 15%-a, azaz a fermentlére nézve 2-2,5%.

A folyamat klasszikus kivitelezése a szakaszos fermentáció, mivel ezzel lehet nagy termék-koncentrációt elérni. Rátáplálással el lehet érni a 200 g/literes titert is. A produktivitás értékek viszont a folytonos fermentációnál sokkal jobbák, de alacsonyabb tejsav koncentrációval. A kettő előnyeit egyesíti a sejtvisszatartásos folytonos rendszer, ahol egy membránon keresztül veszik el terméket tartalmazó levét, míg a sejtek a fermentorban maradnak. Így extrém nagy sejtsűrűség érhető el, ami megnöveli a biokémiai reakció sebességét. Ilyen megoldásokkal fenn lehetett tartani a 60-120 g/l-es termék-koncentrációt igen nagy produktivitás értékek mellett. Ugyanakkor a kinyerés szempontjából fontos, hogy a cukor koncentráció minimális legyen az elvett fermentlében, ez viszont a folytonos fermentációnál nem valósítható meg.

7.1.6. A tejsav izolálása (downstream processing)

A feldolgozási műveletsor nagyon sokféle változatban ismert, kialakításuk függ:

- fermentlé tulajdonságaitól (milyen koncentrációban és milyen kationnal alkotott só formájában van jelen a laktát)
- végtermék kívánt tisztaságától, azaz a végső felhasználási céltól

A fermentlében a sejtek és sejtörmelékek mellett mindig található kis mennyiségű fel nem használt cukor, egyéb szerves sav (ecetsav, esetleg fumársav), színyanyagok, szervesetlen sók, ezen belül fémionok.

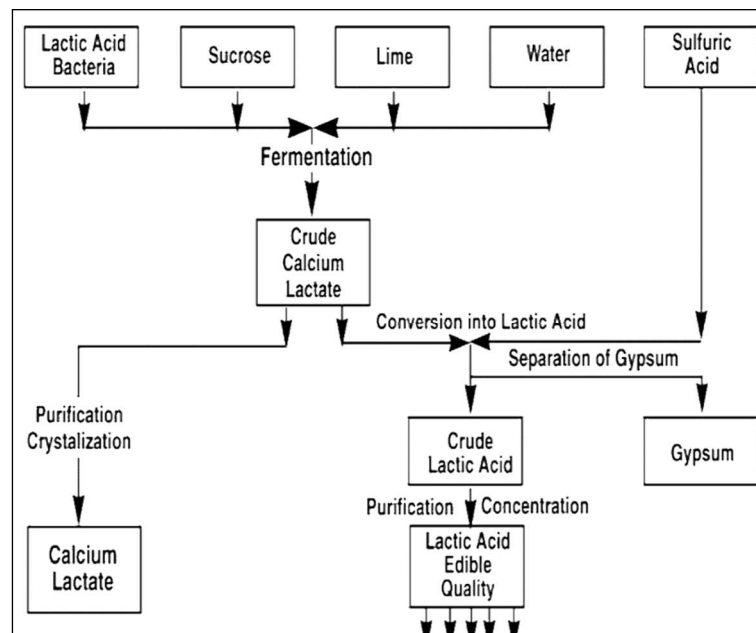
A tejsav végtermék megkívánt tisztasága lehet ipari, élelmiszeripari vagy gyógyszerkönyvi minőség. A polimerizációs célra használt tejsav egyes tisztasági mutatói szigorúbbak, mint a gyógyászati minőségénél, például nem tartalmazhat szénhidrátot.

A „heat stable” minősítés olyan tisztaságú tejsavat jelent, amely kénsavval melegítve sem ad elszíneződést.

A „klasszikus”, kalciumos technológia (LSG = Lime, Sulphur, Gypsum)

A „klasszikus” feldolgozási technológia a „klasszikus”, kalcium-laktátot tartalmazó fermentlére épül. Lépései a következők:

1. A fermentáció vágása után a hőmérsékletet 80-90 °C-ra emelik, az oldat pH-ját kalcium-hidroxiddal 10-11 közé állítják. Ezzel a lúgos főzéssel a mikroorganizmusokat elölik és a jelen lévő fehérje természetű anyagokat kicsapják. Ezen a hőmérsékleten és pH-n a kalcium-laktát oldhatósága jó, teljes egészében oldatba megy.
2. A kivált csapadékot melegen elválasztják (jellemzően szűréssel)
3. Az oldatban kénsav hozzáadásával felszabadítják a tejsavat, a kalcium gipsz formájában kicsapódik.
4. A jelenlévő fémionokat (vas, réz) kénhidrogén, vagy hexaciano-ferrát só adagolásával lecsapják.
5. A csapadékos oldatot leszűrik, jellemzően vákuum dobszűrővel, esetleg szűrőpréssel.
6. A színyanyagokat és a szennyező ionokat aktív szénes derítéssel távolítják el.
7. A kapott tejsav oldat tetszőlegesen töményíthető, akár 80-90 %-ig, csökkentett nyomáson.



103. ábra A tejsav gyártás anyagforgalma

A bemutatott technológia előnye, hogy jól ismert, kidolgozott eljárás, amelyet ipari léptékben is sokszorosan kipróbáltak. Hátránya, hogy:

- nagyok a veszteségek, a teljes sorban a termék mintegy 20 %-a elvész.
- igen nagy a vegyszerigénye, 100 tonna termék kinyeréséhez mintegy 45 tonna $\text{Ca}(\text{OH})_2$ és 55 tonna kénsav szükséges
- ennek megfelelően a termékkel közel azonos tömegű melléktermék (gipsz, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) keletkezik
- ílymódon csak élelmiszeripari tisztaságú tejsav állítható elő, nagyobb tisztasághoz további műveletekre van szükség.

A „kalcium nélküli” technológiák műveletei

A tejsav gyártás fejlesztése során egyre inkább arra törekedtek, hogy a mellőzzék a kalciumot, és más bázisokkal (NaOH , NH_4OH , esetleg KOH) közömbösítsék a keletkező savat. Ez a változtatás kihat a feldolgozási technológiákra is. Megfelelő technológia kialakításával a bázis a feldolgozás során visszanyerhető és újra felhasználható a fermentált sav közömbösítésére. A fejlesztések iránya a kalcium mellőzésén kívül a kinyerés hatékonyságának fokozása és a termék tisztaságának növelése.

Ha a feldolgozási technológiákat lépésekre bontjuk, az egyes műveleteket három kategóriába sorolhatjuk, amelyek sorrendje nem kötött, hanem opcionális:

1. a szabad sav felszabadítása sójából
2. koncentráció műveletek
3. tisztítási műveletek

A szabad sav felszabadítása sójából

A folyamat kulcslépése minden esetben a szabad tejsav előállítása sójából. Ennek megvalósítására többféle eljárást dolgoztak ki, ezeknek megfelelően változik a vegyszerigény és a keletkező melléktermékek mennyisége. Néhány változat:

- A szűrt fermentlé savanyítása kénsavval. A módszer hátránya, hogy sztöchiometrikus mennyiségű kénsav szükséges, és ennek megfelelő mennyiségű ammónium-szulfát melléktermék keletkezik. Ez értékesíthető műtrágyaként, de mivel viszonylag kis koncentrációban (kb. 1 M) jelenik meg, töményítése és kristályosítása sok energiát igényel.
- A szabad sav előállítását történhet kation cserélő gyantán is. A H^+ fázisban lévő gyantával lecserélik az elleniont, és ezzel tejsavat kapnak. Az eljárás elegánsnak tűnik, azonban óriási méretű gyantaágyra van szükség, amelynek regenerálásánál szintén sztöchiometrikus mennyiségű erős savra van szükség, amelyből melléktermékként ásványi só keletkezik.
- A laktát só megbontására alkalmas a bipoláris membránokat alkalmazó elektrodialízis (EDB) is. Ez tiszta, egylépéses megoldás, de nagy az áramfelvétele, egy mól só bontásához elméletileg is 96500 Coulomb töltést kell bevinni. Emellett a membránok költsége is igen nagy.

Mg-laktát tartalmú fermentlé feldolgozása

A fermentáció során a savat lehet Mg oxiddal vagy hidroxiddal is semlegesíteni. Ennek több előnye is van. Bár a Mg-laktát oldhatósága ~80 g/l körül van, a fermentlé hajlamos erősen túltelítődni, akár másfél-kétszer nagyobb koncentrációig. Bepárlással ez felemelhető 200-220 g/l-re, majd hűtéssel kikristályosítható a Mg-laktát. Ezt a sót izoamil-alkoholos közegben sósavval bontják meg. A kapott $MgCl_2$ termohidrolízissel bontható MgO -ra és sósavra, ezek visszavihetők a folyamatba.

Koncentráló műveletek

A képződő tejsav, illetve laktát koncentrációja a fermentáció végén közelítőleg 1 mól/liter. Ez különféle akkumuláló technikák alkalmazásával növelhető kb. 1,5 mól/g. A végtermékként kiadott tejsav koncentrációja viszont igény szerint 80-90-95%, esetleg e fölötti érték. Eszerint a technológia során mindenképpen szükség van a koncentrációt növelő művelet(ek)re:

- **Bepárlás.** A tejsav forráspontja igen magas (228 °C), emiatt a víz lehajtásának látszólag semmi akadálya. A 100 °C körüli hőmérsékleten azonban káros folyamatok indulnak be, egyrészt a fermentléből származó anyagok sötét színanyagokat képeznek, másrészt a tejsavmolekulák is kondenzálódni kezdenek. A gyakorlatban ezért vákuum desztillációt alkalmaznak (fp.: 0,5 Hgmm-nél 82 °C, 14 Hgmm-nél 122 °C).
- **Extrahció.** A savazással visszazorított disszociációjú tejsav sokféle szerves oldószerezrel extrahálható (C4-C8 alkoholokkal, ketonokkal vagy éterekkel – MIBUK, DIBUK, DIPE).
- **Reverz ozmózis.** A klasszikus fordított ozmózis, amely csak a vizet engedi át, alkalmas ipari léptékben is a laktát oldatok koncentrálására. pH=6 körüli értéken körülbelül 90%-os retenció érhető el.
- **(Monopoláris) elektrodialízis.** Az eredetileg sómentesítésre kidolgozott elektrodialízis jól alkalmazható sóoldatok koncentrálására is. Az ammónium laktát oldatot 20-25 %-os koncentrációig lehet töményíteni, ugyanakkor a nemionos szennyező anyagok egy részétől is meg lehet szabadulni.

Észterképzés

A tejsav downstream érdekes lehetősége az észterképzés. Az etillaktát és a butillaktát környezetbarát apoláris oldószerek, mivel jól helyettesítik a szénhidrogéneket, ugyanakkor biológiailag bonthatók, és a hidrolízis termékek is jó szénforrások a mikrobák számára. Tehát egyrészt jól értékesíthető termékek, másrészt az észter létrehozásával, majd elbontásával nagy tisztaságú tejsav gyártható. Az észterképzést és bontást magában a desztilláló kolonnában meg lehet oldani ásványi sav vagy kationcserélő gyanta katalizátorral (reaktív desztilláció).

Tisztítási műveletek

A technológia során, illetve a végtermék minőségének beállítása során szükséges a kis mennyiségben jelen lévő, de zavaró hatású komponensek eltávolítása. Ezek az anyagok többféle elv szerint csoportosíthatók. Egy részük makromolekula, amely a tápoldatból marad, illetve a mikroorganizmusok líziséből képződik. Jelen vannak ezen kívül kis szerves molekulák (cukrok, aminosavak, szerves savak, színanyagok) illetve ásványi ionok is. Tulajdonságaiknak megfelelően sokféle elválasztási műveletet alkalmazhatunk.

7.1.7. A tejsav felhasználása

Az emberiség nagyon régóta fogyaszt tejsav tartalmú élelmiszereket (tejtermékek, kovászolt áruk, kovászos uborka, bor, sör). Így természetes, hogy az iparszerű élelmiszergyártásban is használják a tejsavat, mint kellemes ízű (lágy, nem karcos) savanyító- és tartósítószer. A tejsavat és sóit az FDA is biztonságosnak minősítette (GRAS: generally recognized as safe). Ugyanígy engedélyezték a sztearoil-lakátokat és más észtereket, amelyeket a sütőiparban a tészták állagjavítására használnak. Ezek gyártásához nagyon tiszta „hőstabil” tejsavra van szükség.

A bőriparban és a textiliparban technikai minőségű tejsavat használnak a savas áztatáshoz. A szerves savak használata olcsóbb ezekben a folyamatokban, de a környezetvédelmi szempontok miatt terjed a tejsav használata.

Sok gyógyszer- és kozmetikai termék tartalmaz tejsavat, illetve származékait. A kozmetikai termékekben hidratáló, emulgeáló és stabilizáló komponensként szerepelnek. A kalciumlaktátot széles körben használják a kalcium-hiány kezelésére, pl. a várandósság ideje alatt.

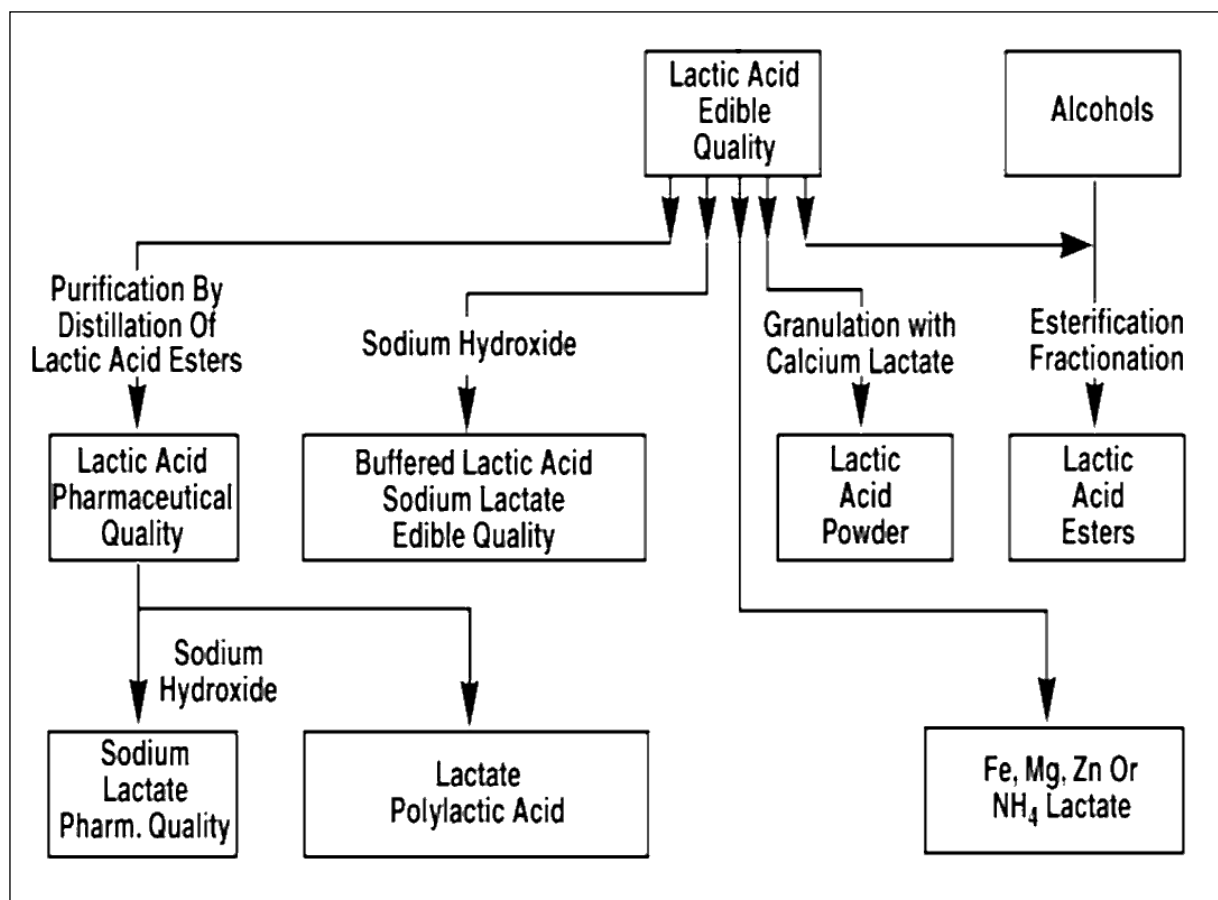
Nagy potenciál van a politejsavnak, mint biológiailag lebomló műanyagoknak az elterjedésében. Puha csomagolóanyagok és filmek készítésére alkalmas. A talajban nedves körülmények között három hónap alatt szétesik és egy-két év alatt teljesen lebomlik. Becslések szerint a polilaktát elterjedésével a jelenlegi ~200.000 t/éves termelés meg is duplázódhat.

Másik „zöld” alkalmazás a tejsav észterek, pl. a butil-laktát alkalmazása a szénhidrogén alapú oldószerek helyett. Jól használhatók festékek, lakkok, lemosók oldószereként. Alkalmazásukkal csökkenthető a kőolaj felhasználás, másrészt a természetben gyorsan lebomlanak.

7.2. Aceton-butanol-etanol (ABE) fermentáció

7.2.1. Bevezetés

A butanolt erjesztési termékként először Pasteur említi 1861-ben. Termelése az aceton-butanol-etanol (ABE) anyagsereúton történik. A három termék párhuzamosan képződik, arányuk általában 3:6:1. Az ipari fermentációs gyártás a huszadik század legelején kezdődött. A változó igényeknek megfelelően mindig más anyagot tekintettek főterméknek. Az I. Világháború előtt a szintetikus gumi (butadién) gyártásához a butanolra volt szükség. Az I. Világháború idején viszont inkább az acetont tekintették főterméknek, mert ezt használták a TNT robbanóanyag gyártásához. A Világháború után újra a butanol válik fontossá, a festékek, lakkok oldószereként (butilacetát formában).



104. ábra A tejsav származékai és alkalmazása

A második világháború alatt megint az acetona volt nagyobb igény, ezúttal a Cordite (tüzérségi lőszer robbanó anyaga) gyártásához.

A század második felében a kőolaj bázisú termékek kiszorították a fermentált oldószereket. A kőolajipar fejlődése mellett a közrejátszott a melasz árának jelentős emelkedése is. Az üzemek nagy részét az ötvenes években leállították, kivéve néhány speciális adottságú országot (pl. Tajvan és Dél-Afrika) ahol a gyártás fennmaradt a nyolcvanas évekig. Az olajválság idején néhány üzem újraindították, majd ezek is leálltak. Jelenleg csak néhány kisebb üzem működik, olyan helyeken, ahol olcsó és másképpen nem hasznosítható melasz keletkezik.

A XXI. században a butanol, mint bioüzemanyag/adalék került újra a kutatások fókuszába. A természeti erőforrások kimerülése megnövelte az alternatív üzemanyagok iránti keresletet és ez arra készítette a tudósokat, hogy újabb stratégiákat tárjanak fel ebben az irányban. A mai napig az etanolt tartják a legmegfelelőbb bioüzemanyagnak, mert gyártása egyszerű a már kidolgozott erjesztési technológiákkal. Azonban az etanol nem a legjobb választás, mert higroszkópos és nagy a gőznyomása. Ha alternatívát keresünk, akkor talán a butanol a legígéretesebb, mert egyrészt jobbak a fizikai tulajdonságai, másrészt 30%-os koncentrációig hozzákeverhető a benzinnel a motor módosítása nélkül. A teljesen butanolos hajtáshoz is csak minimális változtatások kellenek. Ráadásul nem csak a benzinnel adható, hanem a dízel üzemanyaghoz is, igaz, kisebb koncentrációban (10-15%).

Tulajdonság	Butanol	Etanol	Benzin
Energiasűrűség (MJ/liter)	29,2	21,2	32,5
Oldhatóság vízben (ml/100 ml)	9,1	elegyedik	<0,01
Gőznyomás	6,4	18-22	6,4-11,9
Oxigéntartalom (m/m%)	21,6	34,8	0
Oktánszám	96	112-129	91-99

18. táblázat Üzemanyag komponensek tulajdonságainak összehasonlítása

A butanol energiataralma nagyobb és gőznyomása kisebb, mint az etanolé. (17. táblázat). Kis nedvszívó hatása miatt kevésbé korrodálja a motort. Könnyen szállítható, és könnyen elegyíthető a benzinnel. Benzinnel kombinálva a hosszabb szénláncú alkoholok, így a butanol is hozzájárulhat a fosszilis energiahordozók felhasználásának csökkentéséhez és így a globális felmelegedés fékezéséhez.

Hiába jók az anyag tulajdonságai, a gyártás gazdaságosságát javítani kellene ahhoz, hogy versenyképes legyen az etanollal. Az ABE-fermentáció a legtöbb ipari fermentációs technológiához képest kevésbé hatékony. A végső termék koncentráció csak 17-20 g/l, mivel ennél a koncentrációnál a butanol már károsítja a termelő mikroorganizmusokat. Emellett a hozam is alacsony (0,28-0,33 g/g cukor). További problémát jelent a szubsztrát magas ára a termékhez képest. Emellett az oldószer kinyerésének (downstream) költségei is nagyok.

7.2.2. Bioszintézis

A *Clostridium*-ok a többi anaerob mikroba anyagcseréjétől eltérően az egyszerű cukrokból előbb szerves savakat állítanak elő, majd ezeket redukálva hozzák létre az oldószereket (105. ábra).

Az ABE erjesztő *Clostridium* fajok energiatermelése összetett reakcióhálózat. A termékek szempontjából három folyamatot különíthetünk el: (1) a szerves savak termelését (ecetsav, vajsav és tejsav), (2) a gáztermelést (szén-dioxid és hidrogén) és (3) az oldószertermelést (aceton, butanol és etanol). Az ABE fermentáció kétfázisú folyamat. Az első fázis acidogén, ezalatt ecetsav és vajsav, valamint H₂ és CO₂ keletkezik. Ez a fázis egybeesik a baktériumok exponenciális növekedésével, mivel ezekben a reakciókban sok ATP képződik. A savtermelés hatására a pH csökken. Ha intenzív a folyamat és bőséges a szubsztrát ellátás, akkor a pH lemehet 4,5-re is, ami már gátolja a sejtek életfolyamatait. Ezért a fermentáció során a pH-t szabályozzák, nem engedik 5,0-5,4 érték alá. A második fázisban a szerves savakból oldószerek keletkeznek. Ennek során a redukált koenzimek regenerálása folyik, aminek sokkal kisebb az energiahozama. Az anyagcsere lassulásával a tenyészet spórásodni kezd. A savak fogyása a pH emelkedését eredményezi.

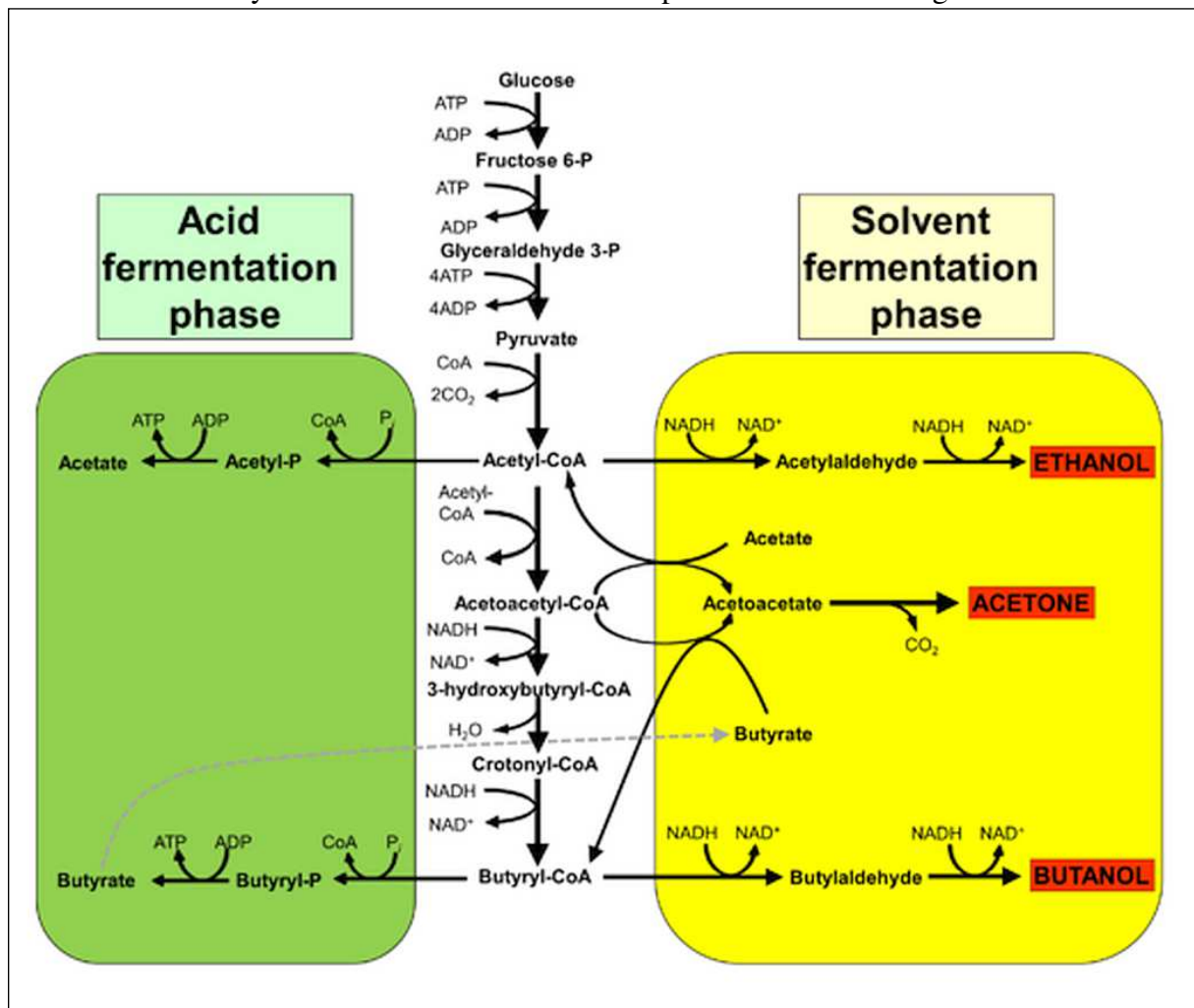
A folyamatnak nincs rögzített sztöchiometriája, a termékek mólaránya közelítőleg 6:3:1. Nyomokban mindig keletkezik egy kevés izopropanol is.



A termékek relatív aránya függ:

- baktérium törzstől
- fermentációs körülményektől

A termékarányok szerint három fermentáció típust különböztető meg:



105. ábra Az ABE termékek bioszintézise

1. Aceton-butanol fermentáció → *Clostridium acetobutylicum*
2. Butanol - izopropanol fermentáció → *Clostridium butylicum*
3. Vajsav - ecetsav fermentáció → *Clostridium butyricum*

Ipari jelentősége az első típusnak van, a fenti reakcióegyenlet ezt írja le. A továbbiakban erre a folyamatra és a *C. acetobutylicum* törzsre koncentrálnak.

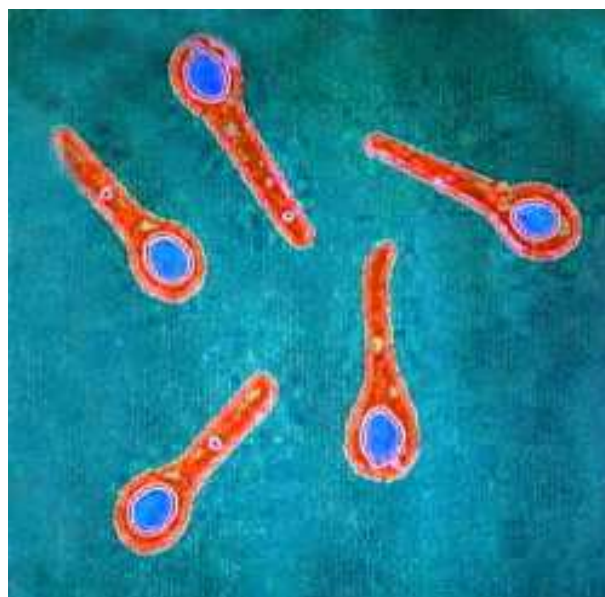
7.2.3. ABE termelő törzsek

A butanol termelésre képes vad törzsek túlnyomórészt a *Clostridium* nemzetséghez tartoznak. Ezek Gram-pozitív spóráképző pálcák, egyik végükön több ostorszerű mozgásszervük van. Elnevezésük onnan ered, hogy spórázaskor a nagy méretű endospórák deformálják, kitágítják a sejtfalat, ezáltal a sejt egyik végén buzogányszerű dudort alkotnak. A spórák nagyon ellenállóak, és hosszú ideig eltarthatók, homokban tárolva akár 30 évig is életképesek. A törzsek igen érzékenyek a fág fertőzésekre, ami jelentős károkat okozott az ipari termelésben is.

A *Clostridium* baktériumcsaládba tartozó mikrobák képesek a keményítőt (egyesek a cellulózt is), vagy egyszerűbb szénhidrátokat (glükózt, fruktózt, xilózt, szacharózt, laktózt, stb.) anaerob körülmények között erjeszteni. A *Clostridium*-ok extracelluláris enzimeket választanak ki, amelyekkel lebontják az összetett szénhidrátokat. Az „enzimkoktél” α -amilázt, α -glükozidázt, β -amilázt, β -glükozidázt, glükoamilázt, pullulanázt és amilopullulanázt is tartalmaz. A kapott monoszacharidokat membránkötött transzporterek viszik be a sejtekbe. A szénhidrátok ezt követően a glikolízisben vagy a pentóz-foszfát úton metabolizálódnak. Ugyanakkor bőséges tápanyag ellátás esetén keményítőszerű tartalék tápanyagot (granulózt) képeznek.

Elsőként Chaim Weizmann 1916-ban izolált és azonosított egy *C. acetobutylicum* törzset, amely keményítőtől butanolt és etanolt erjesztett. Ez egy Gram-pozitív, spóráképző, szigorúan anaerob baktérium, amely aerob körülmények között néhány óra alatt elpusztul. Ez a tulajdonsága korlátozza az alkalmazhatóságát.

A termelt oldószerek is toxikusak a sejtek számára. A MIC50 (a sejt szaporodást 50%-ban gátló koncentráció) butanolra 11 g/l, etanolra 51 g/l, és acetonnal 84 g/l. Azaz a legértékesebb termékből viseli el a legkevesebbet a tenyészet. Az oldószertűrést hosszú törzsjavítási munkával kb. másfélszeresére növelték, így lehet elérni a folyamat végére a 17-20 g/l szintet.



106. ábra Spórák *Clostridium*ok mikroszkópos képe

Törzs	Szubsztrát	Butanol, g/l	kihozatal, g/g	Fermentációs technika
<i>C. acetobutylicum</i>	kasszava keményítő	20,1	0,23	Bioreaktor, szakaszos
	glükóz	19,12		Bioreaktor, rátáplálásos

	glükóz	18,9	0,29	Bioreaktor, szakaszos
	glükóz	17,1		Bioreaktor, rátáplálásos
<i>C. tyrobutyricum</i>	cukornád lé	16	0,24	Bioreaktor
<i>C. pasteurianum</i>	glicerin	12	0,27	Bioreaktor, szakaszos
<i>C. beijerinckii</i>	glükóz	18,6	0,32	Bioreaktor, szakaszos

19. táblázat Különböző *Clostridium* törzsek butanoltermelésének összehasonlítása

A törzsfeljesztő munka, a genetikai manipuláció során a *C. acetobutylicum* törzs genomjába sok ponton beavatkoztak. A változtatások jellemzően a savképző reakciók génjeinek kiütésére és az oldószer termelő lépések enzimeinek overexpressziójára irányultak. (18. táblázat)

A génmanipulációval a termékarány is megváltoztatható. 1980-ban leírtak egy olyan *C. acetobutylicum* törzset, amelynél a termelt aceton arányát a szokásos 30%-ról (60:30:10 arány) 70%-ra (20:70:10 arány) növelték.

7.2.4. Aceton-butanol fermentáció, a klasszikus technológia

Mivel az ismert mikroorganizmusok között a *C. acetobutylicum* és a hozzá nagyon hasonló *C. beijerinckii* termeli és türi a legnagyobb koncentrációban a butanolt, ezek a leggyakrabban használt termelő organizmusok. Tulajdonságaikat és a fermentációs folyamat paramétereit részletesen vizsgálták, a cél mindig a végső butanol koncentráció növelése volt. Törzskonzervként a spórákat steril homokban vagy talajban tárolják. Az inokulum készítés első lépéseként a spórákat hővel aktiválják, 65-100 °C-on 1-3 percig. Két-négy felszaporítási lépcső után a fermentorokat 2-4 %-nyi inokulummal oltják.

Az ipari fermentorok 200-700 m³-es, mechanikus keverő nélküli tartályok. Ezeket üresen gőzzel sterilizik, a tápoldatot folyamatos sterilizáción keresztül vezetik be.

A fermentorokat kapacitásuk 90-95%-áig töltik fel a steril tápoldattal, tiszta szén-dioxid atmoszférában. Az oltás közben és után a folyadékot steril szén-dioxidot buborékolatnak át, ezzel biztosítják a keverést. A későbbiekben a gázfejlődés pezsgése mozgatja, keveri a folyadékot, másrészt kiszorítja az esetleges oxigén nyomokat.

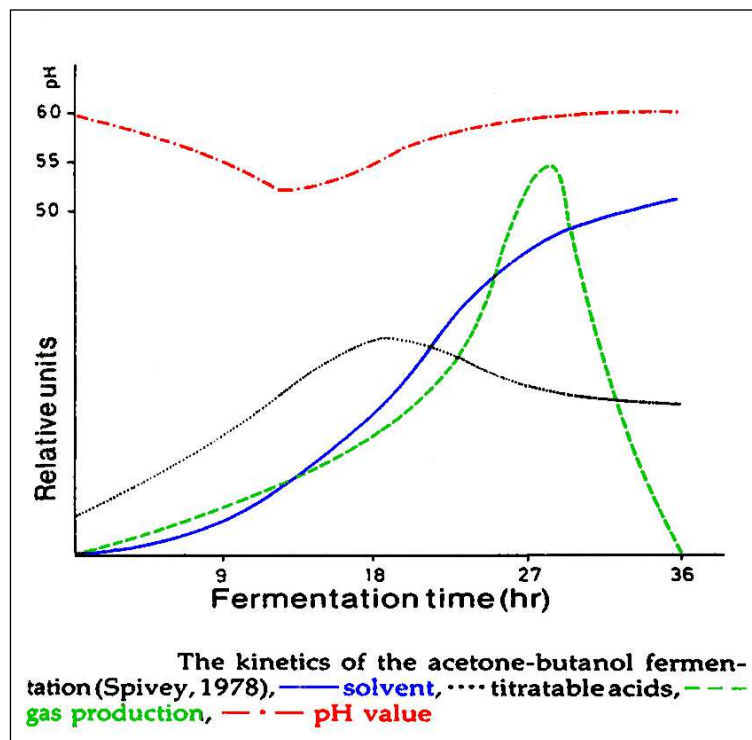
A folyamat fázisai jól követhetők a koncentráció görbéken. Az indulási pH-t 5,8-6 közé állítják. Az első, acidogén szakaszban a pH csökken, mert szerves savak (ecetsav és vajsav) keletkeznek. Nagyobb mennyiségű szénforrás átalakítása esetén olyan sok sav keletkezhet, hogy a pH lemehet 4,5-re is, ahol a törzs anyagcseréje lefékeződik. Az oldószertermelés szempontjából az optimális pH értéke még a *C. acetobutylicum* különböző izolátumai között is eltérő. Van olyan törzs, amely pH=4,5 értéknél termel jól, mások a kiindulási hatos pH állandósítása mellett halmoznak fel sok oldószert. Célszerű megoldás, hogy a pH-szabályozás során nem alkáli lúgokat adagolnak, hanem ammónium-acetátot, acetát puffert vagy kalcium-karbonátot. Az acetát az oldószerképzési fázisban belép az anyagcserébe, és maga is oldószer molekulákká alakul. Ugyanígy kimutatható, hogy ha a fermentáció során vajsavat adagolnak, akkor az is jól hasznosul, egy része közvetlenül butanollá alakul át. Az ammóniumion is hasznosul, pótolja az elfogyasztott nitrogénforrást.

A tápoldatba bemért kalcium-karbonátnak nincs ilyen hatása, de megvan az az előnye, hogy pH-mérés és adagolás nélkül puffertolja a közeget, önszabályozó módon közömbösíti a savakat és nem engedi a pH-t 4,8 alá.

A nyomelemek közül a cink ion szerepe jelentős, elősegíti a savak átalakítását oldószerekké.

A következő szakaszban a pH emelkedik, mert a savak tovább alakulnak, aceton és butanol képződik. Amikor felesleges NADH₂ van jelen, akkor a sejtek felveszik a megtermelt vajsavat és butanollá redukálják. Erre a fázisra jellemző a spóráképzés megindulása és a granulóz termelés is.

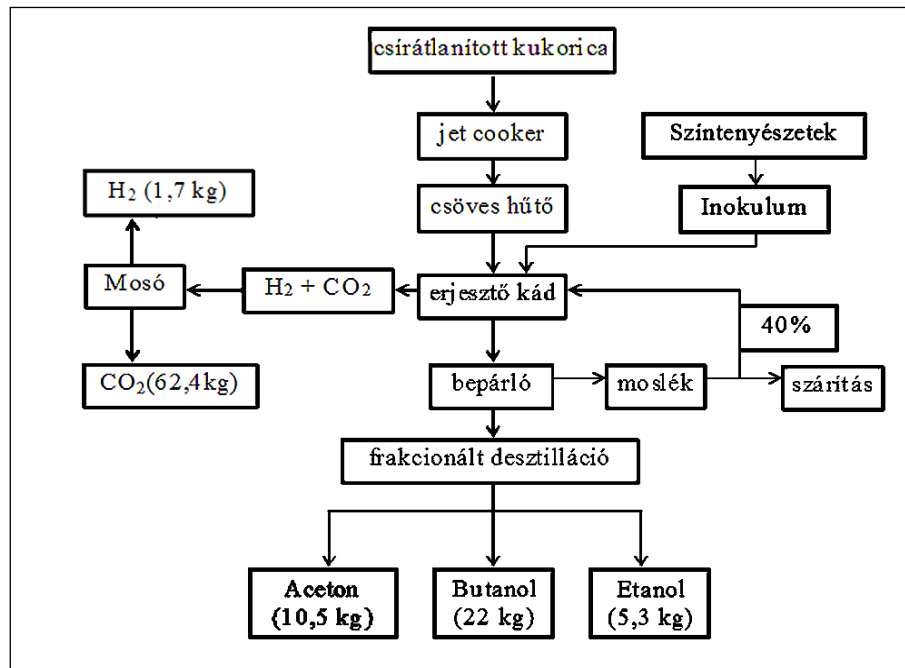
Végül a növekedés és az oldószer termelés leáll. A legnagyobb változás a gáztermelés sebességében mutatkozik. Ez jelzi az anyagcsere leállítását, a fermentáció végét. A pH közelítőleg visszaáll a kiindulási értékre.



107. ábra Szakaszos ABE fermentáció lefutása

7.2.4.1. *ABE fermentáció kukorica szénforráson*

A hagyományos ipari folyamatban a kukoricából cefrét készítenek. A szemekből a csírárt eltávolítják (kitörlik), és a szemeket megőrlik. A darából szuszpenziót készítenek, ezt folyamatos főzőben 130-133 °C-on 60-90 percig elcsirizesítik és megfőzik. Ez a keményítő mellett sok egyéb anyagot is tartalmaz, így nem volt szükség egyéb tápanyagok hozzáadására. Viszont a tápoldat készítésénél víz helyett egyharmad részben az oldószer lepárlás üstmaradékát használták, így sok hasznos anyag, „főtt” biomassza került a lébe. A kukorica felhasználás kb. 8-10% volt a fermentálé mennyiségére vonatkoztatva.



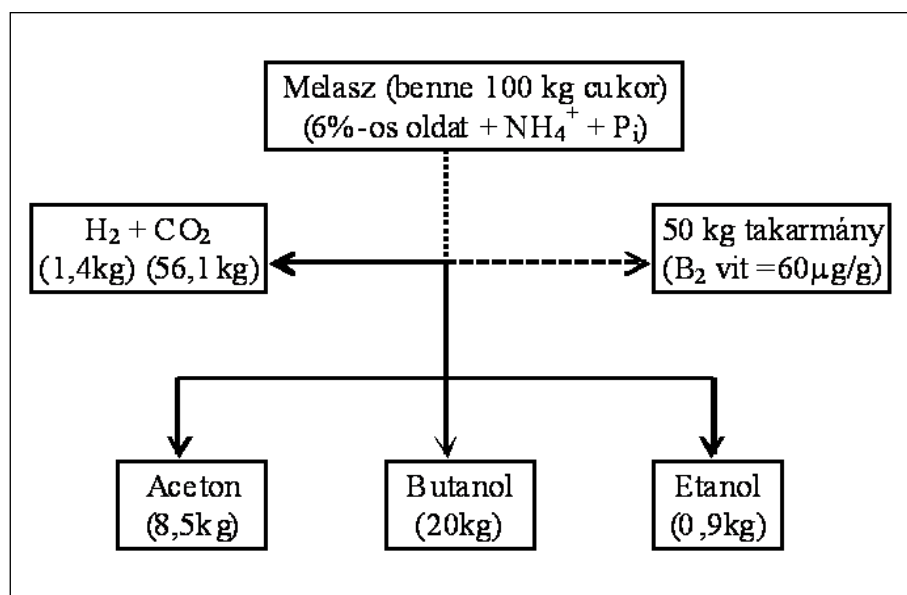
108. ábra A kukorica alapú ABE fermentáció anyagforgalma

A kukorica alapú fermentáció hőmérséklete 34-39 °C, időtartama 40-60 óra és a hozama mintegy 25-26% a kukorica szárazanyagra vonatkoztatva. A végső oldószer koncentráció 12 és 20 g/liter között mozog, általában alacsonyabb, mint melasz alapon. A kapott oldószer-arány nagyjából megfelel a Weizmann-féle 6:3:1-nek.

7.2.4.2. *ABE fermentáció melasz szénforráson*

A melasznak több előnye is van a kukorica szénforrással szemben. Nem kell hidrolizálni, azonnal könnyen metabolizálható cukrot tartalmaz, emiatt időben is rövidebb (~36 óra). Nem kell a csirizes, extrém viszkozitású anyagot nagyon magas hőfokra hevíteni és mozgatni. A melasznál is körülbelül 6,5 % erjeszhető cukor koncentrációt állítanak be. A sterilizálásnál elegendő a 107-120 °C hőfok és a 15-60 perces hőkezelés. A csirizesítő helyett elegendő egy gőzinjektoros folytonos sterilizáló alkalmazása. A melasznál viszont az egyharmad rész üstmaradékon túl további tápanyag kiegészítésre is szükség van, szerves és szervetlen nitrogénforrást és foszfát sókat adagolnak.

A melasz alapú fermentációk optimális hőmérséklete alacsonyabb (29-35 °C), legtöbbször 31-32 °C. Az oldószer koncentrációk és a hozamok (29-33%) nagyobbak, mint a keményítő alapú technológiáknál. A sejtek anyagcseréjét gátolja, ha az oldószer koncentrációja eléri a 18-22 g/litert, bár a gyakorlatban ritkán kaptak ilyen nagy értéket.



109. ábra A melasz alapú ABE fermentáció anyagforgalma

Az erjesztés során termelt szén-dioxidot és hidrogént elválasztják, és különböző célokra használják fel. Az fermentáció után az oldószerket előbb szakaszos vagy folytonos lepárlással választották el, majd a párlatot rektifikálva tiszta acetont, butanolt és egy kevert oldószeres frakciót kaptak. A desztillációs maradék 4-4,5% (tömeg/térfogat) szárazanyagot tartalmaz. Ez a biomassza nagy tápértékű, 28-30% fehérjét és B vitaminokat tartalmaz. Száritott formában széles körben használták állati takarmányok adalékaként.

7.2.4.3. *Erjesztési technikák*

Az eljárás alapja a klasszikus szakaszos fermentáció volt. De mivel a második fázis, az oldószer termelés előfeltétele a viszonylag nagy cukor koncentráció (>7 g/l), már a korai gyártásoknál is alkalmaztak rátáplálást. Így a vad típusú törzsekkel 10-12 g/l, a manipulált törzsekkel 17-20 g/l-es butanol szintet lehetett elérni.

A folytonos fermentációs technika előnye, hogy nagy produktivitást lehet elérni, viszont a termék koncentráció lényegesen alacsonyabb. Az ABE fermentációnál viszont a kétszakaszos lefutás megnehezíti a folytonos fermentációt. Ha az első szakasz egy pontjában folytonosítunk, akkor csak savakat termel a tenyészet, ha viszont a szolventogenezis szakaszát állandósítjuk, akkor egy lassuló növekedésű, spórázó tenyészet állapotát kellene állandósítani. Ez a gyakorlatban is így működött, az egylépcsős kemosztátok rövid működés után instabillá váltak, minden paraméter leromlott.

Kétszakaszos fermentáció esetén logikus lépés a kétlépcsős folytonos technika alkalmazása. Az első lépésben nagyobb hígítási sebességgel a sejtzaporodási, savtermelő fázist állandósítják, míg a másodikban kisebb hígítási sebességgel, azaz nagyobb térfogatban az oldószer termelést. Ezzel a megoldással el lehet érni a szakaszos fermentációk kb. 20 g/l-es termék koncentrációját, lényegesen jobb produktivitás mellett.

Adalék: A kaszkád rendszerek csúcstartója a Szovjetunióban (Doksukino, 1961) megépített nyolclépcsős folytonos fermentációs ABE üzem, 220-280 m³-es reaktorokkal. A gyártás a produktivitása kb. 20%-kal, a hozama 4%-kal volt jobb, mint a korábbi technológia.

A folytonos fermentáció további intenzifikálását jelentette a sejtvisszatartásos rendszer bevezetése. A elfolyó fermentléből még a desztilláció előtt lecentrifugálták a sejteket (steril és szigorúan anaerob körülmények között = containment!), és ezek egy részét visszavitték a fermentorba. Ezzel a sejtsűrűséget a többszörösére emelték, amitől a produktivitás is megnövekedett.

A fermentációs technikák további fejlesztését az upstream és downstream műveletek összekapcsolása jelenti, amellyel lehetővé válik a keletkező oldószer folyamatos eltávolítása a fermentorból. Ezt a későbbiekben részletezzük.

7.2.5. További fejlesztési irányok

Az utóbbi évek gazdasági tanulmányai szerint a bio-butanol termelése a petrokémiai gyártáshoz viszonyítva nem gazdaságos.

Ahhoz, hogy a biotechnológiai út versenyképes legyen a kémiai előállításal további fejlesztésekre van szükség,

1. Genetikailag módosításokkal olyan új törzseket létrehozni, melyek képesek lignocellulózból származó cukrok felhasználására és rezisztensek e hidrolizátumok a mikrobiális inhibitoraival szemben
3. Minél olcsóbb szénforrások hasznosítása (melléktermékek, hulladékok, például a kukorica rost hidrolizátum)
4. a szénhidrát alapanyag minél teljesebb elerjesztése és az értéktelen melléktermékek képződésének minimalizálása. Ez a kihatatal javítása mellett a szennyvízbe kerülő szerves anyag mennyiségét is csökkenti.
5. A sejtömeg visszavezetése, nagy sejtsűrűség
6. A fermentációs melléktermékek (CO₂, H₂, biomassza) hasznosítása
7. A termelt oldószerek folyamatos elvétele a fermentorból, az upstream és a downstream műveletek integrálása.

7.2.5.1. További lehetőségek: olcsóbb szénforrások

A fermentációs technológia költségeinek mintegy hatvan százaléka a szubsztrátok ára. Emiatt fontos lenne, hogy olcsó, megújuló, élelmiszeripari célokra nem használható nyersanyagokat válasszanak, ezzel csökkenhető a szubsztrát költség. A konfliktus alapja ugyanaz, mint a többi bioüzemanyag gyártásánál. Az első generációs gyártások az élelmiszeripartól vonnak el alapanyagokat (cukrok, keményítő növények). Emiatt minden gyártásnál, így a biobutanol termelésnél is célszerű átállni a második generációs eljárásokra, amelyek az élelmezésre nem használható szénhidrátokat (cellulóz, hemicellulóz, lignocellulóz) hasznosítják.

A butanolt termelő *Clostridium*-ok sokféle szubsztrátot képesek hasznosítani, a hexózon túl pentózokat, glicerint, sőt a szintézisgázt (CO+CO₂+H₂) is, csak kisebb hatékonysággal. A legnagyobb potenciál a cellulóz hasznosító törzsekben van. Genetikailag manipulált *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum* és *C. thermocellum* törzsek közvetlenül is képesek a cellulózt lebontani és butanollá alakítani. Ezek a sejtek celluloszómákat tartalmaznak, amelyek a kristályos cellulóz és hemicellulóz bontására specializálódtak. Ezen a területen sokan kutatnak, de a hatékonyság számai még jelentősen elmaradnak a cukor és keményítő alapú technológiáktól.

A mezőgazdasági hulladékok (pl. a cukornád baggassz és a rizsszalma) hatalmas mennyiségben állnak rendelkezésre, és más módon nem is hasznosíthatók. De ezekkel az a fő probléma, hogy ezekből nehéz erjeszthető cukrot előállítani. A növényi rostok komplex szerkezete miatt a poliszacharid molekulák nehezen hozzáférhetők, és a szükséges hidrolizáló enzimek is drágák. Ezek a nyersanyagok előkezelést igényelnek, és ez megnöveli a költségeket. Sokféle kezelési eljárásról dolgoznak világszerte, de még nincs optimális megoldás.

Egy hatékony előkezelési technológiával szemben az az igény, hogy kevés vegyszer és energia felhasználásával és hatékony enzimes hidrolízissel működjön, ugyanakkor kevés erjedésgátló mellékterméket hozzon létre. Az alkoholt termelő élesztőkhöz képest a *Clostridium*-ok sokkal érzékenyebbek a lignocellulózok hidrolízátumaiban előforduló inhibitorokra (pl. a hidroximetil-furfurol, a furfurol és a lignin származékokra). A hidrolízis során különféle öt- és hat szénatomos cukrok keveréke keletkezik, amelyek eltérő módon metabolizálódnak és gátolhatják egymás hasznosulását. A kezelés során mindig marad egy oldhatatlan rostokból álló szilárd frakció, ami megnehezíti a további műveleteket.

7.2.5.2. További lehetőségek: Génmanipuláció

A *Clostridium* törzsek oldószer-tűrőképességét nem egyszerű tovább növelni. Már évtizedek óta foglalkoznak vele, és így jutottak el az eredeti 10-12 g/l-es koncentrációtól a 17-20 g/l-es jelenlegi szinthez.

Sokszoros genetikai átalakításokat végeztek az *E. coli*-n és a *S. cerevisiae*-n is, remélve, hogy az eleve nagyobb oldószer-tűrűsű törzsekbe klónozva a megfelelő géneket magasabb butanol szintet lehet elérni. Napjainkig laboratóriumi léptékben is csak 14-15 g/l-es oldószer koncentrációt értek el így, ami kisebb, mint a *Clostridium*-oknál ipari fermentorban is reprodukálható 17-20 g/l-es szint. További manipulált baktériumok fajoknál a termék koncentráció 1 g/l alatt maradt.

7.2.5.3. További lehetőségek: Downstream fejlesztések

Az etanol gyártásnál a leerjedt cefre koncentrációja általában 5-9 %, de el lehet elérni a 16 %-os koncentrációt is. Ezzel szemben az ABE fermentációnál az elérhető butanol koncentráció csak 17-20 g/l, az összes oldószer együtt kb. 3%. Ennek megfelelően az ABE feldolgozási költsége jóval nagyobb, mint az etanolé. Járható útnak tűnik az oldószeres folyamatos elvétele az erjesztés során, így a koncentráció a toxikus szint alatt tartható. A folyamatos elvételre többféle művelet is alkalmas lehet.

Sztrippelés gázzal

A sztrippelés az illékonyág különbségen alapul. Ha a folyadékon, adott esetben a fermentlén gázt (célszerűen a termelődő szén-dioxidot) buborékolatnak keresztül, akkor megindul a párolgás, és az illékony anyagok gőznyomásuknak megfelelően megjelennek a gázban. Az egyensúly beállítására a buborékok élettartama alatt nincs idő, a gázáram folyamatosan oldószer gőzöket és vízgőzt visz magával. Egy hűtőben ezek lekondenzáltathatók és elvezethetők. A gáz felmelegítés után recirkuláltatható a fermentorba további oldószer kinyerésére. Mivel a *Clostridium*-ok érzékenyek az oxigénre, a sztrippelésre semmiképpen sem szabad levegőt használni. A folyamat során jelentős mennyiségű szén-dioxid keletkezik (az összes szénatom kb. egyharmada ebben a formában távozik), így van kellő mennyiségű inert gáz a sztrippeléshez.

Pervaporáció

A fermentlé egy membránnal érintkezik, amelynek másik oldalán áramló inert gáz vagy vákuum van. A termelt oldószer molekulák beoldódnak a membrán apoláris anyagába, átdifundálnak rajta és a másik oldalon gőzként jelennek meg. Az egyensúly akkor állna be, amikor a gázoldalon a gőzök koncentrációja eléri az adott hőmérséklethez tartozó gőznyomást. Ha viszont a gőzöket egy szivattyúval folyamatosan elvisszük egy kondenzátorba, a termelt oldószer elvétele is folyamatossá válik.

A művelet hatékonyságát két paraméterrel jellemezhetjük:

- szelektivitás: az eltérő polaritású illékony anyagok áteresztésének/visszatartásának mértéke

- fluxus: az egyes komponensek anyagtranszportjának sebessége, egységnyi időre és membránfelületre vonatkoztatva

A pervaporáció szelektív és hatékony művelet, de a drága membránok és az eltömődés veszélye korlátozza a nagy volumenű alkalmazását.

Extrakció/persztrakció

A butanol jobban oldódik a szerves fázisban, mint a vizesben (a fermentlében), megoszlás jön létre. Az egyensúly beállása után a fázisokat szétválasztják (ülepítés/centrifugálás). Problémát jelenthet, hogy a fermentlé felületaktív (emulgeátor tulajdonságú) anyagai stabil, nehezen szétválasztható emulziót hoznak létre. Emellett előfordul, hogy a sejtek a két fázis határfelületére tapadnak, a homogenitás megszűnik.

A folyadék-folyadék extrakció is szelektív művelet, de a számításba jöhető hatékony oldószer általában mérgezőek a baktériumokra. Még legapolárosabb oldószer is kis mértékben oldódik a vizes fázisban, így eljut a sejtekhez és károsítja sejtmembránt. Az átoldódás egyben oldószereszeséget is okoz. A legkevésbé mérgező oldószer a biodízel, azaz a hosszú szénláncú zsírsavak metilészterei.

Az extrakció hátrányait felsorolt hátrányait nagymértékben csökkenthetjük, ha a két fázis közé egy apoláris membránt helyezünk. A két, egymással nem elegyedő folyadék csak membrán anyagán keresztül érintkezik (membránextrakció = persztrakció) Nincs direkt kapcsolat a két fázis között, így az oldószer toxicitása, fázis diszperzió, emulzió és réteg képződés drasztikusan lecsökken vagy megszűnik.

Apoláris anyagú membrán esetén a butanol (és a többi oldószer) beoldódik a membrán anyagába és átdiffundál rajta, míg más, hidrofil komponensek illetve fermentációs köztitermékek (pl.: ecetsav, vajsav) visszamaradnak a vizes fázisban. A membrán túoldalán a molekulák beoldódnak a szerves fázisba, és elvileg beállna a megoszlási egyensúly. Ha viszont az szerves fázist áramoltatjuk, akkor az egyensúly nem áll be, mert a termékeket folyamatosan elvisszük a rendszerből.

További hátrány, hogy az extrakció/persztrakció után a termelt oldószereket el kell választani az extraháló oldószertől. Ez desztillációval lehetséges, ami energiaigényes folyamat. Tehát ilyen módon a desztilláció műveletét nem lehet megkerülni.

A különböző fermentációs és feldolgozási technikák integrációjával kapott eredményeket mutat be a 19. táblázat. Ha az oldószereket folyamatosan elvesszük, akkor egy liter fermentléből nem csak ~20 g butanolt lehet kinyerni, hanem akár több száz grammot is.

A butanol gyártás gazdaságossá tételében, a törzsek és a technológiák fejlesztésében nagy kihívások vannak, sokan foglalkoznak a K+F-el. Az EU a H2020 program keretén belül jelentős támogatással elindította a ButaNexT projektet a butanol gyártási technológia fejlesztésére. Ez a program felöleli a fent felsorolt fejlesztési irányok mindegyikét. Sajnos ennek a programnak nincs magyar résztvevője.

A butanol világpiaca 2019-ben kb. 6500 millió Euro. Az 1,2-1,3 €/kg árral visszszámolva ez ~5 millió tonna/év. Ennek túlnyomó része jelenleg petrolkémiai eljárással készül. A fő felvevő piac Kína (~50%), szinte bármilyen mennyiséget átvenne. A termelés éves növekedési üteme ~3,5 %.

Oldószer kinyerés	Fermentáció	Szubsztrát	Törzs	ABE hozam (g/g)	ABE titer (g/l)	Butanol titer (g/l)	ABE produktivitás (g/l·h)
sztrippelés gázzal	Szakaszos	Glükóz	<i>C. beijerinckii</i> BA101	0.39	75.9	46.4	0.61
		fapép hidrolizátum	<i>C. beijerinckii</i> CC101	0.44	17.7	13.5	0.25
	Rátáplálásos	Glükóz	<i>C. beijerinckii</i> BA101	0.47	232.8	151.7	1.16
		elcukrosított kukorica-keményítő	<i>C. beijerinckii</i> BA101	0.36	81.3	56.2	0.59
		Glükóz	<i>C. acetobutylicum</i> JB200	0.36	172	113.3	0.53
			<i>C. acetobutylicum</i> ABE1401	0.38	177.6	108.3	0.67
	Rátáplálásos; FBB	besűrített kasszava baggasz hidrolizátum	<i>C. acetobutylicum</i> JB200	0.37	108.5	76.4	0.53
	Rátáplálásos; FBB	Glükóz	<i>C. acetobutylicum</i> B3	0.36	106.3	66.1	0.61
	Rátáplálásos; immobilizált		<i>C. acetobutylicum</i> ABE1401	0.38	255.6	166.8	1.15
kétlépcsős sztrippelés	Rátáplálásos; FBB	Glükóz	<i>C. acetobutylicum</i> JB200	0.40		532.3	0.64
Extrakció és sztrippelés	Szakaszos	Glükóz	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	0.37	204	113	0.46
	Rátáplálásos		<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	0.43	460	250	0.65
sztrippelés és pervaporáció	Rátáplálásos	Glükóz	<i>C. acetobutylicum</i> JB200	0.35	622.9	521.3	0.50
			<i>C. acetobutylicum</i> ABE1401	0.38	706.7	482.6	0.67
pervaporáció	Rátáplálásos	Glükóz	<i>C. beijerinckii</i> BA101	0.43	165.1	–	0.98
			<i>C. acetobutylicum</i> XY16	0.37	118	–	0.30
				0.28	142	–	0.29
				0.31	90	–	0.62
	Folytonos	Glükóz	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	~0.36	62.6–117	35.3–64.0	0.30
				~0.35	85.6–202	60.4–131.6	1.13
			<i>C. acetobutylicum</i> DP217	0.37	160	104.6	0.30
		Kasszava		0.38	201.8	122.4	0.76
kétlépcsős pervaporáció	Folytonos	Glükóz	<i>C. acetobutylicum</i> ABE1401	0.35	782.5	452.0	0.45

20. táblázat Integrált ABE fermentációk hatékonysági paramétereit

8. IPARI ENZIMEK

8.1. Az enzimek használatának története

Az enzimek a biológiai anyagok, biológiai makromolekulák, amelyeket élő szervezetek állítanak elő, és amelyek egy meghatározott biokémiai reakció katalizátoraként működnek. Ezek a kémiai reakciók kémiai katalizátoraihoz hasonlóan egy biológiai/biokémiai reakciót gyorsítanak fel akár a sejt belsejében, akár azon kívül is. Így működésüket jobban leírja a biokatalizátor elnevezés. Wilhelm Friedrich Kühne, a Heidelbergi Egyetem a fiziológia professzora 1877-ben használta először az enzim kifejezést, amely a görög *ενζυμη* (enzümé) = „élesztőben” szóból származik. Az enzimeket már évezredek óta használta az emberiség, de Kühne volt az első, aki tudományos terminológiát alkotott erre a biomolekulára. Már a sumérok, az egyiptomiak és görögök is ismerték az enzimtartalmú anyagok empirikus használatát.

Az enzimaktivitásuk miatt használt preparátumoknak is megvan a maga története. Enzimhatásuk miatt használták a malátát (keményítóbontó enzimek), a borjúgyomrot (rennin), a kovászt (tejsavbaktériumok), sőt még a fekáliát is (proteáz aktivitása a bőrkikészítésnél volt hasznos). Időrendbe szedve:

1894-ben Jokichi Takamine felfedezte a takadiasztázt, amely az *Aspergillus oryzae* törzssel termeltetett diasztáz preparátum, a penész extracelluláris enzimeit, elsősorban amilázokat és proteázokat tartalmazta. Emésztést segítő szerként is alkalmazták, pótolta a hasnyálmirigy által termelt enzimek hiányát.

A következő preparátum éppen ellenkezőleg, állati hasnyálmirigy kivonatot tartalmazott, proteáz (tripszin, kimotripszin) aktivitása révén az első enzimes mosópor (Burnus, 1913, Otto Röhm) alkotórésze volt.

A mai értelemben vett fermentációs enzim gyártást 1960-ban kezdte meg a NOVO cég, ipari léptékben kezdte termelni a *Bacillus licheniformis* proteáz enzimét.

1980 után sok tudós a génmanipulációs technikák alkalmazásával az enzimtermelés fokozásán, illetve az enzimek a tulajdonságainak fehérjemérnöki javításán kezdett dolgozni.

Az ipari enzim fermentációs technológiák fejlesztése a célzottan kiválasztott/manipulált törzsek felhasználásával termelt, tisztított, jól jellemzett enzimpreparátumok nagy léptékű előállítására irányul. Ez tette lehetővé az enzimek bevezetését olyan nagyipari termékekbe és folyamatokba, mint például a mosó- és tisztítószerek, a textil- és a keményítő iparok.

Az 1940-es évektől kezdve az intenzív biokémiai kutatás kialakította az enzimek alkalmazását a diagnosztikában, és a klinikai kémiában is megjelentek. Az elmúlt néhány évtizedben az érdeklődés a diagnosztikai enzimológia területén megsokszorozódott. Viszont számos, a szakirodalomban leírt módszer még nem terjedt el széles körben, és az orvosi kutatás nagy területein még nem sikerült felhasználni az enzimes diagnosztika minden lehetőségét.

Jelenleg a legtöbb ipari enzimet hidrolitikus reakcióban használják, különböző természetes anyagok lebontására. A domináns enzimtípus a proteázok csoportja, ezeket széles körben használják a mosószer és tejiparban. A második legnagyobb csoport a különböző szénhidrátbontó enzimeké, fő képviselői az amilázok, cellulázok, amelyeket a keményítő-, textil-, tisztítószere- és sütőiparban használnak.

Az ipari enzimek forgalmát a világpiacon 2010-ben 3 milliárd dollárra becsülték. Ez a piac 2015-re várhatóan eléri a 4 milliárd dollárt. Az enzimek kulcsfontosságú szerepet játszanak számos biotechnológiai termékben és folyamatban. Iparágak szerint az élelmiszer, ital, tisztítószere, ruha, papír, üzemanyag és gyógyszergyártás a legnagyobb felhasználók.

Az enzimek egy része sztereospecifikus, kiválóan alkalmasak aszimmetrikus szintézisekre illetve a racém elegyek reszolválására. Ezt a szelektivitást enantiomer tisztaságú gyógyszerek, mezőgazdasági és vegyi anyagok, takarmány és élelmiszer-adalékanyagok gyártásánál használják ki.

8.2. Lehetséges enzim források

A szükséges enzimeket sokféle élőlényből vonhatjuk ki. Kiindulhatunk állati szervekből, vágóhídi melléktermékekből (gyomor, bél, hasnyálmirigy), ezekből emésztő enzimeket (pepszin, tripszin, rennin, stb.) nyerhetünk ki. A máj is sokféle aktivitású enzimet tartalmaz, ebből nyerhető ki pl. a glutamát dehidrogenáz. Az állati nyersanyag mindenképpen korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre, nagyipari felhasználásnál mindenképpen keresni kell valamilyen más forrást.

Valamivel tágabb keresztmetszet a növényi alapanyag. Történetileg és mennyiségben is a legnagyobb jelentőségű növényi enzim preparátum a maláta. A csírázó növényi magvak sokféle enzimaktivitást hordoznak, ezek közül elsősorban az amilázok (α - és β -amiláz) és a proteázok aktivitását használjuk ki. Emellett számottevő a papain (papaja gyümölcs) és a bromelin (ananász növény) termelése is.

Ipari léptékben egyértelműen a legjobb megoldás a mikrobiális enzimek termelése. A mikroorganizmusok rengeteg enzimes reakcióra képesek, és ezen belül is az egyes funkciókra a különböző törzsekben sokszor nagyon eltérő tulajdonságú enzimet hozott létre az evolúció. Ha állati vagy növényi enzim helyettesítésére keresünk mikroba eredetűt, szinte mindig találunk egyenértékű vagy jobb enzimet megfelelő screeneléssel. A génmanipuláció segítségével az sem probléma, hogy az emlős enzimet mikroorganizmussal termeltessük, erre kiváló példa az eredetileg borjűgyomorban található rennin, a sajtgyártásban használatos tejalvasztó enzim, amit a *Kluyveromyces lactis* élesztővel gyártanak. Ma már a fermentált enzimek kb. 90%-a nem természetes, vad típusú, mert

- vagy átvitték a génjét génmanipulációval egy másik mikroorganizmusba,
- vagy fehérjemérnökséggel (protein engineering) megváltoztatták a szerkezetét.

8.3. Az enzimek piaca és alkalmazásai

Az enzimeket legkülönbözőbb területeken alkalmazzák, beleértve a kémiai szintéziseket, az élelmiszergyártást, az állati takarmánygyártást, kozmetikumok és gyógyszerek előállítását, valamint a kutatás-fejlesztést is. Jelenleg közel 4000 enzim ismert, ezek közül körülbelül 200 mikrobiális enzimtípus van nagykereskedelmi forgalomban. Ebből valójában csak körülbelül 20 enzimet termelnek valóban ipari méretekben. Megjósolható, hogy a biokémiai ismeretek, a fermentációs technológiák és az izolálási módszerek fejlődésével egyre több enzimet fognak ipari léptékben előállítani. A világ teljes enzim igényét mintegy 12 a nagyobb gyártó és 400 kisebb szállító elégíti ki. A teljes enzim piac közel 75%-át három nagy cég, a dániai központú Novozymes, az amerikai gyökerű DuPont (beleértve a 2011. májusában megszerzett dán Danisco-t), és a svájci bázisú Roche dominálja. A piacon igen erős a verseny, kicsi a haszonkulcs és a technológiai fejlesztés dominál (a gyártásfejlesztés a gyártmányfejlesztés előtt).

Az enzimek alkalmazása a termelés volumenét is meghatározza. A skála egyik végén a nagy tömegben gyártott, viszonylag olcsó ipari enzimek állnak, a másik végén a kis tételben termelt és felhasznált, finomvegyszer jellegű innovatív anyagok (pl.: restriktív enzimek, *Taq* polimeráz). Az alkalmazás szerint az alábbi csoportok különíthetők el:

Ipari enzimek

Az ipari enzimek csaknem 75%-a hidrolitikus aktivitású. Szénhidrátbontók, proteázok, lipázok uralják az ipari enzimek piacát, az értékesítés több mint 70%-át ezek adják. Az 1. táblázat bemutatja, hogy a különböző ipari ágazatokban milyen enzimeket alkalmaznak.

Analitika

Pl.: glükóz-oxidáz, alkohol dehidrogenáz, koleszterin oxidáz, foszfatázok

Orvosi alkalmazás

Pl.: aszparagináz, heparináz, sztreptokináz, urikáz, urokináz

Kutatás, nukleinsav manipuláció

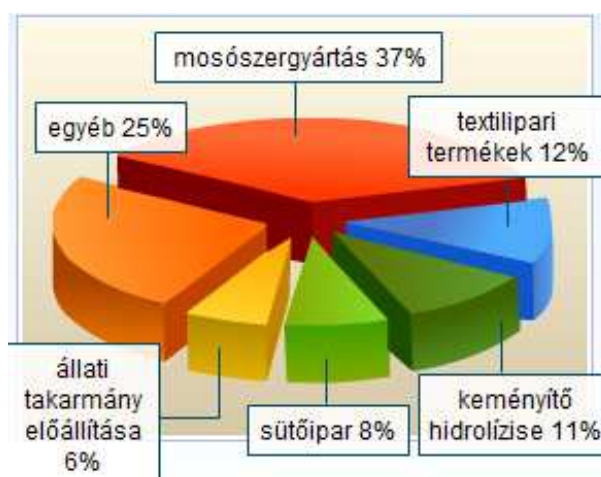
Pl.: restriktív endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS-polimerázok, Klenow enzim.

E tantárgy keretében csak az ipari enzimekkel foglalkozunk

Alkalmazási terület	Enzim	Felhasználás		
Ipari alkalmazások	Papír- és cellulózipar	amilázok	keményítő elbontása a felületkezeléshez	
		lipázok	festék és gyantamentesítés a pépesítésnél	
		cellulázok	a cellulóz rostok elbontásával lágyítja a szálakat	
		mannanázok	fényesíti a papírt a glükomannánok elbontásával	
		lakkázok	fehérít, fényesít	
		β -xilanázok	elősegíti a fehérítést	
	Textilipar	amilázok	keményítő bevonat eltávolítása, írtelenítés	
		cellulázok	fehérít, fényesít	
		pektinázok	kiszabadítja a cellulózt a növényi rostok közül	
		Lakkázok, glükózoxidázok	fehérít, fényesít	
	mosószeresek	proteázok	hidrolizálja a fehérje szennyezéseket	
		lipázok	elbontja a zsíradékokat, amelyek ételből vagy bőrről kerültek a ruhára	
		amilázok	eltávolítja a keményítő szennyezéseket	
		cellulázok	módosítja a cellulóz szálak szerkezetét, lágyít, élénkebb színek	
	Élelmiszeripar	Tejipar	rennin, lipázok	sajtgyártás
			β -galaktozidáz	tejcukor elbontása a laktóz intoleránsok számára
Sütőipar		α -amiláz	részben bontja a liszt keményítőjét, térfogatot növel, javítja a bélzet minőségét	
		β -xilanáz	javítja a tészta minőségét	
		oxidoreduktázok	fokozzák a glutén erősségét	
		lipázok	fokozzák a gázbuborékok stabilitását	
		proteázok	csökkentik a fehérjetartalmat	
Gyümölcsipar		amiláz, amiloglikozidáz	lebontja a keményítőt, ezzel édesít, tükrösít	
		pektinázok	lebontja a pektint, ezzel javul a léhozam és tükrösít	
		cellulázok, hemicellulázok	elősegíti a pektin hatását, csökkenti a viszkozitást	
		lakkázok	barnulásgátlók	
Keményítő ipar		naringináz, limonináz	keserűség szabályozás citrusleveknél	
	α -amiláz	keményítő bontása, elfolyósítása		
	pullulanáz, izoamiláz	keményítőláncok elágazásainak hasítása		

Söripar	β -amiláz	maltóz molekulákat hasít le a keményítő nem-redukáló végéről, maltóz szirup előállítás
	amiloglükozidáz	glükóz molekulákat hasít le a keményítő nem-redukáló végéről, glükóz szirup előállítás
	glükóz izomeráz	
	α -amiláz	keményítő bontása, elfolyósítása, növeli a maltóz és glükóz tartalmat
	pullulanáz, izoamiláz	keményítőláncok elágazásainak hasítása, több erjeszhető cukor
	β -glükánáz	β -glükánok bontása, jobb szűrhetőség
	amiloglükozidáz	glükóz molekulákat hasít le a keményítő nem-redukáló végéről, több erjeszhető cukor
	proteázok	fehérje bontás, jobban növekszik az élesztő
	pentozánázok, xilanázok	hidrolizálja a pentozánokat, javítja a szűrhetőséget
Állati takarmány gyártás	α -acetolaktát dekarboxiláz	megakadályozza a diacetil képződést, javítja a sör ízét
	xilanázok	lebontja a rostokat
	fitázok	lebontja a fitinsavat, felszabadítja a Ca és Mg ionokat
	proteázok	lebontja a fehérjéket, az emésztésgátló faktorokat, javítja az emészthetőséget
Szerves szintézisek	α -amiláz	lebontja a keményítőt, gyorsabban felszívódik a cukor
Kozmetikai ipar	sokféle különböző aktivitás	például enantioszelektív szintézisek
	oxidázok, peroxidázok, polifenol oxidázok	hajfestés
	proteín diszulfid izomerázok, glutation oxidázok	haj hullámosítás
	papain, bromelin, szubtilizin	bőr felület tisztítás
	amiloglükozidáz, glükóz oxidáz	fogpaszták és szájjvizek

21. táblázat Ipari enzimek és használatuk



110. ábra Az enzimek használatának megoszlása iparágak szerint

8.3.1. Stratégiák a mikrobiális enzimek tulajdonságainak javítására

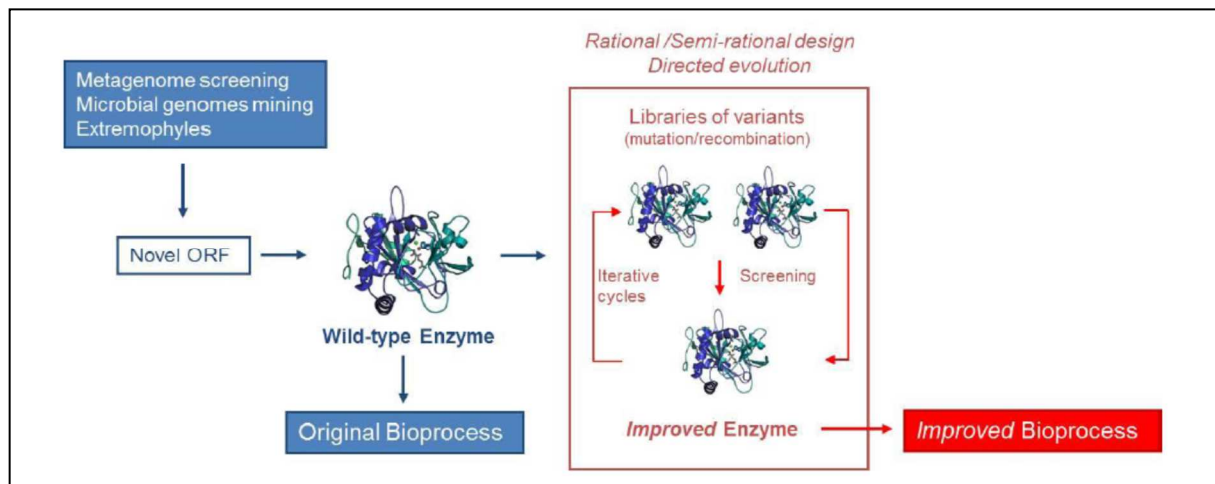
Az enzimek folyamatosan bővülő alkalmazásával együtt egyre nagyobb az igény az eddigieknél jobb vagy új tulajdonságokkal rendelkező biokatalizátorokra. Az enzimek hatékonyságuk a reakciók felgyorsításában, ugyanakkor nem illeszkednek mindenben a technológiai folyamatokba, ezért tulajdonságaik „finomhangolására” van szükség. Ilyen probléma lehet a szubsztrát vagy termék inhibíció, a fehérje molekula gyenge stabilitása, a szubsztrát specifitás vagy enantioszelektivitás gyengesége vagy éppen túlságos pontossága. A genetikai módosítások igen eredményesek ezen a téren, rekombináns DNS-technikával az enzimes technológia hatékonysága akár százszorosára is növelhető.

Új, illetve jobb biokatalizátorok fejlesztése nehéz és összetett feladat (111. ábra). Az enzimek módosításának két fő módszere, amellyel tulajdonságaikat a technológiák igényeihez alakíthatjuk: (1) a meglévő biokatalizátorok racionális átalakítása és (2) fehérjekönyvtárakban kombinatorikus módszerekkel keressük meg a kívánt funkciót.

A rekombináns DNS-technológiával egyrészt tovább fokozható az enzimek termelése, másrészt olyan tulajdonságú enzimek gyártása is lehetővé vált, amelyek korábban nem léteztek. A biotechnológiai fejlesztések, mint például a fehérje mérnökség és az irányított evolúció további lökést adtak a fontos ipari enzimek gyártásának. A biotechnológia fejlődése lehetővé tette a legkülönbözőbb új aktivitású enzimek megjelenését, illetve az eddigetől eltérő körülmények közötti alkalmazását.

Racionális tervezés

Ez a megközelítés a helyspecifikus mutagenézist alkalmazza, célzott aminosav-szubsztitúciókat, ehhez viszont a fehérje háromdimenziós szerkezetének és az enzimes reakció mechanizmusának részletes ismerete szükséges, amely sokszor még nem tisztázott. Azonban mind az aminosav sorrendet, mind a térszerkezeteket gyűjtő adatbázisok intenzív bővülése segít leküzdni ezt az információ hiányt. Egy szűrőprogramban azonosított új enzim aminosav sorrendjének összehasonlítása az adatbázisokban tárolt több ezer már ismert adatsorral lehetővé teszi a hasonló szerkezetű vagy funkciójú fehérjék kiválasztását, a szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatát. A természetben is az evolúció során az új enzimek az eredeti aktív centrum szerkezetének viszonylag kisebb módosulásaival (spontán mutáció – aminosav csere) jöttek



111. ábra Az enzimek fejlesztése fehérjemérnöki úton

létre. A homológián alapuló célzott változtatások érinthetik egyrészt az aktív centrumot, alkalmassá teszik az eddigtilt eltérő szubsztrátok beilleszkedésére, azaz a szubsztrát specifitást megváltoztatására, másrészt a kicserélt aminosavak segítségével másfajta átmeneti komplex jöhet létre, más reakcióutak aktiválási energiája csökken, megváltozhat az enzim funkciója. E fehérje mérnöki beavatkozásoknál több változatot is létrehozhatnak, és ezeket tesztelik. Gyakran bebizonyosodik, hogy a természet, az evolúció „okosabb”, az általunk tervezett és létrehozott változatok kevésbé jók, mint az eredeti, de vannak nagyon jó eredmények is

A fehérjeláncok komputeres tervezésénél elsődleges a főlánc térbeli helyzetének célszerű kialakítása, és az ezt stabilizáló erőkterekhez rendelik hozzá az aminosavak sorrendjét és elrendezését. Ezek nagyon bonyolult és számításigényes feladatok, ezeket az algoritmusokat most kezdik alkalmazni a funkcionális fehérje tervezésben.

A mosószer proteázokat például úgy fejlesztették, hogy az aktív centrumtól távol eső 8 aminosavat módosítottak, így megnövekedett a mosóerő valamint 100°C-on a hőstabilitás 34-szeresre növekedett.

Irányított evolúció

A kombinatorikus módszerek, mint például az irányított evolúció számos változatot hoznak létre, amelyeket azután tesztelni kell enantiomer szelektivitásra, katalitikus hatékonyságra, reakciósebességre, oldhatóságra, stabilitásra és más enzimetulajdonságokra, de nem igénylik az enzim és a reakció mélyebb ismeretét. Az irányított evolúcióval gyorsan és olcsón létre lehet hozni a meglévő enzimek nagyszámú változatát. Számos ezek közül meghatározott feltételek mellett jobban működik, mint a természetben előforduló enzimek. Az irányított evolúció alkalmazásához molekuláris biológiai technikák széles körére van szükség, amelyek lehetővé teszik a természetben előforduló genetikai sokféleség utánzását. Ez lehet a fehérje-kódoló gén random mutagenézise különböző technikákkal, mint például a hibázó polimeráz láncreakció, mutagenézis ismétlődő oligonukleotidokkal, vagy mutagén kémiai szerek. A hibázó PCR véletlenszerű pontmutációkat visz be az enzimmolekulák populációjába. A DNS manipulációs módszerek (DNA shuffling, Molecular Breeding) lehetővé teszik a változatos DNS molekulák in vitro random homológ rekombinációját, ha a gének között a homológia magasabb, mint 70%. Klónozás és expresszió után nagyszámú (10^4 - 10^6) enzim változat jelenik meg, ezek vizsgálatával lehet kiszűrni a legalkalmasabbakat.

A fent említett megközelítések a nem zárják kölcsönösen ki egymást, a racionális, az irányított és a random enzimfejlesztés területe átfed egymással. Így például irányított evolúciós technikák, ahol lehetséges, racionális vagy félig racionális módszerekkel tervezett kisebb enzim variáns könyvtárakat vesznek igénybe, hogy csökkentsék a tesztelés munkaigényét, de anélkül, hogy a jobb variánsok megtalálásának valószínűségét veszélyeztetnék. Az egyik lehetőség,

hogy a mutációk célterülete csak az aktív centrumra (körülbelül 10-15 aminosav) és a hozzá legközelebb eső további 20-30 aminosavra terjed ki, hatásuk ezekben a régiókban számottevőbb. Egy másik stratégia, az úgynevezett CASTing, az aktív hely kombinatorikus vizsgálatán alapul, amelyben az aktív centrum két vagy három aminosavból álló csoportjaival operálnak.

Az irányított evolúciós fejlesztés csúcsteljesítménye pillanatnyilag a glyphosate-N-acetiltranszferáz, amelynek aktivitása a 10.000-szeresére, ugyanakkor, a hőstabilitása ötszörösére növekedett. Az ipari enzimek között elsőként (2000-ben) a Novo Nordisk LipoPrime lipáza jelent meg a piacon.

8.3.2. Rekombináns fehérjék gyártása mikroba gazdaszervezetekkel

A rekombináns DNS technológia nagyban hozzájárult ahhoz, hogy iparilag ismeretlen mikroorganizmusok, illetve magasabb rendű szervezetek enzimeit olyan, a fermentációs iparban jól ismert és jól kezelhető mikroorganizmusok segítségével állíthassunk elő, mint például *E. coli*, *Bacillus subtilis* és további *Bacillus* fajok, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, valamint az *Aspergillus* és *Trichoderma* fajok. Az összes ipari enzim mintegy 90%-át rekombináns fehérjeként termelik.

Az *E. coli*-t több okból is széles körben használják, rekombináns gazdaszervezetként:

- genomja könnyen, gyorsan, és pontosan módosítható
- gyors növekedés és nagy sejtkoncentráció
- könnyen tenyészthető olcsó tápoldaton
- könnyen kiiktatható a proteáz aktivitása

Az *E. coli* képes heterológ fehérjéből akár az összes fehérje 50%-át is felhalmozni. Mindemellett több hátránya is van, például nem képes poszt-transzlációs módosításokra, hajlamos pirogén toxinokat képezni, illetve egyes esetekben zárványtest (inclusion body) formájában termeli a heterológ fehérjét.

Ennek ellenére nagy fehérje koncentrációkat értek el, például alkalikus foszfatázból (PhoA) 5,2 g/l a periplazmában, leván-fruktotranszferázból (LFT) 4 g/l a közegben, más törzssel 20 g/l fehérjekoncentrációt is elértek.

Az élesztő gazdaszervezeteknek több előnye is van a prokarióta host-okhoz képest. A *S. cerevisiae* gyorsan szaporodik egyszerű tápoldaton, nagy sejtsűrűséget lehet elérni, hajlamos a heterológ fehérjéket az extracelluláris térbe kiválasztani, valamint a genetikája könnyebben kezelhető, mint bármely más eukariótáé.

Mindennek ellenére a *S. cerevisiae* nem mindig legjobb gazda az emlős fehérjék nagyüzemi termeléséhez, alkalmazásának megvannak a nehézségei is. Kevés az erős és jól szabályozható promotere, emellett hajlamos a hiperglikozilálásra, akár ötven-száztagú mannóz lánccot is ráépíthet a termékre, és ebben α -1,3 kötések is előfordulnak, ami pedig antigénként immunválaszt válthat ki a szervezetben.

A *Pichia pastoris* vált az egyik legszélesebb körben használt expressziós rendszerré, eddig több mint 700 fehérje előállítását írták le ezzel az élesztővel. Szabadalmakban *P. pastoris*-szal már 30 g/l-es rekombináns fehérje termelést is leírtak. E metilotróf élesztő nagy előnye a *S. cerevisiae*-hez képest, hogy

- erős és jól szabályozott metanol promotere van (AOX1), amely az alkohol-oxidáz enzim mennyiségét az összes oldható fehérje 30%-ig is képes növelni,
- kevésbé intenzív a glikoziláció, a hordozó N atomokhoz rövidebb, maximum 20 egységből álló oligoszacharidok kapcsolódnak, és ezekben nem fordul elő az α -1,3-mannóz kötés,

- a bevitt idegen DNS integrálható a kromoszomális DNS-be, így a transzformánsok stabilizálhatók,
- sok rekombináns fehérjét képes extracellulárisan kiválasztani
- gyors növekedés, nagy sejtsűrűség, és problémamentes léptéknövelés.

A *Hansenula polymorpha* metilotróf élesztő hasonló módon alkalmazható heterológ gén-expresszióra, mint a *P. pastoris*. Itt a metanol-oxidáz gén promóterét használják az idegen gének kifejezésére. A *P. pastoris* AOX1 génjéhez hasonlóan a *H. polymorpha* MOX génje is erősen és szabályozottan expresszálódik, az enzim mennyisége elérheti a összes sejtfehérje akár 37%-át is. Alapvető különbség, hogy a MOX gén expressziója szignifikánsan derepresszálódik glükóz hiányában vagy glükóz limitben, és fordítva, nagy glükóz koncentráció mellett (pl. a sejtszaporítási fázisban) a MOX promóter szabályozása megszűnik.

A harmadik nagy rendszertani egység, a fonalas gombák esetében a rekombináns heterológ fehérjék termeltetésére irányuló molekuláris genetikai technikák már sokkal bonyolultabbak és fáradtságosak, mint az élesztők esetében. A gének bevitele vagy eltávolítása még mindig nehézkes, bár néhány területen születtek eredmények, pl.: a restrikciós enzim mediált integráció, és az *Agrobacterium tumefaciens* TI plazmidja által közvetített átalakítások. Az elért fehérjekoncentrációk rendszerint alacsonyabbak, mint más gazdaszervezetekkel.

A fonalas gombák manipulációjára különböző stratégiákat dolgoztak ki, pl.: proteáz-deficiens törzsek létrehozását, multikópiás génbevittelt, az erős penész promóterek, hatékony szekréciós szignálok azonosítását. Kevesebb figyelmet fordítottak a glikozilációra. Bár hiper-glikoziláció nem lép fel, de rövid mannóz láncok kialakulnak a fehérjén.

Néhány ipari enzim forrás- és gazdaszervezetei:

AQUAZYM ULTRA ^R (amiláz)	<i>Bacillus stearothermophilus</i> → <i>B. licheniformis</i>
PENICILLIN ACILASE ^R	<i>E. coli</i> multikópiás plazmid,
RENNIN (proteáz, sajtgyártásban)	borjúgyomor → <i>E. coli</i> (Pfizer, USA)
	borjúgyomor → <i>B. subtilis</i> (Genencor, USA)
	borjúgyomor → <i>Kluyveromyces lactis</i> (DSM, NL)
NATURPHOS ^R (fitáz)	<i>Asp. niger</i> → <i>Asp. niger</i> (genomba)
PURADAX ^R (mosószer celluláz)	<i>Bacillus</i> BCE103 → <i>B. subtilis</i>
CD-glikozil-transzferáz (ciklodextrin)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> → <i>B. subtilis</i>

8.4. Enzim fermentációk

Tenyésztés

A mikrobiális enzimek előállításának általános technikája a levegőztetett szubmerz fermentáció, emellett régi technológiaként, vagy más folyamatokkal összekapcsolva előfordulnak felületi, illetve SSF (solid state fermentation = szilárd fázisú fermentáció) eljárások is (pl.: pektinázok, hemicellulázok gyártása mezőgazdasági hulladékokon, korpán, répaszeleten, stb.).

A szubmerz fermentáción belül a szakaszos, rátáplálásos, folytonos technika egyaránt előfordul. Ennek megválasztását a műszaki paramétereken kívül az anyagcsere is befolyásolja: induktív enzimek gyártásánál az induktor bevitele rátáplálást igényel. Sok fontos enzim nem konstitutív, csak akkor termelődik, ha a mikroorganizmusnak szüksége van rá. Alapesetben az induktor maga a szubsztrát, ennek adagolásával lehet kiváltani az enzim termelődését. Így az amilázokat → keményítővel, az invertázt → szacharózzal, a β -galaktozidázt → laktózzal a glükóz-izomerázt → xilózzal (xilán, korpa formájában) lehet indukálni.

A másik anyagcsere jelenség, amely a fermentációs technikát is befolyásolja a katabolit represszió. A sejtek a legkönnyebben hasznosítható szénforrást, a glükózt preferálják, ennek jelenlétében az egyéb anyagcsereutakat leállítják. Sok esetben a mikroba szaporodásához adott glükóz lefékezi az enzim termelést. Ekkor a folyamatot több szakaszban hajtjuk végre, a sejt szaporítás után olyan körülményeket teremtünk, hogy glükóz hiányában ne növekedjen, hanem enzimet termeljen a tenyészet. Ezt többféleképpen is megoldhatjuk. Lehet például a glükózt olyan kis adagokban beadni, hogy a koncentráció folyamatosan a limitáló tartományban maradjon. Lehet ezen kívül a mikroba számára nehezen hozzáférhető szubsztrátot adni, amit csak egy lassú enzim bontás után tud hasznosítani (laktóz, keményítő, mannóz, glicerin, stb.), vagy adenil-cikláz regulációs mutánsokat izolálni.

Az ipari enzimek olcsó tömegtermékek, így a tervezők igyekeznek a készülékek kapacitását a műszakilag elérhető maximumra növelni. Ez a kevert, levegőztetett fermentoroknál több száz köbméteres térfogatot jelent.

A levegőztetésre, oxigén ellátásra nincs általános szabály, egyes enzimeket oxigén limitben állítanak elő (pl. glükóz izomeráz, penicillin aciláz), másoknál intenzív levegőztetés szükséges (pl. proteázok).

Feldolgozás

A tisztítás folyamatát az enzim forrása, a fehérje tulajdonságai, és az alkalmazás körülményei határozzák meg. Célszerű minden tisztítási művelet után vizsgálni a kapott összes enzimaktivitást (U) és a fajlagos aktivitást (U/mg). Az első változásából a kihozatalt, a másodikból a tisztítási tényezőt határozhatjuk meg.

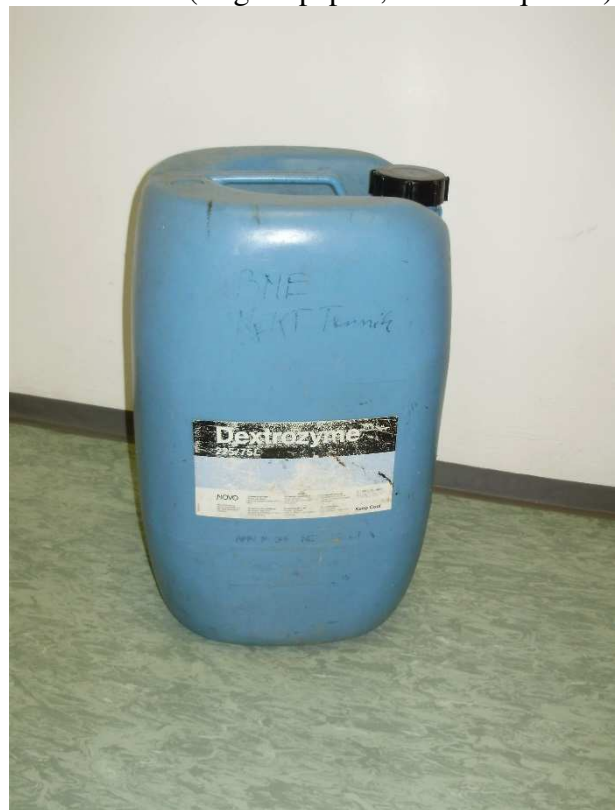
Az alapkérdés, hogy a termelt enzim a sejten belül marad (intracelluláris) vagy a mikroba kiválasztja a fermentlébe (extracelluláris). Az előbbi esetben a sejt tömeget fel kell tární, ez plusz egy bonyolult művelet a feldolgozási technológiában. Ennek elkerülésére célszerű a fehérjét úgy manipulálni, hogy egy megfelelő indító szakaszt (szignál peptid, leader sequence) építenek az elejére, aminek segítségével az enzim a sejt saját fehérjéihez hasonlóan ki tud lépni a sejtmembránon. A homogén oldatból a célterméket, az enzimfehérjét kell izolálni a kívánt formában és tisztaságban. A fehérjék tisztításának jellemző műveletei:

Kicsapás - kicsapás, oldószeres kicsapás (IEP)

Kromatográfia – ioncsere, adszorpciós, néha affin- és gélkromatográfia

Ultraszűrés – koncentráció, diaszűrés

A teljes tisztaság a nagy tömegben gyártott olcsó ipari enzimeknél nem követelmény, csak a zavaró idegen aktivitásoktól és gátló anyagoktól kell megszabadulni. Inert, aktivitással nem rendelkező fehérjék és más anyagok jelenléte általában nem zavaró. A végső formulázásnál olyan enzim preparátumot kell létrehozni, amelyben biztosított az enzimaktivitás megőrzése a szavatossági időn belül, másrészt a technológiában való felhasználás egyszerűen, beméréssel vagy oldással megvalósítható. A szilárd preparátumok gyártásánál az oldószer maradékát szárítással (fluid



112. ábra Folyékony enzim preparátum ipari kiszerezésben

ágyas, porlasztva szárító, dobszárító) távolítják el. A kapott porszerű anyag tulajdonságait is be kell állítani granulálással vagy mikrokapszulázással (a szálló finom por allergiát, vagy más megbetegedést okozhat).

A szilárd termék előállításának költséges, és csökkentheti az aktivitást, emiatt inkább stabilizált oldat formájában hozzák forgalomba az enzimet (112. ábra).

8.5. Ipari enzimek

Az ipari léptékben termelt enzimek szinte mind hidrolázok. Ezen belül a szubsztrátok szerint célszerű csoportosítani az egyes készítményeket.

- Szénhidrátbontó enzimek (ez a keményítőipar kapcsán is tananyag volt)
- Proteázok (pH optimumuk szerint lúgos, semleges és savas proteázok)
- Lipázok

8.5.1. Amilázok

Az amilázok a keményítő hidrolízisét katalizálják egyszerűbb cukrokká. Az emberi szervezetben amilázt találunk az emberi nyálban, ezzel kezdődik az emésztés folyamata. A hasnyálmirigy szintén alfa-amilázt termel, amely a táplálék keményítőjét di- és triszacharidokká bontja. A növények és mikroorganizmusok is termelnek amilázokat. Éppen a diasztáz amiláz volt az első enzim, amit Anselme Payen felfedezett és preparált 1833-ban. Valamennyi amiláz az α -1,4-glikozidos kötéseket hidrolizálja.

A mikrobiális enzimek az első nagy áttörése az élelmiszeriparban a korai 1960-as években történt, a glükóamiláz piacra vitelével, amely lehetővé tette a keményítő lebontását glükózzá. Azóta a glükóz termelés teljes egészében átváltott a hagyományos savas hidrolízisről az enzimes hidrolízisre. Összehasonlításképpen, az enzimes hidrolízis a gőz költségeket 30, a hamutartalmat 50 és a melléktermékek mennyiségét 90 százalékkal csökkentette a régi savas eljáráshoz képest.

1973 óta a keményítő-feldolgozó ipar az enzimek egyik legnagyobb felvevő piacává nőtte ki magát. Az édesítő szirupok gyártásának minden fázisában (folyósítás, cukrosítás és izomerizáció) enzimeket használnak.

Az amilázok forgalma az enzim piac közel 25 %-át teszi ki. Az iparban a mikrobiális amilázokat használják szélesebb körben, mivel sokkal stabilabbak, mint a növényi és állati eredetű amilázok. A mikroorganizmusok használatának nagy előnye a gazdaságos tömegtermelés, és a mikrobákat egyszerűbb genetikailag manipulálni.

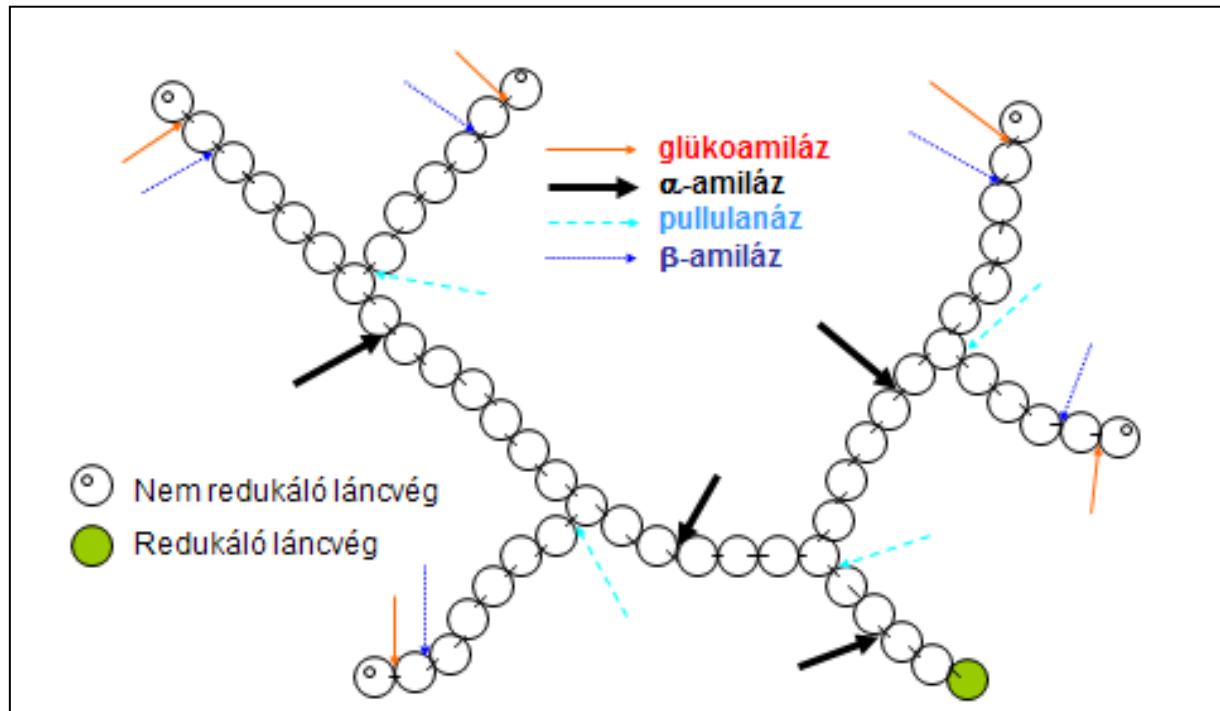
A fontosabb amilázok:

8.5.1.1. α -amilázok

α -amiláz, folyósító enzim: endo-amiláz, a keményítő láncok belsejében, véletlenszerűen az α (1-4)-glikozid kötéseket hasítja, a terméke amilóz szubsztrát esetén maltotrióz és maltóz, amilopektin esetén dextrin, maltóz és glükóz. A folyósító nevet azért kapta, mert hatására a nagyon viszkózus elcsirizesített keményítő elfolyósodik, a bontástól a viszkozitás drámaian lecsökken. A keményítőlánc tetszőleges pontját képes megtámasztani, ezért gyorsabban bont a csak láncvégen dolgozó enzimeknél.

A hidrolízishez legalább három egymás mellett álló α (1-4)-kötésű D-glükóz egységre van szükség. A hidrolízis sebességét vizsgálva az enzim a lineáris amilóz láncokat hasítja a leggyorsabban. A bontás nagymértékben lelassul a szubsztrát polimerizációfokának csökkenésével. Az amilóz lánc hidrolízise két szakaszból áll. Előbb a kevésbé rendezett spirális szakaszból 6-8 glükózból álló oligomerek képződnek, majd ezek kisebb sebességgel maltózzá és maltotriózzá hasadnak. Végül a maltotrióz még lassabban tovább hidrolizálódhat maltózra és glükózra. A képződött termékek mind α -konfigurációban válnak szabaddá. Az α -D(1-6)-os

elágazásokat is tartalmazó amilopektin enzim hidrolízise hasonló, de két elágazás között csak akkor hasadnak fel az $\alpha(1-4)$ -es glükozidos kötések, ha legalább hat glükóz egységből álló lineáris szakasz áll rendelkezésre. A teljes mértékű lebontáskor a maltóz és glükóz mellett 5-15 glükóz egységből álló és 1-2 elágazást tartalmazó oligomerek, ún. α -határdextrinek is keletkeznek.



113. ábra A keményítőbontó enzimek támadáspontjai

Az α -amiláz az állatvilág alapvető emésztőenzime, de előfordul mikroorganizmusokban, növényekben, gombákban is. Ipari szempontból azok a mikrobák érdekesek, amelyek extracelluláris enzimet termelnek:

- *Aspergillus oryzae*
- *Aspergillus niger*
- *Mucor* nemzetség
- *Bacillus licheniformis*
- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *Bacillus subtilis*

A termelő organizmusnak megfelelően sokféle enzimtípus létezik.

Bakteriális α -amilázok: pl. *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* termeli. Igen magas hőfokon (90-105 °C) is használhatók, több óráig megőrzik aktivitásukat. Aktivitásukhoz, stabilitásukhoz Ca^{2+} ionok jelenlétét igénylik. Működésük optimális pH tartománya 6.7-7.0 közé esik. Móltömegük ~50 kDa, de hajlamosak a dimerizálódásra.

Penészgomba α -amilázok: a legjelentősebb enzimforrások az *Aspergillus* törzsek (*A. oryzae*, *A. niger*). Ipari célra általában az *Asp. oryzae* törzs által termelt készítményeket használják. Móltömegük 50-60 kDa körüli, pH optimumuk 5-6 közé esik. Aktivitásuk 55-60 fokig növekszik, efelett bomlanak. Ca^{2+} és Na^{+} ionokkal aktiválhatók.

Növényi α -amilázok: Ipari szempontból a malátázott árpa a legfontosabb enzimeforrás. A nem csíráztatott gabonaféléknek nincs α -amiláz aktivitásuk. A maláta amiláz optimális reakciókörülményei a penész enzimekre hasonlítanak, annyi eltéréssel, hogy a pH optimum 4,7-5,5 közé esik.

Az amiláz termelő *Bacillus* törzsek enzim termelő képességének javításában a klasszikus indukált mutációs-szelekciós módszerek is jelentős eredményeket hoztak, a kinyert aktivitás 50-100-szorosára növekedett.

Az amilázok fermentációs előállításánál két alapvető anyagcsere szabályozási mechanizmust kell szem előtt tartani. Az amiláz induktív enzim, termelődését a szubsztráttal, azaz keményítővel lehet indukálni. A másik a katabolit represszió, azaz glükóz jelenlétében nem indul meg a keményítő hasznosítás. A fermentáció során tehát a kezdeti glükóz szénforrás elfogyása után keményítő adagolásával indíthatjuk el az enzim termelést.

A technológia tehát rátáplálásos szakaszos fermentáció, nagy térfogatú (100-150 m³), levegőztetett fermentorokban.

Felhasználás

Az α -amilázokat sok iparágban alkalmazzák, csak felsorolásszerűen:

Keményítőipar, a keményítő lebontása maltodextrinekké, glükózzá, izocukorrá (Termamyl, ld. később).

Söripar, gabonaszesz gyártása, a maláta aktivitásának kiegészítésére

Textilipar, írtelenítés - a szálakat a technológia egyik fázisában keményítő bevonattal védik, később ezt emésztik le az enzimmel. Az írtelenítő enzim először a maláta volt, majd 1917-ben próbálták ki az első baktérium amilázt. Majd 1950-ben a NOVO-NORDISK hozott forgalomba egy olcsó, stabil, kemikáliákra nem érzékeny, nagy aktivitású *B. subtilis* enzimet AQUAZYM néven. A továbbfejlesztés során a *B. stearothermophilus* enzimét választották, mert nagy a hőstabilitása és széles a pH optimuma, de a törzs kis mennyiségű enzimet termelt. Ezért az enzim génjét *B. licheniformis*-ba klónozták (nem patogén, maga is amiláz és proteáz termelő), ez az újabb termék az AQUAZYM ULTRA^R.

Mosó- és tisztítószeres: a mosószeres detergens tartalma a csak zsíros jellegű szennyezések eltávolítására alkalmas. Más anyagú szennyezések, fehérjék és szénhidrátok esetében nem hatékonyak. A ruhanemű és az edények viszont rendszeresen szennyeződnek étellel és a testfelület anyagaival – ezek főként fehérjéből és keményítőből állnak. Ezért a megfelelő tisztításhoz fehérje- és szénhidrát bontó enzimeket is adagolnak a termékekbe.

8.5.1.2. *Maltamilázok*

β -amiláz

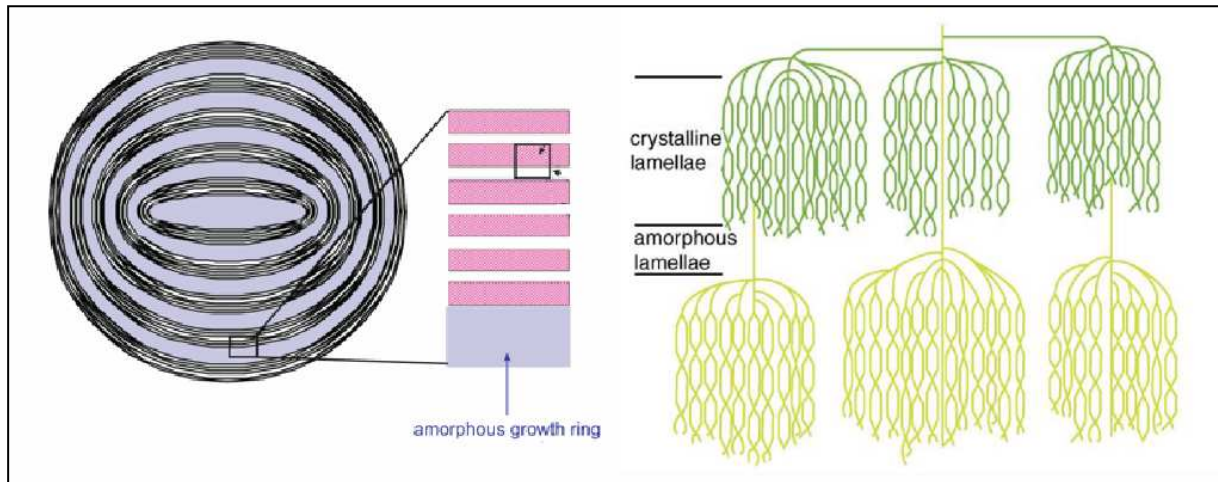
Ez az enzimescsoport a keményítő láncok nem redukáló végéről maltóz egységeket (glükóz(1-4)glükóz diszacharidokat) vág le. Legrövidebb szubsztrátja a maltotetraóz (4 glükóz egység), a maltotriózt csak nagyon kis sebességgel bontja.

Az α - és β -amilázok nevében a görög betűk nem a szubsztrát molekulára utalnak, hiszen mindkét enzim a keményítő α (1-4)-es glükozidos kötéseit hidrolizálja, hanem a termékek térállására. Az α -amilázoknál a lánchasítás után a redukáló láncvégén álló piranóz gyűrűs glükóz -OH csoportja marad α (axiális) térállású, a β -amilázoknál viszont a keletkező maltózé β (ekvatoriális) helyzetű. Ez természetesen csak a keletkezés pillanatában igaz, oldatban azonnal megindul a mutarotáció és lassan kialakul a két forma egyensúlyi összetételű keveréke.

Az α - és β -dextrinek elnevezése a létrehozó enzimek specifitásából vezethető le. Az α -amilázok termékei az α -dextrinek, olyan kis oligoszacharidok, amelyeknél a redukáló láncvég α térállású, és csak egy-két elágazás van a molekula belsejében. Mivel az α -amiláz vágásához legalább hat egységnyi lineáris szakasz szükséges, az elágazási pontoknál még legalább három

glükóznyi láncvég marad. Az α -amiláz egyaránt megrövidíti az elágazó cukorláncok redukáló és nem-redukáló szarait, így az α -dextrinek Y vagy K alakúak.

A β -dextrinek, más néven határdextrinek a maltamilázok vagy amiloglikozidázok hatására jönnek létre. Ezek az enzimek csak a nem-redukáló végek felől közelítik meg az elágazási pontokat, de a redukáló oldalra nem tudnak átlépni, az a szerkezeti rész érintetlen marad. Ezek az enzimek önmagukban csak az amilózt tudják teljesen lebontani, az amilopektin bontása az első elágazásnál leáll. A keményítő szemcse réteges szerkezetét tekintve látható, hogy így csak egy-egy zónát lehet lebontani, az amorf rétegek elágazó fűrtös szerkezete változatlan marad. Nagy dextrin molekula keletkezik, amely láncai végén változatlanul tartalmazza az összes (1-6) kötést. Ezért a teljes hidrolízishez az amilázok kombinált alkalmazására van szükség.



114. ábra A keményítőszemcse szerkezete

A β -amilázok elsősorban a magasabb rendű növényekben fordulnak elő, de számos mikroorganizmus is termeli. Kristályos formában is előállították gabonafélékből (búza, árpa, malátázott árpa, rizs) valamint szójából és batátából (édesburgonya). A mikrobák között jelentős mennyiségű extracelluláris amilázt termel a *Bacillus polymyxa*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. circulans*, valamint néhány *Streptomyces* és *Pseudomonas* faj. A különböző eredetű enzimek tulajdonságai jelentősen eltérnek. A növényi enzimek molekulatömege nagy, 80-250 kDa, míg a baktériumoknál csak 35-60 kDa. A pH optimum is eltérő, 4,8-5,2 illetve 6,0-7,0 közé esik. A hőmérséklet optimum viszont hasonló, 45-55 °C. Aktivitásuk tovább nő 60-65 fokra, de ezen a hőfokon már gyorsan inaktiválódnak.

Felhasználás

Igen nagy mennyiséget használnak fel maláta formájában a sörcefrézésnél és a gabonaszesz gyártásánál. Régebben a tisztított enzim preparátumot is ebből az olcsó alapanyagból nyerték ki. Manapság elsősorban *B. polymyxa* fermentációjával állítják elő. Az élelmiszeripar számára nagy tételben állítanak elő maltóz szirupot (HMS = high maltose syrup) keményítőtől. Ennek megvan az az előnye a többi cukor oldathoz képest, hogy hő hatására nem barnul, nem karamellizálódik.

Maltogén α -amilázok

Ezek az enzimek az előbbiekhöz hasonlóan maltóz egységeket vágnak le a keményítő nem-redukáló láncvégéről, de a termék térállása α marad. A két maltóz izomer közötti különbség oldatban fokozatosan eltűnik a mutarotáció jelensége miatt, a két forma egymásba átizomerizálódik, és egyensúlyi összetételű elegyük alakul ki. A mechanizmusnak megfelelően az α -maltóz mellett β -határdextrinek keletkeznek.

Az iparban általában penész eredetű enzimeket használnak.

8.5.1.3. Amiloglikozidáz, glükoamiláz

Az amiloglikozidáz (szinonim nevei glükoamiláz, γ -amiláz) exoenzim, a keményítő nem redukáló végeiről β konfigurációjú glükóz molekulákat választ le. Specifitása nem tökéletes, az $\alpha(1-4)$ kötések mellett hidrolizálja az $\alpha(1-6)$ és $\alpha(1-3)$ kötések is, de nagyságrendekkel lassabban. Így, ha lassan is, de önmagában is képes a keményítő teljes elbontására glükózzá. A gyakorlatban a hidrolízis idő lerövidítése érdekében mégis az α -amilázzal előbontott keményítő további bontására alkalmazzák. A reakciósebességek összehasonlításából kitűnik, hogy minél rövidebb a cukorlánc, annál lassabban megy hidrolízis (22. táblázat).

Szubsztrát (kötés)	Reakciósebesség, %
maltopentóz (1-4)	100
maltotetraóz (1-4)	77
maltotrióz (1-4)	36
maltóz (1-4)	10
izomaltopentóz (1-6)	2,3
izomaltotetraóz (1-6)	1,5
izomaltotrióz (1-6)	0,8
izomaltóz (1-6)	0,13
panóz (1-6)	7,3
nigeróz (1-3)	0,11

22. táblázat Amiloglikozidáz hidrolízis sebességének összehasonlítása

Amiloglikozidázok az állati szövetekben (máj, vékonybél), élesztő és penészgombákban, valamint baktériumokban egyaránt előfordulnak. Ipari szempontból is a legjelentősebb enzimeforrás az *Aspergillus niger*, emellett gyártják *Asp. awamori*, és *Rhysopus nigricans* törzsekkel is.

A glükoamilázok glikoproteinek. Az *Aspergillus niger* enzime jelentős mennyiségű manózt tartalmaz. A törzs két izoenzimet termel, nagyobb mennyiségben a 97 kDa móltömegűt, kisebb mennyiségben a 112 kDa-osat. Stabilis működési tartományuk 40-60 °C közé esik, eelőtt ez az enzim is gyorsan inaktiválódik. A pH optimum 4,5-5,0, a két izoenzim izoelektromos pontja 3,4 és 4,0.

A penésztörzsek szubmerz tenyésztése kiszorította a régebben (1970 előtt) még alkalmazott felületi technológiákat. Az enzim indukció és a katabolit represszió ennél a technológiánál is működik. Glükóz, laktóz, de még a glutaminsav jelenléte is fékezi az enzimtermelést. Ezért célszerű a folyamat során szénforrást cserélni, a glükóz után keményítőt és/vagy dextrint adagolni. A fermentációs idő a fonalas gombáknál megszokott 4-5 nap, de rátáplálásos technikával 10-12 napig is elnyújtható.

Felhasználás

Iparban az elfolyósított keményítő cukrosítására használják. Fő alkalmazási területe a bakteriális α -amilázzal együtt a keményítőtől kiinduló enzimes glükóz gyártás. A glükóz az élelmiszer és fermentációs ipar fontos alapanyaga és közbelső terméke (izocukor gyártás, szorbit gyártás, fermentációs technológiák szénforrása, szeszgyártás). A glükóz gyártáson kívül felhasználják különleges összetételű keményítőszirupok és diabetikus készítmények előállítására, a sörlet zavarossá tevő dextrinek eltávolítására.

8.5.1.4. *Pullulanáz, izoamiláz*

A pullulanáz (EC 3.2.1.41) egy amilolitikus glükánáz enzim, amely az (1-6)- α -D-glükózid kötések hidrolízisét katalizálja a pullulánban, amilopektinben és glikogénben, és ezek α - és β -határdextrinjeiben (debranching enzyme = elágazást megszüntető enzim).

A név onnan származik, hogy eredetileg a *Pullularia pullulans* nevű mikrobában fedezték fel. A törzs tartalék tápanyaga a pullulán, ami α (1-6) kötésekkel polimerizált glükóz. Ennek visszabontására, mobilizálására termeli a pullulanázt.

A későbbiekben a *Klebsiella aerogenes* (mai nevén: *Aerobacter aerogenes*) által termelt enzimet vizsgálták, termelték, és engedélyezték élelmiszeripari célokra.

Emellett számos olyan törzsben is kimutatták, amelyek egyéb amilázokat is termelnek. Így megtalálták élesztőkben, a prokarióták között pedig *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Clostridium* és *Bacillus* fajokban. Ez utóbbiak közül sokat foglalkoztak a *B. cereus*, *B. acidopullulyticus*, *B. stearotherophilus*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. sectorramus*, *B. cereus* enzimeivel. Mivel az izoamilázokat rendszerint más enzimekkel, általában amiloglükózidázokkal együtt alkalmazzák, az ipari technológiákhoz célszerű olyan enzimeket választani, amelyek pH és hőmérséklet optimuma azonos vagy nagyon közel áll egymáshoz. A glükóamiláz működési paraméterei 50-60 °C és pH=4,5-5,0. Tehát a semleges vagy gyengén lúgos közegben működő izoamilázok nem jönnek számításba. A savas tartományban működik viszont a *Pseudomonas amyloclavata*, a *Bacillus acidopullulyticus* és a *Bacillus sectorramus* enzime. Ezek közül is a magasabb hőmérsékleten aktív enzim alkalmazása előnyös. Mivel a termelő organizmusok produktivitása vagy más tulajdonságai nem mindig megfelelők, ilyenkor célszerű a jónak bizonyult enzim génjét inkább más fajba klónozni és így megoldani a gyártást. A *B. subtilis* emberekre nem patogén és nem toxikus, és használata a múltban élelmiszeripari enzimek termelésében biztonságosnak bizonyult. Ezért gazda szervezetül egy genetikailag módosított *B. subtilis* törzset választottak, amely nem spóráképző, proteáz-hiányos, amiláz negatív és surfactin negatív. Ebben expresszálták a *B. acidopullulyticus*-ból származó pullulanáz (pulC) gént. Ez a génmanipulált *B. subtilis* által termelt pullulanáz megkapta a GRAS (generally recognised as safe) minősítést. A génmanipulációval azt is elérték, hogy az eredetileg induktív enzimek (induktor: pullulán, izomaltóz) konstitutívúvá váltak, az enzimtermelés állandóan folyik.

Felhasználás

Az eddig tárgyalt amilázok egyike sem volt képes az amilopektin elágazásainál található az α (1-6) kötések elfogadható sebességű bontására. A pullulanázt és a hasonló enzimeket éppen erre használják. Hatására az elágazások eltűnnek, minden dextrin lineárisvá válik és ezzel az exoamilázok teljesen le tudják bontani a keményítőt. Az elágazás-bontó enzimeket a hidrolízis második szakaszában, az amiloglükózidázzal együtt alkalmazzák.

8.5.2. *Glükóz és izocukor előállítás*

A keményítőből sok értékes termék állítható elő. Ezen a téren komoly munkát fektettek egyrészt az enzimek kutatásába, másrészt a technológiai folyamatok fejlesztésébe. Az enzimek ideális katalizátorok a keményítőiparban hatékonyságuk, specifitásuk és az enyhe reakcióköörülmények (hőmérséklet, pH) miatt. Ilyen körülmények között kevesebb melléktermék, kellemtelen íz és színanyag képződik. Emellett az enzimes reakciók könnyen szabályozhatók és a kívánt konverzió elérésénél leállíthatók.

Időrendben az első enzim készítmény a glükóamiláz volt, ami teljesen lebontja keményítőt glükózzá. Megjelenése után a teljes keményítő ipar teljes egészében átváltott a hagyományos savas hidrolízisről az enzimes hidrolízisre. Az új technológia tisztább terméket, nagyobb hozamot és könnyebb kristályosítást eredményezett.

A második lépés 1973-ban a rögzített glükóz izomeráz megjelenése volt, amely lehetővé tette a nagy fruktóz tartalmú szirup (HFCS = high fructose corn syrup, magyar neve: izocukor,

izoszörp) ipari gyártását. Ez volt az a nagy áttörés, ami egy több milliárd dolláros iparág, a HFCS termelés születéséhez vezetett az USA-ban.

8.5.2.1. Enzimekkel módosított keményítők

Megfelelő enzimek és a megfelelő reakciókörülmények kiválasztásával a keményítőből sokféle értékes termék állítható elő, amelyek az élelmiszeripar szinte bármely konkrét igényét ki tudják elégíteni. A különböző összetételű, illetve fizikai tulajdonságú szirupokat és módosított keményítőket sokféle élelmiszer, üdítők, cukrászdai, húsipari, sütőipari termékek, fagyalaltok, mártások, bébiételek, befőttek, lekvárok gyártásánál használják fel.

A hidrolizált keményítőt sok fermentációs tápoldatban használják, mint könnyen metabolizálható cukrot. Viszonylag olcsó szénforrásként alkalmazható ipari alkohol, primer metabolitok, enzimek előállításához.

8.5.2.2. Glükóz szirupok igény szerint

Glükóz szirupokat különböző növényekből (búza, kukorica, tapióka, manióka és burgonya) kinyert keményítő hidrolízisével kapunk. A hidrolízis módja és mértéke alakítja ki a végső szénhidrát összetételt, ezáltal az anyag funkcionális tulajdonságait. A hidrolízis mértékét általában a dextróz egyenértékkel jellemzik.

A dextróz (glükóz) egyenérték a cukrok redukáló képességén alapul. A glükóz aldehid csoportja miatt önmagában egy redukáló cukor. Viszont a keményítő láncába épülve az (1-4) kötések miatt elveszti redukáló képességét, csak a lánc egyik végén (=redukáló láncvég) lévő egyetlen glükóz képes redukálni. A hidrolízisnél fordított folyamat megy végbe: a keményítő molekula minden hasításánál két láncvég, egy redukáló és egy nem-redukáló vég jön létre. Így a redukáló csoportok számának növekedésével jellemezhetjük a folyamat előre haladását.

Definíciója:

$$DE = 100 \cdot \left(\frac{\text{elbontott glikozid kötések száma}}{\text{kezdetben jelen volt összes glikozid kötések száma}} \right)$$

$$DE = 100 \cdot \left(\frac{\text{redukáló cukor, glükózban kifejezve}}{\text{teljes szénhidrát mennyiség}} \right)$$

Értéke tehát a kiindulási keményítőnél gyakorlatilag nulla, a teljes bontásnál, amikor már csak szabad glükóz van jelen, 100. Egy maltóz oldat DE értéke értelemszerűen 50. A DE fordított arányosságban áll az oligoszacharidok polimerizációs fokával: átlagos tagszám = 100/DE.

Az irányított enzimes hidrolízissel jól meghatározott cukor spektrumú hidrolizátumok állíthatók elő. Az elcukrosított levek összetételét kromatográfias technikákkal analizálják. A HPLC és GPC (gélpermeációs kromatográfia) elemzések megadják az oldat molekulatömegeloszlását és a teljes szénhidrát-összetételt. Így pontosan jellemezhető és szabványosítható egy termék, például a maltóz szirup (HMS=high maltose syrup) összetétele és tulajdonságai. Ezek a módszerek pontos összetételt adnak, de a gyakorlat szempontjából a minősítéshez sokszor elegendő közvetett paraméterek, mint például a viszkozitás mérése.

8.5.2.3. Technológia

A modern enzimes műveletek a kukorica nedves őrléses feldolgozási technológiájába épülnek be. Bár ez már kiforrott technológia, még mindig folynak kutatások az enzimes átalakítás kihatásának és hatékonyságának javítása érdekében.

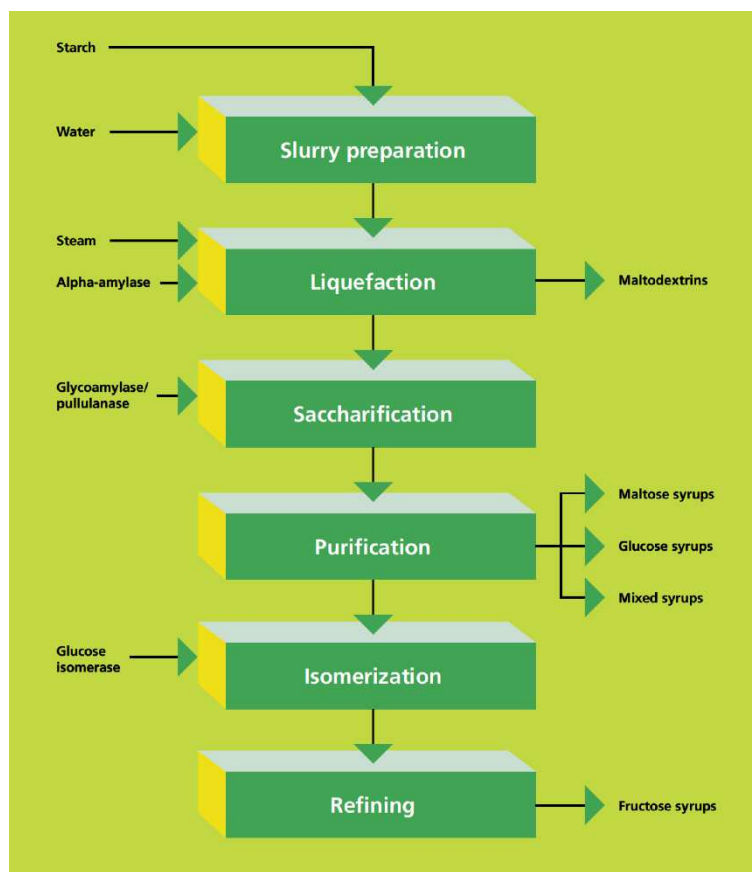
A keményítő feldolgozásának a fő lépéseit a 115. ábra mutatja be. Az enzimes lépések az alábbiakban kerülnek bemutatásra.

Folyósítás

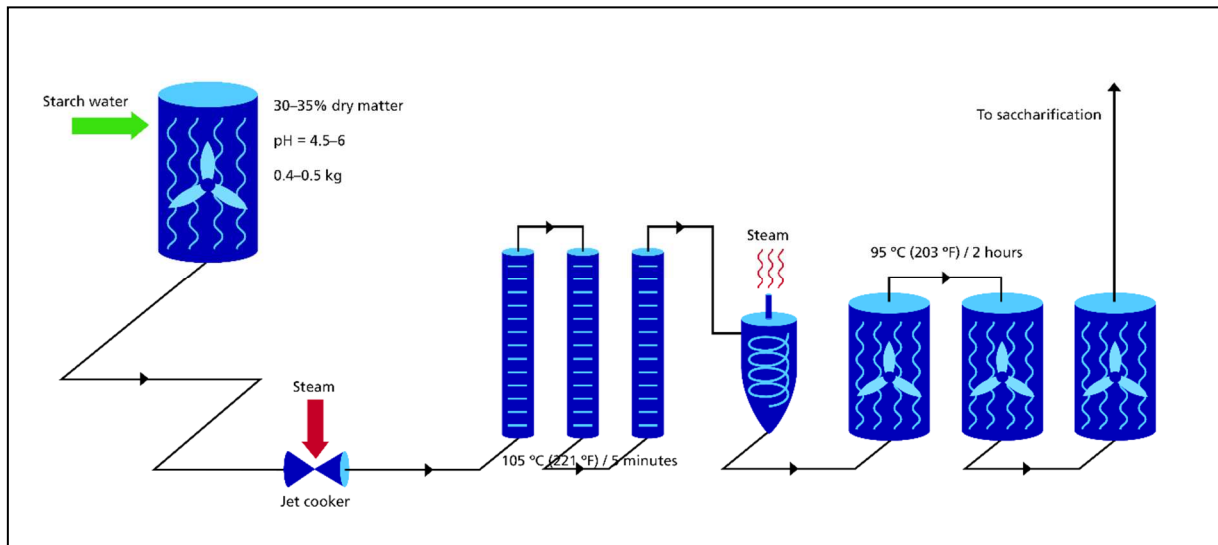
A legelterjedtebben felhasznált nyersanyag a kukoricakeményítő, ezt követi a búza, a tápióka és a burgonya. Mivel a natív keményítő az alfa-amiláz hatására csak lassan bomlik le, a 30-40% szárazanyag tartalmú szuszpenziót előbb a hőmérséklet emelésével elcsirizesítik. A hozzáadott hőstabil bakteriális alfa-amiláz megkezdi a keményítő láncok darabolását (folyósítás), ezzel a további enzimes bontást is lehetővé teszi.

A művelet kivitelezését mechanikailag is ki kell dolgozni, mert a csirizes keményítő szuszpenzió rendkívül viszkózus, a szokásos keverők a szokásos teljesítményfelvétellel nem képesek átkeverni a reaktort. A keverő rendszert inkább dagasztásra kell méretezni, mint keverésre. A folyósítás művelete onnan kapta nevét, hogy ez az óriási viszkozitás az enzim hozzáadására rövid idő alatt (0,5-1 perc) drámaian lecsökken, a keményítő „elfolyósodik”. A keverős (szakaszos vagy folyamatos üzemű) reaktorok alkalmazását meg lehet kerülni, ha folytonos üzemben gőzinjektoros fűtést (jet cooker) alkalmaznak.

A legtöbb üzemben a keményítő elfolyósítása egyszeri enzimadagolással, gőzinjektoros fűtéssel zajlik (116. ábra). A hőstabil alfa-amilázt hozzáadják a keményítő szuszpenzióhoz, azután ezt szivattyúval átnyomatják a gőzinjektoron. Itt éles gőzt nyomtatnak a folyadékba, ami lekondenzálva felemeli a hőmérsékletet kb. 105 fokra. Az elegy ezután egy hőszigetelt csőkégyön halad keresztül – ez a hőntartási szakasz – ahol az 5 perces tartózkodási idő elégséges az elcsirizesítéshez és elfolyósításhoz. A részben elfolyósított keményítő szuszpenziót egy expanziós szelepen keresztül atmoszférikus nyomásra engedik ki. Ennek során a folyadék egy része elpárolog, főtömege pedig 90-100 °C-ra hűl. Ezen a hőmérsékleten kevertetik tovább egy-két órán át, amíg az enzimes hidrolízis el nem éri a tervezett DE értéket.



115. ábra A keményítő feldolgozásának a fő lépései



116. ábra A folyósítás berendezései

Az enzim hidrolizálja az elcsirizesített keményítő $\alpha(1,4)$ -glikozidos kötéseit, ezáltal gyorsan csökkenti a viszkozitást, és α -dextrinek keletkeznek. A folyamatot ezen a ponton meg lehet állítani, és az oldatot tisztítás után bepárolni. A maltodextrinet (DE 15-25) reológiai tulajdonságaik miatt az élelmiszeriparban használják. Édeskés ízű funkcionális összetevők, töltő és sűrítő anyagok pasztákban, bébiételekben, szószokban, mártásokban, ragasztók a levesporokban és instant élelmiszerekben stb.

Cukrosítás

A maltodextrinet további enzim (glükóamilázos, pullullanázos) hidrolízissel a különböző édes szirupokká lehet alakítani. Ezeket a dextróz ekvivalensük szerint különböző csoportokba lehet sorolni: DE= 40-45: maltóz, 50-55: nagy maltóz tartalmú (high maltose), és 55-70: nagy konverziójú (high conversion) szirup. Több enzim kombinációjával (béta-amiláz, glükóamiláz, és pullulanáz, mint elágazást bontó enzim) közepes konverziójú szirupot is elő lehet állítani, amelynek maltóz tartalma közel 80%.

A maltodextrin fázistól glükóamiláz és elágazást bontó enzimek segítségével a legtöbb keményítő-nyersanyag (kukorica, búza, burgonya, tápióka, árpa, és a rizs) gyakorlatilag teljesen elhidrolizálható 95-97%-os glükóz tartalomig.

Az enzimgyártók eleve többféle enzimet tartalmazó, közös optimumú preparátumot forgalmaznak, pl. a DEXTROZYME amiloglikozidázt és elágazásbontó enzimet tartalmaz, amelyeknél a komponensek pH és hőmérséklet optimuma nagyon közel áll egymáshoz. Ennél a termékénél a működési paraméterek: 55-65 °C és pH=4,0-5,0. Az enzim mennyisége és a szükséges reakcióidő fordítottan arányos egymással, sok enzimmel 18 óra alatt el lehet érni a kb. 98%-os hidrolízist, kisebb beméréssel viszont 48 óra is szükséges lehet.

A cukrosításnál célszerű meghígítani a 30-40%-os dextrin oldatot, mert ilyen nagy koncentrációknál mellékreakciók léphetnek fel. Ha az amilázok „nem találnak elég vizet” a hidrolízishez, akkor a levett cukrot víz helyett egy másik oligoszacharidhoz kapcsolják, ezáltal szokatlan szerkezetű oligoszacharid melléktermékek jelennek meg.

A kapott glükóz oldatot a felhasználási cél szerint tisztítják, elsősorban adszorpciós műveletekkel. A tiszta glükóz monohidrát formájában kristályosítható. A bepárlás és a kristályosítás energiaigényes művelet, ezért gazdaságosabb a glükózt tömény oldat, szirup formájában értékesíteni.

A glükóz gyártás olyan nagy üzemméretben folyik, hogy minden technológiai lépésben a gazdaságosabb folytonos működtetésre törekednek.

A gyártás kihozatala és a termék tisztasága a növényi nyersanyagtól függ, a keményítőre nézve 90-99% közé esik.

8.5.2.4. Glükóz-izomeráz (xilóz-izomeráz)

A glükóz gyártása mind agrotechnikailag, mind technológiailag gazdaságosabb, mint a szacharózé. Van azonban egy nagy hátránya, mégpedig az, hogy az édesítő hatása jóval kisebb. Emiatt ugyanolyan édességhez jóval többet kell az élelmiszerekbe adalékolni, mint a répacukorból. Ez egyrészt gazdasági kérdés, mert a több glükóz nagyobb költséget is jelent, másrészt egészségügyi kérdés, mert megnövelt cukorbevitel hosszú távol komoly egészségi károsodásokat okoz. Ezért keresték a megoldást, hogy hogyan lehetne az édesítő értéket megnövelni. Megállapították, hogy a szacharóz másik komponense, a fruktóz édesebb az előbb említettekénél, az édesítő értékek aránya: glükóz : szacharóz : fruktóz = 0,6 : 1 : 1,5.

Izomerizáció

Kézenfekvőnek látszott, hogy a glükózt egy izomerizációs reakcióban át kellene alakítani fruktózzá. Erre több enzim reakció utat is találtak, de a technikai-gazdasági problémák (arzenát kofaktor, alacsony hőfok) miatt végül egy viszonylag rossz konverziójú enzimet, a xilóz izomerázt alkalmazták világszerte. Az enzim eredetileg xilóz izomeráz, de az egy szén atommal hosszabb hexózokkal is végrehajtja ugyanazt a konverziót. Az enzim eredeti funkciója abban is megmutatkozik, hogy termelődését a xilánok (xilóz polimerek, korpában, fűrészporsóban, fás anyagokban található) indukálják.

A szokásos 60 °C körüli hőmérsékleten az elméleti egyensúly közel 50-50%-os koncentráció arányánál van. Az egyensúly viszont csak hosszú reakcióidő után áll be, ezalatt pedig melléktermékek (pl.: pszikóz) keletkezésével kell számolni. Ennek elkerülésére és a kihozatal javítására a reakcióidőt lerövidítik, a konverziót csak kb. 43%-os fruktóz tartalomig vezetik.

Mikroorganizmusok

Az enzimet sokféle mikroorganizmusban azonosították, szinte minden gyártó a saját izolálású nemesített törzsét használja. Közös vonása a fejlesztésnek, hogy az eredetileg induktív enzimek génjeit áthelyezték a konstitutív génállományba.

- *Bacillus coagulans* (Sweetzyme, NOVO, DK)
- *Actinoplanes missouriensis* (Maxazyme, DSM, NL)
- *Streptomyces rubiginosus* (Optisweet22, Miles-Kali Chemie)
- *Streptomyces phaeochromogenes* (Sweetase, Nagase, J)
- *Arthrobacter* (ICI)

Az izomerázok intracellulárisan termelődnek. A hasznosítandó xilán poliszacharid nem lép be a sejtbe, de hidrolízis terméke, a xilóz igen, és ezt a sejten belül izomerizálja az enzim. A sejteltárás, enzimizolálás nehézkes művelet, még nagyobb probléma az izolált enzimek bomlékonysága. Emiatt különböző immobilizációs módszerekkel rögzítik az enzimeket. Használhatnak rögzített sejteket, sejteltárás után a törmelékkel kereszt kötött enzimeket formulázott tölteteket is.

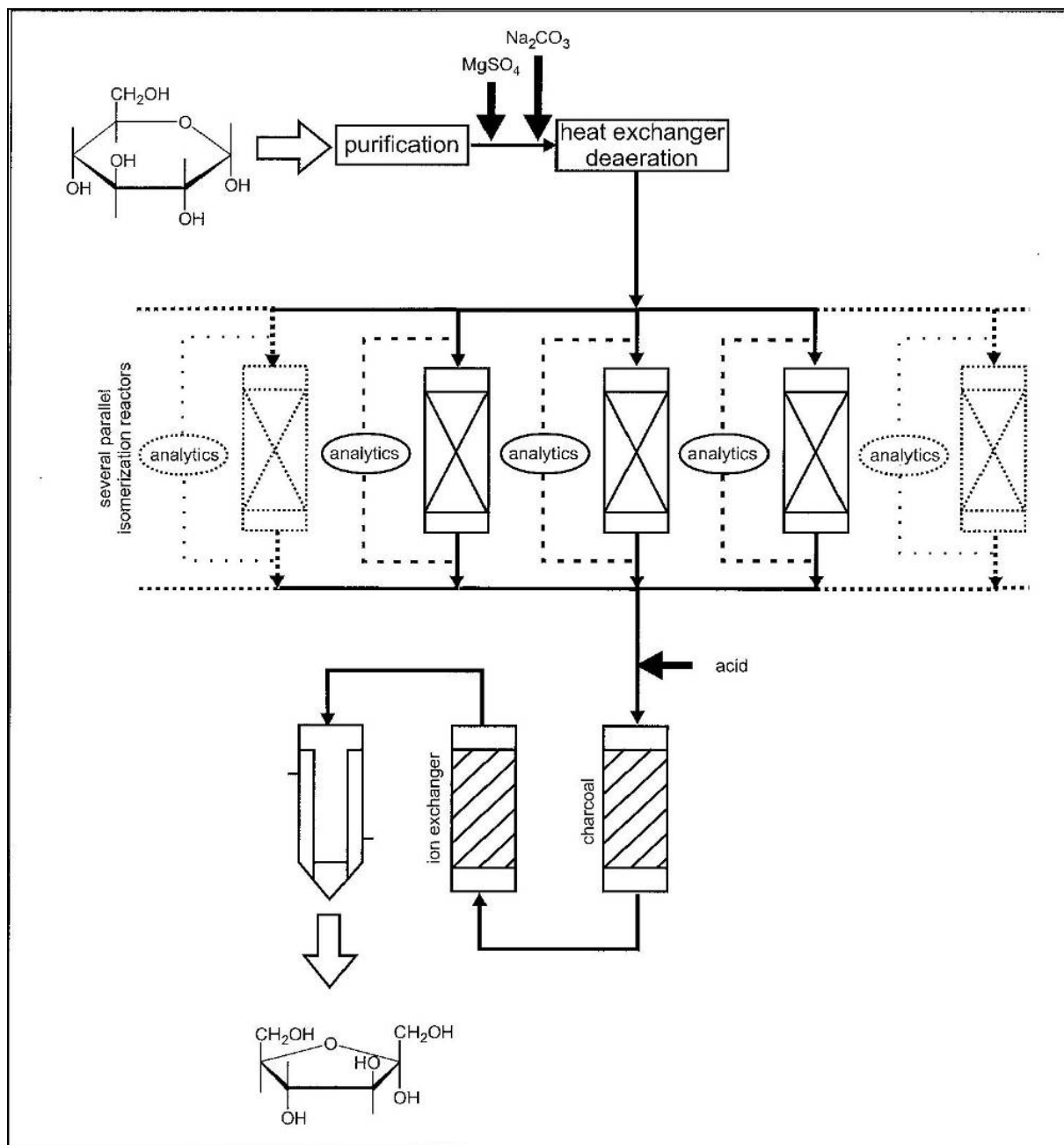
A NOVO *Bacillus coagulans* folytonos fermentációjában a megfelelő enzimtermelés érdekében Co és Mg ionokat adagolnak a tápoldatba. A katabolit represszióval itt is számolni kell, a termelési szakaszban glükóz és oxigén limitet kell fenntartani. A közeg pH-ja a *Bacillus* fermentációknál szokásos 7,5-8.

Konverzió

Az izomerizálásra kerülő glükóz szirupnak tisztának kell lennie: szűrés és aktív szén kezelés vagy ioncserés tisztítás szükséges. Ha az amilázok kalcium igénye miatt az oldat Ca

ionokat tartalmaz, azt el kell távolítani, mert ezek az ionok mérgezik az enzimet. A Mg ionok viszont éppen ellenkezőleg, stabilizálják és aktiválják az enzimet. Az oldott oxigén jelenléte inaktíválja az enzimet és fokozza a melléktermékek képződését. Emiatt a meleg cukoroldatban amúgy is rosszul oldódó oxigén nyomait nátrium-metabiszulfittal távolítják el.

Az izomerizációs reakciót oszlopba töltött immobilizált enzimekkel hajtják végre. A reakció optimális pH-ja 7,5 vagy felette, a hőmérséklet 55-60 °C. E körülmények között nagy az enzimaktivitás, a mikrobiális befertőződés esélye kicsi és az enzim stabilitása is még megfelelő. Ugyanakkor a glükóz és fruktóz meglehetősen instabil, és könnyen átalakul, szerves savak és színes melléktermékek keletkezhetnek. Ezt úgy csökkentik, hogy minimalizálják a reakcióidőt, a cukrok csak annyi időt töltenek e reakciókörülmények között, amíg az oldat átfolyik az immobilizált izomerázt tartalmazó oszlopon. Az enzimet szemcsékben rögzítik, így töltik az oszlopba. A szemcsék elég merevek ahhoz, hogy ne roppanjanak össze a nyomáskülönbségtől,



117. ábra Izoszörp előállítása

és ne zárják el a folyadék útját. A folyamat kis mennyiségű hőt termel, amit folyamatosan el kell vezetni a rendszerből

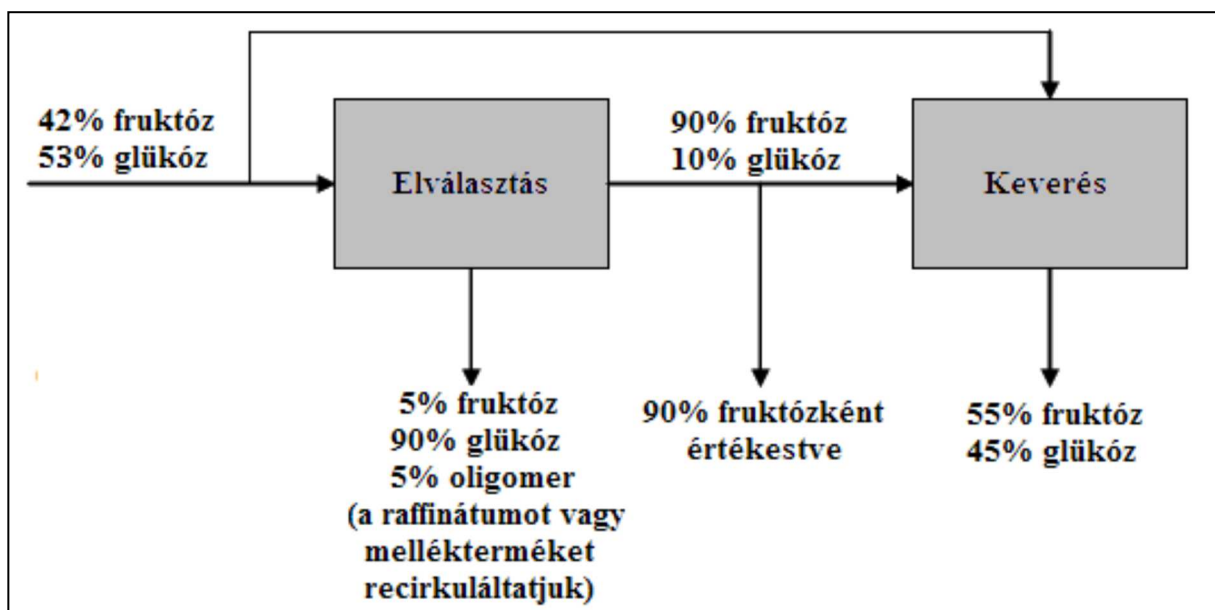
A rögzített enzim idővel veszít aktivitásából. Manapság a kereskedelmi glükóz izomerázok aktivitásának felezési ideje ipari körülmények között 200 nap körül van. Az enzimtöltet hatékonyságát minden reaktornál az elfolyónál optikai szenzorokkal folyamatosan mérik.

Az aktivitás csökkenése miatt az oszlopreaktor konverziója időben változik, így nehéz lenne fenntartani az állandó fruktóz koncentrációt a termékben. Le kellene lassítani az áramlási sebességet, ami viszont a melléktermékek keletkezésének kedvez. Ennek elkerülése érdekében sok oszlopot működtetnek együtt összekapcsolva. Egy gyengébb és egy aktívabb töltetet sorba kötve közel állandósult működést lehet elérni. Az USA-ban használatos oszlop jellemző átmérője általában 0,6-1,5 m, és tipikus ágymagassága 2-5 m. Egy naponta több mint 1000 tonna izocukrot előállító üzem legalább 20 egyedi reaktort használ.

A kilépő cukorelegy százalékos összetétele jellemzően 53 : 42 a glükóz javára, a többi melléktermék. Ez még mindig nem pótolja tökéletesen a megszokott szacharózt. A lé további feldolgozása során adszorpciós lépésekkel megtisztítják, majd egy speciális kromatográfias művelettel részlegesen elválasztják a glükózt és a fruktózt.

Az elválasztásra kalcium ionokkal telített erős kation cserélő gyantát, pl.: DOWEX MONOSPHERE 99-et használnak. Az elválasztás mechanizmusa összetett. Egyrészt az oldott állapotban levő cukrok -OH csoportjai kölcsönhatásba lépnek a gyantán levő kalcium ionokkal (kelátképzés). A fruktóz és glükóz elválasztása azon alapul, hogy a fruktóz/kalcium ion komplexben erősebb kölcsönhatás jön létre, mint a glükóz/kalcium ion komplexben. Az elválasztás mechanizmusát ligandcserés kromatográfiának is nevezik. Másrészt méretkizárásos kromatográfia is megvalósul, mivel a nagyobb molekulák, mint a tri-, tetra- és nagyobb méretű oligoszacharidok, fizikailag nem férnek be a gyantában található polisztírol láncok közötti legkisebb nyílásokba. Fruktóz tisztítás esetén a méretkizárásos kromatográfia a ligandcserés kromatográfiával együtt, párhuzamosan játszódik le. A szirupban levő oligoszacharidok a gyanta gyöngyökön kívül maradnak, így elsőként érnek az oszlop aljára.

Az elválasztáshoz igen nagy oszlophosszra van szükség (~10 m), ezért nem egy kolonnával, hanem több, rövidebb oszlop összekapcsolásával, az ún. szimulált mozgó ágyas (simulated moving bed = SMB) technikával hajtják végre. A kapott frakciók így sem tiszták, mindkettő



118. ábra A fruktóz tartalom beállítása

tartalmaz mintegy 10%-ot a másik cukorból is. A glükóz áramot visszavezetik az izomerizációra, a fruktóz áramot pedig többféleképpen is fel lehet használni. Lehet tovább tisztítani a fruktózt, tetszőleges tisztaságig, lehet ebben a 90%-os formában értékesíteni, de a legnagyobb részét az izomerizációból kapott 43%-os elegyhez keverik úgy, hogy a fruktóz arány 55%-ra növekedjen. Ez az összetétel felel meg legjobban a szacharóz tulajdonságainak, ezt használja föl az óriási mennyiségben az élelmiszeripar izocukor/izoszörp néven. Ezt az elegyet nem kristályosítják ki, hanem 70% szárazanyag tartalomig bepárolva oldatban forgalmazzák.

Az izocukor szinte minden téren képes helyettesíteni a szacharózt, de a legtöbbet mégis az üdítő italokban, fagyaltokban, édes- és tejiparban használják fel.

Adalékok: ez a technológia, mint annyi más műszaki fejlesztés, a háborús politikának köszönhető. Amikor Fidel Castro rendszere átvette az irányítást Kubában, az USA gazdasági blokádot hirdetett ellene. Kuba fő exportcikke a nádcukor volt, ez nem kerülhetett az amerikai piacra. Ettől viszont cukorhiány lépett fel. Az Egyesült Államok nem tudta megtermelni a megfelelő mennyiségű cukrot. Cukornád termesztésére csak Floridában volt mód, ott is csak kis területen. A répacukor pedig eleve drágább, mint a nádcukor, csapadékgépes, és az agrotechnikája költséges, nehezebb gépesíteni. Ráadásul jól termő gabonatermelő területeket kellett volna átállítani cukorrépára. (A répacukor is valójában háborús kényszermegoldás, a napóleoni háborúk idején az angolok kontinentális zárlata miatt a trópusi területekről megszűnt a nádcukor importja, és ezért kezdtek Európában az édes répa nemesítésével és a cukor kinyerésével foglalkozni.) Emiatt született meg az igény, hogy a bőséges kukorica feleslegből kellene valahogy cukorpótlót előállítani. A gyártás így Amerikából indult (Clinton Corn Proc. Co, 1967, nincs kapcsolat a későbbi elnökkel), azután elterjedt az egész fejlett világon. A következő technológiai fejlesztés az izomeráz enzim rögzítése volt (1974).

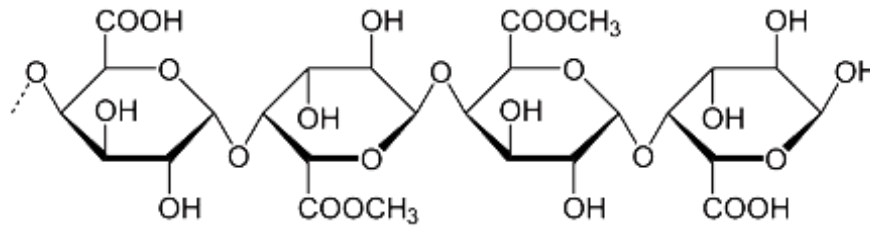
Magyarországon még a rendszerváltás előtt (1982-ben) állami vállalatként hozták létre Szabadegyházán a kukorica-feldolgozó vertikumot, mai szóval biofinomítót, ami melléktermék nélkül dolgozta fel a kukoricát kb. 15 féle terméké (izocukor, glükóz, ipari alkohol, glutén, kukorica csíra, csíraolaj, élesztő, takarmányok stb.). Teljes egészében megvásárolták a fejlett technológiát. Ami akkor azért volt nagy szó, mert a forint még nem volt konvertibilis, és ezt dollárban kellett kifizetni. Ez kivételesen jó beruházásnak bizonyult, három év alatt dollárban is megtérült a befektetés.

Az üzem jelenleg is működik HUNGRANA néven osztrák többségi tulajdonban, de az eredetileg évi 140 000 tonnás kukorica feldolgozó kapacitását azóta több mint egy millió tonnára növelték.

8.5.3. Pektinázok

A pektin a keményítőhöz hasonlóan a természetben gyakran előforduló poliszacharid, összetétele azonban messze nem olyan egységes. Első közelítésben poli-galakturonsavnak tekinthető, melynek karbonsav csoportjai részlegesen (40-70%-ban) metilalkohollal észterezettek. A monomerek béta 1,4-es kötéssel kapcsolódnak össze. Valójában heteropoliszacharid, csak a lineáris alapláncot alkotja tisztán galakturonsav, az elágazó zónákban más cukor molekulák is megjelennek. Itt a lineáris alapláncba ramnóz molekulák is beépülnek, és ezekhez rövidebb, 10-20 egységből álló oligoszacharidok kapcsolódnak, amelyek galaktózból, arabinózból és xilózból állnak.

A pektin szinte minden növényi sejt falának középrétegében előfordul, a cellulózzal, hemicellulózzal együtt. A kultúrnövények között a zöldségek és gyümölcsök (alma, körte, boggyós gyümölcsök, citrusfélék, paradicsom, répa, uborka) termésének érésénél játszik szerepet. Az éretlen termés kemény, a sejtfalak szilárd tartást adnak a szöveteknek. Az érés folyamán a növény saját enzimei részlegesen elbontják a pektint, az a sejtfalból a citoplazmába kerül, ettől a termés megpuhul, élvezhetővé válik. Ez a pektin a felelős a feldolgozás során a dzsemek gélesedéséért (ez itt előnyös, sokszor adagolnak is a gél keményítése érdekében „befőzőpektint” a gyümölcshöz), ugyanakkor sok vizet/folyadékot tart vissza a gyümölcs húsában, ezáltal a gyümölcslégyártásnál kevesebb levet lehet kiperéselni, csökkenti a léhozamot. Mint kiváló védőkolloid „oldatban” tartja a gyümölcslé kolloidális anyagait (fehérjéket, rostanyagokat stb.), ettől a lé zavaros, nem szűrhető és tárolási problémák is fellépnek.

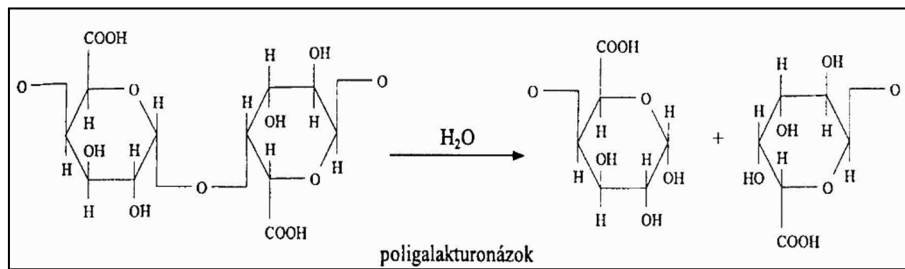


119. ábra A pektin alaplánca

A pektint a gyümölcsfeldolgozás melléktermékeiből extrahálják, mérsékelt égövön alma maradékból, melegebb klímán pedig citrusfélék héjából.

A növényi pektinbontás mellett sok mikroorganizmus, elsősorban a fonalas gombák termelnek bontó enzimeket. Ezek biológiai szerepe egyértelmű. A penészek számára kiváló táptalaj a növények termése a benne található tartalék tápanyagokkal, ehhez pedig a sejtfal lebontásával tudnak hozzájutni. A prokarióták között a lágyrothadást előidéző növénypatogén *Erwinia* fajokra jellemző az enzimtermelés.

A pektin bontásában még több fajta enzim vesz részt, mint a keményítőben. Itt is megtaláljuk az exo- és endoenzimeket. Az exo-poligalakturonázok a lánc végéről hasítanak le egy-egy galakturonsav egységet. Az endoenzimek között az endo-poligalakturonázok statisztikusan

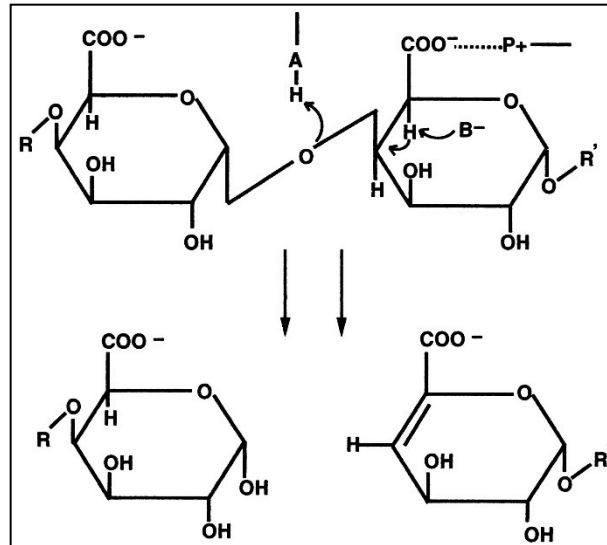


120. ábra Endopektinázok hatása

hidrolizálják a láncot, rövidebb pektin darabokat hoznak létre. Emellett az enzimkomplexben gyakran előfordul a pektin liáz enzim is, amely nem hidrolízissel vágja el a pektin láncot, hanem a hidrogének átrendezésével egy kettős kötést hoz létre a nem-redukáló láncvégen álló cukorban.

A poligalakturonázok (pektinázok) mellett rendszerint jelen van a pektinészteráz is, amely a pektin metilészter kötéseit hidrolizálva metanolt szabadít fel.

Ipari termékként a pektinbontó enzim komplexeket elsősorban penészekkel (*Aspergillus*- és *Penicillium*-fajokkal) állítanak elő. Az enzimek extracellulárisan (sejten kívül) termelődnek, tehát tenyésztés után a fermentléből egyszerűbben preparálhatók. A fermentáció során több enzim termelődik párhuzamosan, a felsoroltakon kívül rendszerint hemicelluláz-keverék is megjelenik, amelyben xilanázok, arabinázok is jelen vannak. Ezek szétválasztására, kitisztására az iparban nincs szükség, ezek a mellékaktivitások nem zavarják, hanem segítik a fő funkciót, a poliszacharidok lebontását.



121. ábra Pektin liáz

Felhasználás

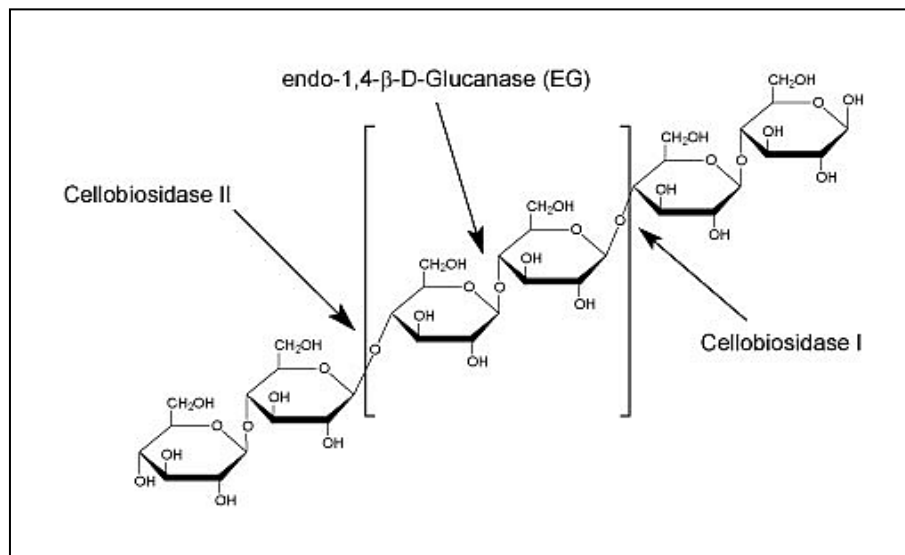
A pektin hidrolízisnek több ipari folyamatnál van jelentősége. Ha pektinázt preparátumot adunk gyümölcszúzalékhoz, akkor a léhozam 2–8%-kal növelhető. Ugyanez az eljárás használható a szőlő feldolgozásánál a must préselés hozamának javítására, illetve az olíva olaj kinyerésénél is.

A gyümölcsléipar az enzimet ezen kívül gyümölcslé derítésére is felhasználja. Az enzimmel nem kezelt gyümölcslé zavaros és szűrhetetlen, de ha a pektint enzimes úton lebontjuk, a védőkolloid hatása megszűnik, és a lé könnyen „tükrösre” szűrhető.

A pektin-hidrolízisnek a felsoroltakon kívül a textiliparban is van jelentősége, a len és a kender áztatásánál. A len és kenderkórók feltárása egy spontán mikrobiológiai folyamatban, az áztatás során történik. Az áztatás célja a külső háncsrostok maradéktalan elválasztása a belső fás részeketől. A háncsrészben cellulózban dús, rugalmas kötegeket, rostnyalábokat találunk, amelyeket egymással és a farésszel pektin (mint ragasztóanyag) köt össze. A kenderáztatásnál ez a pektinanyag elbomlik, és ezáltal a szálak szabaddá válnak, szárítás után a tilolással és gerebenezéssel elválaszthatók. A kender és len növényen mindig vannak a talajból származó, pektinázt termelő *Bacillus macerans* és *Bacillus asterosporus* sejtek, amelyek a számukra kedvező életfeltételeket jelentő áztatóvízben gyorsan elszaporodnak, enzimet termelnek és ezzel fellazítják a rostokat.

8.5.4. Celluláz

A cellulóz a keményítőhöz hasonlóan egy glükóz homopolimer, de az egyes glükóz egységek közötti glikozidos kötések térállása nem α , hanem β (ekvatoriális), ettől a lánc nem spirális alakú, hanem egyenes. A cellulóz molekulának nincsenek elágazásai, így a lineáris β -(1→4)-glükán láncok képesek párhuzamosan egymás mellé rendeződni, kvázikristályos szerkezetet alkotni. A cellulóz a növényi sejtek sejt falának fő komponense. Lineáris molekulái a növények rostjaiban bonyolult szerkezetű kompozitot alkotnak a hemicellulózokkal (5- és 6-szénatomos heteropoliszacharidok) és a ligninnel (polifenol alapú polimerek). A cellulóznak az ad jelentőséget, hogy a bioszférában termelődő biomassza túlnyomó része cellulóz, a keményítő és egyéb poliszacharidok termelése jóval kisebb. Ha sikerülne ennek az anyagnak a gazdaságos, ipari léptékű feldolgozását megoldani, az az élelmiszeriparnak, a bioenergia termelésnek, de



122. ábra A celluláz enzimek támadáspontjai

még a vegyiparnak is hatalmas lökést adhatna. Ehhez viszont le kellene bontani a felépítő glükóz egységekre, amelyek azután a további átalakítások kiinduló anyagai lehet (pl. bioetanol, egyéb fermentációk). A feltételes mód annak szól, hogy ezek a folyamatok még nem érték el a gazdaságosság határát. Nagyon sok kutatás és fejlesztés folyik a cellulóz kémiai és enzimes bontása területén, de ipari szinten működő eljárás még nem született. Ennek oka nem elsősorban a cellulóz molekula nehéz bonthatósága, hanem a növényi rostok említett komplex szerkezete, amelybe a cellulóz beágyazódik. A cellulóz kiszabadításához olyan fizikai vagy kémiai előkezelések (gőzrobbantás, ammóniás áztatás) szükségesek, amelyek megdrágítják az eljárást. Emellett a cellulóz (tartalmú anyagok) nem oldódnak vízben, a reakció heterogén fázisú, ami további problémákat okoz. E technológiák nagy elvi lehetőségei dacára jelenleg a cellulázokat nagy mennyiségben más célokra termelik, így pl. a textilipar és a mosószergyártás számára.

A cellulóz enzimes bontásában – hasonlóan a keményítőéhez – egy több enzimből álló komplex vesz részt. Ennek egyik eleme a β -endoglükánáz (EG), amely a poliszacharid lánc belsejében hidrolizálja a glükózok közötti kötések és ezzel oligo- β -glükánokat hoz létre. A cellulóz bontás exoenzimeit a β -amilázokhoz hasonlóan a lánc végéről kettesével választják le glükóz monomereket cellobióz formájában. Ezek a cellobiozidázok, két alaptípusukat különíthetjük el aszerint, hogy a lánc redukáló (CB1) vagy nem-redukáló (CB2) végén fejtik ki hatáskörüket (122. ábra).

A bontás utolsó lépése a cellobióz hidrolízise glükózzá, ezt az eléggé elterjedt cellobiáz (béta-glükozidáz) enzim katalizálja.

8.5.4.1. *Trichoderma* enzimek

Egy sor mikroorganizmus képes ilyen enzimek előállítására, ezek között legelterjedtebben alkalmazott a *Trichoderma reesei* és a *T. viride*. Ezek celluláz komplexei mind a három aktivitást tartalmazzák, de ezeken belül elkülöníthető 7-8 izoenzim is. Az enzimek párhuzamosan termelődnek és együttesen, ugyanabban a közegben hatnak, így az evolúció során a működési optimumuk is összehangolódott. A *Trichoderma* enzimek pH = 4,2-5,2 között működnek hatékonyan.

Az enzimetermelés ebben az esetben is induktív és a katabolit represszió hatása alatt áll. Glükóz jelenlétében nem termelődik az enzim, hiányában viszont cellulózzal (cellulóz tartalmú melléktermékekkel, hulladék anyagokkal), cellobiózzal, és bármilyen különös, de laktózzal is indukálható. A fermentációnál a szilárd szubsztrátok, a reakció heterogén volta miatt sokat foglalkoztak a szilárd fázisú fermentációval (SSF), de a szubmerz technológia jóval gyorsabbnak bizonyult, bár más enzimekkel összehasonlítva a celluláz fermentáció ebben a formában is

lassú és viszonylag kis mennyiségű enzimfehérjét termel. Próbálkoztak folytonos fermentációval is, abból a megfontolásból, hogy a termelő és felhalmozódó redukáló cukrokat eltávolítsák a rendszerből, mielőtt lefékezne az az enzimtermelést.

8.5.4.2. *Felhasználás*

A pamut az egyik legelterjedtebb textilanyag, szálai gyakorlatilag tiszta cellulózból állnak. A cellulázok egyik textilipari alkalmazása az enzimes kőmosás. Az enzimes kezelés úgy változtatja meg a pamutszálak felületét, hogy azok részben elengedik az indigó festéket, és ezzel ugyanolyan hatást érnek el, mint a durva mechanikus kőmosással.

Az anyag tapintása és fénye egyaránt függ a felület simaságától. Mindkettőt rontja, ha az alkotó fonalak felületén kiálló parányi rostvégek meredeznek, ettől a felület matt hatású lesz. Ezt cellulázos kezeléssel csökkenteni lehet, mind a gyártásnál a kikészítésnél, mind a ruhák mosása során. A cellulázt emiatt széleskörűen alkalmazzák a mosóporokban, az enzim a pelyheket (bolyhokat) eltávolítja, de nem támadja meg a cellulóz rostokat, a textil színes, fényes marad hosszú hordás és gyakori mosás után is.

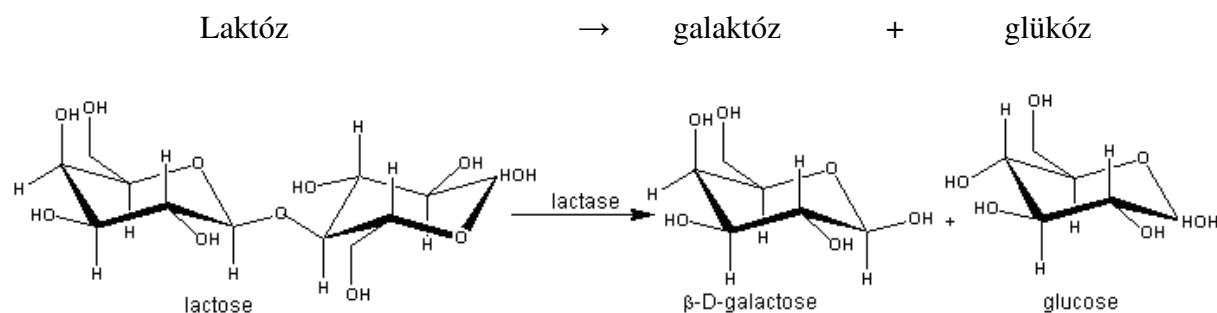
A problémát az okozza, hogy a *Trichoderma* enzimek enyhén savas közegben működnek hatékonyan. Ez a gyárban, a kikészítésnél beállítható, de a ruha mosása lúgos közegben és magasabb hőfokon történik. Erre a célra más enzimeket kellett keresni. Ilyen esetekben a természetben extremofil fajokat keresnek, feltételezve, hogy ezek enzimei is képesek szélsőséges körülmények között működni.

Adalékok: A magas pH-jú és hőmérsékletű élőhelyeket Kelet-Afrika szikes tavaiban keresték (Kenya, Rift Valley, Bogoria tó, ott is egy flamingó fészkelő telep, ahol a madáriürülék még lúgosabbá tette a közeget), innen izoláltak alkáli toleráns vagy obligát alkalofil és hőtoleráns fajokat.

A megfelelő tulajdonságú alkalikus cellulázt a *Bacillus* BCE103 fajban találták meg. Ez a törzs viszont nehezen szaporítható és kevés enzimet termel, emiatt az endocelluláz gént *B. subtilis*-be klónozták. Ez jól ismert, biztonságos gazdaszervezet, extracellulárisan termeli az enzimet, így a feldolgozás is egyszerűbb. Az így termelt hő-, alkáli- és fehérítőtűrő enzimet a Genencor hozta forgalomba 1998-ban PURADAX^R néven.

8.5.5. β -galaktozidáz (laktáz)

Ez az enzim di- és oligoszacharidokban az egyes szénatom béta térállású glükozidos kötésével kapcsolódó galaktóz egységet ismeri fel, és ezt a kötést hidrolizálva galaktózt szabadít fel. Leggyakoribb szubsztrátja a tejcukor (laktóz, galaktóz(1 \rightarrow 4)glükóz diszacharid), amely a hidrolízis során galaktózra és glükózra bomlik.



123. ábra A tejcukor hidrolízise

Az ábrán az is jól megfigyelhető, hogy a két aldohexóz szerkezete nagyon hasonlít egymáshoz, a mindössze a 4 szénatomon lévő -OH csoport térállása különbözik, a glükóznál ekvatoriális, a galaktóznál axiális.

A laktáz aktív centrumában egy cisztein és egy hisztidin aminosav vesz részt közvetlenül a katalízisben. A β -kötésben lévő galaktóz kapcsolódik az enzimhez, az SH-csoport protonot ad át a galaktóz oxigén atomjának, és a hisztidin imidazol csoportja nukleofil támadást intéz a galaktóz C-1 szénatomjára. A glükóz vagy más aglikon molekularész leválik. A következő fázisban egy ROH típusú akceptor, például víz protonálja a szulfhidril aniont és felszabadítja galaktózt.

Az akceptor egy másik cukor is lehet, ekkor di-, tri- vagy akár poliszacharidok is képződhetnek. Ezt a transzferáz aktivitást nem-emészthető oligoszacharidok előállítására használhatjuk fel.

Egyes kationok, mint például a Ca^{2+} és Na^{+} gátolhatják a reakciót, ugyanakkor a K^{+} , a Mg^{2+} és a Mn^{2+} aktiválják az enzimet. Termékinhibíció is fellép, különösen a galaktóz gátolja erősen az enzimreakciót.

8.5.5.1. Termelő organizmusok

β -galaktozidázt nagyon sok törzs termel. A baktériumok között részletesen foglalkoztak az *E. coli* enzimével, amelynek génje a *lac* operonban található (operon szabályozás, Jacob és Monod, Nobel díj 1965), de ez az intracelluláris enzim ipari szempontból érdektelen.

Aspergillus oryzae, *A. niger*: penész eredetű laktázok, vagy savas laktázok. pH optimumuk 4-5 közé esik, optimális működési hőmérsékletük ~ 55 °C. A fonalas gombák extracellulárisan termelik az enzimet, viszonylag olcsó termékek, de alkalmazási korlátjuk, hogy az alacsony pH optimum miatt tejben nem alkalmazhatók.

Kluyveromyces lactis (élesztő laktáz, semleges laktáz): pH optimuma majdnem semleges, 6-7 közötti, hőfok optimuma ~ 35 °C. Az élesztő intracellulárisan termeli, emiatt költségesebb előállítani, viszont alkalmazható tejben is a laktóz hidrolízisére.

Az emlősök kicsinyeiket tejjel táplálják, ez változó töménységben, de minden esetben tartalmaz tejcukrot. Az újszülöttek vékonybele termeli a laktázt, amely emészthető monomerekké bontja a tejcukrot. Az életkor előrehaladtával (az embernél kb. három éves kor után) ez az enzimtermelés gyakran megszűnik, ez okozza a laktóz intoleranciát.

Az enzim előállítása szubmerz, aerob fermentációval történik (bár az *Aspergillus*-oknál leírtak szilárd fázisú fermentációt is). Szénforrásként célszerű tejcukrot alkalmazni, ez indukálja a növekedéshez kötött laktáz termelést. A fermentáció időtartama a törzstől függ, az élesztő fermentáció egy-másfél nap alatt lefut, a penészeknél 4-5 napig is eltart. A feldolgozás az élesztőknél bonyolultabb a sejtfeltárás művelete miatt. Az enzim kinyerésénél segíthet a sejttömeg kezelése hidegen toluollal.

8.5.5.2. Felhasználás

A különböző laktázok konkrét alkalmazásait elsősorban a pH optimum, és más pH-függő jellemzők határozzák meg. A semleges optimumú élesztő laktázt túlnyomórészt a laktózszegegy sterilizált tej termelésére használják. Ugyanez alkalmazható az édes savó (pH = 6,1) laktóztartalmának bontására is. A penész laktázt viszont a sajtgyártás másik melléktermékének, a savanyú savónak a kezelésére használják.

Fermentált tejtermékeknél (joghurt, sajt stb.) a hidrolízissel létrehozott cukrok a sejtkultúrák szaporodását felgyorsítják.

Az élelmiszeriparban a tej, tejalapú italok és tejpor gyártásánál a laktóz hidrolízise, növeli az édességet. Az egyes cukrok relatív édessége a glükózhoz viszonyítva: laktóz 20% < galaktóz 58% < glükóz 70%. Ebből látható, hogy a hidrolízis több mint háromszorosára növeli az édességet, ettől a termékek vonzóbbak lesznek, különösen a gyermekek számára. A fagyaltoknál az íz mellett még egy szempont szól az enzimkezelés mellett. A laktóz oldhatósága rossz, különösen fagyponthoz közeli hőmérsékleten, így előfordulhat, hogy a fagyaltban kikristályosodik, ami rontja a termék élvezeti értékét.

Hidrolízis után a monoszacharidok jól oldódnak, kiválás nem fordul elő.

Laktóz intolerancia esetén az is megoldás lehet, hogy a tejcukrot tartalmazó élelmiszerrel együtt tablettá, draszté, vagy kapszula formájában laktáz enzimet vesz be a fogyasztó, és ezzel pótolja az emésztőcsatornából hiányzó enzimet.

A laktáz felnőttkori hiánya a háziállatoknál is természetes. Ha tehát a laktózt felnőtt állatok takarmányozásában alkalmazzák, ezt a tejcukrot is célszerű előzőleg hidrolizálni. Borjú és szopósmalac-tápokban gyakran alkalmaznak sajtygyári savót, ezeknél a tejcukor bontása előnyös, de nem feltétlenül szükséges.

8.5.5.3. *Technológiák*

1. Szakaszos enzimes technológia laktózszegény tej előállítására:

Azért választják a szakaszos eljárást, mert a folytonoshoz képest kisebb a befertőződés veszélye. Oldott élesztő enzimet adnak a tejhez, a tej saját közel semleges pH-ját nem változtatják meg. A tejet 35 °C-on tartják 4 órán keresztül. Ennyi idő alatt a laktóz 70-80%-a átalakul, a mikrobák szaporodása viszont még nem számottevő. Az enzimek a tejben marad, a folyamatos sterilizálás (UHT = ultra high temperature, ~140 °C) során inaktiválódnak. A termék tehát nem laktózmentes, csak csökkentett laktóz tartalmú, más szóval laktózszegény, low lactose milk.

2. Folytonos technológia immobilizált enzimekkel:

Ezt savanyú savó (sajtygyári melléktermék) laktózának hidrolízisére használják. A savas közegben jól alkalmazhatók az olcsó penész enzimek. Az alacsonyabb pH részleges védelmet nyújt a befertőződés ellen is. Az enzimet oldhatatlan hordozóra rögzítik, ezzel oszlopokat töltenek meg, amin megfelelő tartózkodási idővel átengedik a savót.

Adalék: Laktóz intolerancia, laktóz érzékenység

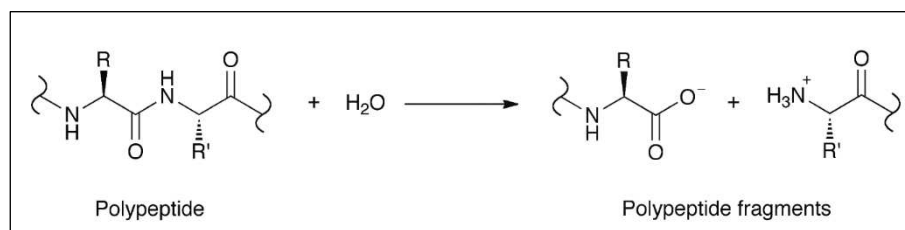
A csecsemők bélrendszere kb. 3 éves korukig elegendő laktáz enzimet termel, ezáltal tökéletesen megemésztik az anyatej laktóz tartalmát (~ 7,5%). E kor fölött a táplálkozás változásával ez az enzim feleslegessé válik, alapesetben termelődése fokozatosan leáll, felnőtt korra eltűnik. Ha ezek a személyek tejet (tejcukrot) fogyasztanak, az emésztetlenül halad végig a vékonybélben és a vastagbélbe jut. Ott ozmotikus hatásánál fogva jelentős mennyiségű vizet tart vissza, ezáltal hasmenést okoz. Ráadásul a jelen lévő anaerob bélmikroflóra szénforrásként hasznosítja a laktózt, amiből széndioxid és szerves savak keletkeznek. Az erős gázfeljődéssel kísért hasmenést nevezik explosive diarrhea-nak. Maga a jelenség a laktóz intolerancia, ezek a személyek nem tolerálják a laktózt, a kellemetlen tünetek elkerüléséhez kerülniük kell tejet és a belőle készült ételeket.

Az emberi faj fejlődése során egyes csoportokban, a pásztornépeknél viszont a táplálkozás úgy alakult, hogy a felnőttek is rendszeresen fogyasztottak tejet és tejtermékeket. Ezekben a populációkban szelekciós hátránnyá vált a felnőttkori enzimhiány. Azok, akik érett korukban is fogyaszthattak laktóz tartalmú élelmiszert, mennyiségileg (kalória) és minőségileg (teljes értékű fehérje) jobban táplálkoztak, így javultak a túlélési és szaporodási esélyeik. A nemzedékek során a szelekció átfordította az arányokat, a felnőttkori enzimtermelés lett a jellemző, és az intolerancia kisebbségbe szorult. Az eltérő táplálkozás miatt a laktóz intolerancia térkép nagyon tarkává alakult. A thai, kínai, és afroamerikai populációkban az intolerancia aránya 97, 90, és 73 százalék. A fehér (kaukázusi) és a svéd populációkban viszont a toleránsak előfordulása 84 illetve 96%. Területileg is erős átmenetek figyelhetők meg. Az intoleráns kínaiak mellett élő pásztorkodó mongolok toleránsak. Fekete-Afrikában a lakosság nagyrészt intoleráns, viszont a marhatartó maszájok toleránsak.

8.5.6. *Proteázok*

A proteázok a peptid lánc az 16. ábrán látható hidrolitikus bomlását katalizálják. A reakció valójában három egymást követő részfolyamatból tevődik össze:

1. létrejön a Michaelis komplex az eredeti peptid lánc (S) és az enzim között (ES),
2. a peptid kötés hasítása, az új N-terminális peptid leválása,
3. nukleofil támadás a még kötött másik peptidre és a szabad enzim rekonstruálása



124. ábra A proteázok alapreakciója

A szubsztrát koncentráció jelentősen különbözik az élelmiszeripari és a mosószer alkalmazásoknál. Az élelmiszereknél a fehérje koncentráció nagy, százalékokban is kifejezhető, míg a mosásnál a tisztítandó felületen kevés fehérje természetű szennyezés van jelen. Ezzel együtt a rendszer messze van a kémiai egyensúlytól, a folyamat a bomlás irányába megy végbe, a nagyobb molekulák szintézise elhanyagolható. A folyamat csak úgy fordítható meg, ha nagy aminosav koncentrációt állítunk be, ez esetben a proteázok képesek peptid kötések létrehozására, de csak di- és tripeptid keletkeznek (pl.: aszpartám gyártás). Sok proteáz enzim szubsztrát specifikusa nem korlátozódik a peptid (savamid) kötésre, képesek a karbonsav észtereket is hidrolizálni. Ezt a melléreakciót az enzimaktivitás mérésére lehet kihasználni.

A fehérje hidrolízis kvantitatív leírására a hidrolízis ekvivalenst (h) használják. A (h) mértékegysége (mól elbontott peptid kötés)/(kg fehérje (szubsztrát)). A hidrolízis ekvivalens jól használható a fehérje hidrolízis kinetikai vizsgálatánál, de más célokra inkább a hidrolízis fokot ($DH = \text{degree of hydrolysis}$) számítják ki. Definíciója:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \cdot 100\%$$

h_{tot} az egy kilogramm fehérjében található összes peptid kötések mennyisége, mólban kifejezve. Jó becslésként ezt 8 mól/kg-nak vehetjük, mert ha az aminosavak átlagos molekula-tömegét 125 g/mol-nak vesszük, akkor egy kg fehérjére nyolc aminosav, azaz 8 peptid kötés jut. Pontos értékét a fehérje aminosav-összetétele alapján számíthatjuk ki. Néhány extrém összetételű fehérjétől eltekintve (pl.: zselatin – 11,1) ez az érték jól használható.

Az élelmiszeriparban a hidrolízis fok nagymértékben meghatározza a termék tulajdonságait, így az enzimek alkalmazhatóságát is. Ehhez kapcsolódóan fontos, hogy a hidrolízis előrehaladtát a folyamat közben követni lehessen és a reakciókat egy jól meghatározott szakaszban, a termék optimális állapotában le lehessen állítani. A mosó- és tisztítószeres esetében a hidrolízis fok meghatározása felesleges, mert mind a szubsztrát koncentráció, mind annak változása nagyon kicsi és nehezen mérhető.

A proteázokat többféle szempont szerint csoportosíthatjuk, így a termelő organizmus szerint lehetnek állati, növényi vagy mikrobiális eredetűek, támadáspontjuk szerint endopeptidázok vagy exopeptidázok. Az exopeptidázok a peptid kötések a polipeptid lánc az aminosav vagy karboxil végén bontják, egy, két, vagy három aminosavat választanak le, míg az endopeptidázok a lánc belső peptid kötéseit hasítják. A pH optimum alapján meg szoktak különböztetni alkális, neutrális és savas proteázokat, ami viszont kapcsolatban van katalízis mechanizmusával, az aktív centrumban működő kémiai funkció csoportokkal (szerin, tiol-, aszparaginsav és metallo-proteázok). A szerin-proteázok családja két további alcsoportra osztható: kimotripszin-szerű és szubtilizin-szerű proteázokra, (ezek a legfontosabb ipari termékek). Az osztályok neve onnan ered, hogy más-más katalitikus csoport vesz részt a reakcióban. A szerin és cisztein proteázoknál az aktív centrumban lévő szerin hidroxil, illetve a cisztein tiol csoportja indít nukleofil támadást a katalízis során.

Szerin-proteázok

A név arra utal, hogy az enzim aktív centrumában a szerin oldallánca a nukleofil csoport. A katalitikus hely három aminosavból áll, a szerin mellett egy-egy aszpartát és hisztidin oldallánc együttesen alkotja az úgynevezett katalitikus triádot. Ezek az aminosav láncban egymástól távol helyezkednek el (pl.: a kimotripszin esetében: His57, Asp102, Ser195), de a fehérje háromdimenziós szerkezetében egymás közelébe pozícionálnak. A szerin proteázok gyakoriak mind a prokarióta, mind az eukarióta szervezetekben.

Cisztein proteázok

A cisztein-proteázok is széles körben elterjedtek, megtalálhatók az állatok, növények, baktériumok és vírusok körében egyaránt. Hatásmechanizmusuk közel áll a szerin proteázokhoz, de itt a támadó nukleofil ágens a szerin hidroxil csoportja helyett a tiol-csoport. A katalitikus triád is hasonló (papain esetében: Cys25, His159, Asp175), de kiegészül egy negyedik aminosavval (Gln19), amelynek savamid nitrogénje a peptid kötés oxigénjével képez hidrogén hidat.

Aszparaginsav proteázok

Az aszparaginsav proteázok nevüket az aktív centrumban lévő két katalitikus fontosságú aszparaginsavról kapták. A különböző eredetű, emlős, gomba, vírus enzimek háromdimenziós szerkezete nagyon hasonló egymáshoz. Az enzimek két szerkezetileg hasonló doménből állnak, és az aktív centrum a két domén közötti résben alakul ki. A legtöbb aszparaginsav proteáz a pH 2-4 tartományban aktív (pl.: pepszin), emiatt régebben ezt az enzim osztályt a savas proteázokkal azonosították. Ez alól kivétel a rennin, amelynek optimális pH tartománya 5,5-7,5 közé esik.

Metalloproteázok

Katalitikus aktivitásukat az aktív centrumban lévő egy vagy két fém ion, leggyakrabban cink ion biztosítja (pl.: termolizin). Érdekessége a mechanizmusnak, hogy a nukleofil támadást itt egy erősen polarizált vízmolekula hajtja végre.

Számos kereskedelmi enzimpreparátum többféle proteáz keveréke. Ezeket a termelő organizmus párhuzamosan szintetizálja, és nem érdemes az egyes enzimeket tisztán kipreparálni, mert együttesen általában hatékonyabban működnek, mint izolált formában. A gyógyszeriparban szigorúbbak a tisztasági követelmények, de az élelmiszeriparban és a mosószereknél elterjedtek a vegyes enzimmészítmények.

Néhány kereskedelmi forgalomban lévő proteáz jellemzőit foglalja össze az 23. táblázat. Az Alcalase, Esperase, Savinase és a tripszin szerin proteázok, míg a Neutralse metalloproteáz, amelynek aktív centrumában egy Zn ion helyezkedik el. A Durazym és az Everlase a Savinase fehérje mérnökileg továbbfejlesztett variánsai. A sajtgyártásban használatos Rennilase vagy Fromase aszparaginsav proteázok. Tiol- vagy cisztein proteázokkal növényi enzimek között találkozhatunk, ilyen a papain (papaja), a bromelin (ananász növény) és a ficin (füge).

Kereskedelmi név	Eredet	Formulázás	pH tartomány	Hőfok tartomány
Alcalase	<i>Bacillus spp.</i>	folyadék/granulátum	6–10	10–80
Esperase	<i>Bacillus spp.</i>	folyadék/granulátum	7–12	10–80
Everlase	<i>Bacillus GMO</i>	folyadék/granulátum	8–11	15–30
Savinase	<i>Bacillus GMO</i>	folyadék/granulátum	8–11	15–75
Durazym	<i>Bacillus spp. GMO</i>	folyadék/granulátum	8–11	15–70
Neutralse	<i>Bacillus spp.</i>	folyadék/granulátum	6–8	10–65
Protamex	<i>Bacillus spp.</i>	mikrogranulátum	6–8	10–65
Flavourzyme	<i>Aspergillus spp.</i>	folyadék/granulátum	4–8	10–55
Rennilase vagy Fromase	<i>Rhizomucor meihei</i>	folyadék/granulátum	3–6	10–50
Trypsin	hasnyálmirigy	granulátum	7–9	10–55

23. táblázat Kereskedelmi forgalomban lévő enzimek tulajdonságai

A proteázok bioszintézisének gyakori jelensége, hogy az enzim egy inaktív fehérje (zimo-gén) formájában jön létre és választódik ki, és csak a sejten kívül aktiválódik. Ez általában irányított proteolízis, egy rövidebb-hosszabb peptidet le kell hasítani a fehérjeláncról (pl.: pep-szinogén – pepszin átalakulás). A mikroorganizmusok saját enzimeik esetében kihasználhatjuk az aktiválódás természetes mechanizmusait. A rekombináns fehérjeként termelt enzimeknél viszont többlet feladatként meg kell oldani az aktiválást is.

A proteázokat ipari léptékben mikrobákkal állítják elő, mert az állati és növényi enzim-források korlátozottak. Ha másként nem megy, az állati enzim génjét klónozzák mikroorganizmusba, és így termeltetik nagy mennyiségben (pl.: rennin). A mikrobák proteáz termelése szervesen kapcsolódik az anyagcseréjükhez, enzimeikkel lebontják a fehérjéket és a kapott egyszerűbb molekulákat anabolikus vagy katabolikus anyagcseréjükben hasznosítják. A reakció végbemehet extra- vagy intracelluláris enzimekkel. A bontás első lépése általában oligopeptidek létrehozása endopeptidázokkal, majd az exopeptidázok ezeket tovább hidrolizálják aminosavakká. Az első lépést az extracelluláris proteázok végzik, a sejt csak a kis molekulákat képes felvenni és hasznosítani. Az intracelluláris proteázok is létfontosságúak a sejt különféle celluláris és anyagcsere-folyamatainak fenntartásához, mint a fehérjék folyamatos megújulása, a sejtek differenciálódása, a fehérjék aktiválása.

A proteázok a teszik ki az ipari méretben termelt enzimek nagy részét, ezen belül az alkálikus proteázok a vannak túlsúlyban. A termelő törzsek között találunk baktériumokat, fonalas gombákat, élesztőket és sugárgombákat, de a legnagyobb súllyal a *Bacillus*-ok által termelt enzimek szerepelnek.

8.5.6.1. *Alkálikus proteázok*

Az alkálikus proteázok általános tulajdonságai

Az mosószerekben használatos alkálikus proteázok pH = 8-12 közötti tartományban aktívak, ezen belül az optimális pH általában 9-11 közé esik. Egy-két extrém bakteriális enzimet is izoláltak, amelyek jól működnek pH = 12-13-nél is.

A proteázok optimális hőmérséklete rendszerint 50 – 70 °C közé esik. Mint minden enzimnél, itt is keresik a magasabb hőmérsékleten dolgozó változatokat. Ilyenek a prokarióták körében fordulnak elő, például a *Bacillus sp.* B189 optimális hőmérséklete kivételesen magas, 85 °C-os. Más fajok, mint pl.: a *Bacillus*-ok a *Streptomyces*-ek és a *Thermus* fajok enzimeinek hőstabilitása Ca²⁺ ionok hozzáadásával növelhető meg hasonló értékre. Általánosságban elmondható, hogy a lúgos proteázok – bár nem fém proteázok – fémionokat (leggyakrabban Ca²⁺, Mg²⁺ vagy Mn²⁺ iont) igényelnek az aktivitásukhoz vagy stabilitásukhoz.

A fonalas gombák (*Aspergillus*, *Mucor*) által termelt alkálikus proteázok ipari jelentősége változatos tulajdonságaik ellenére kicsi, inkább a szélsőséges körülmények között is jól működő bakteriális enzimeket termelik ipari méretekben. Ezek jellemző típusa a szubtilizin csoport. Nevét a *Bacillus subtilis*-ről kapta, de sok más organizmus termel hasonló szerin proteázokat. Ipari méretekben a genetikailag manipulált *Bacillus amyloliquefaciens* és *Bacillus licheniformis* törzsekkel állítják elő. Magas pH és hőmérséklet optimuma révén különösen jól alkalmazható mosószerekben.

Adalék: ezeket az extremofil baktérium törzseket a természetből speciális táptalajon szelektálják. A fő szénforrás nem-hidrolizált fehérje (ha aminosavak vannak jelen, a sejtek nem termelnek proteázot, mert nincs rá szükségük). A pH-t 10-re állítják és a lemezeket melegen inkubálják. Ami ilyen körülmények között kinő, az nagy valószínűséggel termeli az alkálikus proteázokat.

A génmanipulációnál az enzimfehérje kópiaszámát meg lehet növelni, ha – a gén elé egy erős promotert építünk be, – a gént multikópiás plazmiddal fejeztetjük ki. Az enzim szerkezetét a fehérjemérnökség módszereivel lehet javítani, aminosavak cseréjével lehet az aktivitást, illetve a hőstabilitást növelni.

Mosószer proteázok

A mosólé, mint működési környezet több szempontból is kedvezőtlen az enzimek számára. A mosás magasabb hőmérsékleten, 40-90 fokon történik. Bár az iparban törekednek az alacsonyabb a hőmérsékletekre, de a háztartási mosógépek mindegyikében van 90 fokos program. A közeg erősen lúgos (pH = 9-12), és inaktiváló/inhibitor jellegű anyagok is jelen vannak. A teljesség igénye nélkül: detergensok: n-alkil-benzol-szulfonátok, alkohol-szulfátok, alkohol-éter-szulfátok, etoxilált alkoholok, kationos tenzidek. Vízlágyítók: zeolitok, nátrium-karbonát, nátrium-szilikát, nátrium-citrát, nátrium-tripolifoszfát (STTP), nátrium-nitrilotriacetát (NTA), polikarboxilátok. Fehérítők: nátrium-perborát, nátrium-perkarbonát, tetraacetyl-etiléndiamin (TAED), nonánil-fenol-szulfonát (NOBS) és más adalékanyagok: habzás-szabályozók, stabilizátorok, feldolgozási segédanyagok, optikai fehérítők, lerakódás elleni szerek, korrózió-inhibitorok, illatanyagok, színezékek. Töltőanyagként a poroknál nátrium-szulfátot, a folyékony mosószereknél vizet használnak. Ez a komplex közeg nagyon leszűkíti az alkalmazható enzimek körét.

Adalék:

A mosószer enzimek története egészen 1914-ig nyúlik vissza, amikor a két német tudós, a Röhm and Haas hasnyálmirigy proteázt és nátrium-karbonátot tartalmazó mosószert hozott forgalomba Burnus néven. Ez újítás volt, megelőzte a korát, de egyúttal több kezdeti problémába ütközött. Egyrészt a nyers fehérjebontó enzim preparátum sok szennyeződést tartalmazott, így gyakran beszennyezte a tisztítandó ruhákat. Másrészt, mivel csak egy tablettát kellett 10 liter vízbe adni, a háziasszonyok többszörösen túladagolták, mivel nem hitték el, hogy ennyi is elegendő a mosáshoz. Ehhez járult, hogy az enzim kinyerési technológia nem volt elég gazdaságos.

Az első bakteriális enzimet, alkálikus proteázt tartalmazó mosószert 1956-ban Alcalase kereskedelmi néven vezették be a piacra. Por formában a Novo hozott forgalomba enzimes mosóport BioTex márkaneven 1963-ban. Az iparág 1971-ben krízisen ment át. Az enzimes mosószer finom pora a levegőben szállva súlyos allergiás reakciókat váltott ki a nyálkahártyákon és a bőrfelületen. Át kellett alakítani a szer formulázását. Finom por helyett mikrokapszulázással, granulálással olyan szemcséket kellett kialakítani, nem szállnak a levegőben és a nem is aprózódnak a manipuláció során, ugyanakkor változatlanul könnyen és gyorsan oldódnak a mosólében.

Ma a mosószerekben sokféle enzim kombinációját használják (lipázok, cellulázok, amilázok), de a főkomponensek változatlanul a Bacillus törzsek által termelt szubtilizin típusú alkálikus proteázok.

Proteázok a bőriparban

A bőr kikészítése történhet kémiai úton, vegyszerekkel, de ezek az anyagok veszélyesek a dolgozókra és a környezetre nézve (nátrium-szulfid, nátrium hidroxid, krómvegyületek stb.) Az enzimek alkalmazásával ezek az ártalmas vegyszerek nagyrészt kiválthatók, a technológia „megszelídíthető”. A bőrfeldolgozás több lépésből áll, az egyes fázisokban más és más enzimek alkalmazhatók (24. táblázat). A sok részfolyamatban alkalmazott proteázok használatában az a kihívás, hogy maga a bőr is fehérje rostokból áll, amit meg kell őrizni, míg az egyéb fehérje anyagokat szelektíven el kell bontani.

A bőrfeldolgozás fázisai	résztevő enzim	funkció
tartósítás	nem enzimátikus	bőr és irha tartósítása
áztatás	lúgos/hasnyálmirigy proteáz	nem-fibrilláris fehérjék eltávolítása
szórtelenítés	lúgos/semleges proteáz	szórtelenítés
zsírtalanítás	lipázok és proteázok	zsírok eltávolítása
pácolás	tripszin és alkalikus proteáz	puha, rugalmas, hajlékony bőr
cserzés	nem enzimátikus, az előző kezelések hatnak	a cserzés minőségének javítása

24. táblázat Enzimek alkalmazása a bőrfeldolgozás egyes fázisaiban

Adalék: a középkorban is alkalmaztak proteolitikus enzimeket a bőrfeldolgozásban. Enzimforrásul emberi és kutya fekáliát használtak, mivel ezek az élőlények termelnek emésztőrendszerükben fehérjebontó enzimeket. Az ezzel foglalkozó műhelyeket (tímár, cserzővarga) a szag és a járványveszély miatt a település periferiájára „száműzték”. Mivel működésükhöz vízre is szükség volt, ez a helyszín rendszerint a település vízfolyásának legalsó pontja volt, ott, ahol a folyóvíz elhagyta a lakott területet. Így a középkori Budán a céh műhelyei az Ördögárok torkolati szakaszára, a mai Döbrentei tér környékére települtek.

A nyersbőrt nem használják fel azonnal a vágás helyszínén, a szállítás/tárolás során viszont sajátenzimes és mikrobiológiai romlás indul meg. Ezért az irhákat konzerválni szükséges. Ez történhet: ~sós vízbe merítéssel, ~hús-oldali sózással vagy ~szárítással. Mindezek dehidratálják a bőrt, ezzel akadályozzák a biokémiai folyamatokat. Ebben a fázisban nincs szükség enzimekre, éppen a működésük meggátlása a cél.

A beérkező bőroket először egy áztató fürdőben újra hidratálják. Az áztatásnak több funkciója is van. A víz kioldja a sókat és a globulinokat. Eltávolítja a szennyezéseket, a mosóhatás fokozására lipázokat és/vagy detergenset is lehet adagolni. A víz hatására a kollagén rostok megduzzadnak, a szerkezet szivacsossá, azaz könnyebben hozzáférhetővé válik. A vízfelvétel proteázokkal fokozható, mivel ezek kioldják a köztes nem-rost fehérjéket, húsmaradékot, hámfehérjéket. E célra kettős enzimpreparátumot adagolnak: egyrészt alkálikus proteázokat (Alcalase, Promod 206P), másrészt tripszint, vagy hasonló proteázt, azonos mennyiségben. Az áztatást melegítés nélkül, 10-20°C-on végzik, alkálikus közegben, amit mésztej hozzáadásával állítanak be.



125. ábra Bőrök kezelése áztatókádban

A klasszikus, vegyszeres szórtelenítésnél a bőrt erősen lúgos, 10-12% mésztejet, szervesen szulfidokat vagy tioglikolsavat és aminosavat tartalmazó fürdőben áztatják. Ezek veszélyes anyagok és a keletkező szennyvíz ártalmatlanítása is komoly problémát jelent. Emiatt terjedtek el az enzimes kezelések. Az enzimekkel nem a szőr anyagát, a keratint bontják le, mert az a legtöbb proteáz számára nem bontható, a kompakt, spirális, rengeteg diszulfid híddal rögzített szerkezet miatt.

Adalék: A keratináz enzimek külön csoportot képeznek a proteázok között. A keratinázt termelő törzsek izolálásánál a szilárdított táptalajba apróra vágott madártollat főznek, így biztosítják ezt a speciális szénforrást a mikroorganizmusok számára.

Adalék: a hajsütés azon alapszik, hogy a haj keratinjában ezek a diszulfid hidak magas hőmérsékleten felnyílnak, majd lehűlve újra összekapcsolódnak

Az enzimek a keratin helyett a szórtüszőt támadják meg, a szőrszál gyökerének emésztésével a szőr meglazul és enyhe mechanikai hatásra lemosódik. Ebben a lépésben különböző

eredetű alkálikus proteázokat használnak (Promod 206P, NUE = Novo Unhearing Enzyme). Durva szőrű állatok (pl. birka) esetén a kezelés hosszabb időt vesz igénybe. Ekkor a húsoldalt egy festékréteggel védik meg. A reakciót szobahőfokon, éjszakán át folytatják. Magasabb hőmérséklet vagy az enzim túladagolása a bőr szerkezetének roncsolódásával jár. Szerencsére a bőr fibrilláris fehérjéi, a kollagén és az elasztin nehezebben bonthatók, mint az őket körülvevő egyéb proteinek. A kollagén láncok hármas spirálokat alkotnak, ami sztérikusan nehezíti az enzimek hozzáférését. Emellett az aminosav összetétel is különleges, sok prolint és hidroxiprolint tartalmaz, amihez kicsi a proteázok affinitása.

A bakteriális proteázok mellett itt szerepet kapnak a *Streptomyces* és *Aspergillus* fajok által termelt enzimek is, mivel ennél a technológiánál nincs szükség magas hőmérsékletre, sőt éppen hidegen is nagy aktivitású enzimekre van szükség. Elterjedt az *Aspergillus flavus* proteáza Clarizyme márkanéven.

A zsírtalanítás fázisa nem mindig különül el a technológiában. A zsíros anyagok eltávolítása szükséges a vegyi anyagok behatolásának elősegítéséhez, illetve a folyamat legvégén az egyenletes festéshez. A zsiradék eltávolításába besegít az áztatásnál alkalmazott detergens, de a trigliceridektől enzim bontással is megszabadulhatunk. Ha a proteázokkal együtt alkalmazuk, akkor azonos pH optimumú enzimeket kell keresni. Hiába jó hatású pl. a birkabőr zsírtalanítására a *Rhizopus* lipáz, ez savas közegben működik jól, ehhez be kell iktatni a technológiába egy külön savas enzim áztatást. Az *Aspergillus niger* enzime, illetve a bakteriális lipázok viszont lúgos közegben hatékonyak, ezeket lehet a proteázokkal együtt, egy áztató fürdőben alkalmazni. A mérszetejű oldatban az alkálikus proteázok és lipázok együttes alkalmazásának (NovoLime® = proteáz/lipáz keverék) több előnye is lehet. A proteázok felnyitják a zsírsejteket, így a zsírok hozzáférhetővé válnak a lipázok számára. Továbbá a zsírok hidrolízisével (= elszappanosításával) létrejövő szappanok emulgeálják a zsíros anyagokat, így helyettesítik a detergenset.

A cserzés már nem enzim es folyamat, de a megelőző enzim es kezelések határozzák meg, hogy a cserzőanyagok mennyire tudnak behatolni a rostokba, milyen minőségű lesz a kikészített bőr. A cserzőanyagok keresztkötéseket hoznak létre a kollagén láncok között, ezáltal stabilizálják a bőr szerkezetét, ellenállóvá teszik a bakteriális, enzim es, illetve savas bomlással szemben.

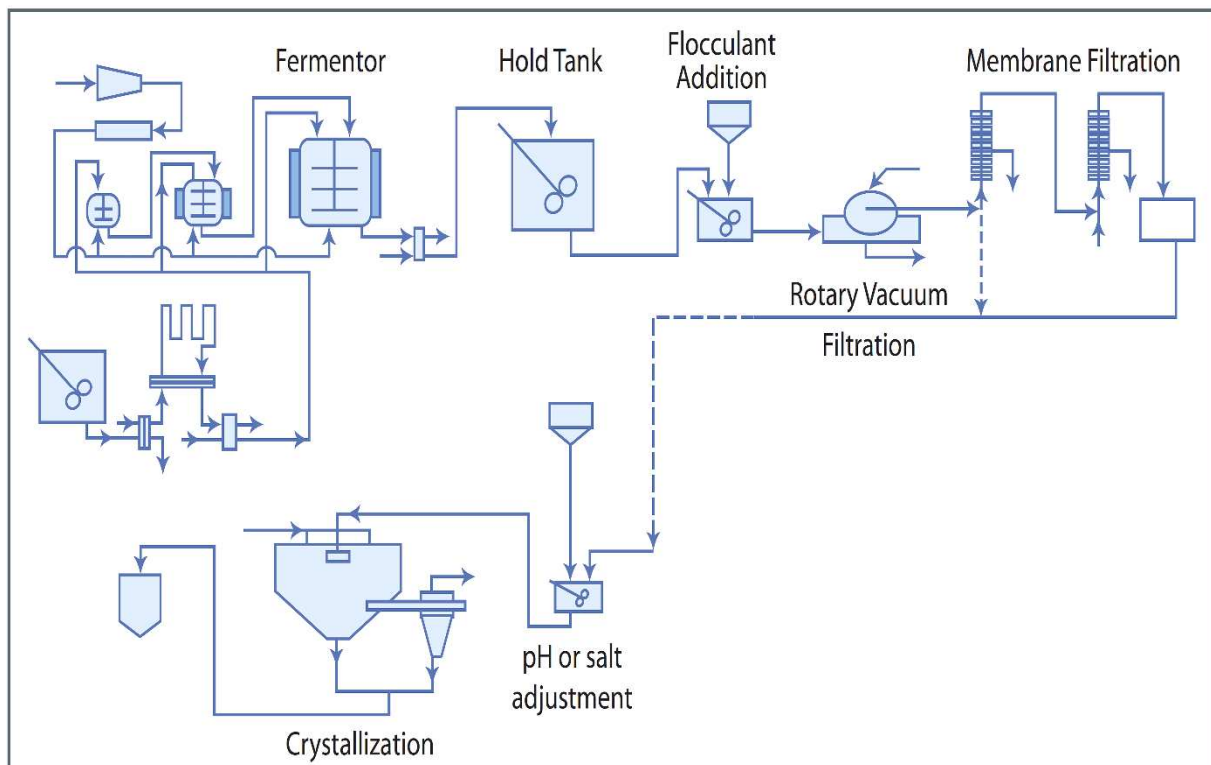
Alkálikus proteázok előállítás a fermentáció

Az alkálikus proteázokat nagyrészt *Bacillus* törzsekkel állítják elő, jellemzően fed batch (rátáplálásos) fermentációval. (Spórázó törzseknél a folytonos fermentációt nehéz jól termelő munkaponton a poszt-exponenciális fázisban stabilizálni.) Szénforrásként könnyen metabolizálható cukrokat alkalmaznak, a többszöri rátáplálást indokolja a katabolit represszió veszélye. Nitrogénforrásként szerves anyagokat (szójadara, kukorica lekvár, részlegesen hidrolizált fehérje tartalmú melléktermékek) adagolnak. szubsztrát ez esetben is indukálja a hasznosító enzim, a proteázok termelését. Az ammónium- és a szabad aminosav tartalmat célszerű alacsony tartani, mivel ezek jelenléte feleslegessé teszi a fehérje szubsztrátok hidrolízisét, ezért a proteáz termelés csökken.

Az olcsóbb szerves nitrogén források közül ammónium nitrátot adhatunk, de azt is inkább csak kiegészítésként. A tenyésztés oxigénigénye nagy, a folyamat érzékeny az oxigén limitációra. A fermentáció során végig intenzív levegőztetésre van szükség.

Alkalikus proteázok előállítása: Feldolgozás

A termék izolálásának első lépése a sejtek elválasztása. Mivel a termelő baktérium sejtek kicsik, a fermentlé előkezelés nélkül nem szűrhető. A lé savanyításával és/vagy flokkuláló anyagok hozzáadásával könnyíthető meg a szűrés, illetve a szűrés helyett centrifugálást lehet alkalmazni. A nagy térfogatú, viszonylag híg sejtmentesített enzimoldatot ultraszűréssel lehet betöményíteni. Az enzimfehérjét az oldatból kicsapják. Ez egyaránt történhet kisózással és oldószeres kicsapással. A kisózásnál az szokásos ammónium szulfát helyett általában nátrium szulfátot használnak, mert ez esetben lúgos közegben kell dolgozni, és ekkor az ammónium sókból ammónia szabadul fel. Az oldószeres kicsapásnál két-háromszoros térfogatú acetonnal csapják ki az enzimet. Egy általános feldolgozási sémát mutat be a 126. ábra.



126. ábra Proteázok általános gyártási sémája

8.5.6.2. Neutrális proteázok

A sejtek nagy többsége számára a „fiziológiás”, semleges közeli pH az optimális, enzimeik is ehhez adaptálódtak az evolúció során. Így sok faj rengeteg neutrális proteázát izolálták már, de gyakorlati jelentőségük mégis kisebb, mert kevésbé tűrik a szélsőséges körülményeket (hőmérséklet, pH), így alkalmazási területük is szűkebb. Jól termelő törzsek minden nagy rendszertani egységben előfordulnak, általánosan használatosak a

- *Bacillus subtilis*
- *Streptomyces. griseus*
- *Aspergillus oryzae*

enzimeik. Működésükhöz gyakran igényelnek kationokat, pl. a CaCl_2 , NaCl növelheti a stabilitásukat.

Proteázok a sütőiparban

A búzaliszt egyedülálló tulajdonsága, hogy sikértartalma vízzel összedolgozva egy viszkoelasztikus tézstaszervezetet hoz létre. Ez a glutén mátrix visszatartja a kelesztés során keletkező gázt a tészta belsejében, és egy buborékokkal lazított szerkezet jön létre. A laza, rugalmas szerkezet hőkezelés (sütés) után is megmarad. A búzaliszt előnyös sütőipari tulajdonságai a fehérjéknek köszönhetők, így a fehérjék minősége és a mennyisége meghatározza a búzaliszt minőségét. Fehérjebontó enzimek adagolása megváltoztatja a tészta szerkezetét és ezzel a sütési tulajdonságokat is.

A kelesztett péksüteményeknél előfordulhat, hogy a túl sűrű fehérjeszerkezet nem engedi kellően kitágulni a pékárut, az túlságosan tömött és kicsi marad. Kis mennyiségű specifikus proteáz (jellemzően fonalas gomba eredetű - pl. *Aspergillus oryzae* - proteáz) képes úgy lazítani a sikért, hogy jobb lesz a tészta nyújthatósága, gyorsabban kel és ezáltal a végtermék állaga és mérete is jobb lesz. Hasonló hatás érhető el kémiai szerekkel, például L-ciszteinnel vagy nátrium-metabiszulfittal is. Ezek a redukáló szerek a fehérjeláncok közti diszulfid hidak felbontásával csökkentik a térhálósítás mértékét. Ezek az idegen anyagok viszont benne maradnak a termékben és fel kell tüntetni az áru csomagolásán, ezért szívesebben választják az enzimes kezelést.

A kelesztés nélkül készült termékeknél, mint a kekszek, ostyák, ropi, stb. a viszkoelasztikus tulajdonság nem előnyös, sőt szükségtelen. Ezeknél más a kívánalom, a puha, rugalmas, laza textúra helyett a kemény, törékeny, ropogós terméket keresik. A glutén térháló a rugalmasságot segíti elő, ennek hiányában kapunk merev, törékeny terméket. A szerkezetalkotó fehérjéket specifikus proteázok, jellemzően *Bacillus* proteázok alkalmazásával megbontani. Az enzimek alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy a különböző fehérjetartalmú lisztek sütőipari tulajdonságait egységesítsék. Ez a cél ebben az esetben is elérhető enzimek helyett az előbb említett kémiai redukáló szerek adagolásával, de ezeket ritkán alkalmazzák. A peptidázok alkalmazása befolyásolhatja a kenyér ízét és a kéreg színét is. A peptidázok aminosavakat és oligopeptideket termelnek. Ezek, és az ezekből a hő hatására keletkező molekulák befolyásolják az ízeket. Aromás, édes és keserű anyagok, ízfokozók és potenciális oxidánsok jelenhetnek meg. A szabaddá váló amino-csoportok hő hatására reakcióba lépnek a cukrok aldehid csoportjával (Maillard-reakció), ami szintén szín- és ízanyagok kialakulását eredményezi. Ezek adják például a kenyérbélső jellegzetes ízét és barna színét.

Proteázok a húsfeldolgozásban

A főtt vagy sült húst akkor tekintjük megfelelő állagúnak, ha könnyen rágható, ugyanakkor megtartja rugalmas, rostos textúráját. Ezek az érzékszervi tulajdonságok nehezen kvantifikálhatók és nagyon sok tényezőtől függenek. A nyers hús állaga a vágás után több lépésben változik. Az izmokban előbb beáll a hullamerevség, majd ez fokozatosan felenged, ahogy a bomlási folyamatok előre haladnak. A szerkezet fellazulásában endogén proteázok, elsősorban a katepszinek játszanak szerepet. A hús természetes érése lassú folyamat, hűtőházi körülmények között (+1-4 °C) legalább 10 napot igényel, de akár 3-4 hétig is tarthat. Ez az érlelési folyamat igen jó állagú húst eredményez, de közben a vízvesztés elérheti a 7%-ot is, és a hús ettől összezsugorodik. A folyamat felgyorsítására az élelmiszeriparban már fél évszázada alkalmaznak exogén proteázokat. Túlnyomórészt növényi enzimeket használnak (bromelint, papaint, ficint), de szeletelt húsoknál bakteriális eredetű proteázokat is alkalmaznak. A fő probléma az enzim bejuttatása a hús belsejébe. Ha csak ráfröcskölnek az enzimidatokat vagy beáztatják a húst, a puhító hatás nem lesz egyenletes, a belső részek keményebbek maradnak. Hatékonyabb megoldás az oldat beinjekciózása. A kémiai reakciók termodinamikájának megfelelően az enzimes folyamat sebessége a hőmérséklet emelésével exponenciálisan növekszik. Ebből az következik, hogy a puhítás túlnyomó részben a hőkezelés (főzés, sütés) során megy végbe, nem a hűtve tárolás közben.

8.5.6.3. *Savas proteázok*

A savas proteázokat régebben egyértelműen az aszparaginsav proteázokkal azonosították, de manapság már ide sorolják a később besorolt glutaminsav proteázokat is. Az Asp proteázokon belül két alaptípus különíthető el:

- Pepszin típusú enzimek ($\text{pH}_{\text{opt}} = 2-4$), elsősorban *Aspergillus*-ok termelik
- Rennin típusú enzimek: ($\text{pH}_{\text{opt}} = 5-7$), főleg *Mucor* törzsek termelik

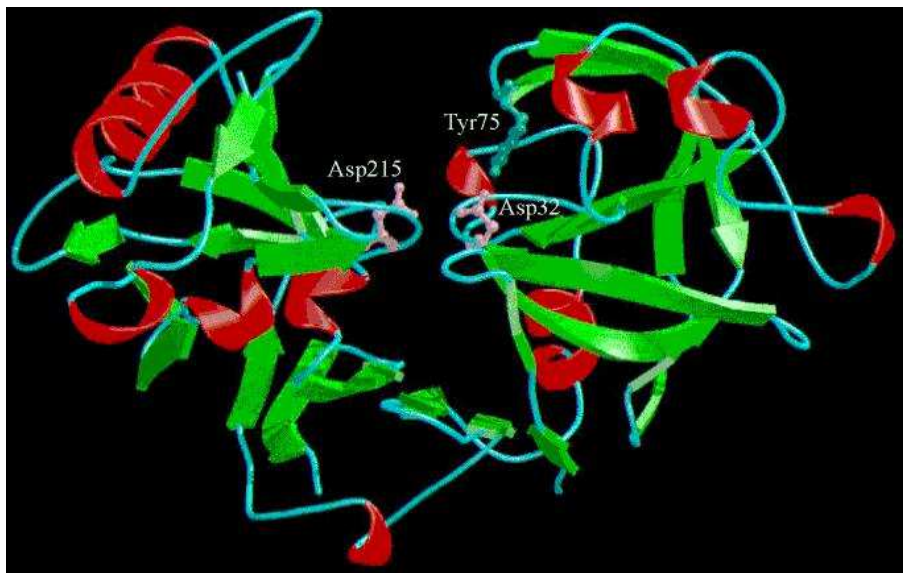
A savas proteázokat több területen is felhasználják:

- Emésztést elősegítő preparátumokban (a gyomorban a pepszin hatás kiegészítésére, pótlására)
- Szója szósz előállítására, a szójafehérjék irányított hidrolízisére
- Tej alvasztására. Ez a sajtgyártás kritikus lépése, a tej kolloid szerkezetének megbontrása, aminek hatására a tej két fázisra, túróra és savóra válik szét.

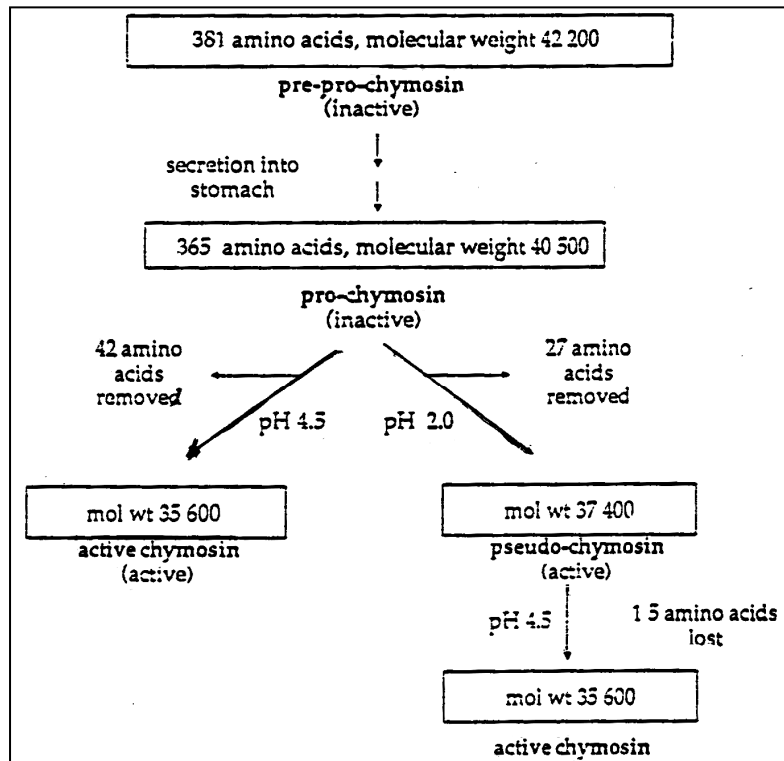
Ez utóbbi enzimet állítják elő nagyipari méretekben, ezzel foglalkozunk részletesebben. Az enzimnek több neve is van, magyarosan oltóenzimnek, latinosan chymosinnak nevezik, ennek magyaros átírása a kimozin. A szakirodalomban elterjedt a rennin és a rennet név is.

Adalék: az oltóenzim név onnan ered, hogy ezzel „oltják be” a tejet, hogy megalvadjon a sajt készítésénél. Az enzim klasszikus forrása a 3-4 hetes borjú negyedik gyomra, amelynek az a funkciója, hogy a tejet a könnyebb emésztés érdekében megalvasztja. A pásztornépeknél, így Mongóliában ma is használják a félretett, zacskószerű gyomrot oly módon, hogy beletöltik a tejet, ami egy idő után a gyomorfal enzimatartalmának hatására megalvad és kiönthető a „reaktorból”. Hasonló enzim minden emlős újszülöttjének gyomrában megjelenik, így a csecsemőknél is.

Az enzimfehérje inaktív zimogén formában termelődik, ez a preprokimozin. A fehérjelánc 381 aminosavból áll, a molekulatömege 42200. Az első 16 aminosav a szignál peptid, a bioszintézisnél azonnal leválik, az így kapott prokimozin 365 aminosavból áll, móltömege 40500. A további aktiválás egy további peptid lehasadásával savas közegben



127. ábra Kimozin A, két Asp az aktív centrumban



128. ábra A kimozin aktiválódása különböző közegekben

autokatalitikusan megy végbe. Érdekes, hogy az átalakulás a közeg savasságától függően kétféle módon is bekövetkezhet. pH=2-nél egy kisebb, 27 aminosavból álló peptid válik le, így jön létre a pszeudokimozin, aminek már van katalitikus aktivitása. Ha viszont a közeg pH-ja csak ~4,5 körülire csökken, akkor egy nagyobb, 42 tagú fehérjerész hasad le, és létrejön a kész, aktív kimozin. A pszeudo-kimozin a savas közegben meglehetősen stabil, csak akkor alakul át a végső formába, ha a pH értéket megemeljük a 4,5 körüli szintre (128. ábra).

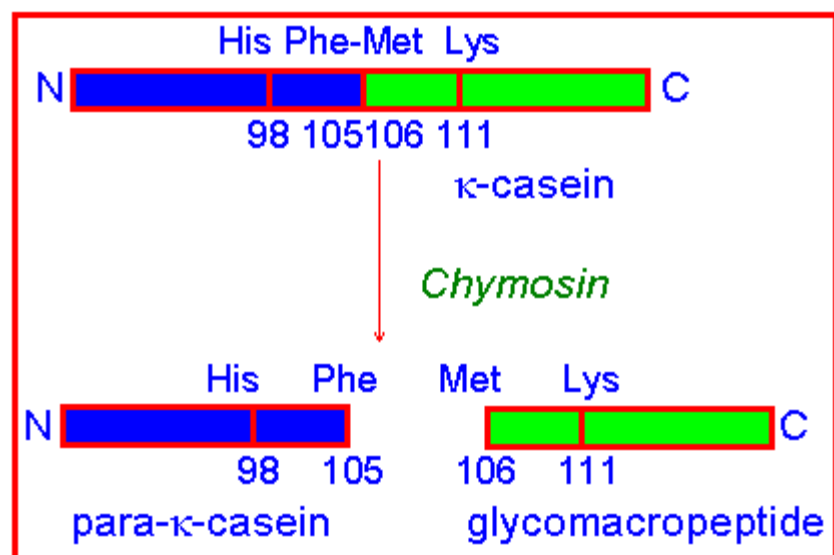
A szarvasmarha kimozinnak két izoformája van, ezek között csak egyetlen aminosavban van különbség: az A formában a 244 helyen aszparaginsav található, a B enzimnél glicin. Az egyes egyedekben a szerkezetet az allélek határozzák meg, az állatok ~40%-a A, ~60% pedig a B formát termeli.

A kimozin aktivitása:

A kimozin egy nagyon specifikus endopeptidáz. Hasítási helye kizárólag a fenilalanin-metionin közti peptid kötés. Szelektivitására jellemző, hogy a tejben található tucatnyi fehérje közül egyedül a κ -kazein a szubsztrátja, azon is csak egyetlen hasítási helyet talál. A hidrolízissel kettévágja a κ -kazeint és ezzel destabilizálja a tej micelláris szerkezetét. A hidrolízisstermékek a para- κ -kazein és a glikomakropeptid (129. ábra)

Mintegy százötven évvel ezelőtt dolgozták ki a legelső ipari enzimgyártási technológiát. A vágóhídon összegyűjtött borjúgyomorból sóoldattal vonták ki a kimozint (Christian Hansen, 1874).

Állati oltóenzim kimozin és pepszin keveréke. A két enzim aránya elsősorban az állat életkorától függ, a kimozin tartalom a szopós borjúnál legmagasabb (mintegy 95%). A borjúgyomrának alacsony pepszin tartalma azzal magyarázható, hogy a pepszin képes a kolosztrumban (főcstej) jelen lévő immunglobulinokat is elbontani, amelyek szükségesek az újszülött állat immunitásának kialakulásához.

129. ábra A κ -kazein hidrolízise

A sajtgyárak egyre növekvő igényét ez a termék nem tudta fedezni, így sorozatos próbálkozások történtek az állati kimozin pótlására más enzimmal.

Előbb egy másik állati eredetű készítménnyel, a „csirke pepszinnek” nevezett emésztő enzimmal próbálkoztak. Ezt szintén vágóhídi melléktermékből vonták ki. A termék nem teljesen váltotta be a hozzá fűzött reményeket, hatása nem volt teljesen azonos az eredetivel, ráadásul az alapanyag mennyisége ebből is korlátozott volt, Izraelen és Csehországon kívül nem terjedt el.

Mások abból a megalapozott feltevésből indultak ki, hogy a legtöbb állati enzimmal azonos hatásút lehet találni a lényegesen változatosabb mikrobiális enzimek körében. Széleskörű screening programot indítottak analóg hatású enzimek felkutatására.

A hasonló tulajdonságú enzimeket a fonalas gombák körében találták meg. Ipari méretben is alkalmazott enzintermelők a *Rhizomucor miehei* (régebben *Mucor miehei*), *Rhizomucor pusillus* (régebben *Mucor pusillus*), és a *Cryphonectria parasitica* (régebben *Endothia parasitica*), a magyar neve gesztenyepenész. Ez utóbbit 1967-ben az USA-ban hozták forgalomba SUPRAREN néven.

Ezek az alvasztó enzim preparátumok is tartalmaznak a kimozinon kívül más fehérjebontó enzimeket. Ennek jellemzésére az MC/PA (vagy röviden C/P) arányt használják. Jelentése: milk clotting activity (tejalvasztó aktivitás)/proteinase activity (összes proteáz aktivitás). A sajtgyártás szempontjából a magas értékek a kedvezők, mert ha sok az egyéb proteáz, akkor azok a tejfehérjéket sok kis oldható peptiddé aprítják, amelyek a savóban oldódva elvesznek a sajt készítés számára, ráadásul keserű ízt okoznak. Az aktivitások aránya állandó enzimarány mellett is változik a pH-val. Alacsony pH értéknél a pepszin típusú savas proteázok aktivitása nagyobb, enyhén savas közegben pedig a kimoziné. A tej normális 6,5-es pH-ján mérve a rekombináns kimozinok C/P értéke a legnagyobb, a borjúgyomorból kivont preparátumé alacsonyabb, majd a mikroba eredetű (*R. miehei*, *R. pusillus* és a *C. parasitica*) enzimek tisztasága sorrendben egyre kisebb. A különböző eredetű enzimek tulajdonságait az 25. táblázat mutatja be.

enzim	forrás	MS, kDa	IEP	t _{opt} °C
Kimozin	borjú	35,7	4,98	40–44
Mucor pepszin	<i>R. miehei</i>	38	4,58	58–62
Mucor pepszin	<i>R. pusillus</i>	30–39	4,41	42–45
Endothia pepszin	<i>C. parasitica</i>	33,8	4,89	42

25. táblázat A különböző eredetű enzimek tulajdonságainak összehasonlítása

A kimozin heterológ termelése

A rekombináns fehérjék előállítására ma már számos genetikai transzformációs rendszert áll rendelkezésre, de kezdetben csak néhány gazdaszervezetről lehetett választani. A sokféle lehetséges gazda közül az élelmiszeripari enzimek termelésében még mindig két törzs dominál, az *Aspergillus niger* és a *Kluyveromyces lactis*. Mindkét törzset több évtizeden keresztül biztonságosan használták az élelmiszeriparban, és mind a sejtek, mind az ezekből származó enzimek elnyerték a GRAS (Generally Recognised As Safe = általánosan biztonságosnak elismert) FDA státuszt.

A kimozin előállítását elsőként a Pfizer Inc engedélyeztette *E. coli* gazdaszervezettel 1988-ban. Később mindkét említett eukariótával is megoldották a gyártást.

Az enzimek fermentációs gyártásánál leggyakrabban a fonalas gombákat használják, mert ezek vad törzsként is nagy mennyiségű fehérjét választanak ki a fermentlébe. Így a feldolgozási lépéssor viszonylag egyszerű, nagyok a hozamok és alacsonyak a költségek. Ugyanakkor a penész alapú gyártásnak megvannak a maga hátrányai a bakteriális fermentációkkal összehasonlítva. A fermentációs idő hosszabb, 4-6 nap, ez növeli az energiaköltségeket, rontja a fermentorok kapacitásának kihasználtságát. Emellett nagyobb a fertőzés kockázata, a fonalas tenyészetnél morfológiai és reológiai problémák léphetnek fel, ami megnehezíti a mretezést, a léptéknövelést és a reprodukálhatóságot.

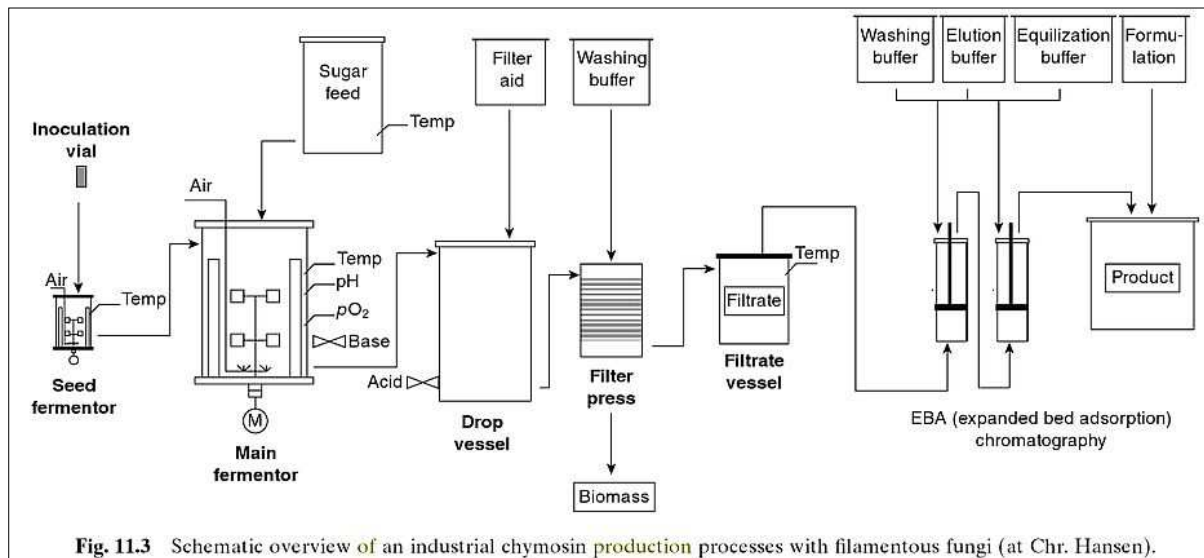
Baktériumok fő előnye a gombákhoz képest a viszonylag egyszerű tápoldat és a gyors növekedés. Sokszor elegendő egy kémiai meghatározott (chemically defined), ásványi sókból álló tápoldat, amelyen jobb a tenyésztés reprodukálhatósága, mert az eredmény nem függ a fonalas gombáknál használatos komplex tápanyagok (szója- vagy élesztő kivonat) változékonyságától. Egy bakteriális fermentáció ideje alig fele a penészgomba alapú technológiák szokásos időtartamának, ami jelentős költségmegtakarítást jelent. Másrészt a legtöbb baktérium nem képes a célfehérjék kiválasztására, azok a sejten belül, intracellulárisan halmozódnak fel, ami megnehezíti a termék kinyerését és tisztítását, ezzel rontja a kihozatalt és az egész technológia gazdaságosságát. Ezen kívül az intracelluláris fehérjék izolálása során nagy mennyiségű vegyi anyagot használnak fel, ami hulladékként jelentősen terheli környezetet.

A mikroorganizmusok között akadnak olyan gazdaszervezetek, amelyek egyesítik magukban a bemutatott két csoport előnyös tulajdonságait. A *Kluyveromyces lactis* és egyes *Bacillus* expressziós rendszerek egyrészt gyorsan szaporodnak, másrészt nagy mennyiségű terméket hoznak létre extracellulárisan.

A megfelelő host kiválasztását legtöbbször nem lehet előre, elméleti alapon elvégezni. Sokszor több különböző törzsből is kifejeztetik a célfehérjét és ezek tesztelése alapján hozzák meg a végső döntést. A biológiai és technikai szempontokon túl szerepet játszik még a gazdaszervezet ismertsége, a korábbi genetikai manipulációk során szerzett tapasztalat és a technológiai ismeretek. Ezek birtokában jelentősen lerövidíthető a fejlesztés ideje, hamarabb lehet a piacon megjeleníteni a termékkel, ami jelentősen befolyásolja az új technológia profitabilitását

Kimozin termelés penészgombákkal

Több gyártó is van a piacon: Christian Hansen (DK) CHY-MAX néven, Genencor (USA) CHYMOGEN néven forgalmaz kimozint. A génmanipulált *A. niger* var. *awamori*-ra



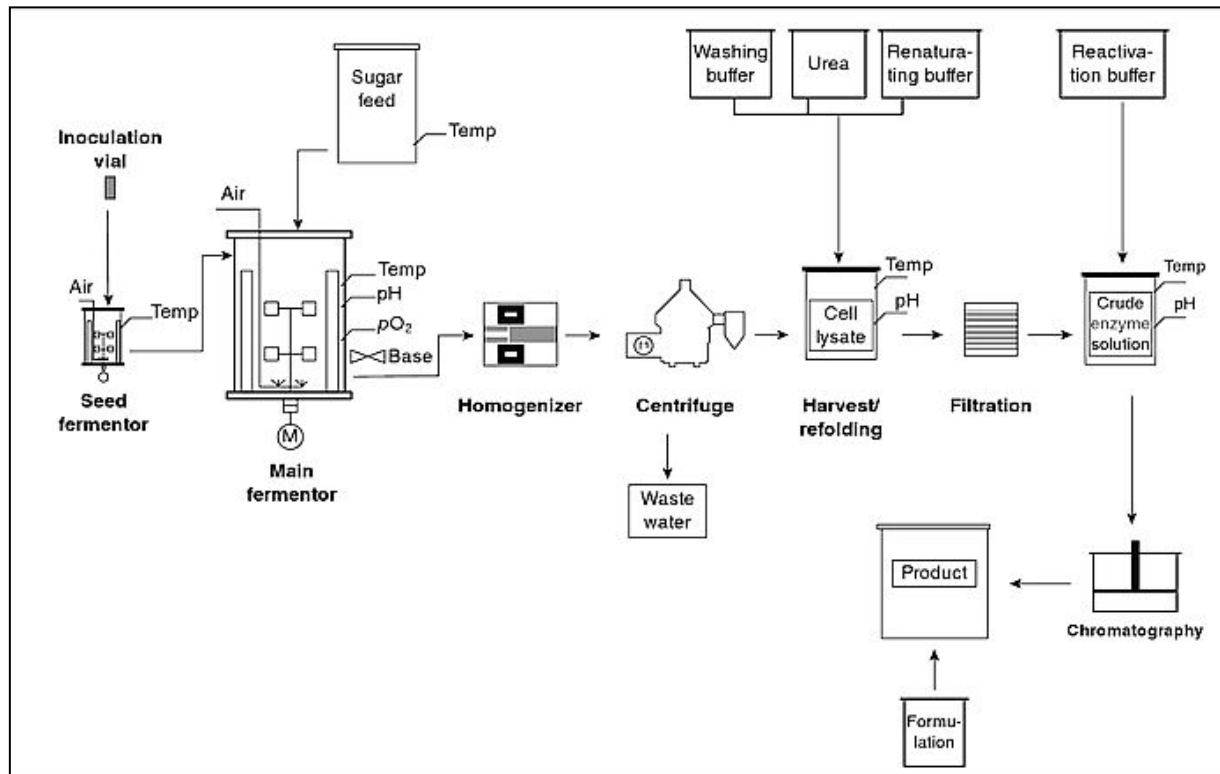
130. ábra Kimozin gyártás technológiája fonalas gombával

épülő technológia az általános, soklépcsős oltótenyészet nevelés helyett egyetlen inokulum fermentációs lépést alkalmaz, ezt a fermentort vegetatív tenyészet helyett spórákkal oltják be. Az oltótenyészet a főfermentációnak kb. tíz százaléka, azaz több tíz köbméteres. Feladata nem a termékképzés, hanem nagy mennyiségű gyorsan szaporodó sejttömeg előállítás. A termelő fermentációt tízszeres térfogatú, azaz akár több száz köbméteres, keverős, levegőztetett készülékben végzik.

A folyamatot komplex tápoldatban, rátáplálással hajtják végre. Szénforrásként könnyen metabolizálható cukrokat (melasz, maltóz, maltodextrin vagy glükóz) adagolnak. A maltóznak vagy a maltodextrinnek akkor van jelentősége, ha a kimozin gén elé a glükoamiláz maltózzal indukálható promóterét építik be. Az enzim extracellulárisan termelődik. Általában egy hetes fermentáció után az enzimkoncentráció már nem növekszik tovább, sor kerül a fermentáció vágására és elkezdődik a feldolgozás (termékizolálás) lépéssora. Az első lépés a sejttömeg elválasztása. Fonális gombák esetében ez szűrővásonon, például vákuum dobszűrőn történhet. A további lépések az enzim végtermék kívánt tisztaságától függenek. Ha nem zavaróak az egyéb fehérjék, akkor további elválasztás helyett egyszerűen porlasztva szárítással eltávolítják a vizet a rendszerből. Más technológiában az enzimdátot ultraszűrőssel töményítik, és egyúttal eltávolítják a kis molekulájú szennyezéseket is. Ha tisztább preparátumra van szükség, akkor kromatográfiával (Christian Hansen, DK) vagy adszorpcióval választják el az enzimet a szennyezésektől. A tisztított fehérjét adalékanyagokkal formulazzák, ezzel tartósítják (prolonged shelf life), szilárd preparátum esetében oldódását gyorsítják (130. ábra).

Kimozin termelés baktériummal (*E. coli*-val)

Az *E. coli* a legjobban tanulmányozott gazdaszervezet, már számtalan genetikai manipulációt hajtottak végre rajta. Nem véletlen, hogy ez volt az első kimozin termelő gazdaszervezet, a Pfizer Inc engedélyeztette 1988-ban, és ez volt a legelső genetikai manipulációval előállított élelmiszeripari enzim a piacon. Hátránya viszont, hogy a kimozint intracellulárisan termeli. A manipulációs eljárás azóta klasszikussá vált: az *E. coli* K-12 törzsbe traszfektálták a prokimozin gént a pBR322 plazmid vektorral, a kifejeződést a *trp* promóterrel szabályozták. A Pfizer később az egész üzletágat továbbadta a Christian Hansen, (DK) cégnek.



131. ábra Kimosin gyártás technológiája *E. coli*-val

A folyamat jelentősen különbözik az *A. niger*-rel kidolgozottól. Speciális rátáplálási stratégiával állandó szénforrás limitben tartják a tenyészetet, ugyanakkor nagy sejt- és enzimkoncentrációt tartanak fenn, miközben lefékezik az anyagcserét és megakadályozzák az ecetsav felhalmozódását. Az *E. coli* ugyanis korlátolatlan növekedésben ecetsavat termel, ami nagyobb koncentrációban toxikussá válik és akadályozza a növekedést, valamint a termékképződést. A *coli* sejtekben a kimosin oldhatatlan zárványtestek (inclusion bodies, IB) formájában halmozódik fel. Ezek feloldására, foldingjára, az aktív szerkezet kialakítására speciális műveletsort kellett kidolgozni. Előbb az elkülönített sejteket nagynyomású homogenizátorral feltárlják, és az IB szemcséket centrifugálással leválasztják, majd pH=2 pufferrel mossák. Az oldást kaotróp oldószerekben (7-9 M karbamid) lúgos közegben lehet megoldani. Az így kapott oldatban a fehérje még nem aktív, a megfelelő harmadlagos szerkezet erős hígításban lassan, spontán alakul ki az ún. folding pufferben, amely ásványi sókat és kis molekulájú anyagokat, pl. arginint tartalmaz.

Ezután az aktív enzimet a szokásos fehérjetisztítási módszerekkel, például anioncsere-kromatográfiával tisztítják (131. ábra).

Kimosin termelés élesztővel (*Kluyveromyces lactis*-szal)

A *K. lactis*-t a Dutch States Mines (DSM, NL) alkalmazta gazdaszervezetként a kimosin gyártására (MAXIREN néven, 1990). Ezt a jól ismert élesztőtörzset már az ötvenes évek óta használták a laktáz fermentációs előállítására, amit az élelmiszeriparban a tejcukor bontására alkalmaztak (Gist-Brocades, NL).

Az expresszióhoz a bovin kimosin gén elé az erős *lac4*-promotert építették be és az enzim sejtől való kilépését a jól ismert élesztő α -faktor leader szekvencia hozzácsatolásával segítették elő. Az első fejlesztéseknél az expressziós kazettát plazmiddal fejeztették ki (pUC19 élesztő plazmid), de később a gént a kromoszomális DNS-be építették be.

A fermentáció során az *E. coli*-hoz hasonlóan a tápanyag speciális összetételével és adagolási stratégiájával nagy sejtsűrűséget állítottak be, miközben a keletkező etanol

koncentrációját alacsonyan tartották. A technológiák sikeresen léptéknövelték 100 m³ fölé is. Az extracelluláris enzim tisztítása a penész eredetű enzimhez hasonló lépéssorral történik. Mivel a törzs kevés egyéb extracelluláris fehérjét termel, a kimozint könnyű izolálni. Az előírások szerint a termék nem tartalmazhat élő sejteket ezért a levet benzooesavval kezelik, és alacsony pH-n szűrik. Eközben a sav hatására a prokimozin → kimozin átalakulás is végbemegy. A termék (MAXIREN^R) tartósítását benzooesavval vagy NaCl-dal oldják meg.

A rekombináns terméknek több előnye is van az eredeti, borjúgyomor kimozinnal szemben:

- tisztább, mint a borjú rennin, mert nem tartalmaz kísérő enzimeket (pepszint és egyebeket)
- kémiaailag és biológiailag teljesen azonos a borjú enzimmel
- termelése olcsóbb
- állandó tisztaságú, mentes állati szervmaradványoktól (pl. nincs BSE veszély)
- korlátlanul termelhető

Az ipari termelés Franciaországban, Seclinben indult meg, hosszú és bonyolult engedélyeztetési eljárás után. Az üzem engedélyt kapott rekombináns mikroba tenyésztésére és megszerezte az ISO 9002 bizonyítványt is. Magát a terméket pedig – mivel már nem állati eredetű – elfogadták a vegetáriánusok is, és a kóser és halál vallási szabályok szerint is megfelelőnek minősítették. Az engedélyeztetés során meg kellett vizsgálni a

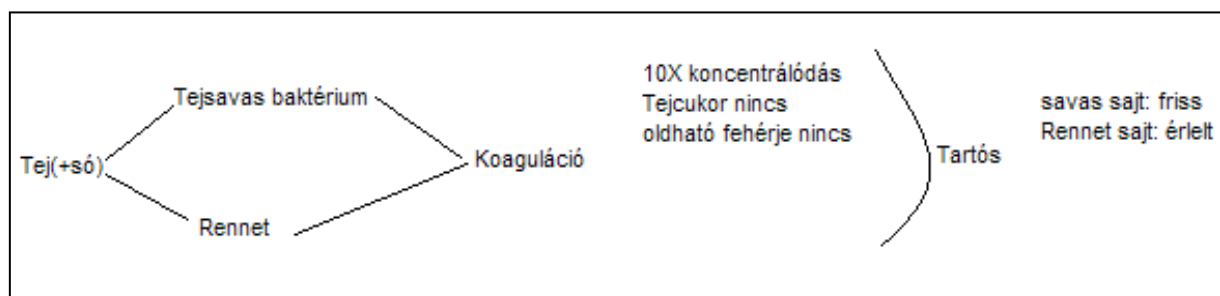
- rekombináns törzs DNS stabilitását,
- esetleges patogenitását,
- a termék mutagenitását,
- toxicitását,
- allergenitását.

Ezután sajtgyártási tesztek és organoleptikus vizsgálatokat is végeztek, és akkor fogadták el, amikor a francia sajtínyencek sem tudták megkülönböztetni a termékeket.

8.5.6.4. A kimozin szerepe a sajtgyártásban

A sajtgyártás kulcslépése a tej megalvasztása. A tej kolloidális szerkezete átalakul, a micellák elveszítik stabilitásukat és a tej szétválik egy fehérje alapú géltre és a homogén savó folyadéokra. A kivált gél szerkezetét mechanikai hatásokkal (keverés, aprítás, préselés) megbontják, így kivonják a benne visszatartott savó nagy részét. A folyadék eltávolítását melegítéssel és sózással is elősegítik.

A tejfehérjék kicsapása más módon is megvalósítható. A kazeinok izoelektromos pontja 4,5 körül van. Ha a pH-t erre az értékre csökkentjük, a fehérjék kicsapódnak. A mechanizmus eltérő, ez esetben nem történik kémiai bontás a fehérjeláncban, csak a disszociáció mértéke változik. A savas tejalvasztást is nagyon régóta használják a háziiparban és a nagyiparban egyaránt. A savat a tejben elszaporított tejsavbaktériumokkal állítják elő, amelyek egyrészt kellemes ízanyagokat termelnek, másrészt a pH biztosan nem csökken 4,5 alá, mert ekkor a baktériumok



132. ábra A tej alvasztásának lehetőségei

működése is leáll. A savas és enzim alvasztást párhuzamosan, sőt sokszor kombinálva alkalmazzák a különböző termékek készítésénél. Nem szigorú szabály, de általában a friss sajtoknál a savas, érlelt sajtoknál az enzim technológiát használják (132. ábra).

Adalék: Magyarországon is elterjedt növény a tejoltó galaj. Nevét onnan kapta, hogy főzete a tejjel keverve ugyanúgy kicsapja, mint a tejsav vagy a kimozin. A középkorban is használták sajt készítésre, sárga színanyaga a sajtokat is megfestette.

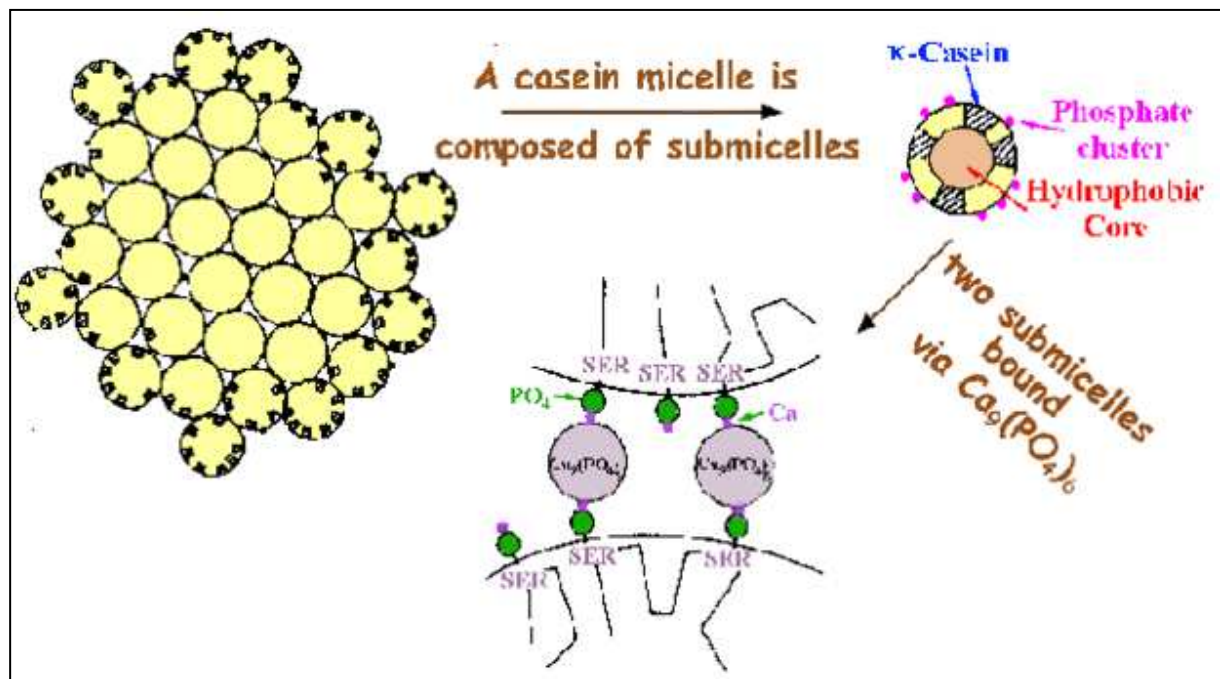
A fehérje csapadék a túró, illetve ebből préseléssel, sózással, érleléssel, esetleg további mikroorganizmusok elszaporításával készítenek nagyon sokféle sajtot.

Fehérje	%	Foszfát csoportok molekulánként
Kazein		
alfa s1-kazein	32	8
alfa s2-kazein	8	10-13
béta-kazein	32	5
kappa-kazein	8	1-2
	80	
Savó fehérjék		
béta-laktoglobulin	12	0
béta laktalbumin	4	0
immunglobulin	3	0
szérum albumin	1	0
	20	

26. táblázat A tehéntej fő fehérje frakciói

A tehéntej fehérjetartalma összesen kb. 8%. Ennek mintegy 80 %-a kazein, ami négy fő frakcióból áll: α 1-, α 2-, β - és κ -kazein. A kazeinek hidrofób jellegű fehérjék, mindegyik tartalmaz foszforsav csoportokat. A fehérjék további 20%-a vízoldható savófehérje 26. táblázat.

A kazeinek apoláris jellegük miatt a vizes közegben csak kolloid formában oldódnak, micellákat alkotnak. A micellák további szubmicellákból állnak. Ezek felületén található az



133. ábra A tej micelláris szerkezete

amfifil jellegű κ -kazein molekula, amely poláris aminosav oldalláncaival fordul a vizes fázis felé. A felületen lévő szerin aminosavak OH csoportjai kölcsönhatásba lépnek a $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ komplexekkel, amelyek hídként összekapcsolják a szubmicellákat (133. ábra).

Ez a szerkezet meglehetősen stabil, hiszen a tej felforralása sem bontja meg a kolloidot.

Amikor a kimozin elhidrolizálja a κ -kazein 105-106 helyén található fenilalanin-metionin közti peptid kötést, destabilizálja az egész micella rendszert. A micellában található fehérjék kicsapódnak. A hidrolízis és a csapadékképzés két külön folyamat, a környezeti tényezők eltérő módon hatnak rájuk. A kalcium ionok elősegítik a kazeinek aggregálódását, de magát az enzimes reakciót nem befolyásolják. Ugyanez a helyzet a hőmérséklettel is. A 25-35 fokos tartományban a reakciósebesség csak kis mértékben gyorsul, ugyanakkor a fehérjék kiválása sokkal intenzívebbé válik. Az enzimaktivitás érzékeny a pH-ra, a tej normális, 6,5-es pH-ján nagy, savas irányba mozdítva jelentősen csökken, a 4,5-es érték már az enzim izoelektromos pontja, ahol az aktivitás minimális.

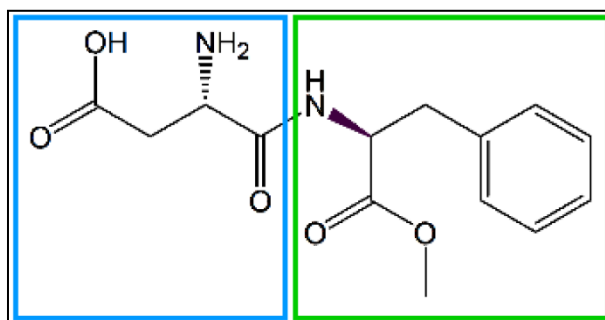
A kapott két fázis összetétele a következőképpen alakul: a túró tartalmazza az eredetileg 8%-nyi fehérje túlnyomó részét, kb. 7 százalékot, a zsírokat, és a Ca-foszfátot. A savóba kerül a tejcukor teljes egészében (5,5-7,5%), a maradék ~1% fehérje, valamint az ásványi sók.

Adalék: a savóból a maradék egy százaléknyi fehérjét forralással ki lehet csapni. Egyes országokban ebből is készítenek sajtot. Az olasz ricotta sajt neve is erre utal: re+cotta = újra + főzés. A friss sajtok gyakorlatilag azonnal fogyaszthatók, az érlelt sajtok csak hosszabb (4 hét-2 év) érlelés után. Ennek során csökken a víztartalom és kémiai, biokémiai, mikrobiológiai változások mennek végbe. A fehérje bomlás folyamatos, szabad aminosavak, biogén aminok, ammónia is keletkezik. Számos sajtajtát starter tenyészetekkel oltanak be az érlelés elősegítése érdekében (camembert, rokfort, brie, kéksajt, stb.).

8.5.6.5. Fémproteázok

A termolizin egy hőstabil fémproteáz, amit eredetileg a *Bacillus thermoproteolyticus* törzs termelt. Az enzim kofaktora Zn^{2+} ion, a stabilitását 4 Ca^{2+} biztosítja. Az ipari felhasználásra gyártott proteázok között ennek a legnagyobb hőstabilitása. A termolizin és hasonló mikrobiális enzimek azért kapták a fémproteáz besorolást, mert katalitikus aktivitásukhoz egy fém-ionra, általában Zn^{2+} ionra van szükség. Korábban ezeket a semleges proteázok közé sorolták, mert a pH optimumuk 7 körül van. További közös tulajdonságuk a hasonló szubsztrát specifitás, a legnagyobb sebességgel a hidrofób és terjedelmes oldalláncú aminosavak (Leu, Phe) amino csoportjánál elhelyezkedő peptid kötések hidrolizálják.

Bár a metalloproteázokat nem csak a laboratóriumi felhasználásra, hanem ipari léptékben is gyártják, a piac kicsi, mert a hidrolízis specifitása szűkebb a többi proteázhoz (szerin proteázok, cisztein proteázok) viszonyítva. Használatuk akkor indokolt, ha más enzimek nem képesek a hidrolízisre. Ilyen nehezen bontható anyag például az árpa fehérje, amely egy specifikus szerin proteáz inhibitorot tartalmaz.



134. ábra Az aszpartám szerkezete

A termolizin legnagyobb felhasználója az aszpartám gyártás. Az aszpartám (L- α -aszpartil-L-fenil-alanin-metilészter, APM) egy mesterséges édesítőszer, amely mintegy kétszázszor édesebb, mint a szacharóz. Kémiailag egy dipeptid származék (134. ábra).

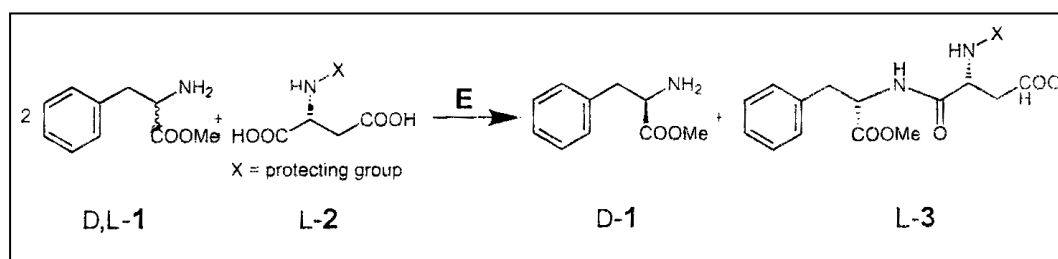
Adalék: Az aszpartámot a Searle cég vegyésze, G.D. Schlatter véletlenül fedezte fel 1965-ben, miközben egy tetrapeptid szintézisén dolgozott. A Searle cég sok nehézség árán engedélyeztette és piacra vitte az aszpartámot. 1985-ben a Monsanto felvásárolta az egész céget és NutraSweet Company néven működtette tovább. Közben megjelentek a versenytársak, az alapanyag aminosavakat termelő Ajinomoto, és a holland-japán közös vállalat a Holland Sweetener Company (HSC). 2000-ben az Ajinomoto átvette a terméket a Monsanto-tól, és ezzel a világpiac 40%-t látja el. A HSC 2006-ban beszüntette a gyártást, mert nem bírta a piaci versenyt. Ennek oka elsősorban a kínai gyártók megjelenése volt.

A gyártás egy lépéses enzim biokonverzió, így az enzim és használatának költsége kulcsfontosságú gazdaságossági kérdés. Az egyik technológiai előrelépés ezen a téren az enzim immobilizálása volt. Többszöri felhasználással az adott enzim mennyiség jobban kihasználható. Az immobilizáció eredményeként az oldatban kifejezetten labilis enzim évekig stabil marad. Egy másik módszer szerint a teljes sejteket rögzítik. A rögzítés előtt a sejtömeget hőkezelik. Ez a hőstabil termolizinnek nem árt, de a hőérzékeny enzimek, így a fumaráz is elbomlik. Ezáltal a fumársav–almasav átalakulás miatt bekövetkező fumársav veszteség kiküszöbölhető.

Az enzim aktivitása jelentős mértékben növelhető a körülmények beállításával. Sók (2-4 M NaCl), n-pentanol hozzáadása, illetve nagy nyomás (50-100 bar) a többszörösére növeli az enzim aktivitását. Emellett jelentős eredményt hozhat magának az enzimnek a fehérjemérnöki módosítása. Site directed mutagenézissel *Bacillus subtilis*-ben kifejezve mind az enzim aktivitását, mind stabilitását a többszörösére növelték. Más lehetőség az enzim fermentáció hatékonyságának javítása, olcsóbb enzim előállítási technológia keresése.

A reakciót vizes közegben, pH = 7-7,5 között hajtják végre, az optimális hőmérséklet $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, ez a kompromisszum a kielégítő reakciósebesség és az enzim hosszú élettartama között.

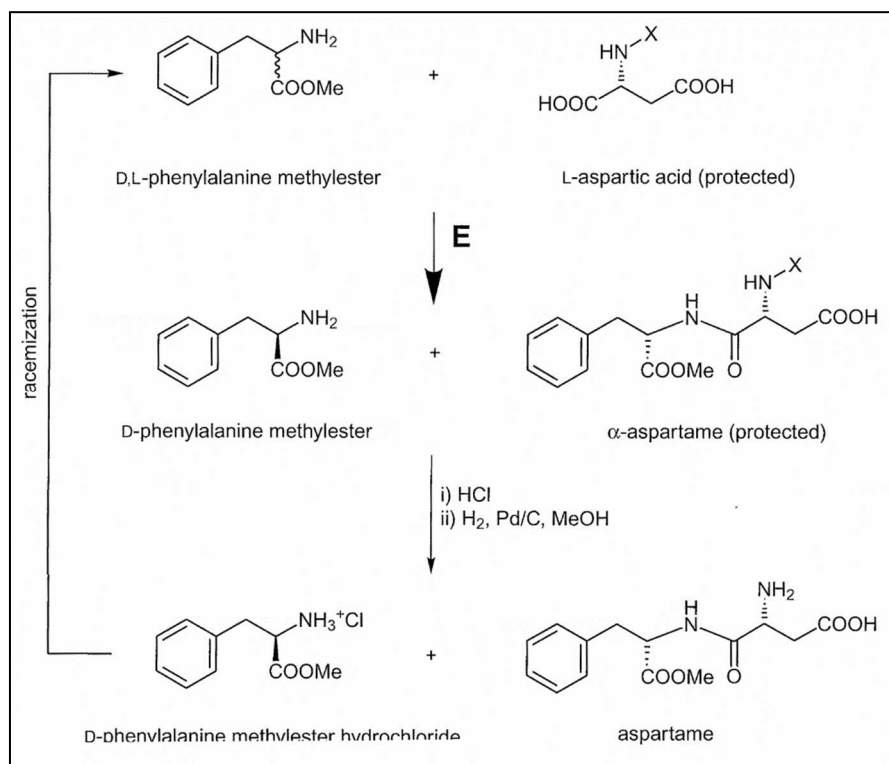
Az enzim tulajdonságai után nézzük magát a reakciót. A termolizin proteáz, tehát fehérjebontó enzim, de itt fordított irányú reakcióban, peptid kötés létrehozására használjuk. A két aminosavból (Phe + Asp) irányítottan dipeptidet hozunk létre. A katalizált reakció (135. ábra):



135. ábra Az aszpartám előállítása

A szelektivitás itt is érvényesül, a nagy, apoláris aminosav (Phe) amino csoportján alakul ki a peptid kötés. Ahhoz, hogy csak a fenilalanin amino csoportja reagáljon az aszparaginsav 1-karboxil csoportjával, a rajtuk lévő egyéb funkciós csoportokat blokkolni kell, egyébként random di- és oligopeptidek képződnek. A Phe karbonsav csoportját metilészter formájában blokkolják, az aszparaginsav amino csoportját pedig egy benzil-oxi-karbonil (BOC) csoporttal védik. Ez utóbbit a termékről katalitikus hidrogénezéssel lehet eltávolítani, a metil csoport viszont a termék része, nem kell leválasztani.

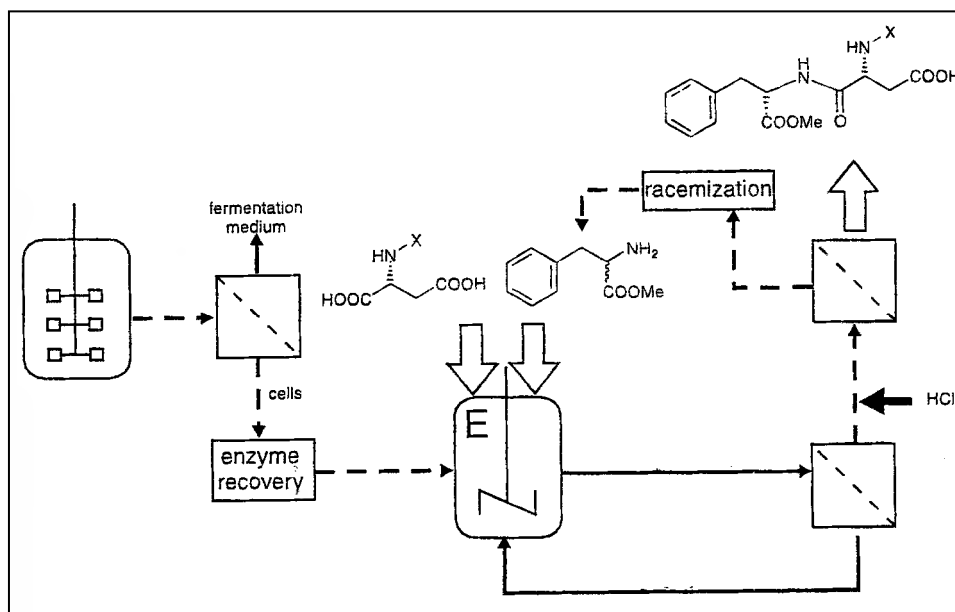
Az enzim specifikusait többszörösen kihasználják. Az átalakítás szelektivitása abban áll, hogy az Asp két karbonsav csoportja közül csak 1 pozíciójű lép reakcióba, a 4 helyzetű viszont nem. Ez onnan vezethető le, hogy a fehérjéket α -aminosavak alkotják, a proteázok ezek peptid kötéseit hidrolizálják, így visszafelé is ezt a szerkezetet hozzák létre. Másrészt az enzim sztereoszelektív, csak az L-aminosavak lépnek reakcióba. Ez azt jelenti, hogy alapanyagként az olcsóbb, szintetikus, racém DL-fenilalanint is fel lehet használni mégis csak L-aszpartám keletkezik (enantiomer tisztaság: 99,99 %), a D-Phe változatlan formában marad.



136. ábra Az aszpartám gyártás reakciói

A termék tisztasága azért lényeges szempont, mert az izomer melléktermékek nem édes, hanem keserű ízűek. Az aszpartám gyártása kémiai szintézissel is megoldható, de ott jelentős mennyiségű keserű izomer keletkezik, aminek elválasztása jelentősen megdrágítja a folyamatot. A racém fenilalanin alkalmazásának van még egy előnye. A keletkező BOC-aszpartám és a megmaradó D-Phe oldhatatlan komplexet képeznek, ami kicsapódik a reakcióelegyből, kiszűrhető. A csapadékot sósavval kezelik, ebben a D-fenilalanin feloldódik, a BOC-aszpartám továbbra is oldhatatlan marad, elválasztható. Az előbbi racemizálják és visszaviszik a folyamatba, az utóbbiról hidrogénezéssel leválasztják a védőcsoportot (136. ábra). A reakció hőt termel, a készüléket hűteni kell. A technológia lépéseit az enzim fermentációs előállításával együtt mutatja be a 137. ábra.

Az aszpartám piaca jelenleg kb. 30 000 t/év, lassan, de folyamatosan bővül. Ennek legalább háromnegyed részét különféle italok édesítésére használják fel, a további mennyiség is az élelmiszerekbe kerül, dzsemek, cukorkák, édességek, tejtermékek, diabetikus készítmények édesítésére. Elterjedésének korlátja, hogy magasabb hőmérsékleten, főzés, sütés hatására elbomlik, így sütőipari termékekben nem alkalmazható



137. ábra Aszpartám gyártás technológiai lépései

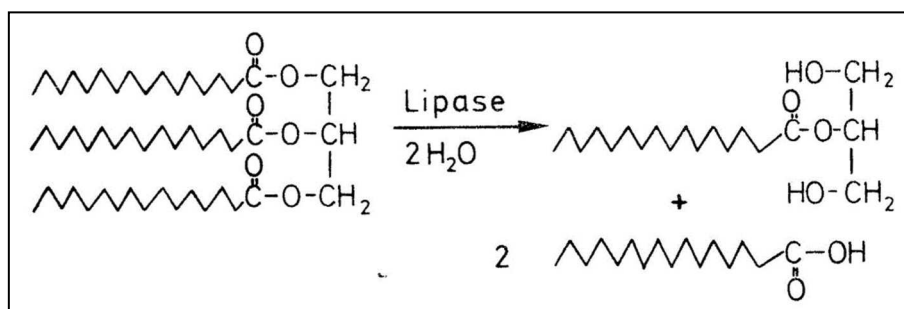
8.5.7. Lipázok

A lipázok (triacil glicerín hidrolázok) a hidrolázok közé tartoznak, a karbonsavak észter kötéseit bontják. Élettani szerepük a trigliceridek hidrolízise digliceridekké, monogliceridekké, zsírsavakká és glicerinné.

Az iparban a zsírok hidrolízise megoldható kémiai úton is, magas hőmérsékleten és nagy nyomás alatt (250 °C és 30-60 bar). Azonban ez az eljárás nem alkalmas a telítetlen zsírsavakat tartalmazó olajok, különösen a több kettős kötést tartalmazó olajok feldolgozására. Emiatt terjedt el az enzimes hidrolízis.

Mivel a szubsztrát rosszul oldódik vízben, külön fázist is képez, a reakció, ezzel a katalízis is részben heterogén fázisú, a víz-olaj határfelületen megy végbe. A többi hidroláz enzimhez hasonlóan a lipázok sem igényelnek kosubsztrátot. Általában sokféle hasonló szubsztrát átalakítására képesek, de régióspecifitást és sztereospecifitást mutatnak.

A reakció sebessége általában függ a zsírsavak szénláncának hosszától. Rendszerint a rövid szénláncú zsírsavak észtereit lassabban bontják, mint a közepes és hosszú szénláncúakét. A hossz mellett befolyásol az esetleges kettős kötések száma és helyzete. A *Geotrichium candidum* lipáz például szelektíven bontja a 9 pozícióban cisz helyzetű kettős kötést tartalmazó zsírsavak észtereit. Sok lipáz régióspecifikus abból a szempontból, hogy a glicerinen a primer alkohol csoportok (1 és 3 pozíció) észtereit nagyságrendekkel gyorsabban hidrolizálja, mint a középső (szekunder) csoporttét (pl. *Rhizopus* lipázok) (138. ábra). Egyes enzimek specifikusak a glicerinnre, mások egyéb alkoholos vegyületek észtereit is bontják.



138. ábra Régiószelktív lipázok reakciója

Hőfok optimumuk változatos, alacsony és magas hőmérsékleten működő enzimeket is találhatunk. A hőstabil lipázok, mint a *Thermus aquaticus*, *T. flavus* és *T. thermophilus* fajok enzimeivel magasabb hőmérsékleten (50-70 °C között) lehet dolgozni, ami több előnnyel is jár. Csökken a befertőződés kockázata, javul a diffúziós anyagátadás sebessége és a lipidek oldhatósága.

Mindez sokféle, változatos ipari alkalmazást tesz lehetővé, a lipázokat mosószerekben, a bőr-, textil-, élelmiszer-, papír- és gyógyszeriparban használják.

A lipázok széles körben elterjedtek, az állatok, növények és mikroorganizmusok körében egyaránt, gyakorlatilag minden sejt termel több-kevesebb lipázt.

A legtöbb kereskedelmi forgalomba kerülő lipáz mikrobiális eredetű, mivel csak ezeket lehet ipari léptékben előállítani. Mind a gombák, élesztők és a baktériumok körében található lipáz termelő törzsek. A baktériumok körében az említett *Pseudomonas*-ok és *Thermus*-ok, az élesztők között a *Candida* törzsek (*C. cylindracea*, *C. antarctica*, *C. rugosa*), a fonalas gombáknál pedig a *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* és *Penicillium* fajok alkalmasak ipari léptékű lipáz termelésre. A bakteriális enzimek között külön figyelmet érdemelnek a *Pseudomonas* lipázok, amelyek kitűnően működnek vizes közeg helyett szerves oldószerekben is.

Kisebb léptékben gyártanak még hasnyálmirigy lipázt is, ezt sok más enzimhez hasonlóan a sertés vágóhidakon összegyűjtött szervekből nyerik ki

A törzsek változatosságának megfelelően a fehérje molekula is sokféle. A molekulatömegek 22-69 kDa között változnak. Az enzimek működésére jelentős hatással vannak a jelen lévő fémionok. A kétértékű ionok általában növelik az aktivitást, illetve elősegítik a fehérje leválását a sejtek felületéről. A nehézfémekre viszont érzékenyek, gátolják működésüket.

A lipázok szubsztrátjai, a zsírok és olajok rosszul oldódnak vízben, az oldott szubsztrát koncentráció alacsony, emiatt a reakciósebesség is kicsi. Szerves oldószerek jelenléte megnöveli a szubsztrát oldhatóságát, ezzel a reakciósebességet. Ugyanakkor az oldószeres közeg a legtöbb fehérjét denaturálja, tönkreteszi. Szerencsére a lipázok között sok oldószer-tűrő fehérje van, amelyek apoláris közegben is megtartják szerkezetüket és aktivitásukat. A szerves oldószerben végrehajtott enzimes reakciók új lehetőségeket nyitottak meg a kémiai szintézisekben. Sok lipázzal kimutatták, hogy aktívan működik vízzel elegyedő (metanol, etanol, aceton, glicerin) és nem elegyedő (hexán, ciklohexán, heptán, izo-oktán, xilol és MTBE) oldószerekben. A reakciót gyakorlatilag vízmentes közegben is végre lehet hajtani, arra azonban ügyelni kell, hogy a hidrolízishez szükséges sztöchiometrikus mennyiségű víz (általában néhány ezrelék) jelen legyen.

Az oldószer nem csak az enzimaktivitást növeli, hanem a lipázok stabilitását, élettartamát is. Oldószeres közegben (víztartalom <3%) a lipázokat 20-30 fokkal magasabb hőmérsékleten lehet alkalmazni, mint vizes pufferben.

8.5.7.1. *Fermentáció*

A lipáz enzimet leggyakrabban szubmerz szakaszos, illetve rátáplálásos fermentációval állítják elő. Indukálható enzimek, termelésüket a szubsztrát, azaz növényi olajok adagolásával lehet kiváltani. Gátolhatja az enzim képződését a katabolit represszió (a glükóz jelenléte), illetve a termékinhibíció (glicerin szénforrás). A termékképzés növekedéshez kapcsolódó folyamat, főként az exponenciális fázisban történik. A *Rhizopus chinensis* fermentációnál a maximális intracelluláris lipáz aktivitást az exponenciális fázis végén kapták, amikor az alapvető szubsztrátok koncentrációja limitálónak vált. Jelentősen növelni lehet az enzim termelést rátáplálásos fermentációban, a beadagolt szubsztrát lehet húskivonat illetve növényi olaj.

A nitrogén-források között a törzsek igényétől függően szerves és szervetlen anyagok egyaránt alkalmazhatók. Elegendő lehet egy minimál táptalaj, ásványi sókkal, nátrium-nitráttal,

ammónium-szulfáttal és ammónium-nitráttal esetleg karbamiddal kiegészítve. Más törzsek olyan komplex szerves nitrogénforráson termelnek jól, mint a kukorica lekvár, pepton, tripton vagy az élesztő kivonat. Szerves nitrogénforrás egyrészt számottevően megnöveli a költségeket, másrészt megnehezíti az enzim izolálását, tisztítását.

A levegőztetés intenzitása nagyon eltérő hatással van a lipázok fermentációjára. Egyes mikroorganizmusok minimális levegőztetés mellett termelik a lipázt, másoknál bőséges oxigénellátásra van szükség. Az oxigén hatása feltehetőleg közvetett, nem az enzimtermeléshez van rá szükség, hanem az enzim termékeinek, a szabad zsírsavaknak az oxidációjához. *Rhizopus* törzseknél egyértelműen kimutatták, hogy az oldott oxigén szint emelése (keveréssel, levegőztetéssel, stb.) fokozza a lipáz termelést.

A lipáz fermentációknál speciális lehetőség a szerves oldószerek használata. A *Ps. aeruginosa* ugyanúgy nőtt és termelte a lipázt n-tetradekán és n-dodekán jelenlétében, mint oldószer nélkül. A *Bacillus sphaericus* 205y vízzel elegyedő oldószerek (akár 75%) jelenlétében is növekedett és lipázt termelt. A *Pseudomonas sp.* G6 törzset egyedüli szénforrásként n-hexadekánon minimál tápoldaton szaporítva a tenyészet jól szaporodott, és sok lipázt termelt.

Az így termelt enzimek oldószeres vagy vizes-oldószeres közegben is működnek, sőt sokszor nagyobb az aktivitásuk, mint egy vizes pufferben.

8.5.7.2. Izolálás, tisztítás

A lipázok sokféle ipari alkalmazása ismert, de ezek nagy többségében nincs szükség nagy tisztaságú enzimre. Bizonyos esetekben, amikor valóban tisztított biokatalizátorra van szükség, egyszerű és olcsó feldolgozási műveletsorral kell ipari mennyiségű, stabil és nagy aktivitású enzim készítményt előállítani.

Az enzim tisztítását a szokásos fehérje elválasztási műveletekkel (csapadékképzés, ultraszűrés, kromatográfia, adszorpció) oldják meg.

Az ioncserélő kromatográfiánál általában anion cserélő töltetekkel (gyenge – DEAE, erős – Q) kötik meg a lipázokat. A hidrofób kölcsönhatás kromatográfiát (HIC) szívesen alkalmazzák, mert a lipázokról ismert, hogy a fehérje felületén hidrofób foltok találhatóak, amelyek jól kötődnek a hidrofób töltetkez. A feldolgozás végén gyakran tisztítják az enzimet gélkromatográfiával.

8.5.7.3. Enzim rögzítés

A lipázok immobilizálásában speciális lehetőségeket biztosít a fehérjék hidrofób jellege, aminek révén spontán adszorpcióval is kötődnek apoláris hordozók felületére. Ezeket jól nedvesítik a szerves oldószerek, a reakció akadálytalanul végbemehet. A hordozó lehet poliuretán hab, polipropilén szemcse vagy akár ásványi anyag is.

Az kötött enzimek mellett alkalmaznak immobilizált sejteket is. A lipázt tartalmazó sejteket agar, alginát vagy poliakrilamid gélbe zárják. Ennél a megoldásnál a rögzítés általános előnyei mellett számolni kell az anyagátadás limitáló hatásával.

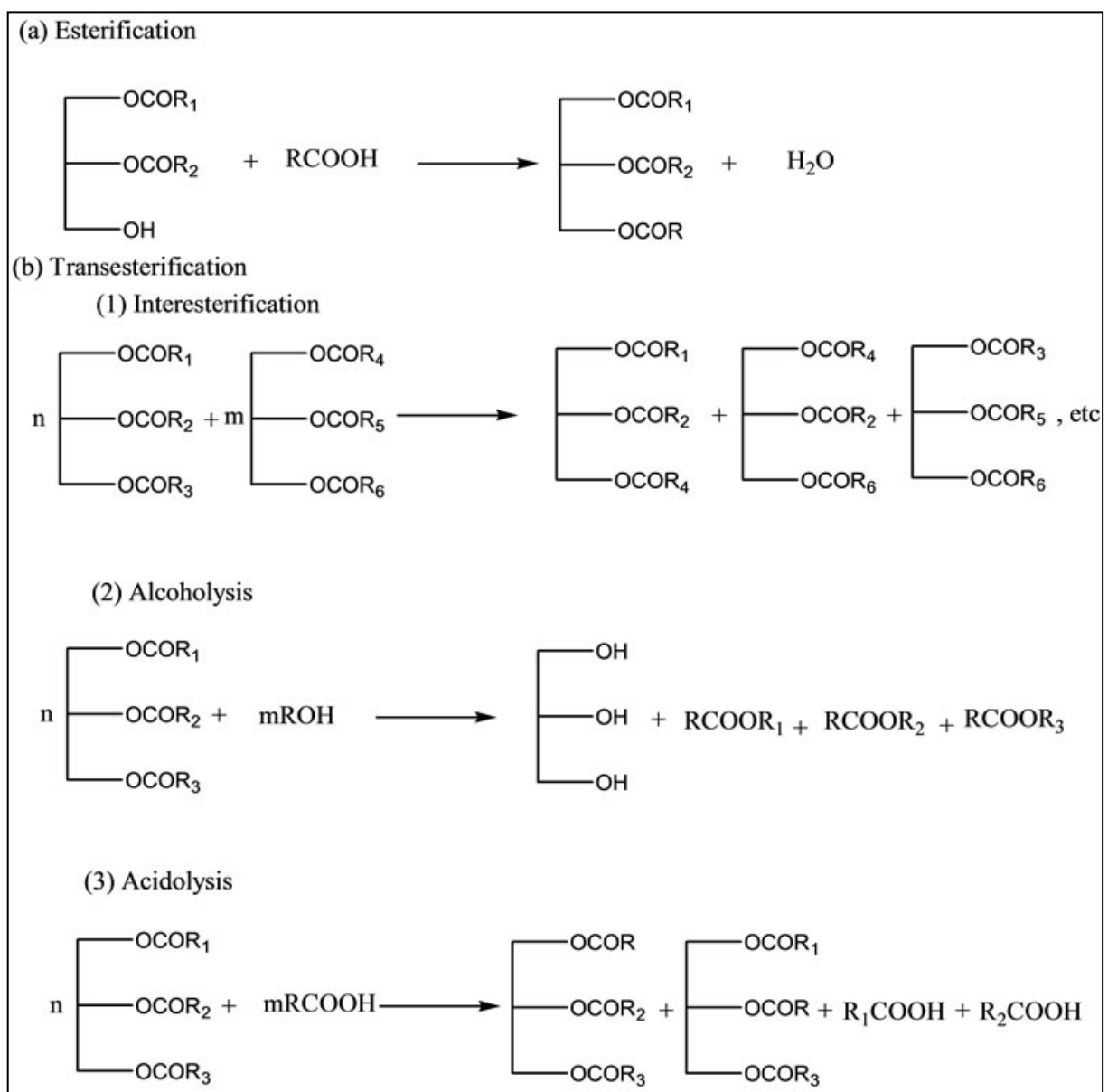
8.5.7.4. Alkalmazások

A lipázokat közvetlenül is lehet alkalmazni emésztést elősegítő készítményekben. Erre a célra a legalkalmasabb a hasnyálmirigy lipáz. Sok iparág használ lipáz készítményeket:

- Élelmiszeripar (a sajtok érlelésénél és a sütőiparban a tészta javítására)
- Bőripar (zsírtalanítás)
- Kozmetikai ipar (kíméletes, lúgmentes elszappanosítás)
- Cellulóz és papíripar (szennyezések eltávolítása)
- Átészterezési reakciók

Ez utóbbiakkal foglalkozunk részletesebben.

Az átészterezéseknél is azt használják ki, hogy minden enzimes reakció megfordítható, az „előre” és „vissza” menő folyamatok egyidejűleg játszódhatnak le és beáll közöttük egy dinamikus egyensúly. A hidrolízis és az észterezés párhuzamosan folyik, egy adott hidroxil csoportról ismételtelen leválnak, majd rákötődnek a zsírsavak. A természetes zsíradékok zsírsav összetétele sohasem homogén, így az adott pillanatban szabadon lévő zsírsavak is sokfélék. Az észterezésnél a nagy valószínűséggel nem ugyanaz a zsírsav kerül vissza az –OH csoportra, hanem statisztikusan valamelyik a jelen lévő szabad karbonsavak közül. Ettől a bevitt trigliceridek zsírsav összetétele megváltozik. Ezt a változást céljainknak megfelelően kihasználhatjuk, sőt irányíthatjuk, ha megfelelő specificitású enzimeket választunk, illetve megfelelő reakciópartnereket viszünk a rendszerbe. A két fő lehetőség, hogy nem-specifikus, vagy 1,3-specifikus lipázokat alkalmazunk. Előbbire akkor van szükség, ha mind a három észter kötést át kívánjuk alakítani. A reagáló partner lehet karbonsav vagy alkohol, aszerint, hogy a molekula melyik részét szükséges megváltoztatni. De lehet egy másik triglicerid is, amellyel a zsírsavak statisztikusan kicserélődnek (139. ábra).



139. ábra Lipázok átészterezési reakciói

8.5.7.5. *Esettanulmány: kakaóvaj pótló anyag előállítása*

A csokoládégyártás és a kapcsolódó iparok szűk keresztmetszete az, hogy a kakaó korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre. A kakaócserjét ültetvényeken termesztik, de a termelés nem intenzifikálható, mint más ipari növényeknél, és a kultúra érzékeny az időjárás szélsőségeire. Az alapanyag drágasága létrehozta az igényt valamilyen pótlóanyag kifejlesztésére. A kakaómag feldolgozása során két hasznos frakciót állítanak elő: a kakaómasszát (amely barna színű, keserű, íz és aromaanyagokat tartalmaz), és a kakaóvaját – ez fehéres színű, íztelen és gyakorlatilag tisztán trigliceridekből áll, szobahőmérsékleten szilárd és csak 37 fokon olvad meg. Az előbbi pótlása szinte lehetetlen, de a kakaóvaj kémiai összetételét meg lehet közelíteni. Az alap gondolat az, hogy valamilyen olcsó, hozzáférhető növényi olaj telítetlen zsírsavait ki kell cserélni hosszú szénláncú, telített savakra. Erre a feladatra kézenfekvő megoldás az átészterezés lipáz enzimmal. Eljárásokat dolgoztak ki pálmamag olaj, illetve napraforgó olaj átalakítására is. A 27. táblázatban szerepel a pálmaolaj és a kakaóvaj triglicerid összetétele. A kakaóvaj magas olvadáspontját a hosszú szénláncú telített zsírsavaknak (sztearinsav, palmitinsav) köszönheti.

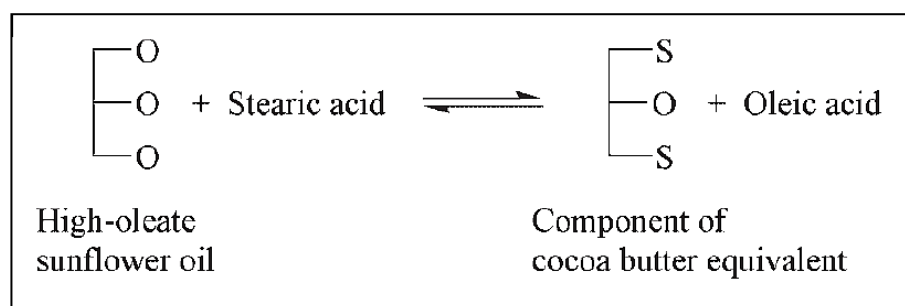
Triglicerid	Pálmaolajban %	Enzimes termékben %	Kakaóvajban %
StStSt	5	3	1
POP	58	16	16
POSt	13	39	41
StOSt	2	28,5	27
StLnSt	9	8	8
StOO	4	4	6

St = sztearát (C18,0); P = Palmitát (C16,0); O = Oleát (C18,1); Ln = Linolát (C18,2)

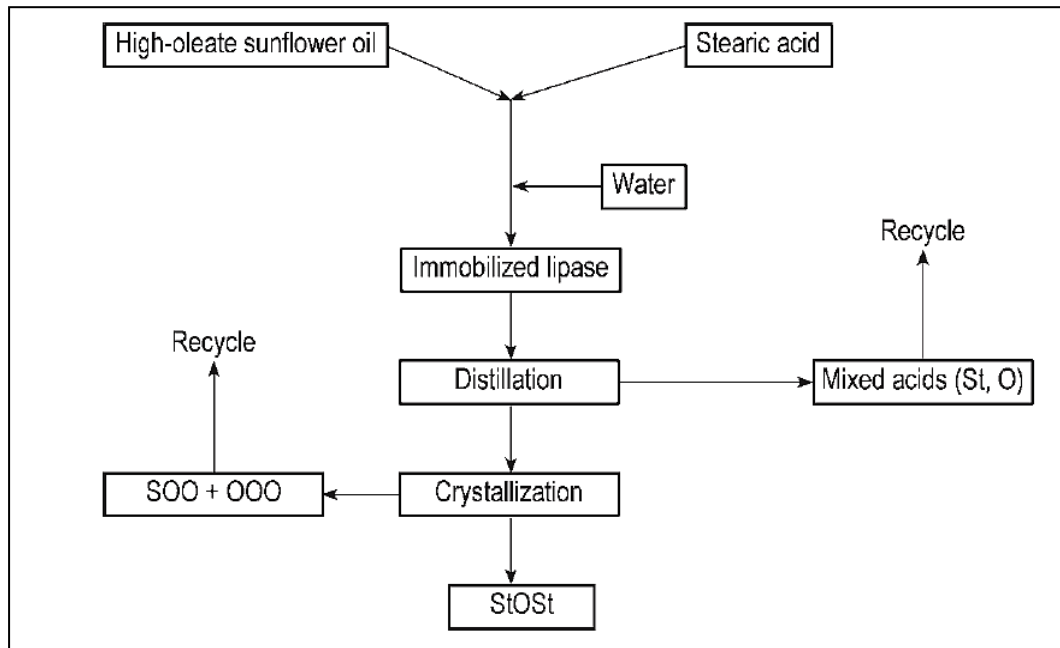
27. Táblázat Zsiradékok triglicerid összetétele

A pálmaolajban (ami szobahőfokon szintén szilárd, emiatt pálmazsírnak is szokták nevezni) ezek részaránya lényegesen kisebb, a folyékony napraforgó olajban pedig elenyésző. Az is megfigyelhető, hogy a középső pozícióban még a kakaóvajban is olajsav található. Így az átalakítás arra irányul, hogy a két szélső zsírsavat cseréljük le sztearinsavra. Erre a célra az 1,3-szelektív lipázok is megfelelnek. A napraforgó olaj átalakításánál is hasonló a helyzet, a trioleát főkomponens két szélső pozícióján cserélik le az olajsavat sztearinsavra (140. ábra)

Az ipari technológiákban oldószeres közegben (például petroléterben) hajtják végre a reakciót. Kis mennyiségű vizet (1-2 ezrelék) adnak az elegyhez, ez szükséges az enzim hidratálásához és a hidrolízishez. A folyadékot immobilizált enzim tölteten engedik át (pl. *Rhizomucor miehei* lipáz, diatómaföldön kötve). A jellemző hőmérséklet 70 °C, a konverzió javítása érdekében az anyagot recirkuláltatják. A termékek közül előbb molekuláris desztillációval eltávolítják a szabad zsírsavakat (olajsav, maradék sztearinsav), ez utóbbit izolálva vissza lehet vinni



140. ábra Napraforgó olaj átészterezése

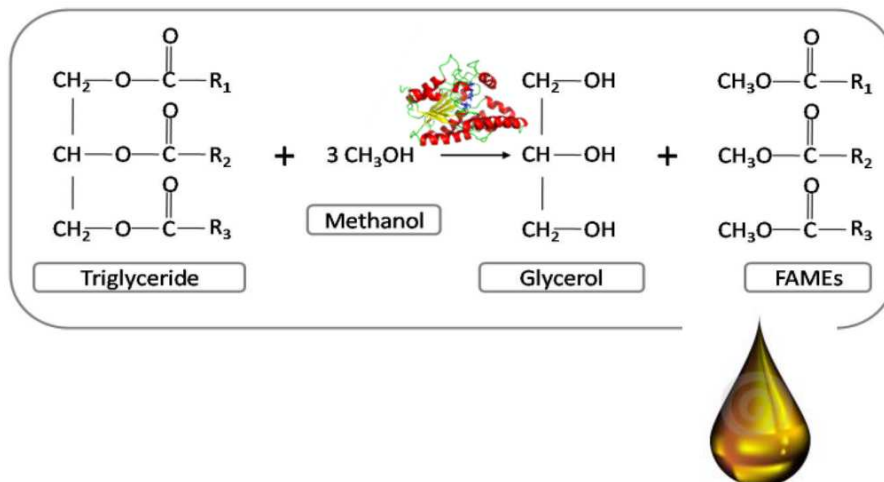


141. ábra Kakaóvaj pótló anyag előállítása napraforgó olajból

a gyártási folyamatba. A maradékot lehűtve a sztearinsav észterek kikristályosodnak, az olajsavak olvadékban maradnak. A szilárd fázist lecentrifugálva kapjuk a kakaóvaj pótló anyagot, a felülúszóban maradó gliceridek visszakerülnek a reakcióba.

8.5.7.6. Esettanulmány: átészterezés alkoholokkal – biodízel üzemanyag enzimés előállítása

A fosszilis eredetű üzemanyagok kiváltásának egyik lehetősége, hogy növényi olajokat használunk fel belső égésű motorok hajtóanyagaként. Ipari mennyiségben a repce, illetve napraforgó olaj jöhet számításba. Ezek egyes dízel erőgépekben (pl. traktorokban) közvetlenül is felhasználhatók, de az égés nem tökéletes és sok kellemetlen melléktermék keletkezik. A trigli-

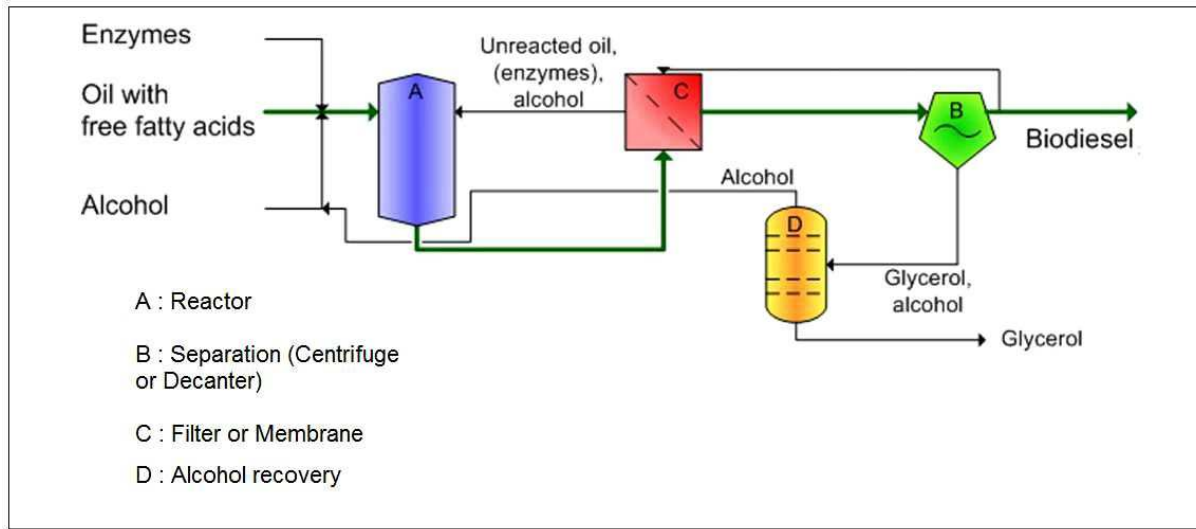


142. ábra Biodízel üzemanyag gyártása napraforgó olajból

ceridek túl nagy molekulák, illékonyosságuk, gőznyomásuk kicsi. Célszerűen ezeket a kisebb és illékonyabb zsírsav metilészterekké alakítják át, és ezt használják üzemanyagként. A folyamat egy lépésben átészterezéssel hajtható végre. Ez megvalósítható a klasszikus kémiai úton, kálium hidroxidos főzéssel is. Ez az eljárás olcsóbb, de a melléktermékként keletkező lúgos gyan-ta/iszap veszélyes hulladék, ártalmatlanítása külön költségekkel jár. Lipáz enzimmal viszont enyhe körülmények között, ártalmatlan melléktermékek nélkül megoldható a gyártás. Ehhez olyan

nem-specifikus lipázra van szükség, amely mindhárom észter kötést egyforma sebességgel bontja (142. ábra).

Az enzimeket membránnal vagy más módon visszatartják a reaktorban. A keletkező glicerin külön fázist képez, elválik az olajtól és így centrifugális szeparátorral elválasztható. A maradék metanol is megoszlik a két fázis között, túlnyomó része a glicerines fázisba oldódik. Ezt a két anyagot desztillációval szétválasztják, a metanolt vissza lehet vezetni a reakcióba, a glicerin mint hasznos termék értékesíthető. Az olajos fázis megfelelő konverzió esetén egyből használható üzemanyagként, ha viszont sok a maradék glicerid, akkor azokat kifagyasztással el lehet távolítani (143. ábra).

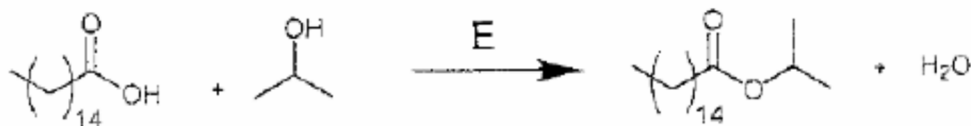


143. ábra A biodízel gyártás technológiai folyamata

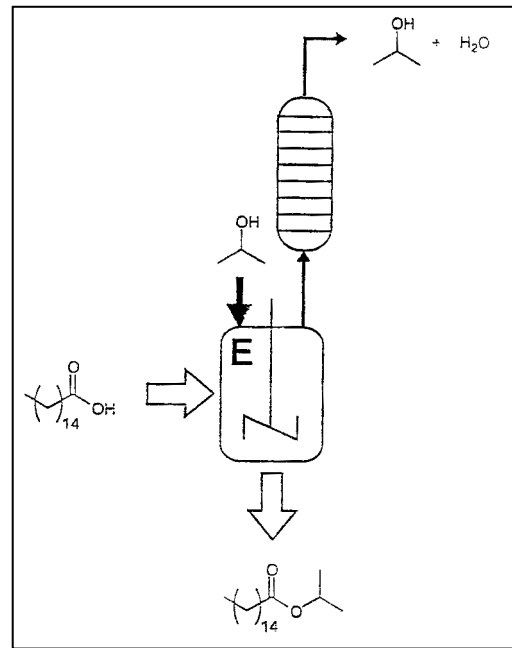
8.5.7.7. Esettanulmány: észter képzés lipázzal – izopropil-palmitát/mirisztát

Az észter képződés egyszerű egyensúlyi kémiai reakció, amely sav illetve bázis katalízissel megy végbe. Katalizátorként lipáz enzimet is alkalmazhatunk. A konverzió növelése érdekében a képződő vizet el kell távolítani a rendszerből. Erre több megoldást is találtak: - azeotróp desztillációt, - pervaporációt.

Az izopropil palmitát és mirisztát a kozmetikai iparban nagy mennyiségben használatos krémek, szappanok, testápolók alapkomponenseként. Az észter előállítását immobilizált enzimmel (*Candida antarctica* lipáz) oldják meg.



Az oldószer a kis víztartalmú izopropanol, ebben oldják fel a palmitinsavat (pH=7-nél nem-disszociált, apoláris formában van). A reakció optimális hőmérséklete 60 °C. A keletkező víz eltávolítását folyamatos azeotróp desztillációval oldják meg. Az izopropanol-víz rendszer minimális forrponú azeotrópot alkot, amelynek forrponja 80,4 °C. Ez túl magas az enzim optimális hőmérsékletéhez képest, ezért vákuumdesztillációt alkalmaznak 60 °C-on. A távozó izopropanolt folyamatos adagolással pótolják. A szakaszos reakcióban 14 óra alatt 99% fölötti kitermelést lehet elérni (144. ábra).



144. ábra Észter előállítása lipáz enzimmel

9. MIKROBIÁLIS POLISZACHARIDOK

9.1. Általános bevezetés

A nagy mennyiségben rendelkezésre álló növényi poliszacharidokat már régóta alkalmazzák a háziipar és az ipar területén (keményítő, cellulóz, agar-agar, alginát, pektin, inulin, karragén, guar gumi, módosított keményítő, gabonaglükánok, gumiarábikum stb.). A növényi forrásokból izolált poliszacharidokkal összehasonlítva a hasonló célokra is felhasznált mikrobiális poliszacharidok előnye, hogy a gyártás nagy volumenben, viszonylag kis terület- és időigénnyel, jól szabályozottan megoldható. A termék állandó minőségű, a piaci igényeknek megfelelően állítható elő, szemben a növényi eredetű termékekkel, amelyek termelése a tenyésztőtől, évszaktól, időjárástól függ és kémiai jellemzői sem állandóak.

A növényi alapú hidrokolloidokkal összehasonlítva fermentált anyagok előnye, hogy a termelés időigénye rövidebb, a több hónapos tenyésztővel szemben csak néhány nap, és nem foglal el mezőgazdasági területeket. Ezzel együtt a termelési költség a döntő tényező, amely meghatározza a mikrobiális eredetű anyagok elterjedését. A költségek meghatározó elemei a szubsztrát ára, valamint a (nagy méretű) fermentor beruházása és üzemeltetése.

Számos érdekes tulajdonságokkal rendelkező, jól alkalmazható biopolimert fedeztek fel és vizsgáltak meg laboratóriumban, de mégis csak néhány vált nagy léptékben gyártott terméké. Ennek okai többfélék, de elsősorban a gyártási nehézségek teszik gazdaságtalanná a termelést. A magas termelési költségek, az alacsony poliszacharid hozamok, melléktermékek képződése és a feldolgozási műveletek (downstream) bonyolultsága egyaránt problémát jelentenek. Ezek megfelelő mérnöki optimalizálással csökkenthetők. Ehhez a folyamat mélyebb megértésére (process understanding) van szükség, mind a mikrobiális fiziológia, mind a bioszintézis és genetika, mind az upstream és downstream műveletek területén.

Gondot okozhat, hogy a termelő törzs gyakran többféle poliszacharidot is termel párhuzamosan, illetve az egyes termékek sem homogének, móltömegük és elágazási fokuk nem egységes. Ez a törzs tulajdonságain túl a tápoldat összetételétől, a fermentációs körülményektől és a tisztítási lépések hatásosságától is függ.

Egyes mikrobiális poliszacharidok közvetlenül helyettesíthetik a növényi (pl. guar gumi, gumiarábikum vagy pektin) vagy alga eredetű (pl. karragén vagy alginát) anyagokat. Mások viszont speciális egyedi tulajdonságaikkal újabb alkalmazási lehetőséget teremtettek. Azok váltak iparilag fontos terméké, amelyek kitűntek kedvező reológiai tulajdonságaikkal, vagy helyettesítettek valamilyen nehezen vagy korlátozottan hozzáférhető anyagot. Több, eredetileg összetett élőlényekből kivont poliszacharid termelését is megoldották már mikrobákkal. Így gyártanak már mikrobiális cellulózt, alginátot, hialuronsavat, sőt heparint is.

A hidrokolloidok globális piacát a mikrobiális polimerek növekvő aránya ellenére még a növényi- és alga eredetű poliszacharidok (pl. keményítő, galaktomannánok, pektin, karragén és alginát) dominálják. Az összes piaci forgalomból a xantán, a legjelentősebb fermentált anyag is csak 6%-kal részesedik.

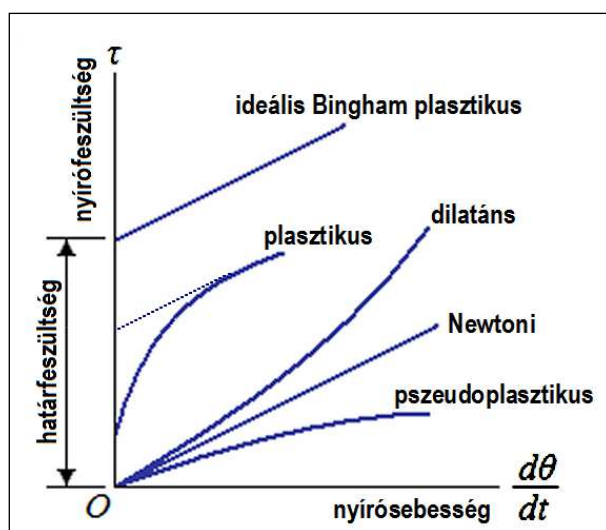
A mikrobiális poliszacharidok vagy extracelluláris vegyületek vagy a sejthez kötött anyagok. Lehetnek elsődleges (pl. sejttal biopolimerek) vagy másodlagos anyagcseretermékek. Funkciójuk többféle lehet. Egy részük a sejttal alkotórésze (mint például a gombák β -glükánjai), vagy tartalék tápanyag (mint például a poli-hidroxibutirát), vagy a kiszáradás ellen védő nyálkaanyag. Alkothatnak külső nyálkás réteget, ami valamilyen felületre ragasztja a sejtet (mint például xantán és gellán) vagy képezhetnek merev kapszulát, ami megvédi a sejteket a kedvezőtlen körülmények (pl. szélsőséges pH, kiszáradás, oxigén stressz, antibiotikumok, fagociták) hatásai ellen.

Sokuk természetes összetevő az élelmiszereinkben (pl. az ehető gombákban vagy a sör-élesztőben), másokat évtizedek óta adalékként használnak az élelmiszeriparban, valamint a gyógyszerekben, kozmetikai és egyéb ipari területeken, az olajiparban, a biológiailag lebomló műanyagokban.

9.1.1. Tulajdonságok

9.1.1.1. Reológiai tulajdonságok

A poliszacharidok használata vizes oldataik érdekes reológiai tulajdonságain alapul. Egyesek viszonylag kis koncentrációban is gélt képeznek, amit sok területen fel lehet használni. Mások nagy viszkozitásukkal és nem-newtoni viselkedésükkel tűnnek ki. Az időtől független reológiai alaptípusokat mutatja be a 145. ábra. A newtoni folyadékok folyásgörbéje az origóból induló egyenes, meredeksége a dinamikai viszkozitás.

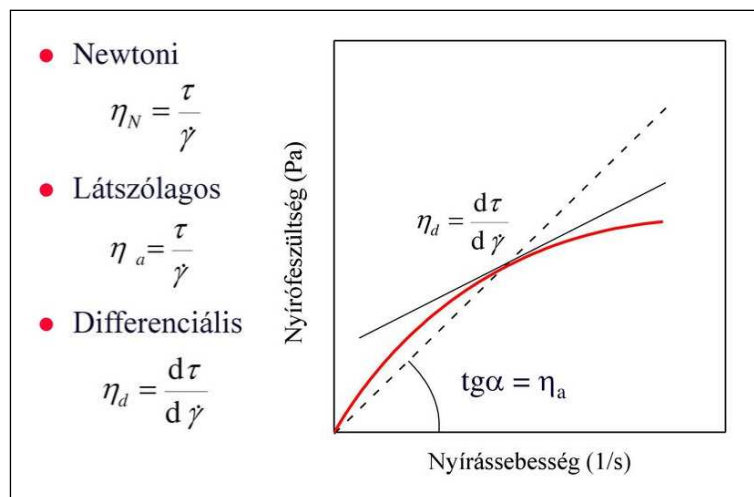


145. ábra A reológiai folyásgörbék alaptípusai

A poliszacharid oldatok általában pszeudoplasztikus viselkedésűek, a folyásgörbe „lehajlik”. Leegyszerűsítve ez azt jelenti, hogy az oldat kis nyírósebességnél nagy viszkozitású, nagy nyírósebességnél viszont kis viszkozitást mutat. Az kapcsolat hatványfüggvénnyel írható le: Newtoni fluidum esetén n értéke 1, pszeudoplasztikus esetben egynél kisebb, dilatáns esetben egynél nagyobb.

$$\tau = \dot{\gamma}^n$$

A nem-newtoni folyadékok viszkozitása tehát pontról pontra változik. Az adott nyírósebességhez tartozó ún. látszólagos viszkozitást kétféleképpen is értelmezik. Tekinthető egyrészt a nyírófeszültség és a nyírósebesség hányadosának. Grafikusan ez az origóból az adott pontba húzott egyenes meredekségeként olvasható le. Más megközelítés szerint az adott pontban a folyásgörbéhez húzható érintő meredeksége. Ellenőrző méréseknél az első módszer a praktikusabb, mert csak egy értéket kell leolvasni. A meredekség megadásához viszont sok pontot kell felvenni, arra függvényt illeszteni és annak meredekségét kiszámítani.



146. ábra A látszólagos viszkozitás értelmezései pszeudoplasztikus fluidumnál

9.1.1.2. A poliszacharidok szerkezete:

A szacharidok gyűjtőnévbe sokféle cukor fér bele, a leggyakoribbak a glükóz, fruktóz, és a mannóz. Emellett jellemzőek a cukorsavak is, sokféle cukorból levezethető -on-savak és -uron-savak is előfordulnak. Ezek viselkedése az anionos csoportok miatt pH-függő. A cukrok -OH csoportjaihoz szerves savak kapcsolódhatnak (ecetsav, piroszőlősav, glicerinsav, borostyánkősav) észter vagy ketál formában.

Az alkotó elemek fajtái szerint megkülönböztethetünk homo- és hetero-poliszacharidokat. A homopoliszacharidok egyféle monoszacharid egységből épülnek fel, például a dextrán, a pullulán, a szkleroglükán, a kurdlán glükóz homopolimerek, eltérő kötésekkel. A xantán és a (mikrobiális) alginát többféle cukorból álló, ismétlődő egységeket tartalmaz.

EPS	Alkotó komponensek	Töltés	Molekulatömeg	Főbb tulajdonságok	Alkalmazási területek	Piac (tonna/év)	Piac (US\$)	Ár (US\$/kg)
Xantán	Glükóz Mannóz Glükuronsav Acetát Piruvát	Anionos	(2.0-50) x 10 ⁶	Hidrokolloid - Nagy viszkozitás kis koncentrációban és kis nyírósebességnél is; - Stabilitás széles pH, só koncentráció és hőmérséklet tartományban	Élelmiszerek Olajipar Gyógyszerek Kozmetikumok és testápoló cikkek Mezőgazdaság	96 000	235 millió	3 - 5
Gellán	Glükóz Ramnóz Glükuronsav Acetát Glicerát	Anionos	5.0 x 10 ⁵	Hidrokolloid - Stabilitás széles pH tartományban Gélesítő kapacitás Termoreverzibilis gélek	Élelmiszerek Állateledel Gyógyszerek Kutatás: agar helyettesítő és elektroforézis gél	N.A.	15 millió	55-66
Alginát	Guluronsav Mannuronsav Acetát	Anionos	(0.3-1.3) x 10 ⁶	Hidrokolloid Gélesítő kapacitás Filmképzés	Élelmiszerek Hidrokolloid Orvosi: - Sebészeti kötszerek - Sebkezelés - Szabályozott gyógyszer bevitel	30 000	N.A.	5-20
Cellulóz	Glükóz	Neutrális	10 ⁶	Kristályos szerkezet Oldhatatlan a legtöbb oldószerben Nagy szakítószilárdság Formázható	Élelmiszerek (emészthetetlen rost) Orvosi: - Sebkezelés - Véredények - Hangszóró membránok	N.A.	N.A.	5.8-12

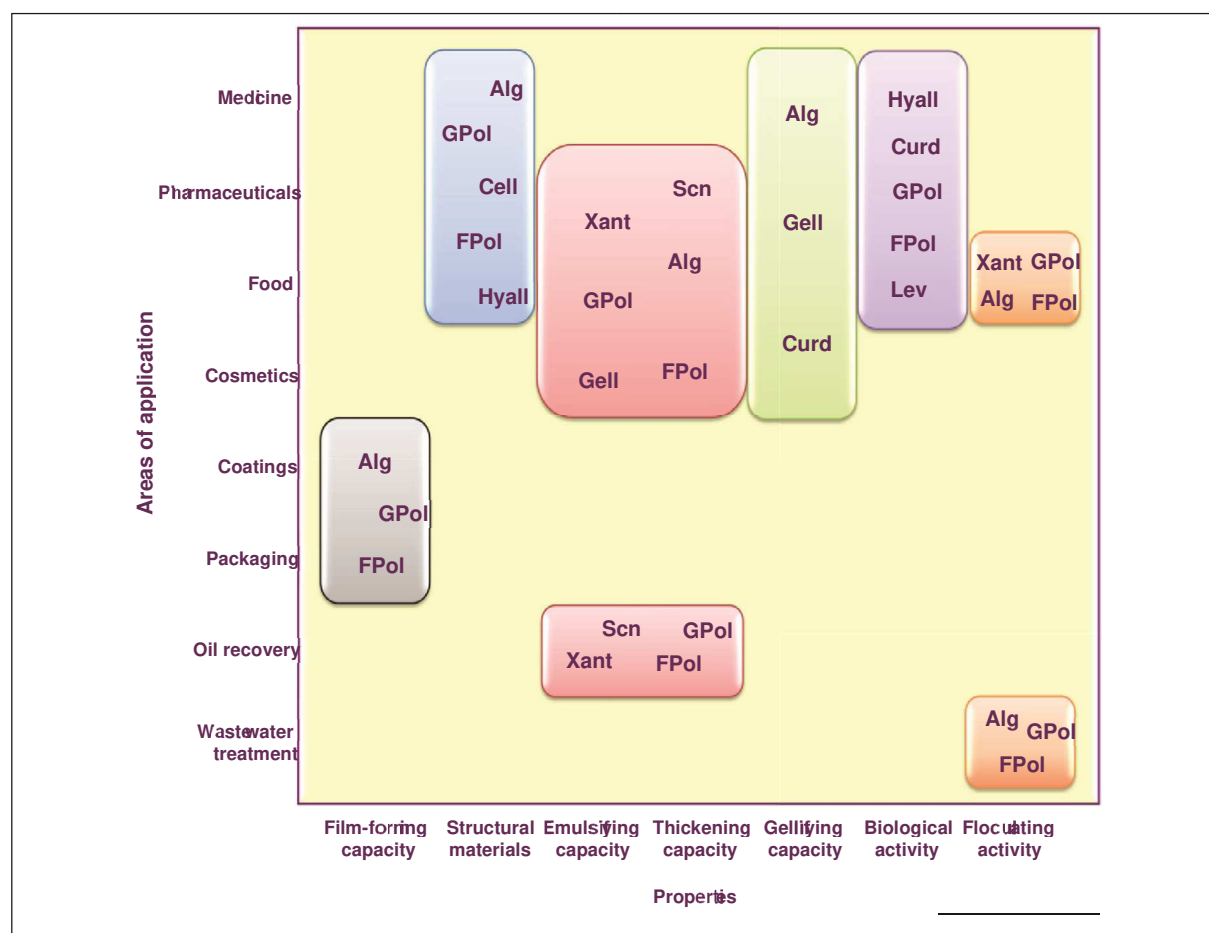
Dextrán	Glükóz	Neutrális	$10^6 - 10^9$	Nem-ionos Newtoni folyadékként viselkedik	Élelmiszerek Orvosi: Vérplazma pótló Kromatográfiás töltet	2 000	N.A.	N.A.
Kurdlán	Glükóz	Neutrális	$5 \times 10^4 - 2 \times 10^6$	Gélképző Vízben oldhatatlan Ehető és nem toxikus Biológiailag aktív	Élelmiszerek Gyógyszeripar Nehézfémek eltávolítása Beton adalék	N.A.	N.A.	55
Hialuronsav	Glükuronsav Acetil- glükózamin	Anionos	2.0×10^6	Biológiailag aktív Erősen hidrofil Biokompatibilis	Orvosi Táptalaj gél	N.A.	1 000 millió	100 000
Szukcino- glikán	Glükóz Galaktóz Acetát Piruvát Szukcinát 3-hidroxi- butirát	Anionos	LMW < 5×10^3 HMW > 1×10^6	Pszudoplasztikus viszkózitás szabályozó Savtűrő	Élelmiszerek Olajkinyerés	N.A.	N.A.	N.A.
Leván	Fruktóz	Neutrális	3.0×10^6	Kis viszkózitás Jó vízoldhatóság Biológiailag aktív: - Antitumor aktivitás - Gyulladáscsökkentő Jól tapad Filmképzés	Élelmiszerek (prebiotikumok) Takarmány Gyógyszerek Kozmetikumok Egyéb ipar	N.A.	N.A.	N.A.

28. Táblázat A legismertebb mikrobiális poliszacharidok: a fizikai-kémiai és funkcionális tulajdonságok, a fő alkalmazási területek és a piaci adatok áttekintése

9.1.1.3. *Funkcionális tulajdonságok és alkalmazások*

A molekulák vizes oldatban sokféleképpen rendeződhetnek el és ez meghatározza tulajdonságaikat és ipari alkalmazhatóságukat. Jó példa erre a gellán és xantán különböző viselkedése. Mindkettő negatív töltésű heteropoliszacharid, de más a polimer összetétele és szerkezete. A lineáris gellán molekulák magasabb hőmérsékleten rendezetlen tekercset alkotnak, de lehűtve kettős spirál formába mennek át. Nagyobb koncentrációban ezek vastagabb rúd-szerű aggregátumokká alakulnak át és makroszkopikus gél képeznek. A kialakuló gél tulajdonságai az acil csoportok jelenlététől függenek: az acilezett forma rugalmas és hőálló zselét ad, míg a dezacilált anyagból merev, kemény gél lesz. Ennek megfelelően a gellánt több iparágban is gélesítő adalékként használják (28. táblázat). A xantán viszont elágazó láncú, és bár alkot kettős spirált, de nem hoz létre gél szerkezetet. Ehelyett az összefonódott polimer láncok nagyon viszkózus oldatot eredményeznek. Így a xantánt viszkozitás-fokozóként alkalmazzák (28. táblázat).

Az egyes polimerek tulajdonságai drámaian megváltoztathatók a más biopolimerek hozzákeverésével. Jól ismert példa a galaktomannánok (pl. szentjánoskenyérmag, locust bean gum) összekeverése xantánnal, ami az előbbiekkal ellentétben gél szerkezet kialakulásához vezet.



147. ábra A mikrobiális polimerek alkalmazási területei

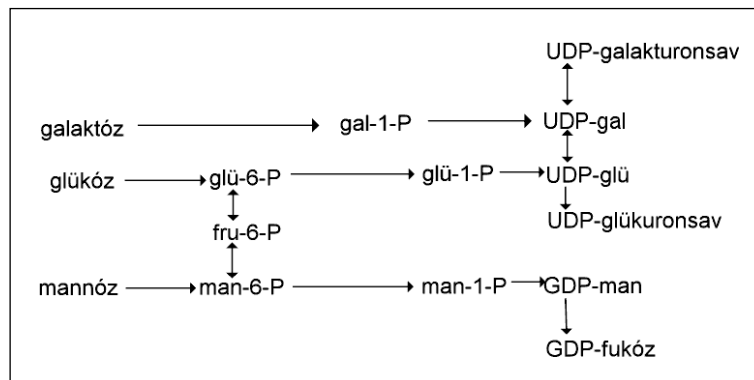
Ezen túlmenően a kémiai átalakítások is jelentősen megváltoztathatják a funkcionális tulajdonságokat. A savcsoportok eltávolítása, keresztkötések létrehozása, kovalens kötések más biopolimerekkel mind javíthatják a polimerek tulajdonságait.

A poliszacharidokat nem-newtoni viselkedésük és a nagy viszkozitásuk miatt már széles körben használják értékes termékek (élelmiszer-, gyógyszer-, és kozmetikai ipar) gyártásánál, legtöbbször töltő-, stabilizáló-, kötő- és szerkezetjavító adalékként (147. ábra), (28. táblázat).

Az élelmiszeripari termékekben alkalmazott anyagoknak kompatibilisnek kell lenniük az élelmiszer-összetevőkkel és az előforduló sokféle pH és ionerősség mellett is meg kell tartaniuk kedvező tulajdonságaikat.

9.1.2. A poliszacharidok bioszintézise

A poliszacharidok bioszintézisének a sejtek belsejében lévő monoszacharidok előbb foszfo-nukleotiddá alakulnak át (pl. UDP-, TDP-, GDP-cukor), amelyek azután a sejtmembránba kötött lipid templát molekulákra teszik át a cukrokat. A glükóz polimereknél elsőként a glikolízis köztiterméke, a glükóz-6-foszfát alakul át glükóz-1-foszfáttá és ez kapcsolódik a nukleotidokhoz (148. ábra).



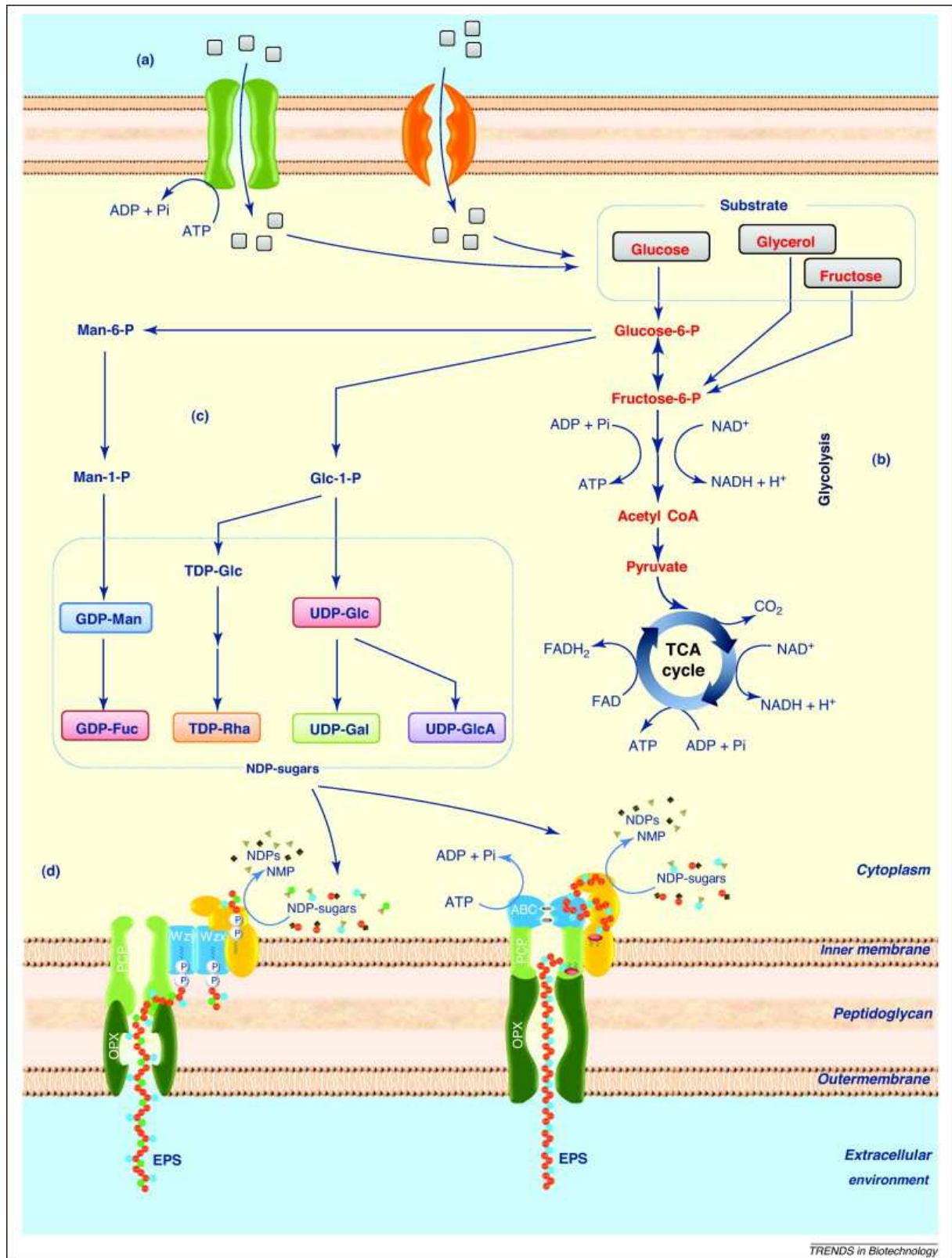
148. ábra A nukleotid-cukrok kialakulása

A sejtfa poliszacharidok és számos exopoliszacharid részben vagy teljesen intracellulárisan, a sejten belül alakul ki, de például a dextrans, leváns, alternánt a sejt felszínén lévő enzimek szintetizálják.

A részlegesen intracelluláris exopoliszacharid szintézisben a lipid karrerek is jelentős szerepet játszanak. Ezek hosszú szénláncú foszforsav-észterek és izoprenoid alkoholok, amelyek apoláris láncukkal a sejtmembrán lipid rétegében rögzülnek. A foszfát csoportok kezdetben befelé állnak és ezen szerelődnek össze a polimer részegységei. A továbbiakban ezek átfordulnak a membrán külső oldalára, és ott következik be a polimerizáció (149. ábra).

Néhány speciális esetben az általános mechanizmustól eltérően a polimerizáció a membrán belső oldalán zajlik, és az egész láncot viszik ki a sejtől a lipid hordozóhoz kapcsolt exportőr fehérjék.

A komplex heteropoliszacharidok, mint például a xantán és a gellán bioszintézis útja rendszerint bonyolultabb, több lépésből áll, mint a homopoliszacharidoké.



149. ábra A poliszacharidok bioszintézise

9.1.3. Termelő törzsek

A poliszacharid képzés általánosnak mondható minden nagyobb rendszertani egységben. A termelő baktériumtörzsek mellett ott vannak az élesztők (BYG = bakers yeast glucan), a fonalas gombák (pullulán, szkleroglükánok), sőt a kalapos gombák is (shii-take – lentinán).

A legtöbb mikroorganizmus termel felületi poliszacharidokat, de néhányuk stresszes állapotban képes nagyobb mennyiséget (>40 g/l) is előállítani.

A mai napig, csak néhány bakteriális poliszacharid vált ipari terméké, ezeket a 29. táblázat foglalja össze. A közeli rokonságban álló fajok bioszintetikus útjai hasonlóak, ezért a termelt poliszacharidok szerkezete és tulajdonságai is hasonlóak.

Termelő törzs	Poliszacharid
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Szukcinoglikán
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Szukcinoglikán
<i>Rhizobium meliloti</i>	Szukcinoglikán
<i>Halomonas eurihalina</i>	Leván
<i>Zymomonas mobilis</i>	Leván
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Glükán
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrán
<i>Gluconacetobacter xylinum</i>	Cellulóz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alginát
<i>Pseudomonas putida</i>	Alginát
<i>Sphingomonas elodea</i>	Gellán
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Gellán
<i>Xanthomonas sp.</i>	Xantán

29. táblázat Ipari jelentőségű poliszacharidokat termelő baktériumok

A törzsek termelőképességének javítására genetikai módosítással kevés lehetőség van. A bioszintézis megszakítása mutációval egyszerűbb termékeket eredményezhet (például nem kerülnek rá a cukrokra a szerves savak), de ez nem változtatja meg alapvetően a termék minőségét és mennyiségét.

9.1.4. A poliszacharidok gyártása (általános elvek)

A mikrobiális poliszacharidokat nagyrészt fermentációval állítják elő, a folyamatnál a szokásos technológiai paramétereket kell beállítani, optimálni: tápoldat összetétel, pH-érték, hőmérséklet, levegőztetés, oldott oxigén szint. A tápoldat lehet szintetikus, glükóz vagy szacharóz szénforrással, illetve állhat komplex, mezőgazdasági vagy élelmiszeripari melléktermékekből (pl. melasz, kukorica szirup, deproteinizált savó, burgonya és gyümölcs maradék, stb.). Néhány esetben a de novo fermentáció helyett enzimes biokonverzióval termelik a poliszacharidokat.

A termelt biopolimer mennyiségére és minőségére egyaránt hatással van a törzs kialakítása (metabolikus és géntechnológia), az (upstream) folyamatoptimalizálás, és a termékizolálás hatékonysága. Ez utóbbi a végtermék kinyerése és tisztítása centrifugálással vagy szűréssel, csapadékképzéssel és szárítással.

A technológiai optimalásról vannak adatok a xantán, gellán, pullulán és szkleroglükán gyártásáról, ugyanakkor más mikrobiális poliszacharidok előállításáról alig van információ. Azonban megfogalmazható néhány általános szabály, amely legtöbb folyamatra érvényes.

Tápközeg:

A nagy C/N arány bizonyítottan minden poliszacharid termelését elősegíti, kevesebb biomassza és több poliszacharid keletkezik. A nitrogén és foszfát limitáció egyaránt fokozza a termékképzést, célszerű ezek indulási koncentrációját úgy megválasztani, hogy a sejtszaporodási szakasz végére elfogyjanak. A szénforrás általában 20-40 g/l cukornak felel meg.

A szén és nitrogén forrás megválasztása befolyásolja a biopolimer termelést. A xantánt többféle szénforráson is elő lehet állítani, de a kihozatal változó. A glükózon, szacharózon, maltózon és oldható keményítőn kapott hozamok ebben a sorrendben csökkennek. A fermentációs tápoldatban lévő cukrok aránya befolyásolhatja a heteropoliszacharidokat alkotó cukor monomerek arányát. A dextrán és a leván gyártásának szubsztrátja egyértelműen a szacharóz.

Szénforrásként előnyös mezőgazdasági, élelmiszeripari vagy ipari melléktermékeket (melasz, sajtgyári savó vagy glicerin) felhasználni, azonban ezek alkalmazásánál problémák léphetnek fel. Az eltérő tápanyag összetétel és a szennyező anyagok hatására más anyagcserutak is működésbe léphetnek, így más polimerek és/vagy (nem kívánt) melléktermékek is képződhetnek. A nem hasznosuló komponensek inhibítorként működhetnek, csökkentve a termékképzést.

A nagy tisztaságú (pl. orvosi célú) termékek előállításához jó minőségű, tiszta alapanyagokat kell felhasználni, hogy csökkenthessük a tisztítás költségeit, a szennyeződésnek átvitelének kockázatát. Ilyen esetekben a hulladékok vagy melléktermékek használatáról le kell mondani, vagy a downstream lépések költségei jelentősen megnőnek.

A nitrogénforrás minősége a törzsek igényétől függ. A fonalas gombáknál megfelelnek a szerves nitrogén sók is, de más törzsek szerves N-forrást igényelnek (pl. a *Xanthomonas*-ok és a tejsav baktériumok, mint a *Leuconostoc mesenteroides*).

A minimál táptalaj komponensein túl egyes esetekben vitamin, aminosav és prekursor kiegészítésre is szükség van.

A poliszacharidok termelése a termékképzési kinetika szempontjából is változatos, többféle típust is azonosíthatunk, de a poliszacharidok általában másodlagos anyagcseretermékeknek, szekunder metabolitoknak tekinthetők. De akad példa a növekedéshez kötött bioszintézisre (gellán, bakteriális cellulóz és az élesztő glikánok) és a limitált szakaszban megjelenő, sejtszámhoz kötött termékképzésre (kurdlán) is.

A tápanyag adagolás stratégiája is befolyásolja a fermentáció hatékonyságát. Ipari méretben a szakaszos technológia az általános, de sokszor kiegészítik rátáplálással (fed batch). Ezzel kiküszöbölhető a szubsztrát inhibíció, és javulhat a végtermék koncentráció. Az elérhető termék koncentrációnak viszont gátat szab az a jelenség, hogy a felhalmozódó polimer olyanira viszkózussá teszi a fermentlevet, hogy a tápanyag transzport gyakorlatilag megszűnik, és ezzel a tenyészet saját magát fojtja meg. A nagy oxigén igényű xantán fermentációnál ez kb. 3%-nál következik be, míg az anaerob dextrán gyártásnál 8%-ig is el lehet menni.

A hőmérséklet és a pH is kontroll változói a fermentációknak. A bakteriális fermentációk esetében az optimális hőmérséklet legtöbbször 28-30 °C körül van, míg a gombáknál a poliszacharid szintézisének optimális hőmérséklete általában valamivel alacsonyabb, 25-28 °C körüli. A kiválasztott hőmérséklet gyakran kompromisszum a sejtnövekedés és a termékképzés optimuma között. Ha ez a két optimum jelentősen eltér, akkor célszerű a hőmérsékletet változtatni, kétszakaszos eljárást kidolgozni.

Az optimális pH-t is elsősorban a mikroorganizmus határozza meg. A baktériumok tipikusan a semleges közeget kedvelik, a 6-7 közötti pH tartományt. Ugyanakkor anyagcseréjük során a cukrokból szerves savakat termelnek, ami csökkenti a pH-t, és lelassítja a folyamatokat. Emiatt a savakat közömbösíteni kell, pH méréssel és szabályozással az értéket az optimális tartományban tarthatjuk. A poliszacharid termelő gombák lényegesen savasabb közegben

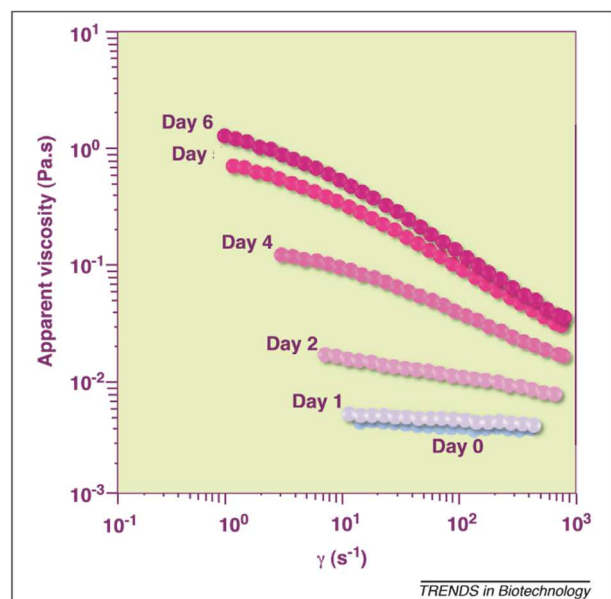
működnek optimálisan. A szkleroglukánnál a 3,5-4,5; a pullulánnál 4,5-5,5 a legkedvezőbb pH tartomány.

A levegőztetés és keverés szintén fontos tényező a fermentációs poliszacharid előállításánál. Mivel a termelő mikroorganizmusok nagy része aerob, az oxigén szükséges a sejtnövekedéshez. Az intenzív levegőztetés a pullulán és a xantán esetében serkentő hatású a poliszacharid szintézisre. Más törzseknél viszont az alacsony oldott oxigén szint visszafogja ugyan a sejtek szaporodását, de fokozza a polimer szintézist. Ennek lehetséges magyarázata lehet az, hogy az oxigén hiány az egyik a szekunder metabolizmust kikényszerítő stresszelő körülmények közül.

Az oxigén bevitel és a keverés néha egymástól függetlenül hat. A gellán fermentáció esetében a magas oxigén szint, a nagy levegő bevitel (1 VVM felett) csökkenti a hozamot, ugyanakkor az intenzív keverés (pl. 500 rpm) alapvető fontosságú ennél a viszkózus fermentálnél. A növekvő viszkozitás a legtöbb mikrobiális poliszacharid termelésénél fellépő általános probléma. A kialakuló egyre nagyobb viszkozitás egyre jobban korlátozza a tápanyagok, ezek között az oxigén transzportját, különösen, ha a tenyészetben a sejtek nem egyesével, hanem csoportosan vannak jelen. Általánosan megfogalmazható, hogy nagy nyíróerejű keverés szükséges.

Más törzseknél viszont mikroaerofil (bakteriális alginát) vagy teljesen anaerob (dextrán *Leuconostoc mesenteroides*-sel) környezetet kell fenntartani.

A poliszacharidok gyártása során a fermentálé reológiája drasztikusan változik. A lé kezdetben vízhez hasonló newtoni folyadék, ami fokozatosan egy nagyon viszkózus pszeudoplasztikus viselkedésű folyadékká válik. Ez a változás jól látható a 6. ábrán. Az indulásnál a viszkozitás közel állandó (newtoni), az idő előrehaladtával viszont nem csak növekszik, hanem egyre erőteljesebben függ a nyírósebességtől (pszeudoplasztikus). A viszkozitás ilyen mértékű növekedése megnehezíti az átkeverést, és reaktorban lévő lé már nem lesz homogén. Ez pedig már megnehezíti a levegőztetést, a beadagolt anyagok elkeveredését, és a méréseket is, mivel a benyúló szenzorok környezete nem reprezentálja a fermentálé egészét. A pszeudoplasztikus jellegből levezethető, hogy a keverő közelében, ahol nagy a nyíróhatás, kicsi lesz a viszkozitás, azaz gyorsabb az anyagátadás. Távolabb, ahol a keverő már nem tud elég turbulens áramlást létrehozni, nagyobb a viszkozitás és romlik az anyagátadás. A holt terek kialakulását úgy akadályozhatjuk, hogy növeljük a keverő átmérőjét és optimaljuk a lapátok kialakítását. Az átmérő növelésével viszont olyan mértékben nőne a teljesítményfelvétel (a méret ötödik hatványával), hogy a fordulatszámot le kell csökkenteni. Ennek megfelelően a fermentorok nem túl nagyok, az 50-200 m³ mérettartományba tartoznak.



150. ábra Poliszacharid fermentálé látszólagos viszkozitásának változása a fermentáció során, log-log ábrázolásban

9.1.4.1. *Kinyerés és tisztítás*

Az extracelluláris mikrobás poliszacharidok kinyerése a fermentléből általában három szakaszból áll: 1. a sejtek eltávolítása, centrifugálással vagy szűréssel; 2. a polimer kicsapása a sejtmentes léből vízzel elegyedő szerves oldószerrel (pl. metanol, etanol, izopropanol vagy acetone); 3. a kicsapott polimer szárítása, fagyasztva szárítással (laboratóriumi méretben) vagy dobszárítóval (ipari méretekben).

Sok esetben a fermentlevet a vágás után, még a fermentorban, a sejtek elválasztása előtt pasztörözik (90-95 °C-on). A hőkezelés célja a baktériumsejtek elpusztítása és a terméket bontó enzimek inaktíválása. Emellett magasabb hőmérsékleten kisebb a lé viszkozitása, ami megkönnyíti a következő szűrést vagy a centrifugálást.

Ezután következhet a sejtek elválasztása szűréssel vagy centrifugálással, de nagy viszkozitás esetén a lé nem mindig szűrhető és centrifugálással sem ülepszíthető. Ha a fermentlevet vízzel, híg sóoldattal vagy alkoholokkal hígítjuk, akkor le lehet csökkenteni a folyadék viszkozitását, és ez megkönnyíti a szűrést, a szennyeződések eltávolítását. Ez viszont hátrányt jelent a következő lépésnél, mert lényegesen nagyobb mennyiségű sejtmentes felülúszó keletkezik, és ebből következően nagyobb mennyiségű kicsapó oldószer szükséges. A sejtek elválasztás helyett eliminálhatók, lizálhatók lúgos vagy enzimes kezeléssel is.

A meghatározó lépés a termék oldószeres kicsapása. Vízzel elegyedő szerves oldószereket (alkoholok, acetone) adnak a léhez egy-kétszeres mennyiségben. Élelmiszer minőségű xantán előállításához az FDA izopropanolos kicsapást ír elő. A csökkenő polaritás miatt a poláris molekulák, így a poliszacharidok oldhatósága romlik, egy határon kicsapódnak. A csapadék-képzést elő lehet segíteni többértékű fémionokkal is, amelyek keresztkötéseket hozhatnak létre a láncok között. Ezt a csapadékot már lehet szűrni.

A kapott szemcsés anyagot levegővel/inert gázzal/vákuumban szárítják. A végterméket a kívánt szemcsenagyságú porrá őrlik.

Az eljárás mellékterméke hatalmas mennyiségű vizes oldószer, a fermentlé térfogatának akár két-háromszorosa. Ennek regenerálásához desztilláló üzemet kell telepíteni a fermentációs üzem mellé, ami jelentősen növeli a költségeket.

A terméket sokféle, kis és nagy molekulású vegyület szennyezheti. Ezek részben a tápoldatból származnak, részben a sejtek anyagcseréjének termékei (pl. sejttermelékek, sók és fehérjék). A további tisztításhoz már minden egyes biopolimerre megfelelő technikát kell kiválasztani és optimalizálni a termék molekula szerkezeti és fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a kívánt tisztaság és rendeltetészerű használat alapján. Tisztulást lehet elérni az átkristályosításhoz hasonlóan az anyag újraoldásával és ismételt kicsapásával. A fehérjéket el lehet távolítani szelektív kicsapással (pl. kisózással, triklór-ecetsavval) vagy enzimekkel (proteázokkal). Alkalmazható ezen kívül membránszűrés (pl. ultraszűrés) is. Ha a fehérjék eltávolítását olyan vegyszerek hozzáadásával hajtják végre, amelyek reakcióba léphetnek az EPS komponensekkel, akkor az negatív hatással lehet a polimer minőségére, vagy csökkenhet a termék kihozatala. Ezért meg kell találni a technológiai kompromisszumot a termék kihozatala, tisztasága és minősége között.

A legszigorúbb tisztasági követelmények, a gyógyszerkönyvi minősítés az orvosi felhasználású poliszacharidokra vonatkoznak. Az élelmiszer minőségű biopolimereknél enyhébbek az előírások, de ezek sem tartalmazhatnak pl. biomasszát (sejtterméket és más intracelluláris összetevőket) és a kinyeréshez használt segédanyagokat.

9.2. TERMÉKEK, TECHNOLÓGIÁK

9.2.1. XANTÁN

A xantán (angolul xanthan gum, azaz xantán gumi) egy tipikus bulk poliszacharid, amit viszkozitás növelő és stabilizáló tulajdonságai miatt alkalmaznak. Ezt a *Xanthomonas campestris*, egy Gram negatív növényi kórokozó termeli, amely a xantánnal, mint ragasztóval tapad a növények felületére. A törzs a keresztes virágúakra veszélyes, a káposztafélék nyálkás rothadását okozza (a nyálkaanyag maga a xantán).

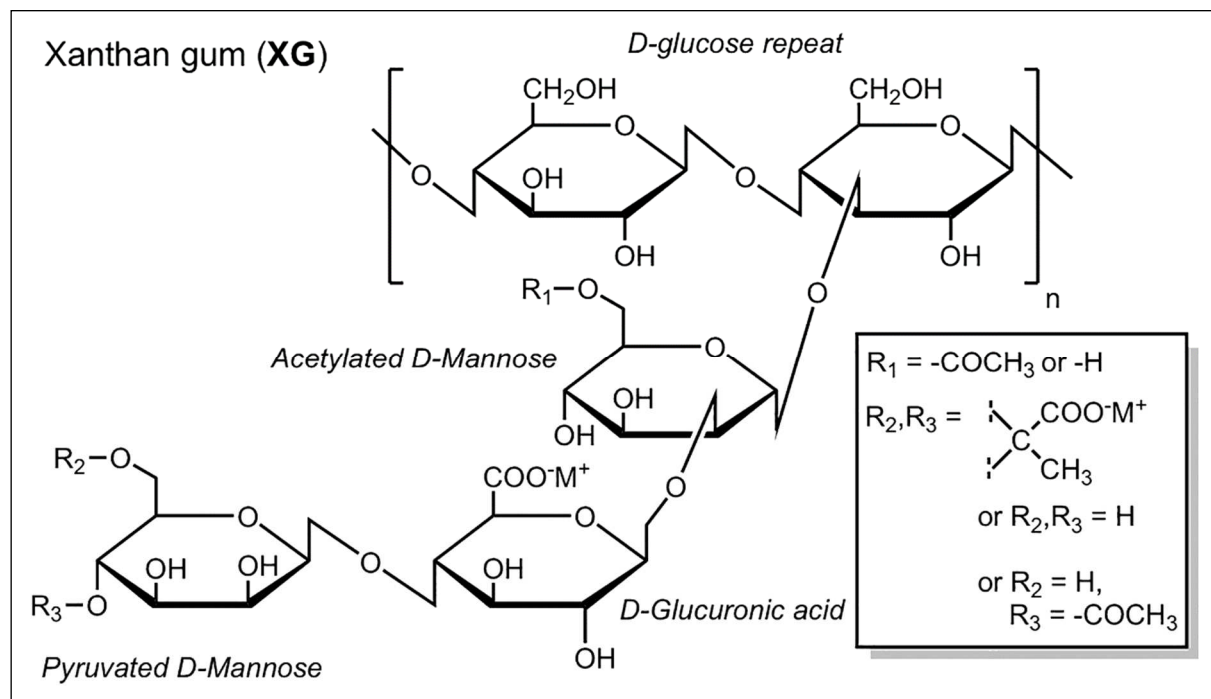
1963-ban fedezték fel, és hamarosan gyártani is kezdték az élelmiszeripar számára, adalék kódja E415. Alkalmazását élelmiszer-adalékként az FDA mennyiségi korlátozás nélkül hagyta jóvá, mivel teljesen ártalmatlan anyagnak bizonyult.

A legnagyobb mennyiségben termelt mikrobiális poliszacharid, a piaca körülbelül 100.000 tonna évente, az ára 1-4 USD/kg között ingadozik.

9.2.1.1. Szerkezete:

A xantán lineáris főlánc (1-4) kötésekkel összekapcsolt β -D-glükóz egységekből áll, amelyben minden második cukorhoz a C-3 pozícióban egy triszacharid oldallánc kapcsolódik. Ebben az első mannózhoz egy glükuronsav kapcsolódik (1-2), ehhez még egy mannóz (1-4) kötéssel. Kémiai szerkezete a 7. ábrán látható. Móltömege 2.000.000 és 20.000.000 Dalton között mozog, ez részben a fermentációs körülményektől, részben az egyes láncok aggregációjának mértékétől függ. A természetes xantánban a belső mannózhoz a C-6 pozícióban egy ecetsav kapcsolódik észter kötéssel, az oldalláncok végén lévő mannózhoz pedig egy piruvát ketál formában.

Xantán a piruvil- és acetil-csoportjai savas (pH 3) vagy lúgos (pH 9) közegben eltávolíthatók, de ez nem befolyásolja a reológiai tulajdonságokat.



151. ábra A xantán kémiai szerkezete

A xantán térbeli szerkezete függ a közeg ionerősségétől. Kis ionerősségnél az egyenes, cellulóz-szerű főlánc körül az oldalláncok kinyúlnak. Nagyobb sókoncentrációknál viszont visszahajlanak a molekula gerince felé, ami rendezettebb, tömörebb szerkezetet eredményez, és ez a magasabb tranzíciós hőmérsékletben is megmutatkozik.

A xantán oldatok viszkozitása igen nagy, a legnagyobb az iparilag is használt poliszacharidok között. A viszkozitás már kis koncentrációban is nagy, pl. 5 g/l-es oldatban szobahőmérsékleten 1000 cP (=1 Pa.sec). Ez jól kihasználható az élelmiszeriparban.

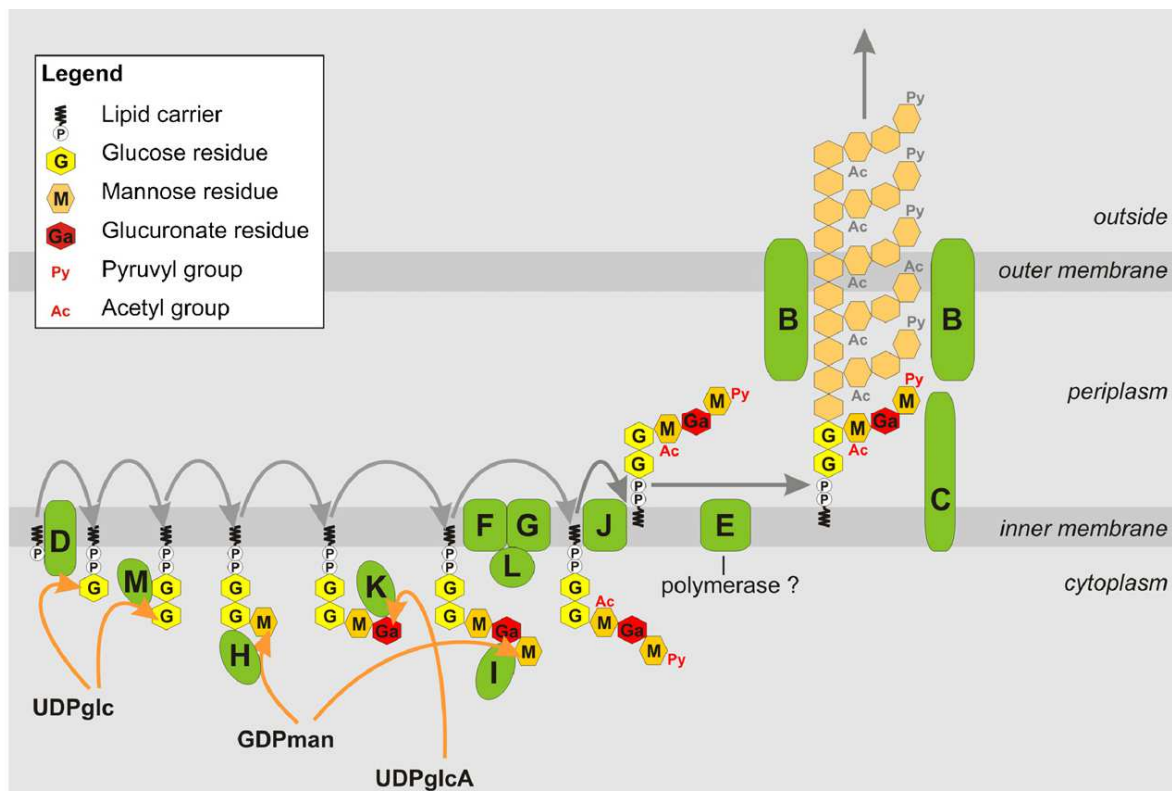
Ugyanakkor a xantán gélképző tulajdonsága gyenge. Ezt viszont jelentősen lehet javítani más ionos poliszacharidokkal kombinálva. Például a szentjánoskenyérmag-gumi (locust bean gum), a karragén vagy az agaróz hozzákeverése 50:50 tömegszázalékban kiváló szinergikus kölcsönhatást hoz létre.

Szerkezeti módosítások

A lehetséges szerkezeti módosítások legfontosabb célpontjai a triszacharid oldalláncon lévő savak. Az acil és piruvát származékok száma a xantánon befolyásolja tulajdonságokat. Ezt az arányt kétféleképpen is befolyásolhatjuk. Átállíthatjuk a fermentációs körülményeket, illetve kereshetünk hiányos anyagcseréjű (természetes hiánymutánsok) altörzseket. Például az *X. campestris* var. *phaseoli* acetilmentes, illetve a var. *oryzae* piruvátmentes xantánt termelnek. A vad típusú altörzsek keresése mellett indukált mutációval is próbálkoztak. A megfelelő enzimek kiiktatásával politetramer illetve politrimer xantán formát próbáltak előállítani. A politetramert sikerült előállítani gyengébb (50%-os) kihozattalal, de a trimert nem.

9.2.1.2. *A xantán bioszintézise*

A xantán képződésének alapsémája a következő: (1) a szubsztrát felvétele; (2) szubsztrátok metabolizmusa; (3) alapegységek létrehozása nukleotidokhoz kötött cukrokból lipid hordozón;



152. ábra A xantán bioszintézise

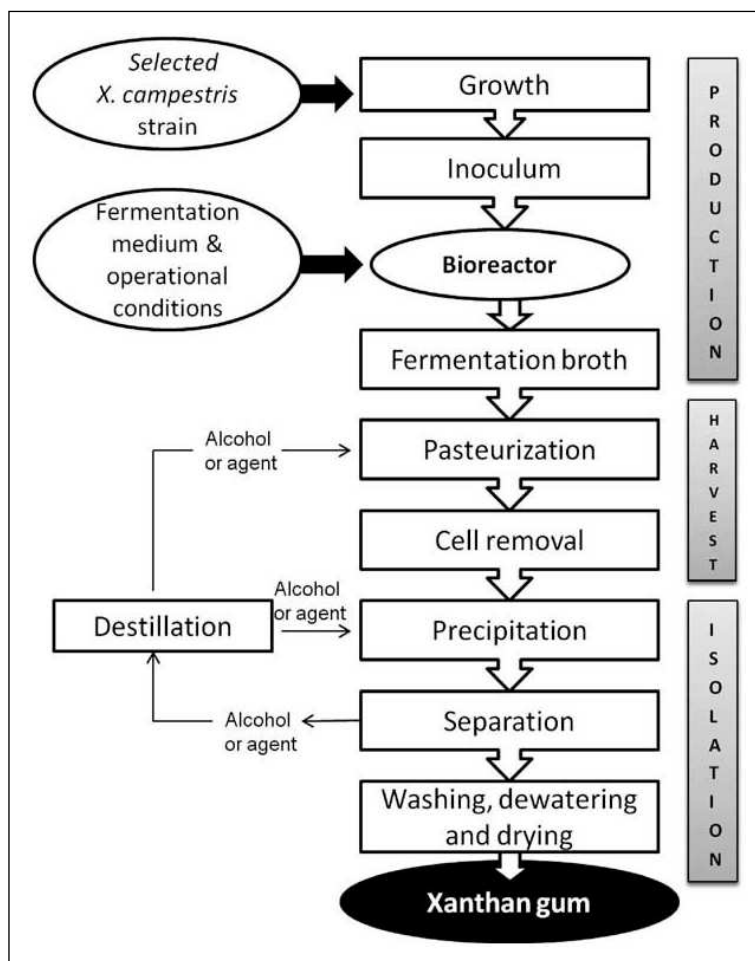
(4) dekorálás szerves savakkal (5) kiléptetés a sejtből (6) polimerizáció a periplazma térben (7) kiléptetés külső térbe.

A xantán alapegysége a citoplazmában kialakuló cukor-nukleotidokból épül fel egy poliizoprenol-foszfát templáton, ami a sejt belső membránjába horgonyozódik. A savcsoportok acetil-CoA és foszfoenol-piruvát kapcsolódásával jönnek létre. Az ismétlődő egység szintézise két UDP-glükóz, két GDP-mannóz és egy UDP-glükuronsav molekula felhasználásával jön létre. A kész pentaszacharid egységet egy enzim a lipid hordozó átfordításával (flip) átviszi a membrán külső felületére, a periplazmás térbe. Itt megy végbe a polimerizáció és a kész lánc a külső membránon keresztül tolódik ki a sejten kívülre. A folyamathoz tizenkét, nagyrészt membránkötött enzimre van szükség. Ezek génjei egy operonban (xanthan cluster) helyezkednek el (*gumB-M* gének, 16 Kb).

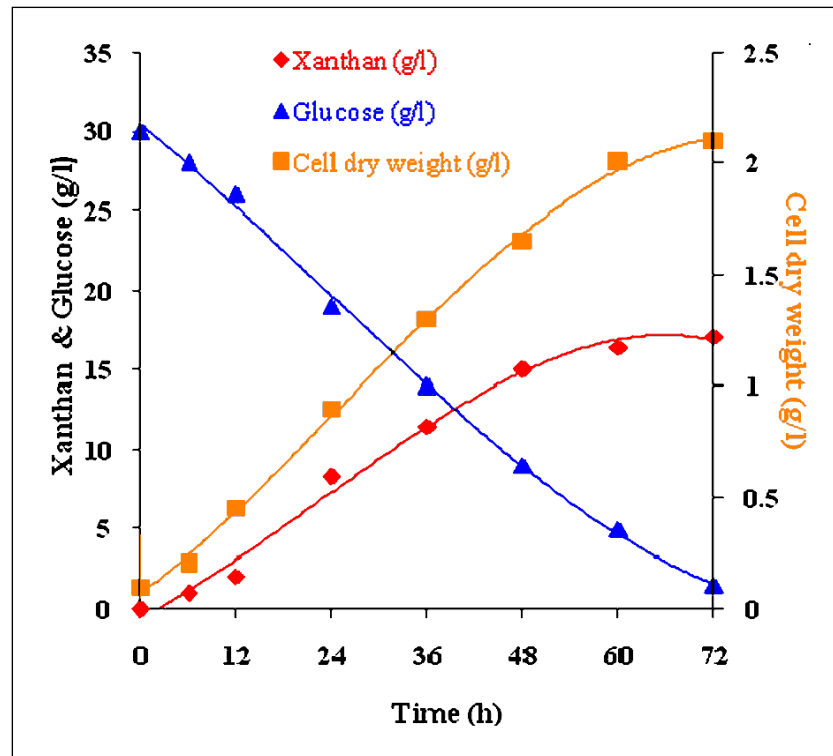
9.2.1.3. Xantán gyártása

A teljes technológiai folyamatot mutatja be a 153. ábra.

A xantánt termelő *X. campestris* törzseket liofilizálva vagy mélyhűtve (-180 °C-on) tárolják. Több szaporítási lépés után indítják a termelő fermentációt. A táptalaj optimalizált összetétele, az alkalmazott bioreaktor típusa, és működtetése, valamint a tenyésztési körülmények (hőmérséklet, pH, oldott oxigén koncentráció) határozzák meg a mikroba szaporodását és a xantán termelést.



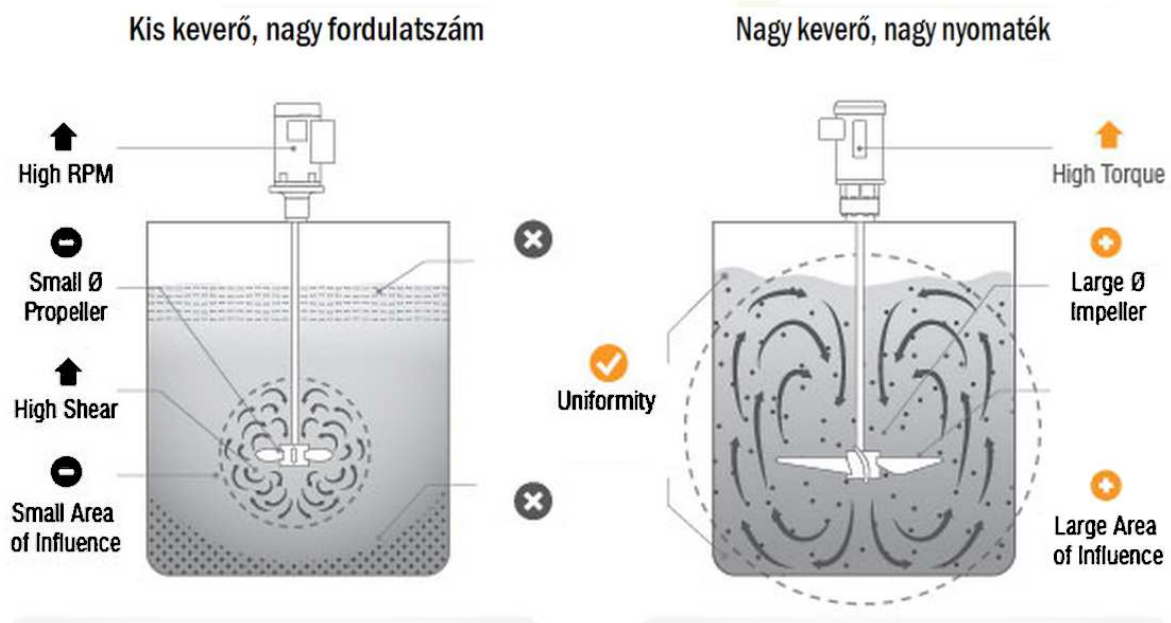
153. ábra A xantán gyártás folyamatábrája



154. ábra Xantán batch fermentációja *X. campestris*-szel

A tápoldatban szénforrásként 4-5 % glükózt adagolnak, ebből 25-30 g/l xantán képződik, optimális esetben a konverzió eléri a 70 % -ot. A xantánt többféle szénforráson is elő lehet állítani, de a kihozatal változó. A glükózon, szacharózon, maltózon és oldható keményítőn kapott hozamok ebben a sorrendben csökkennek.

Nitrogén forrásként a törzs szerves vegyületeket, azaz fehérje hidrolizátumot igényel. Különösen jól hasznosítja a glutaminsavat, de ez ipari méretben túlságosan költséges lenne.



155. ábra Keverők hatásának összehasonlítása

Ennél a gyártásnál is ügyelni kell a magas C/N arányra. Akkor termelődik sok xantán, ha a N-forrás annyira elfogy, hogy koncentrációja limitálóvá válik. Ezzel együtt a xantán elsődleges

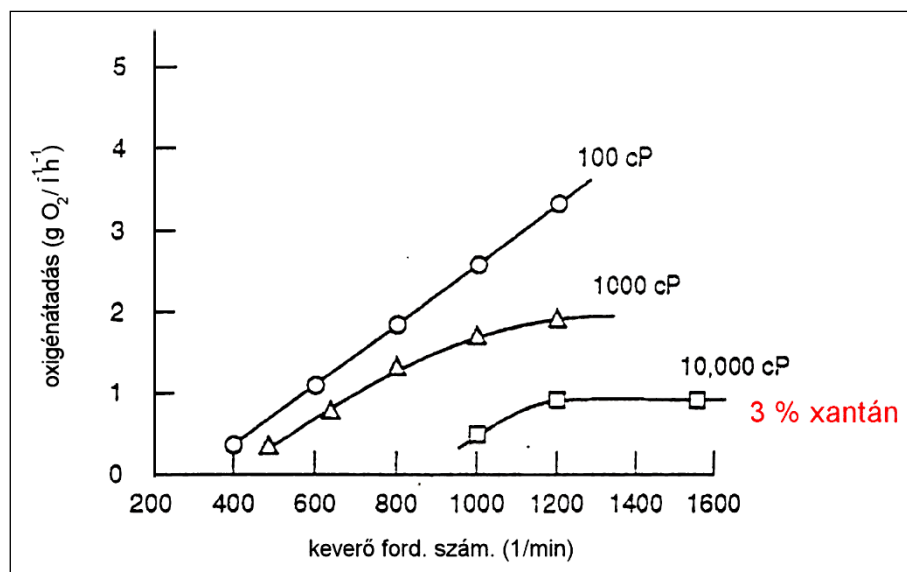
anyagcseretermékeknek tekinthető, termelés kinetikája I. típusú, a sejtszaporodással együtt változik a termékézés. 154. ábra.

Baktérium törzset használunk, azaz az optimális pH $7 \pm 0,3$. a cukor hasznosítása során azonban a tenyészet savakat termel, ami leviszi a pH-t. Ezt közömbösíteni kell, a pH-t legfeljebb hatig engedjük le, pH=5 alatt a termékézés lelassul, sőt leáll.

Különösen nagy problémát jelent a speciális reológiájú fermentlé a levegőztetés szempontjából. A keverő közelében, ahol nagy a nyíróhatás, kicsi lesz a viszkozitás, azaz gyorsabb az anyagátadás. Távolabb, ahol a keverő már nem tud elég turbulens áramlást létrehozni, nagyobb a viszkozitás és romlik az anyagátadás. Emiatt nagy átmérőjű, és kisebb fordulatszámú keverőket kell alkalmazni (155. ábra). Gondot okoz a buborékok optimális mérete is. Ha kicsik, akkor a viszkózus lében nem tudnak felszállni, növelik a holdup-ot, és fokozatosan elfogy belőlük az oxigén. Ha nagyok, akkor felszállnak, de kicsi a fajlagos felület, és ettől romlik az OTR.

A nagy viszkozitás az oka, hogy a tenyészet végül önmagát fojtja meg. A sűrű lében megszűnik a konvektív anyagszállítás, és a diffúzió nem elegendő a sejtek ellátásához. Az anyagátadás annyira lelassul, hogy a sejtek anyagcseréje leáll. Ez a xantán esetében kb. 3%-os koncentrációnál következik be. A 156. ábrán látható, hogy ennél a koncentrációnál már hiába növeljük a keverő fordulatszámát, a bekevert teljesítményt, az oxigén bevitel egy minimális értéken állandósul.

A xantán fermentációnál különösen kell ügyelni a sterilitásra. A xantán burok miatt lassan növekvő sejtek versenyhátrányban vannak az esetleg bekerülő idegen mikrobákkal szemben. A



156. ábra Az oxigénátadás változása xantán fermentlében

semleges közeg, a glükóz+szerves nitrogén tartalmú tápoldat mind kiváló életteret biztosít a fertőzéseknek. Az aszeptikus zárással nem csak a mikrobák bejutását kell megakadályozni, hanem a növénypatogén törzs kijutását is a környezetbe. Az elmenő levegőt a szokásosnál hatékonyabban kell megszűrni, és a fermentlevet lefejtés előtt pasztörizálják.

A feldolgozás kulcslépése ez esetben is az oldószeres kicsapás. Nagy mennyiségű, 1-1,5-szeres térfogatú, vízzel elegyedő szerves oldószerrel (izopropanol, etanol, acetone) kicsapva a termék kiszűrhető. A szükséges oldószer mennyisége Ca, vagy K-sók adagolásával csökkenthető. A keletkező nagy mennyiségű vizes oldószeret célszerű az üzemben belül regenerálni. Az oldószeres termék szárításánál a távozó oldószer gőzök tűz- és robbanásveszélyt jelenthetnek.

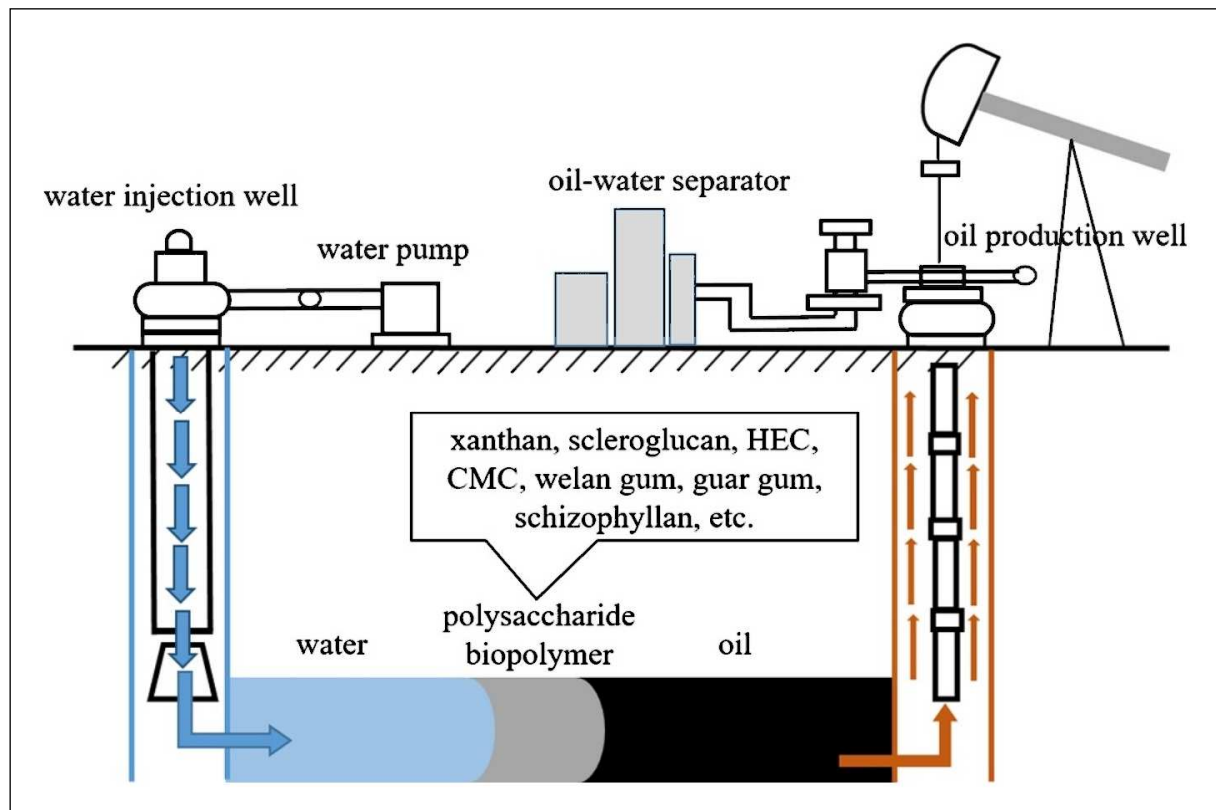
A xantánt por formában, vagy 8%-os oldatként hozzák forgalomba. Élelmiszer célra szánt poroknál az FDA előírás maximum 10 000 sejt/g-ot enged meg. Ha ennél nagyobb a

fertőzöttség, akkor az propilén-oxid gázos dezinficiálással csökkenthető. Az oldatoknál még nagyobb probléma a sterilitás fenntartása.

9.2.1.4. *A xantán felhasználása*

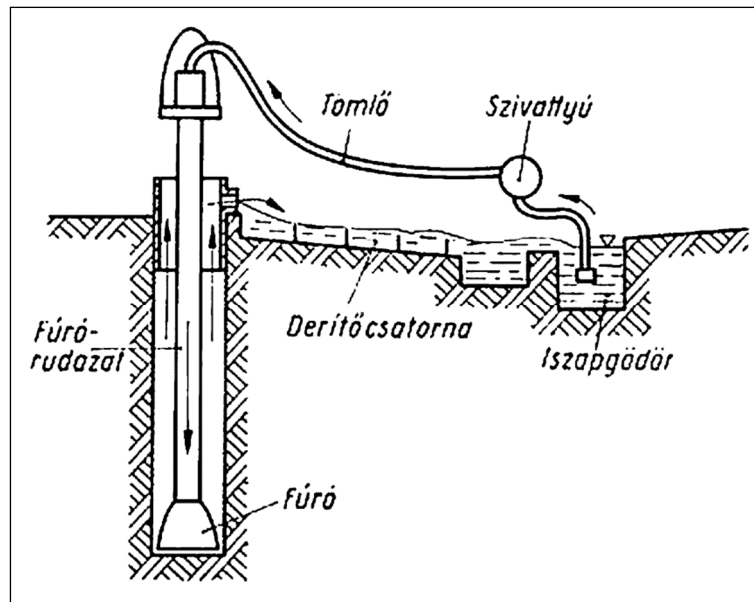
Több mint 30 éve, hogy az USA FDA emberi fogyasztásra jóváhagyta a xantán használatát. Ez nem csak az élelmiszeriparra korlátozódik, hanem a szájon át adott gyógyszerészeti és orvosi készítményekre is. Az élelmiszeriparban xantánt sűrítő, stabilizáló és emulgeáló komponensként használják. Előnyös, hogy oldatának kis koncentrációban is nagy a viszkozitása. Hideg és meleg vízben egyaránt jól oldódik, jól tűri fagyasztást és a felolvasztást. Erősen savas oldatban is stabil, sőt viszkozitása még növekszik is. Annak ellenére, hogy nagy a viszkozitása, ez nyírás hatására lecsökken, így könnyen keverhető, önthető és áramoltatható. A megtermelt xantán kb. 60 %-át veszi fel az élelmiszeripar, 15%-ot használnak fogpaszták, emulziós festékek (cseppenés mentes festék) készítésére és további 15% kerül az olajkitermelésbe.

A kimerülő félben lévő olajmezőknél a másodlagos olajkitermelést úgy oldják meg, hogy az olajtartalmú kőzet alá egy másik furaton keresztül vizet, pontosabban poliszacharid oldatot szivattyúznak. A viszkózus oldat kiszorítja a kapillárisokból a szintén viszkózus kőolajat és az víz-olaj emulzió formájában felhozható az eredeti olajkúton át.



157. ábra Poliszacharid oldatok alkalmazása a másodlagos olajkinyerésben

Hasonló ipari alkalmazás a fúró öblítő folyadékok adalékolása. A folyadék szerepe kettős, és éppen ezért jól kihasználható a pszeudoplasztikus oldat kettős természete. Az öblítő folyadék egyik szerepe a fúrófej hűtése. A kőzeteket aprító fogazott fejek nagymértékben felmelegednek,



158. ábra A fúróöblítő folyadék áramlása

hűtést igényelnek. Gyors forgásuk ugyanakkor erős nyírást hoz létre a fej körül a folyadékban, az oldat viszkozitása kicsi lesz, így hatékony a hőátadás, a hűtés. A másik funkció a közettörmelék elszállítása. A függőlegesen felfelé áramló folyadék viszi magával a kődarabokat, de azok a sűrűségkülönbségnek megfelelően ülepednek, lefelé mozognak. Ezt az ülepedést akadályozza az, hogy ebben a szakaszban a folyadék laminárisan, kis nyírás mellett áramlik, így a viszkozitása nagy lesz. A felszínen a zagyból kiülepítik a közetszilánkokat, és a folyadékot visszacirkuláltatják.

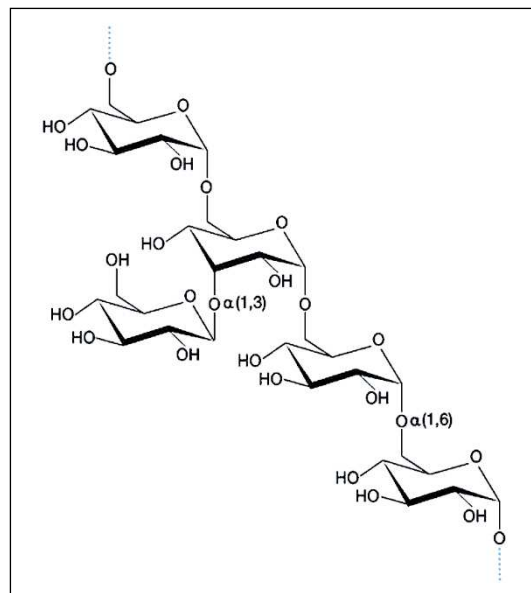
A sütőiparban a javítja a termékek térfogatát és a textúráját (különösen a gluténmentes pékáruknál). A sütés során visszatartja a vizet, növeli az eltarthatóságot, a hűtve tárolt tészták jobban bírják a fagyasztást-felolvasztást. Diétás süteményekben ragasztóként helyettesíti a tojásfehérjét, krémekben és gyümölcsstermékben csökkenti a szinerézist. Dresszingeiken, mártásokban és szirupokban javítja az emulziók stabilitását savak és sók jelenlétében is. Széles hőmérséklet-tartományban megtartja a viszkozitását. Javítja a termékek testességét, konzisztenciáját. Vajas és csokoládés öntetekben növeli a sűrűséget és a viszkozitást. Hatékony stabilizátor és sűrítő adalék krémsajtokban és rostos italokban is.



159. ábra Fúróberendezés és öblítő folyadék (ferde fúrás a Karinthy Frigyes út alatt, saját felvétel)

9.2.2. DEXTRÁN

Egy másik korán felfedezett és gyakran alkalmazott bakteriális poliszacharid a dextrán. A dextránt eredetileg a cukorlevek és borok nyálkásodásának vizsgálata során azonosították és jellemezték. Kedvező tulajdonságai miatt hamarosan használni kezdték az élelmiszerek sűrítésére és állagjavításra. Később ezen kívül gyógyszerként és inert mátrixként is alkalmazták. Bár sok baktérium törzs termeli (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Acetobacter*, és *Gluconobacter* fajok), iparilag a *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512 tejsavbaktérium törzssel termelik, szacharóz szubsztráton. A molekula mintegy 95%-ban lineáris α -(1,6) kötésű glükózból és kb. 5%-nyi α -(1,3) kötésű elágazásból áll. A természetes dextrán molekula tömege viszonylag magas, egy millió Da körüli, de sokkal nagyobb értékeket is mértek, mivel a molekulák hajlamosak az aggregálódásra. Az ipari célokra forgalomba hozott dextránt kisebb molekulákra tördelik (savas vagy enzimes hidrolízissel) és elválasztják a különböző méretű frakciókat.



160. ábra A dextrán szerkezete

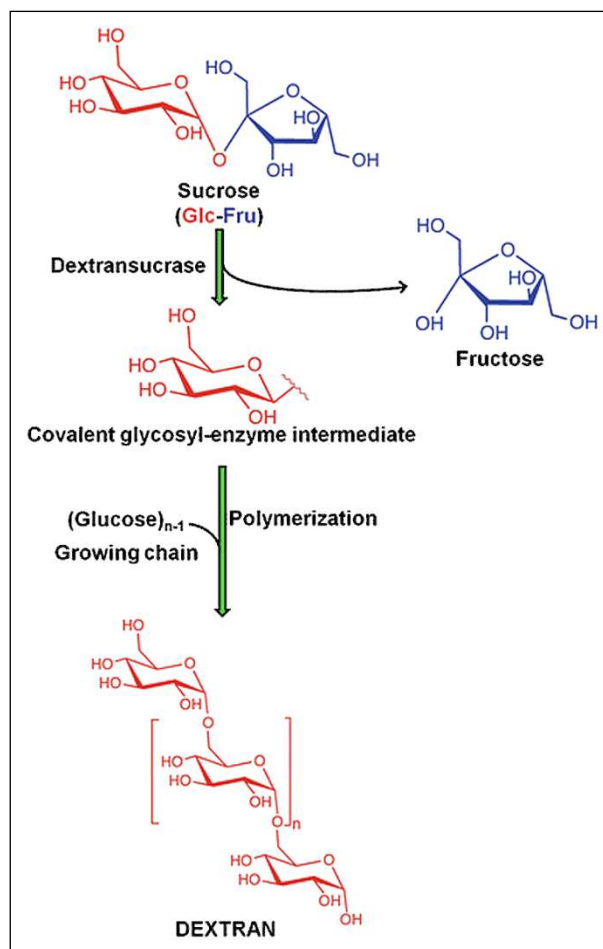
9.2.2.1. Tulajdonságok

A dextrán fizikai-kémiai tulajdonságai a gyártáshoz használt mikroba törzstől függően változatosak, de még az egyetlen törzs által termelt anyag is heterogén, a molekulatömeg és az (1,6) kötések aránya jelentős eltéréseket mutathat. Emiatt a megtermelt dextránt forgalomba hozás előtt a kívánt molekulatömeg és a felhasználási cél szerint fracionálják. A kereskedelmi dextrán könnyen oldódik meleg vagy hideg vízben is, oldata mérsékelten viszkózus, és még nagy koncentrációban (50%) sem gélesedik. A nagy molekulatömegű dextránokban általában több az elágazás, ami csökkenti a vízdoldhatóságot. Azok a dextránok, amelyekben az α -(1,3) kötésű elágazások aránya meghaladja a 43%-ot, vízben már gyakorlatilag oldhatatlanok. A közepes és kis molekulájú dextránok (500 kDa alatt) vizes oldatban newtoni viselkedést mutatnak egészen 30%-os koncentrációig. A tisztítatlan, nagyobb molekulákat is tartalmazó "natív" dextrán viszont már 1,5%-os oldatban is pszeudoplasztikus viselkedésű.

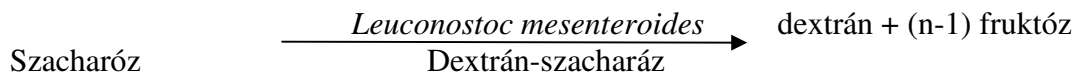
Az α -(1,6) kötések az emésztő enzimek csak nagyon lassan tudják hidrolizálni, a dextrán az oldható, de nem bontható élelmi rost frakcióba tartozik.

9.2.2.2. Bioszintézis

A bioszintézis kulcslépése a dextrán-szacharáz (dextrán-szukráz, α -glükozil-transzferáz) enzim által katalizált transzglikozilációs reakció, amelyben a szacharózból a glükóz átkerül valamilyen akceptor molekulában lévő láncevégi glükózra, így hosszabbodik a poliszacharid lánc. A folyamat indításánál dextrán még nincs jelen, az első reakciónál szacharózra kerül a glükóz. Emiatt a dextrán molekulák legelső eleme egyetlen fruktóz, ehhez kapcsolódik a több ezer glükóz. A reakció gyakorlatilag irreverzibilis, a polimert még éheztesítés esetén sem bontják vissza a sejtek. A konverzió közel 100%-os.



161. ábra A dextrán képződése



*Adalék: A spontán dextrán képződés komoly problémát okozhat a cukorgyárakban. Ha egy elzárt csővezetékben hosszabb ideig áll a tömény cukoroldat (anaerob körülmények között), akkor ez lehetővé teszi a *L. mesenteroides* elszaporodását és a dextrán képződést. A viszkózus oldat olyan dugót képezhet, amit a normál szivattyúzással nem lehet megmozdítani, és ezzel üzemzavart okozhat.*

9.2.2.3. Fermentáció:

A *L. mesenteroides* tejsavbaktérium, ez sok mindent meghatároz a fermentációs technológiában. A törzs anaerob, nincs szükség levegőztetésre, csak minimális keverésre. A szubsztrátként beadott szacharóz az egyetlen szénforrás. A sejtek növekedésük során tejsavat termelnek, a pH csökken, ez viszont káros a folyamatra. Emiatt a keletkező savat közömbösíteni kell, a pH-t nem szabad 5 alá engedni. Szintén a tejsavbaktériumokra jellemző, hogy hiányos anyagcseréjük miatt komplex, szerves nitrogén forrást igényelnek (pl. 1-2% kukoricalékvárt).

A folyamat kétszakaszos, előbb a sejtszaporítási fázis, majd az enzimes reakció, a termékképzés következik. A képződő sejtömeg minimális a poliszacharidhoz képest. A baktériumsejtek nagyon kicsik, még nagy sejtszám mellett is alacsony a szárazanyag tartalom. 0,5 g/l-nyi baktériumsejt termel a folyamatban kb. 80 g/l dextránt (160-szoros mennyiség). Ennyi termékhez kétszeres mennyiségű (16%) szacharóz kell, hiszen csak a glükózból lesz termék, a fruktózból nem. Ennyi cukrot nem érdemes egyszerre bevinni a rendszerbe, mert a nagy ozmózisnyomás megállítja a folyamatot, emiatt több részletben visszük be a szubsztrátot.

Ez egy nyugvósejtes technológiára emlékeztet, bár az enzimek itt nem a sejteken belül vannak. Elvileg lehetne az enzimet izolálni, tisztítani, és azzal gyártani a dextránt, de ez az út költségesebb.

9.2.2.4. Feldolgozás

A kinyerés menete analóg a többi poliszacharidéval. A kulcslépés a metil-alkoholos kicsapás majd szűrés. A kapott termék móltömege a legtöbb célra túl nagy, rövidebb láncokká kell tördelni. A részleges hidrolízist meg lehet oldani sósavas főzéssel 100 °C-on vagy enzimes kezeléssel. A *P. funiculosum* termel erre a célra megfelelő endohidrolázt. A hidrolízis után metanolos frakcionált kicsapással választhatók el a különböző méretű molekulák. Az élelmiszerekben a 15-90 kDa-os tartományt használják. Életmentő lehet a dextrán alkalmazása vérplazma pótlására. Vérvesztés esetén a volumen pótlására nem mindig áll rendelkezésre elegendő plazma vagy humán szérum albumin. Ilyenkor átmenetileg más, hasonló tulajdonságú hidrophil polimerekkel helyettesíthetjük az albumint (zselatin, dextrán, hidroxipropil-keményítő). A dextránból kétféle oldatot forgalmaznak erre a célra, az egyik a 40 kDa-os frakció 10%-os oldata, a másik 60-70 kDa-os és 6%-os töménységű. Az előbbinek erősebb a volumen növelő hatása és a vesén keresztül viszonylag gyorsan kiürül. Mivel ezek a készítmények egyenesen az emberi véráramba kerülnek, a gyógyszergyártás rendkívül szigorú tisztasági és biztonsági követelményeinek megfelelően készülnek.

Adalék: A laboratóriumi gyakorlatban is találkozhatunk a dextránnal, mint oszloptöltettel (Sephadex). A láncokat keresztkötésekkel térhálósítva vízben oldhatatlan, erősen hidrophil, neutrális és biológiailag nem bontható univerzális mátrixot kapunk. Ez a térhálósítás mértékének beállításával méret szerinti elválasztásra (kizárásos kromatográfia) alkalmas, illetve különböző kötőcsoportok rávitelével más kromatográfias és adszorpciós műveletek végrehajtása is megoldható.

Az elválasztási műveletek között még egy ponton találkozhatunk a dextránnal. A vizes kétfázisú extrakciónál a polárisabb fázis általában tömény (10-20%-os) dextrán oldat (PEG-dextrán rendszerek).

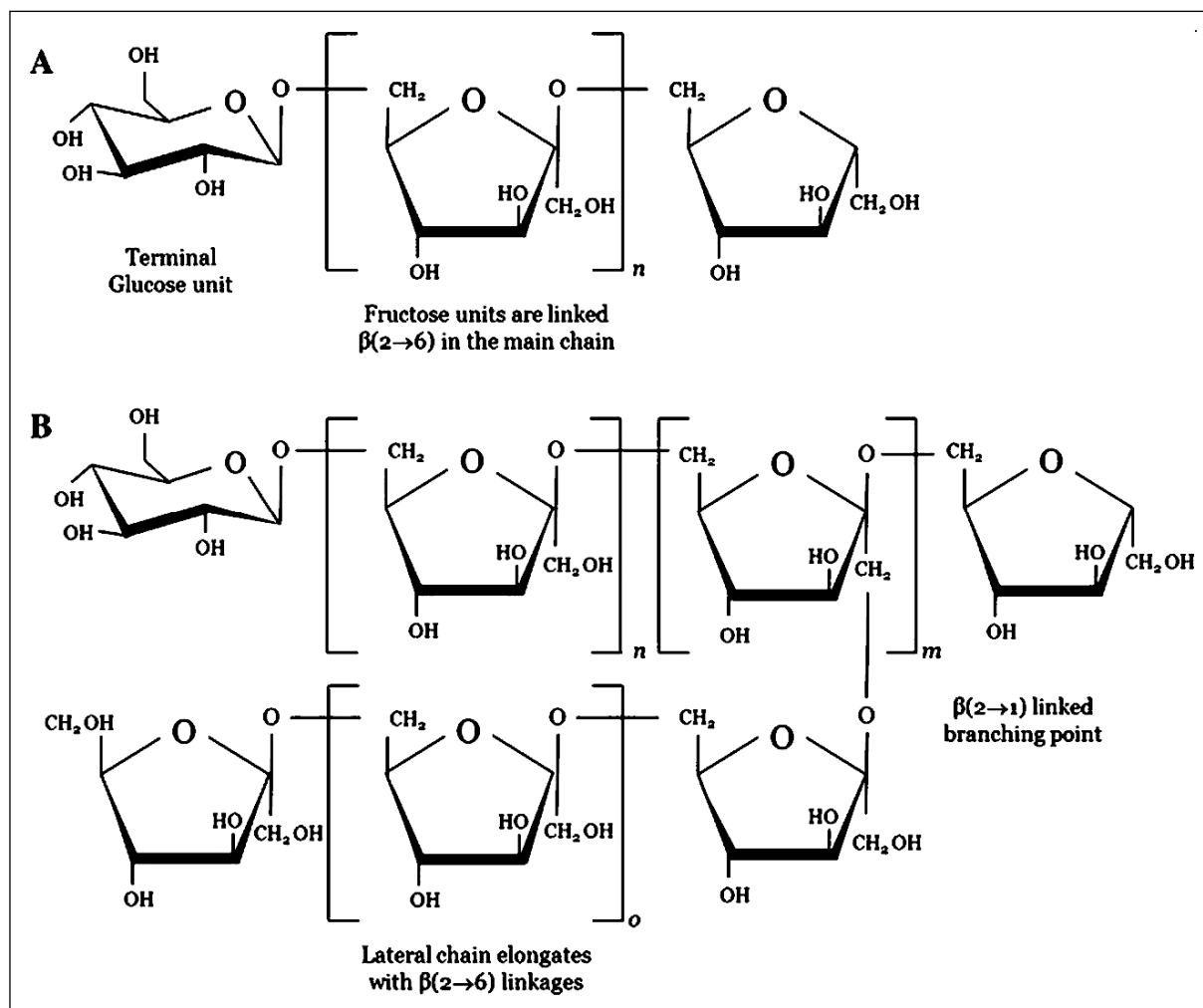
9.2.3. Leván:

A leván biokémiai értelemben, szerkezetében és képződésében a dextrán tükörképe. (A szacharóz glükózából dextrán, a fruktózából leván képződik). A leván D-fruktózokból álló homopoliszacharid (fruktán). A főláncot β -(2,6) kötések alkotják, az elágazások β -(2, 1) kötéssel kapcsolódnak (162. ábra).

A bakteriális levánok vízdoldhatósága nagy molekulatömegük (10^6 – 10^7 Dalton) ellenére jó. Ez sok elágazást tartalmazó szerkezetükkel magyarázható. A leván belső viszkozitása jóval kisebb, mint más hasonló molekulatömegű poliszacharidoké, mivel a szerkezete nem lineáris, rúd alakú, hanem a sugárirányban kiterjedő elágazások miatt inkább kompakt gömb- vagy ellipszoid formájú.

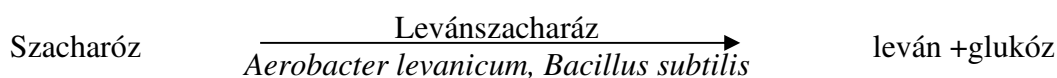
A *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* által termelt leván oldata még 20%-os koncentrációban is newtoni viselkedésű marad. *B. subtilis* levánját egy kis molekulásúlyú és kisebb viszkozitású, és nagy molekulatömegű, viszkozusabb frakcióra lehet szétválasztani. A leván nem gélesedik és nem duzzad a vízben. A bakteriális levánok érzékenyek az enzimes vagy savas hidrolízisre, azaz emészthetők, ellentétben a növényi eredetű levánokkal, amelyek nem bonthatók.

Sok baktérium termel levánt, például a *Streptococcus salivarius*, a *Lactobacillus sanfranciscensis*, a *Bacillus subtilis* és a *Bacillus polymyxa*, az *Acetobacter xylinum*, a *Gluconacetobacter xylinus*, a *Microbacterium levaniformans*, a *Zymomonas mobilis* és még néhány mikroorganizmus.



162. ábra A leván szerkezete

A leván bioszintézist a levánszacharáz (levánszukuráz) enzim katalizálja, ami a szacharóz molekuláról levett fruktózt áthelyezi, transferálja valamilyen fruktózt tartalmazó akceptor molekulára, adott esetben az épülő lánc végére.

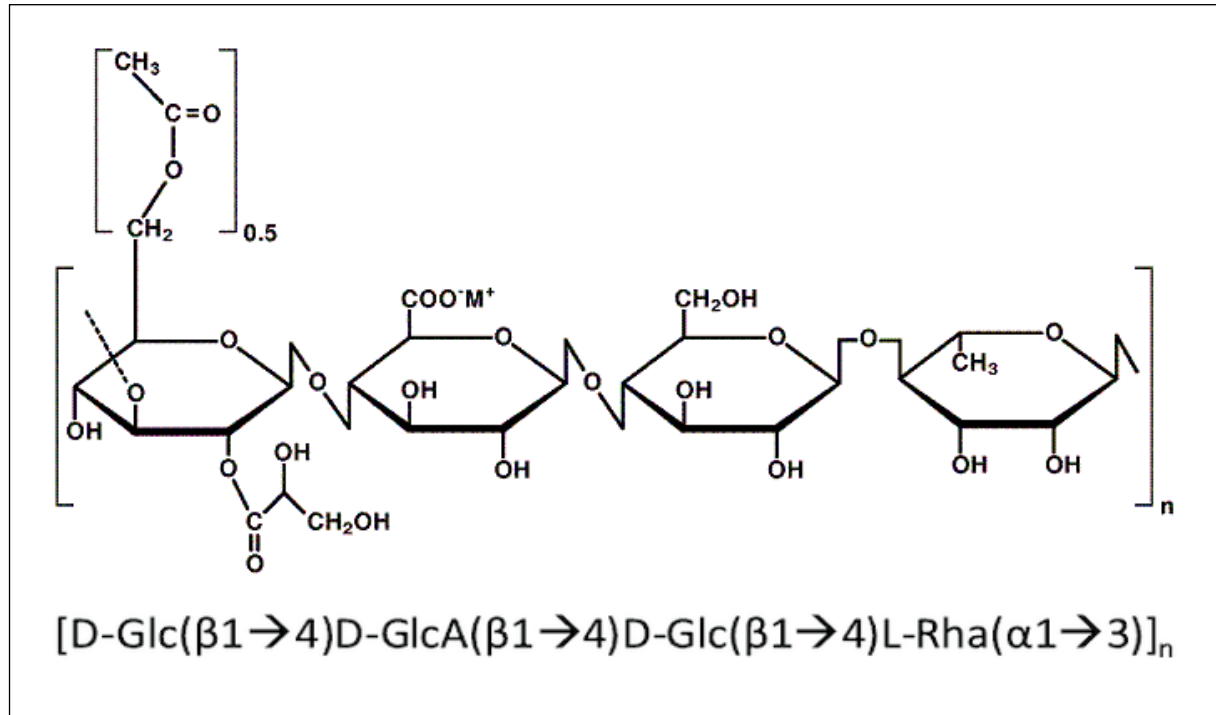


A technológia is analóg a dextránnal, annyi különbséggel, hogy a termelő törzsek aerobok, tehát szükséges a levegőztetés. A gyártást meg lehet oldani fermentációsán (sejtszaporítás + biokonverzió), vagy izolált és tisztított levánszacharáz enzimmal. A termelt leván móltömege változó (10^6 – 10^7 Da), ez a használt mikroorganizmustól és a technológiai feltételektől függ. Tulajdonságai és élelmiszeripari alkalmazásai hasonlítanak a dextránra, de a levánnak több kedvező egészségügyi/gyógyászati hatása is van.

A *B. subtilis* és a *Z. mobilis* törzsekkel 40-50 g/l termékkoncentráció érhető el, 62 %-os konverzió mellett.

9.2.4. Gellán

A legelső xantán mintájára más hasznos bakteriális poliszacharidokat is kerestek. Ennek során azonosították a gellánt. Egy növényi kórokozó, a *Spingomonas paucimobilis* (korábban *Pseudomonas elodea*) termeli. Eredeti, természetes funkciója, hogy a patogén sejteket a megtámadott vízi növények felületére ragasztja. Neve is innen ered (elodea = hínár). A natív gellán ismétlődő lineáris tetraszacharidokból álló anionos heteropolimer, átlagos móltömege 500.000 Dalton. Az alkotó molekulák sorrendje: glükóz-glükuronsav-glükóz-ramnóz. A glükózhoz karbonsavak kapcsolódhatnak észter kötéssel. Minden tetraszacharidon van egy ecetsav, és átlagosan minden másodikhhoz egy glicerinsav is kapcsolódik. Szerkezetét a 163. ábra mutatja be.



163. ábra A gellán szerkezete

A glükuronsav miatt anionos jellegű poliszacharid, a kétértékű fémionok (pl.: Ca²⁺) a láncok között keresztköteket hozhatnak létre.

Ha a gellán fermentációhoz laktózt adtak az általánosan használt glükóz helyett, akkor a polimer acilezettsége csökkent, és ettől a termék reológiai tulajdonságai rosszabbak lettek.

A feldolgozás során alkoholos kicsapással nyerik ki, majd igény szerint lúgos kezeléssel leválasztják az észterező savakat.

Felhasználás

A gellán termék és technológia kifejlesztésének az volt a célja, hogy a xantánt egyszerűbben előállítható és olcsóbb anyaggal lehessen helyettesíteni. De még mielőtt megkapta volna az élelmiszerengedélyt, már agar-helyettesítőként forgalmazták, elsősorban mikrobiológiai táptalajokban. Az eredeti gellán géljei túl gyengék és gumyszerűek, de ha eltávolítják az észterező savakat, akkor keményebb, törékeny gélek hozhatók létre.

Az ipari célra gyártott gellánt általában lúgos főzéssel dezacetilezik, amely az eredetileg lágy, elasztikus géleket képző polimert átalakítja. Ennek hatására a poliszacharidból kemény,

törekeny, termoreverzibilis, savtűrő, átlátszó gélek jönnek létre. A kereskedelemben háromféle aciláltságú (magas, alacsony és savmentes) gellán kapható.

A gélek akkor átlátszóak, ha az ionerősség és a polimer koncentrációja kicsi. Az ionerősség növelése zavarossá teszi a kialakuló gélt, viszont szacharóz hozzáadásával meg lehet tartani az átlátszóságot.

Olyan tartós filmet is lehet belőle képezni, hogy kísérleteznek inzulin gellános bezárásával is, amivel lassan felszívódó, retard hatású inzulin készítményt lehetne előállítani.

A gellánt az élelmiszeripar sokféle területen használja: viszkozitás növelő, stabilizátor, gélesítő adalék a desszertek, zselék, bevonatok, mártások, pudingok, italok gyártásánál, vagy más poliszacharidokkal együtt ehető filmek és bevonatok készítésénél.

Ha a dezacetilezett gellánról lemoszák az összes többértékű kationt, akkor a hozzáadott kalcium ionokkal ugyanolyan gélt képez, mint az alginátok.

9.2.5. „Helyettesítő” poliszacharidok

A természetes forrásokból kinyert poliszacharidok egy részénél is felmerült az igény, hogy alternatív módon, fermentációval, nagy mennyiségben, állandó minőségben állítsák elő ezeket.

Így az alginátot, amit eredetileg barnamoszatokból, pl. *Macrocystis pirifera*-ból vontak ki lúgos kezeléssel, párhuzamosan fermentációs úton is gyártják. Több mikroorganizmus is képes alginátot szintetizálni. Ezek közül az *Azotobacter vinelandii* termel az alga-algináthoz leginkább hasonló poliszacharidot. Az alginátot az élelmiszerekben, a textiliparban, papírkészítményekben és a gyógyszeriparban is használják sűrítőként, stabilizátorként, zselésítő és emulgeáló szerként. Toxicitása alacsony, kalcium ionokkal jól gélesíthető és viszonylag olcsó. (Az alginátról részletesebben ld. a BIM jegyzetben.)

Mikrobiális cellulóz

A mikrobiális cellulózt többek között az *A. xylinum* törzsszel termelik. Ez szerkezetileg azonos a növényi cellulózzal, β -(1,4)-kötésekkel összekapcsolt glükopiranoz láncok alkotják, ugyanakkor nem kapcsolódik hozzá hemicellulóz, pektin és lignin, ami a növényi eredetű cellulózokat mindig szennyezi. Az FDA ennek az anyagnak is megadta a "GRAS" (generally recognised as safe = általánosan biztonságosnak elismert) státuszt élelmiszer adalékként. Ez a cellulóz nagy tisztasága és kristályos szerkezete mellett abban is különbözik a növényi eredetű terméktől, hogy erősebb gélt képez, jobb a formázhatósága és nagyobb a vízkötő kapacitása. Élelmiszeripari és orvosi alkalmazása igen széleskörű.

Heparin

A heparin egy lineáris és sok szulfátcsoportot tartalmazó glükóz-aminoglikán, melynek antikoaguláns tulajdonságai vannak. D-glükózamin és D-glükuronsav kapcsolódik benne egymáshoz 1-4 glikozidos kötésekkel. Számos hidroxil és amino csoportja kénsavval észterezett, erősen anionos tulajdonságú. Az állati és az emberi szervezet számos szövete termel heparint, klasszikus gyártása vágóhídi melléktermékekből való kivonáson alapul. Biotecnológiai gyártása során az első lépésben *E. coli*-val termelnek kondroitin szulfátot, majd ebből emlős sejtekkel hozzák létre a heparint.

9.3. Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)

Elsőként Villiers észlelte 1891-ben, miközben keményítőt emésztett *Bacillus amylobacter*-rel. Ez a kultúra feltehetőleg nem volt tiszta tenyészet, valószínűleg hőstabil *B. macerans* spórákat is tartalmazott. Villiers 1000 g keményítőből 3 g kristályos terméket izolált, amit „cellulozin”-nak nevezett el, ami valószínűleg α - és β -CD-t tartalmazott.

1904-ban Schardinger izolált egy törzset, amely 25%-ban termelt kristályos dextrineket keményítőből. A törzset később *B. macerans*-nak nevezték el. A molekulák szerkezetét 1942-ben sikerült meghatározni röntgenkristallográfiával.

9.3.1.1. Szerkezet és tulajdonságok

A ciklodextrinek (CD) a ciklikus oligoszacharidok családjába tartoznak, amelyek α -(1,4) kötésű glükopiranoz alegységekből állnak. A különbség közöttük a felépítő glükopiranoz egységek számában van, az α -CD 6, a β -CD 7, a γ -CD pedig 8 glükóz egységből épül fel. A szakirodalomban cikloamilóz, ciklomaltóz és Schardinger dextrin néven is említik. 1961-ben igazolták a δ -, ζ -, ξ -, η -CD természetes képződését is.

A ciklodextrin molekulákban az összes glükopiranoz egységükben 4C_1 szék konformációban van (mint az egyéb dextrineknél és a keményítőnél). A kötőszögek miatt a gyűrű nem zárulna tökéletesen, a záródásnál a kötések kissé deformálódnak. Ez a deformáció (és vele a feszültség) az α -CD-ben a legkisebb, míg a γ -CD-ben a legnagyobb.

Az egyik glükopiranoz egység C-2-OH csoportja hidrogénkötést képezhet a szomszédos glükopiranoz egység C-3-OH csoportjával. A β -CD molekulában ezek a H-kötések egy tejes másodlagos övet alkotnak, ezért a β -CD egy meglehetősen merev szerkezet (164. ábra). Valószínűleg ez a magyarázata, hogy a β -CD-nek a legkisebb az oldhatósága az összes CD közül.

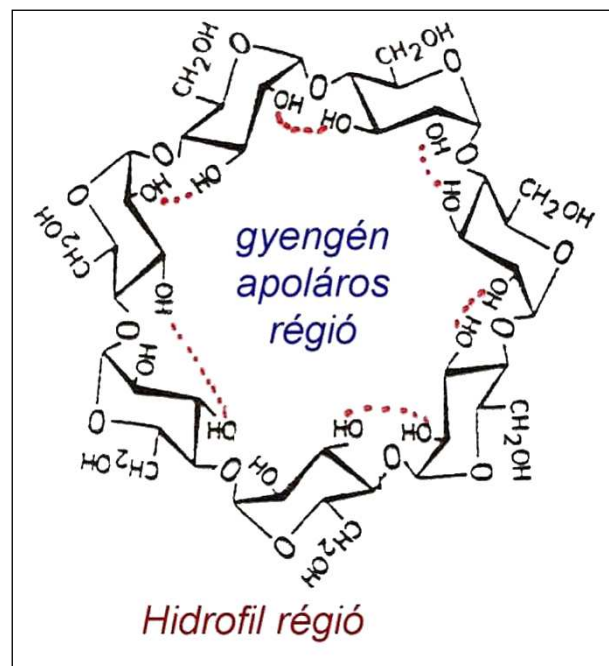
A ciklodextrinek az apoláris szerves oldószerekben oldhatatlanok.

A ciklodextrinek királis nem-redukáló oligoszacharidok. Savas körülmények között a ciklodextrinek lassabban hidrolizálódnak, mint a malto-oligoszacharidok. A ciklodextrinek levő glikozidos kötések α -amilázzal lehet elhidrolizálni, viszont az *exo*-amilázok nem hatnak rájuk. Az enzim hidrolízis sebessége a γ -CD esetén a leggyorsabb, ezt követi sorrendben a β -, és α -CD. Az összes CD nagyon stabil és jól oldható lúgos oldatokban, magas pH-n. A ciklodextrinek a keményítőnél jobban ellenállnak a savas vagy lúgos kezelésnek, pH 2 és 12 között nem bomlanak.

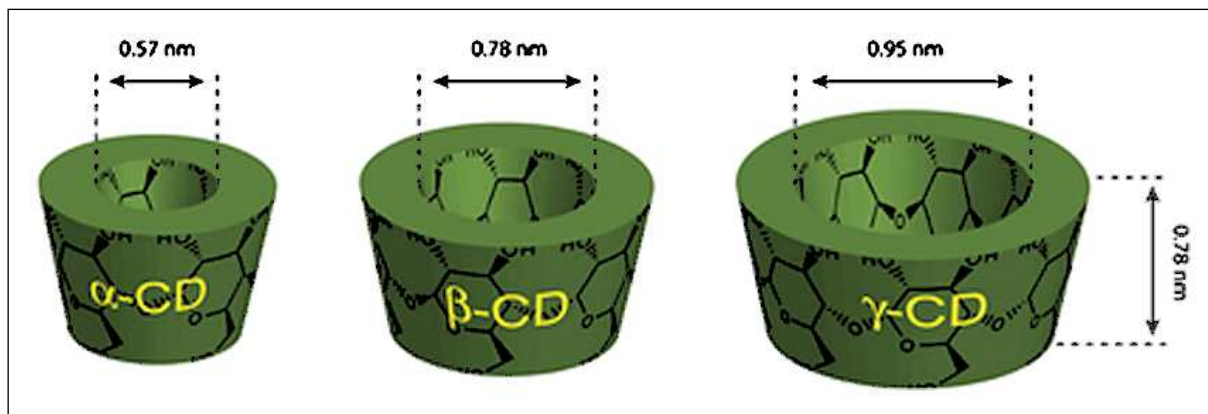
A CD-gyűrű valójában csonka kúp alakú, amit szoktak fánk vagy koszorú alaknak is nevezni, de legtalálhatóbb a „virágcserep alak” hasonlat.

A háromféle alapvegyület méreteit pontosan ismerjük (165. ábra és 30. táblázat).

E sajátos elrendeződés miatt a szabad hidroxil csoportok a molekula külső felületén találhatóak, míg a belső részben a hidrogén hidak és nem-polarizált C-H csoportok miatt gyengén apoláris felület alakul ki.



164. ábra A ciklodextrinek szerkezete



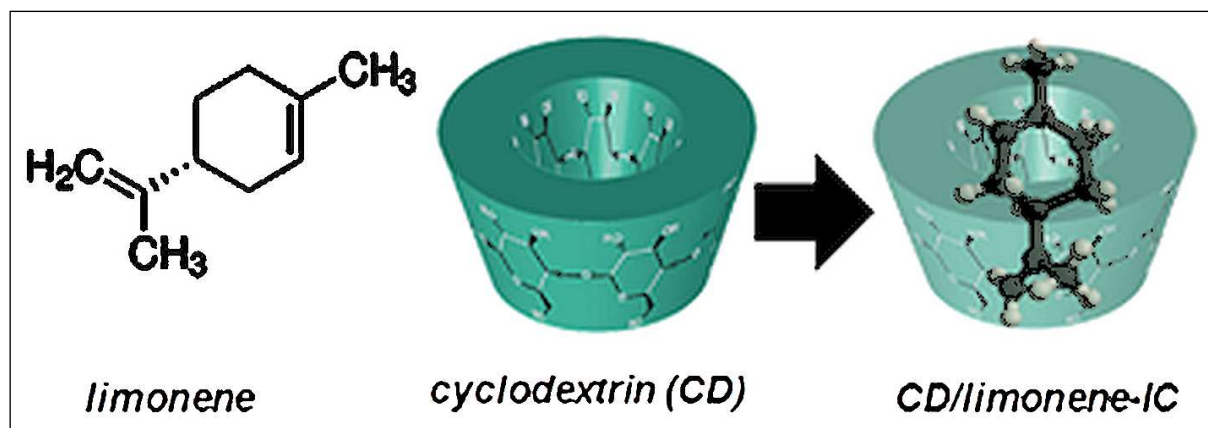
165. ábra A ciklodextrinek mérete

Tulajdonság	α -CD	β -CD	γ -CD
Glükópiranóz egységek száma	6	7	8
Molekuláris tömeg (g/mol)	972	1135	1297
Vízoldhatóság 25°C-on (% w/v)	14,5	1,85	23,2
Külső átmérő (nm)	1,46	2,54	1,75
Belső üreg átmérő (nm)	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
Tórusz magassága (nm)	0,79	0,79	0,79
Belső üreg térfogata (nm ³)	0,174	0,262	0,427
Belső üreg térfogata (ml/mól)	104	157	256
Belső üreg térfogata (ml/g)	0,10	0,14	0,20

30. táblázat A ciklodextrinek méretei

Zárvány molekula képződése

Az apoláris belső felület teszi lehetővé a ciklodextrinek különleges kölcsönhatását, azt, hogy képesek a molekula üregében hidrofób molekulákat befogni, zárványvegyületeket képezni. A gazdamolekulák változatossága (α -, β -, γ -CD) sokféle, részben vagy egészében apoláris vendégmolekula „molekuláris csomagolását” teszi lehetővé (166. ábra).



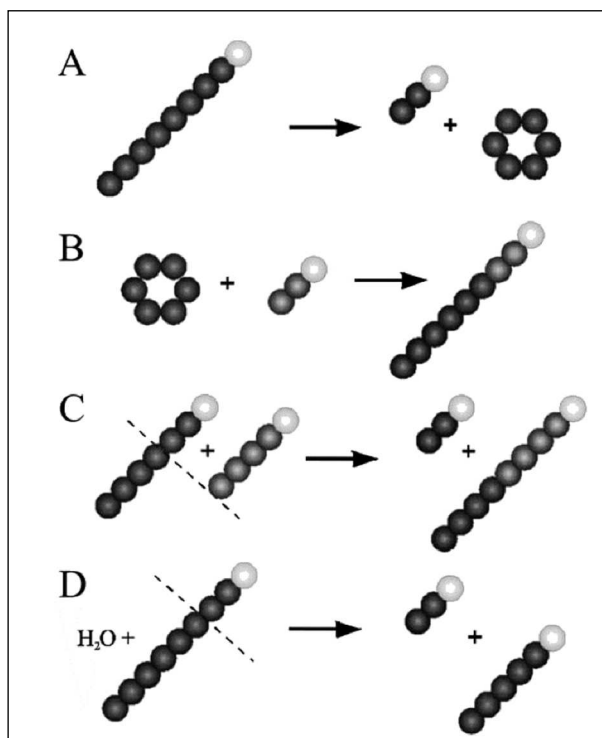
166. ábra Apoláris vendégmolekula befogása

9.3.1.2. *Bioszintézis*

A ciklodextrineket egy lépésben, intramolekuláris transzglykozilezési reakción keresztül lehet előállítani lineáris dextrinekből a CGTáz enzimmal.

Az enzim formális neve ciklodextrin-glikoziltranszferáz [1,4- α -D glükán 4- α -D-(1,4- α -glükano)-transzferáz; EC.2.4.1.19], amely a különböző nyitott láncú oligoszacharidok ciklizációs reakcióját katalizálja.

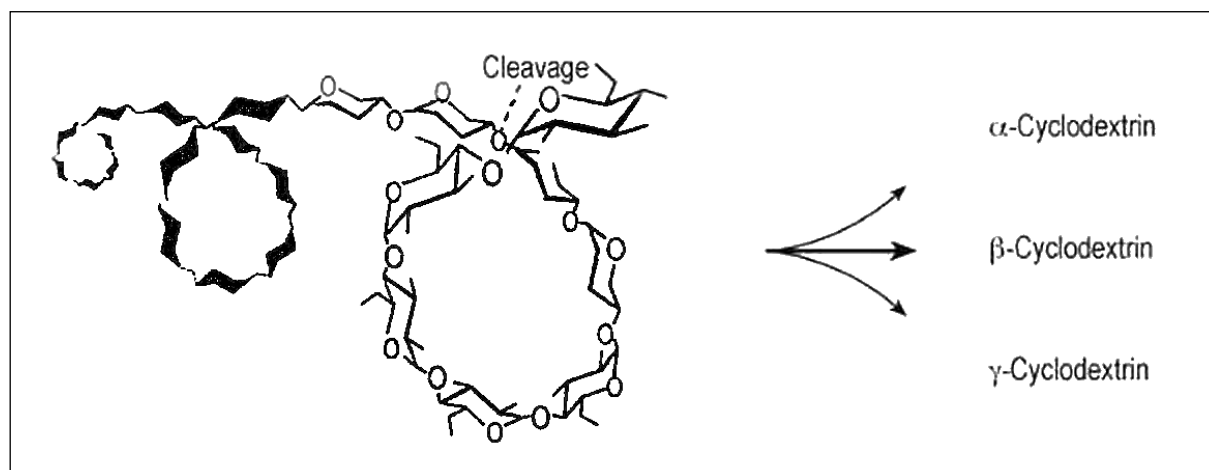
A CGTáz enzim az α -amiláz enzimszalád tagja. A CGTáz egy multifunkciós enzim, amely a ciklizációs reakció mellett összekapcsolási reakciót is katalizál (felnyitja a ciklodextrin gyűrűt és az így kapott lineáris malto-oligoszacharidokat akceptorokhoz transzferálja). Ezen kívül gyenge hidroláz aktivitással is rendelkezik és diszproporcionálási reakciót is katalizál intermolekuláris transzglykozilezési reakciók révén. A CGTáz enzim által katalizált reakciók a 167. ábrán láthatók.



167. ábra A CGT-áz enzim által katalizált reakciók

Az enzim tehát nem egyszerűen a cukorlánc két végét kapcsolja össze, hanem gyűrűt képez és a kimaradó oligoszacharidokat levágja. A gyűrű méretét a keményítő lánc alakja határozza meg. A növények által termelt poliszacharid spirális szerkezetű és ezt a formát az elcsirizetés után is megtartja. Az enzim a spirál egy fordulatának megfelelő hosszúságú szakaszból képez gyűrűt, így kerülnek legnagyobb valószínűséggel egymás közelébe az összekapcsolandó cukoregységek (168. ábra). A gyűrűképzés nem pontos, a különböző tagszámú ciklodextrinek párhuzamosan képződnek. A reakció végére spontán módon egy egyensúlyi összetételű elegy jön létre. Mivel a reakciók megfordíthatók, az egyes ciklodextrinek egymásba átalakíthatók. A termékek aránya a termelő enzimtől és a körülményektől függ. A keletkező

ciklodextrin gátolja az enzimet, emiatt a konverziós értékek kicsik (például pH=6, T= 55 °C mellett 23% α -CD és 11% β -CD keletkezik).



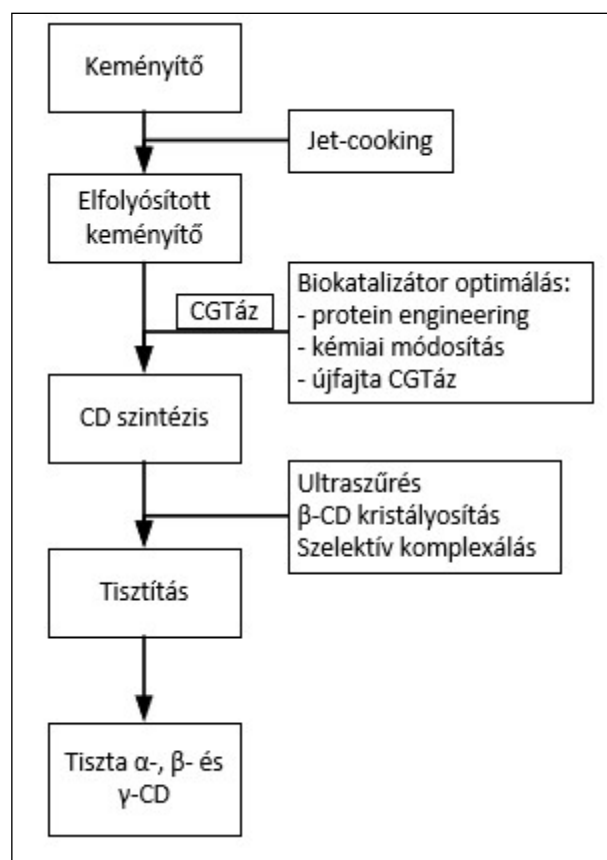
168. ábra A ciklodextrinek képződése

9.3.1.3. Törzsek

Számos mikroorganizmus képes a CGTáz enzim termelésére. Ilyen törzsek például a *Bacillus macerans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clarkii*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. firmus*, *B. circulans*, *B. ohbensis*, *Thermoanaerobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae* és a *K. oxytoca*. Mivel a *Klebsiella pneumoniae* veszélyes patogén, az enzimet klónozták a jól kezelhető *B. subtilis*-be. A gyártók nagy többsége saját fejlesztésű törzssel maga termeli az enzimet, nem a világpiacon szerzi be. A technológiában tehát első lépés az enzim fermentáció, az enzim kinyerése, tisztítása, esetleg rögzítése. A konverzió csak ezután következik.

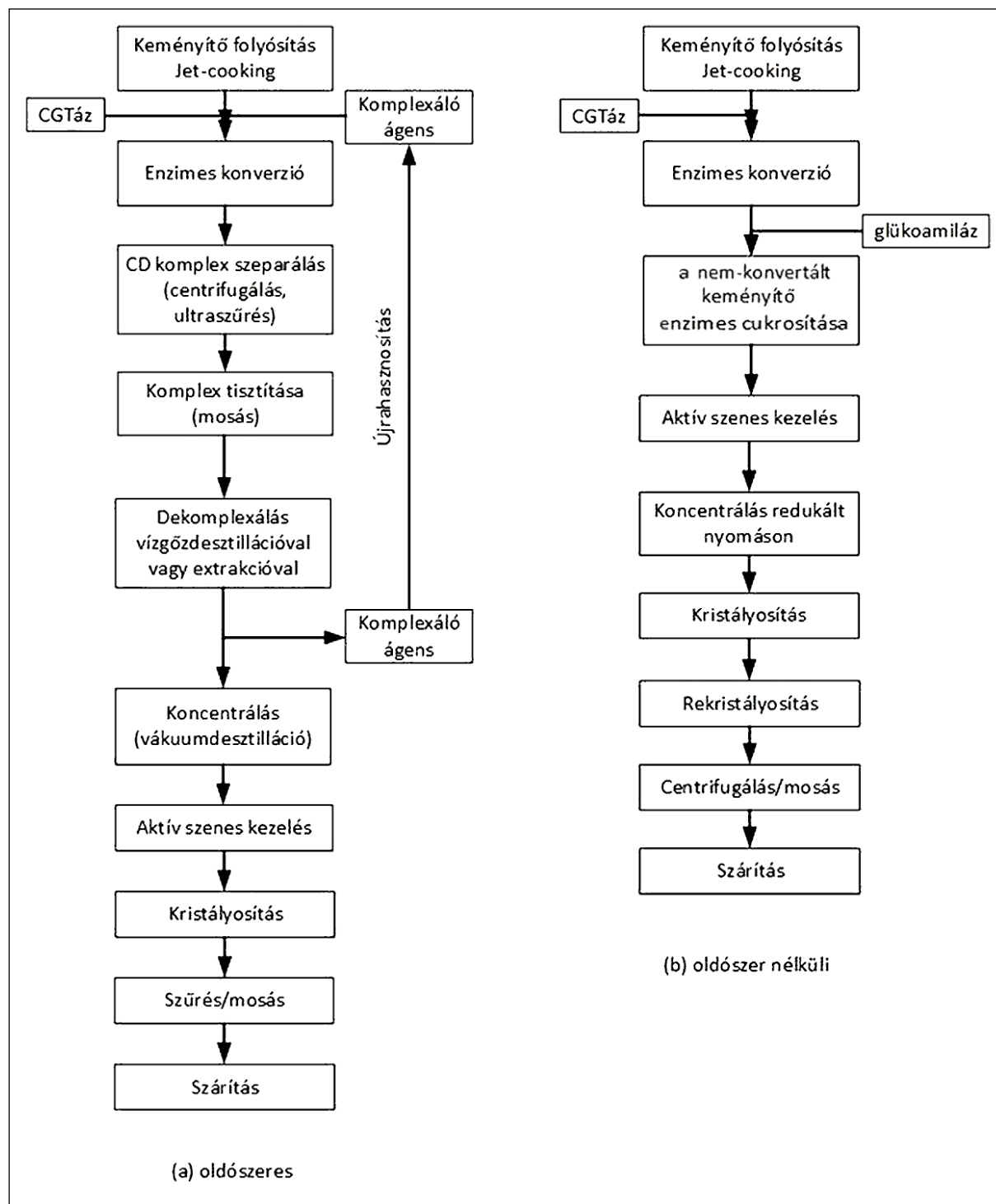
9.3.1.4. Gyártási technológiák

A gyártás kiindulási anyaga minden esetben a keményítő (főleg kukorica- vagy burgonyakeményítő), amelyet elfolyósítanak. A keményítő folyósítása 3-8 dextróz ekvivalensig (DE) történik. Ha a keményítő elfolyósítása nem megfelelő, akkor megindul a retrogradáció. Ha a keményítőt túlhidrolizáljuk, akkor a diszproporcionálási reakció fog dominálni, ez pedig szintén alacsony CD hozamot eredményez. Ha a keményítő hidrolízisére α -amilázt alkalmaznak, akkor azt a



169. ábra A ciklodextrin gyártás általános sémája
CGT-áz hozzáadása előtt inaktiválni kell, különben a hozam nagymértékben csökken.

Az elfolyósítási lépést követően válik szét a folyamat oldószeres és oldószermentes eljárásokra (170. ábra).



170. ábra A ciklodextrin gyártás két változata

9.3.1.5. Oldószeres eljárások

Ipari léptékben a legtöbb ciklodextrint oldószeres eljárásban állítják elő, ahol a szerves oldószer – főként toluol, dekanol – komplexképző szerként működik. Az eljárás a keményítő elfolyósításával kezdődik (tipikus keményítő koncentráció 20-30%). Az elfolyósítást hőstabil α -amilázzal végzik, az glükóz gyártásnál tárgyalt módon. A magas hőfok elérésére itt is *jet-*

cooker-t használnak, de a folyósítást nem követi a cukrosítás. Ezután a kapott dextrin oldatot le kell hűteni az enzim optimális hőmérsékletére, hozzá kell adni a CGTáz-t és a szerves komplexképző szert. A gyártást úgy lehet valamelyik CD termék irányába eltolni, hogy a kívánt termékből még a reakcióelegyben zárványvegyületet képzünk. Ehhez gondosan kiválasztott, méretben pont illeszkedő szerves vegyületekre van szükség (31. táblázat). A létrehozott addukt vegyület az egyensúly szempontjából „eltűnik” a rendszerből, legtöbbször ki is csapódik, így az enzim az egyensúly helyreállítása érdekében folyamatosan utánpótolja.

Néhány kicsapószer, például a ciklohexán, az α - és β -CD-ek keverékét eredményezi, de a hőmérséklet szabályozásával ezek relatív aránya szabályozható. Ahogy a hőmérséklet emelkedik, úgy a β -CD relatív mennyisége nő.

α -CD	1-dekanol	ciklohexán	etanol
β -CD	triklór-etilén	toluol	
γ -CD	brómbenzol	α -naftol	ciklohexadekán-8-alkén-1-on

31. táblázat Specifikus komplexáló ágensek a ciklodextrinek gyártásánál

A konverzió leállítását után a CD-oldószer komplexet centrifugálással vagy szűréssel lehet elválasztani a reakcióelegytől. A visszamaradó oldat fel nem használt keményítőt, lineáris dextrineket, glükózt, maltózt, CGTáz-t, maradék szerves komplexképző szert, melléktermékeket és vizet tartalmazhat. Az elválasztott adduktot mossuk, a szűrletet desztilláljuk, hogy a felesleges komplexképző anyagot visszanyerjük. A következő lépésben a CD-komplexet vízben szuszpendáljuk és a komplexképző szert vákuum/vízgőzdesztillációval elválasztjuk.

A termék oldatot vákuum-desztillációval lehet koncentrálni, néha szükséges aktív szénnel is tisztítani. A ciklodextrint hűtéssel kikristályosítjuk, majd leszűrjük, mossuk és szárítjuk. Ezek a feldolgozási lépések nem alkalmasak a különböző tagszámú frakciók elválasztására, ezek együtt jelennek meg a termékben. A termék tisztaságát az előző lépések, a megfelelő enzim és a komplexképző szer határozza meg.

β -CD előállítás

A gyártás 33 %-os keményítő szuszpenzió elfolyósításával kezdődik. A pH-t $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hozzáadásával emelik 7,2-re, ezzel a *B. subtilis* α -amiláz Ca-ion igényét is biztosítják. A hidrolízist 80 °C-on egy órán keresztül vezetik, majd az amilázt egy órás 120 °C-os hőkezeléssel inaktíválják. Az elegyet lehűtik 50 °C-ra, hozzáadnak 5% toluolt, és a CGTáz enzimet. A konverziót 100 órán keresztül vezetik.

Ahogy a reakció halad előre, a β -CD-toluol addukt oldhatatlan formában kicsapódik. A keményítő egységnyi tömegére vonatkoztatott hozam jellemzően 35-40%, sokkal nagyobb, mint az oldószer nélküli eljárással kapott hozam. A reakció befejeződése után a komplexet szűréssel vagy centrifugálással lehet elválasztani. A csapadékot vízben szuszpendálják, a keveréket felmelegítik és a kicsapószer desztillálással eltávolítják, egyúttal a CD oldatot betöményítik. A desztilláció végén a CD marad vizes fázisban és az oldószer 1 ppm alatti koncentrációban marad jelen. A β -CD oldatot aktív szénnel kezelik, majd a kristályosítás céljából lehűtik. A kívánt β -CD kristályait szűréssel vagy centrifugálással összegyűjtik, majd szárítják. A termék tisztasága 98%, az α - és γ -CD-ek jelenléte elenyésző.

α -CD gyártás

Előállítását nehezíti, hogy sokkal jobban oldódik vízben, mint a β -CD (140 g/l), nehezebb kikristályosítani. A reakcióelegyből n-dekanolos komplexképzéssel vonható el.

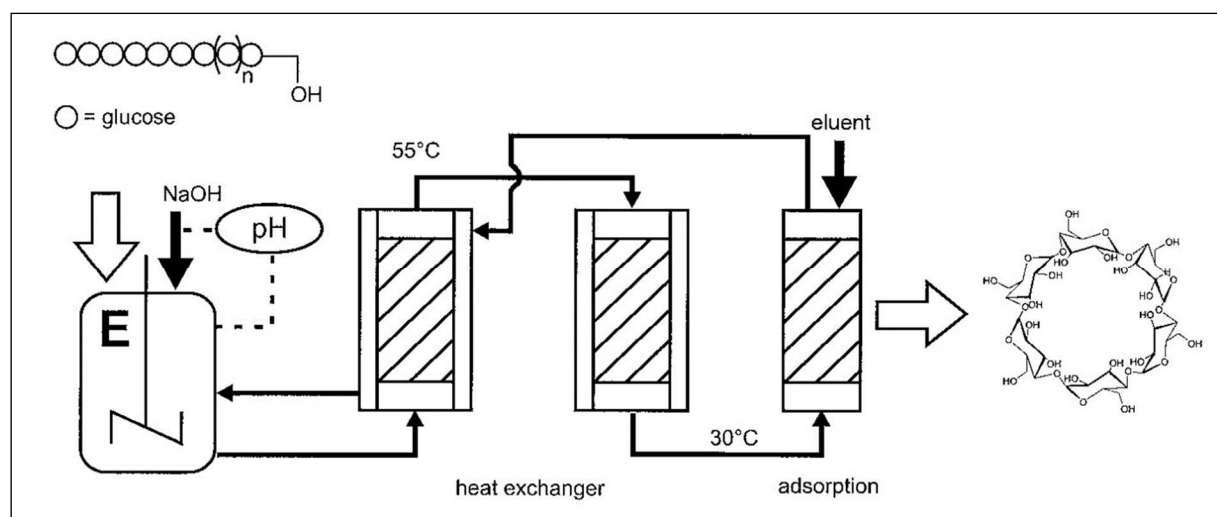
A *B. macerans* által termelt enzim a folyamat kezdeti szakaszában α - és β -CD-ek keverékét termeli, a reakciót elég hosszú ideig kell folytatni ahhoz, hogy a β -CD eltűnjön. A keményítőre számított kitermelés elérheti az 50 %-ot, ennek kb. 90%-a α -CD. A dekanol vízgőz-desztillációval távolítható el.

γ -CD termelés

A β -CD gyártás melléktermékeként preparálható. A rosszul oldódó β -termék addukt kiválása után kis koncentrációban az anyalúgban marad a γ -CD, a keményítőre vonatkoztatott hozama csak 2%. Innen komplexképzéssel választható ki γ -termék, például metil-etilketon és α -naftol keverékével. Ez a komplex vízben oldhatatlan, metanolban viszont jól oldódik. A komplex megbontása után vízben oldják, ioncserélő oszlopon és/vagy aktív szénnel tisztítják. Betöményítés után kristályosítják.

9.3.1.6. *MERCIAN eljárás*

A Mercian Co. egy japán cég, amely oldószeres addukt képzése nélkül oldotta meg az egyes ciklodextrin frakciók termelését. Az enzim reakció a hidrolizált keményítőn az előzőekhez hasonlóan megy végbe, oldott enzimmal, 55 °C hőmérsékleten. Az elválasztás a szelektív adszorpción alapul. A reakcióelegyet adszorpciós oszlopokon áramoltatják keresztül majd visszavezetik a reaktorba. A megkötés nagyon szelektív, majdnem eléri az affinkromatográfia specifitását. A hordozó kitozán, egy inert, hidrofil polimer. Az enzim adszorpcióját a tölteten 3% NaCl beoldásával akadályozzák meg. Az α -CD megkötéséhez ligandként sztearinsavat használnak. Szelektivitása igen jó, a kötött frakció tisztasága 95%. A β -CD megkötéséhez egy speciális szerves molekulát találtak, a ciklohexán-propánamid-n-kapronsavat. A technológiai nehézséget az okozza, hogy a két folyamat hőfok optimuma jelentősen eltér. Az enzim reakció 55 °C-on működik ideálisan, de ez nem kedvez az adszorpciónak. A kolonnákban 30 °C a megfelelő hőfok, de ezen az enzim aktivitása minimális. Emiatt a hőmérséklet változtatására hőcserélőket használnak. A kivett levet lehűtik, majd az oszlopok után visszamelegítik. A jobb hőhasznosítás érdekében a reaktorból jövő oldattal melegítik elő a recirkuláltatott folyadékot (171. ábra).



171. ábra A Mercian eljárás folyamatábrája

A folyamat anyagmérlege: egységnyi dextrinből 22,3% α -CD, 10,8% β -CD és 5,1% γ -CD nyerhető.

9.3.1.7. *A ciklodextrinek alkalmazása*

A ciklodextrinek zárványvegyületei kiválóan alkalmasak molekuláris csomagolásra, a bezárt anyagok molekuláit egyenként burkolja be a cukorgyűrű. Ezek a vendégmolekulák egyrészt eltűnnek a folyadékból, pontosabban a bezárt és az oldott koncentráció egyensúlyban van. Ugyanakkor a bezárt molekulák könnyen mobilizálhatók, ha az oldatból fogy az anyag, akkor az egyensúly újra beáll, a komplex formából gyorsan felszabadul a kellő mennyiségű molekula.

A molekuláris csomagolás hatásai:

- Növeli az apoláris molekulák vízoldhatóságát. A cukorrészek révén a molekula-komplex polaritása sokkal nagyobb, mint a vendégmolekuláé egyedül.
- Csökken a bezárt anyag illékonyága. A gőznyomás kialakítása szempontjából csak a szabad molekulák koncentrációja számít, a bezártaké nem.
- Javul a bezárt molekula stabilitása. A komplexben kevésbé hozzáférhető a kémiai reakciópartnerek, például az oxidáló ágensek számára.
- Gyógyszerhatóanyagoknál a tároló kapacitás depóképzést tesz lehetővé. A komplexben bevitt gyógyszer mennyiség hosszabban marad a keringésben, elnyújtottabb hatást biztosít.
- Injekció formában bevitt gyógyszereknél előfordul, hogy a hatóanyag a beadás helyén irritálja a szöveteket. Zárványként bevitt molekulák esetében ez a hatás nem lép fel, a ciklodextrinek elszigetelik a hatóanyagot a sejtektől.

A ciklodextrinek felhasználási területe igen széles és egyre bővül. Az éves termelési volumen néhány 100 tonnára becsülhető.

Alkalmazások élelmiszerekben, kozmetikumokban

A fűszerek és más aromás anyagok illóolajait ciklodextrinekbe lehet csomagolni. Így az aromák stabilizálódnak, kevésbé illannak el, és védve vannak az oxidációval szemben is. A hagyma és a fokhagyma olaját bezárva a kellemetlen szag nélkül vihetjük be ezeket a hasznos anyagokat. Olvadt vajból a CD kivonja a koleszterin 90%-át. Kozmetikumokban a bezárással az illatanyagok lassabban illannak el, a termékek hosszabban tárolhatók. Szobahőmérsékleten az illékonyág, azaz az illatintenzitás kicsi, de a bőrre kerülve a magasabb testhőmérséklet hatására felerősödik.

Alkalmazások a biotechnológiában

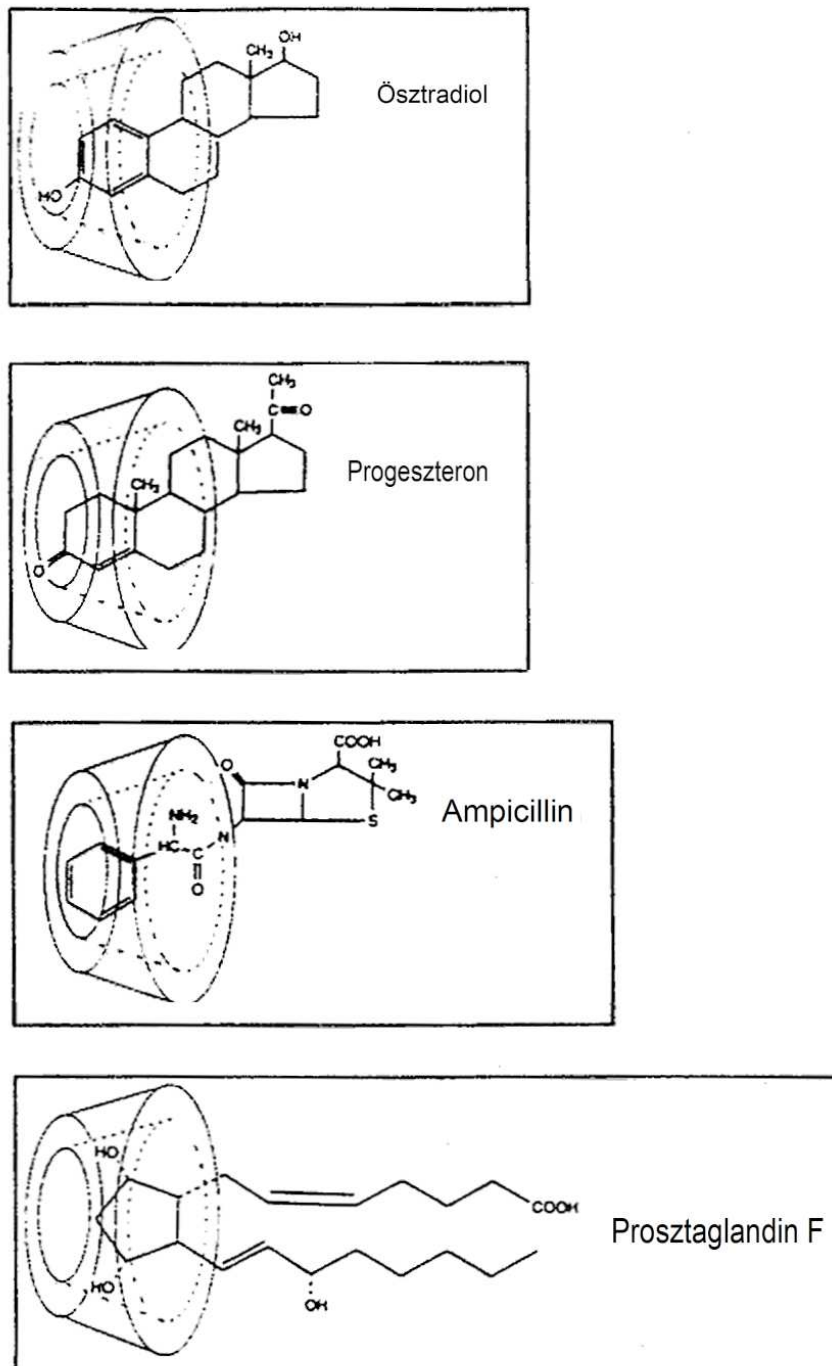
A fermentációs folyamatok során gyakran okoz problémát valamely apoláros komponens rossz vízoldhatósága. Zárványvegyületben alkalmazva ezeket az anyagokat a kellő mennyiségben vihetjük be a rendszerbe.

A *Bordatella pertussis* tenyésztésénél a szabad zsírsavak gátolják a tenyészet növekedését. β -CD hozzáadásával a zsírsavak komplexbe kerülnek, így megindulhat a szaporodás.

A *Mycobacterium leprae* esete éppen fordított. A szaporodást éppen az gátolta, hogy a számára esszenciális palmitin- és sztearinsavat nem tudta a vizes fázisból felvenni. Ha ezeket dimetil- β -CD komplex formában adagolták, a növekedés megindult.

A szteroid konverzióknál általános gond az, hogy mind a szubsztrát, mind a termék rosszul oldódik vizes közegben (a fermentáléban), így „kristályfermentációt” kell végezni, a szteroidok kristályos formában végig jelen vannak a fermentáléban. A szubsztrát hozzáférhetőségének javítására az egyik módszer a ciklodextrin zárványkomplex alkalmazása. Bár nagyon költséges, de ipari méretekben is alkalmazzák a β -CD-t a hidrokortizon \rightarrow prednizolon átalakításnál. A konverzió igen jó, megközelíti a 100%-ot.

Szintén szteránvázis vegyület a növényi eredetű szívgyógyszer, a digoxin. A hatásos főkomponens mellett a növényi sejtek inaktív melléktermékként Lanatozid-C-t is termelnek, ami enzimis konverzióval digoxinná alakítható. A dimetil- β -CD alkalmazásával az oldhatóság javítása révén az enzimis folyamat hozama 20%-ról 50-60%-ra növekedett.



172. ábra Ciklodextrin-hatóanyag komplexek

Alkalmazások a gyógyszerekben

Az emberi szervezetbe bevitt gyógyszerek formulálásában is szerepe van a ciklodextrinnek. A felsorolt előnyök közül itt kerül előtérbe az oldhatóság javítás, a depóképzés, az irritáció csökkentése. Néhány példa az alkalmazásra (172. ábra):

Indometacin (gyulladásgátló, de irritatív)

Prostaglandin E₂ + β-CD: szublingualis készítmény, szülés indítására

Prostaglandin E₁ + α-CD: injekciós készítmény, érszűkület kezelésére

Benexate + β-CD: gyomorfekély kezelésére

10. ANTIBIOTIKUMOK

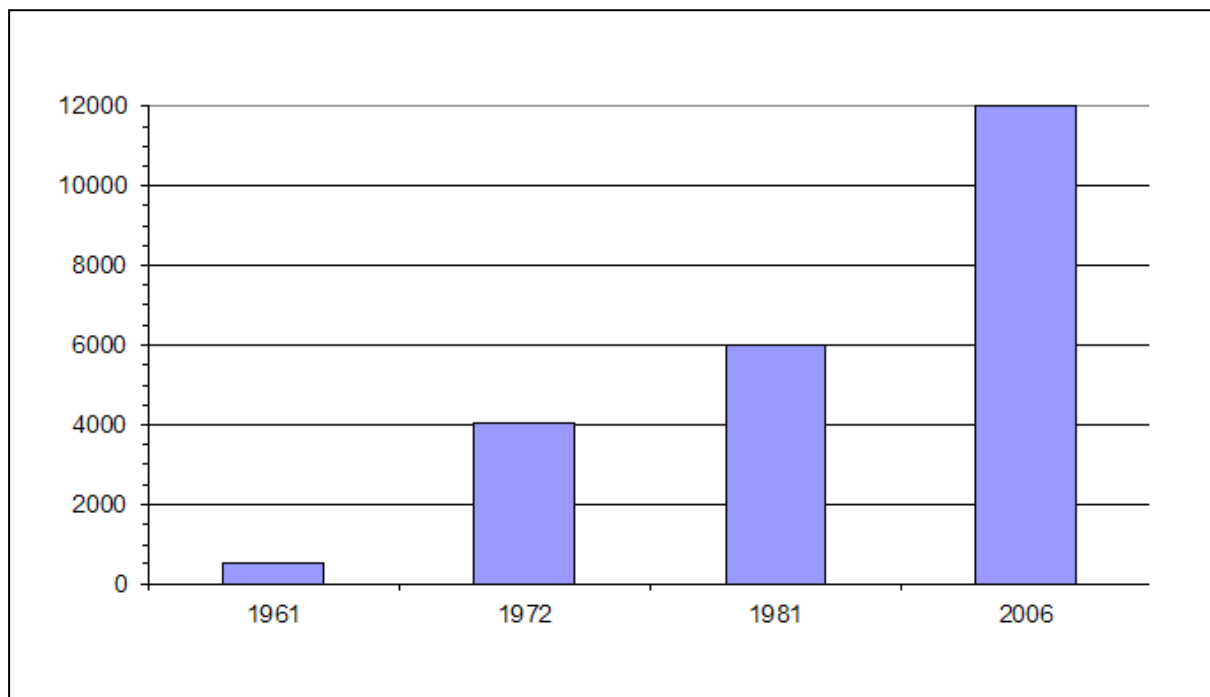
10.1. Általános bevezető

Az **antibiózis** fogalmát a szimbiózissal együtt elsőként Viullemín használta az élőlények kölcsönhatásainak leírására 1889-ben. Ő még a *Lactobacillus*-ok tejsav termelését tekintette antibiózisnak, a mai értelemben vett antibiotikumok felfedezése fél évszázaddal később történt.

Az **antibiotikumok** olyan mikroorganizmusok által termelt, más mikrobák életfolyamatait gátló vegyületek (szekunder metabolitok), amelyeket a hatásos koncentrációban az emberi szervezet károsodás nélkül elvisel. Régebben az antibiotikumok körébe számították a szintetikusan előállított mikrobaellenes gyógyszereket is. Egyesek az antibiotikumok körébe sorolják a mikrobiális eredetű citosztatikumokat is. Ezek szintén szekunder metabolitok, a humán terápiában alkalmazzák, de nem a fertőző betegségek kezelésére, hanem a tumorterápiában, a gyorsan szaporodó emberi sejtek elpusztítására.

A **másodlagos anyagcseretermékek** termelése nem kapcsolódik közvetlenül a sejt energia és anyagtermeléséhez, a tenyésztés későbbi szakaszában fordul elő. Sokszor kedvezőtlen környezetváltozás hatására indul be a termelés (többszörös tápanyag limit, eltolt pH, kellemetlen anyagcseretermék felhalmozódása, stb.), ha a szokványos anyagcsereutak nem működnek megfelelően. Termelésük sokszor értelmetlennek tűnik (lehet pl. nyálkaanyag, toxin, alkaloid, pigment, tokanyag, antibiotikum), a sejtnak nincs közvetlen haszna a termelt molekulából.

A szekunder metabolizmus beindulását segíti a tápanyag limit, ha a **szénforrás** kis kon-



173. ábra Az ismert antibiotikumok számának alakulása az elmúlt évtizedekben

centrációjú vagy nehezen hozzáférhető a mikroorganizmus számára (a bőséges szénforrás az elsődleges anyagcsereét pörgeti fel), és ha a **nitrogénforrás** komplex, szerves eredetű (szójaliszt, kukoricalékvár), és adagolással folyamatosan alacsony szinten tartják a koncentrációját (a sok N a növekedésnek kedvez, az ammónium-sók pedig inkább gátolják a termékképződést). *Szeretlen foszfát* jelenlétében a szekunder metabolizmus rendszerint nem kezdődik el, ezért csak annyit adnak a tenyészethez, amennyi a mikrobák szaporodásához szükséges, és elfogy, mire eléri a kívánt sejtszámot és a másodlagos anyagcseretermékek bioszintézise beindulhat.

Eddig körülbelül 12–13 000 antibiotikumot írtak le, ezek közül néhány százat gyártanak ipari léptékben fermentációs és/vagy félszintetikus úton. Az ismert vegyületek közül nagyjából 300-at alkalmaznak humán a gyógyászati gyakorlatban (ezek 30-40 féle alapstruktúrából származtathatók).

Az ismert antibiotikumok száma az elmúlt évtizedekben ugrásszerűen megnőtt, azonban egyre nehezebb új antibiotikumokat találni a folyamatos törzsfeljesztések, izolálások, *screeningek* dacára. Az új antibiotikum típusok, antibiotikum osztályok felfedezése gyakorlatilag megállt, 1987 óta nem fedeztek fel új kategóriát. Míg 1960-ban a megtalált antibiotikumok 5%-a klinikai alkalmazásra került, addig 2006-ra ez az arány lényegesen, 1% alá csökkent. Az antibiotikum kutatás klasszikus módszere vad törzsek izolálása a természetből kioltási zónák alapján. Kiindulási anyagként legtöbbször egzotikus talajmintákat alkalmaznak, ezekben várható ismeretlen törzsek, változatok előfordulása.

Az antibiotikumok nagy többsége a klinikai gyakorlatba vétel után egy-két évtizeddel elavul, kikerül az alkalmazási körből. Ennek oka lehet az elterjedő rezisztencia, a mellékhatások, allergia fellépése vagy hatékonyabb, olcsóbb, könnyebben alkalmazható szerek megjelenése.

Új antibiotikumok felfedezésének kényszere a fejlett országokban a legnagyobb, ahol a fizetőképes kereslet is megvan az új gyógyszerkészítményekre. Egy klinikai alkalmazásban álló antibiotikum egészen addig nem nevezhető elavultnak, amíg a fejlődő országok – a másutt már nem használt gyógyszert – sikerrel alkalmazhatják.

Az utóbbi években a génmérnökség (*genetic engineering*), valamint a számítógépes molekulamodellizálás elterjedésével lehetőség nyílt a már ismert antibiotikumok új származékainak vagy hasonló szerkezetű (analóg) vegyületeinek termelékenyebb előállítására is.

A felfedezett antibiotikumok mintegy háromnegyed része sugárgomba (*Actinomycetes*) metabolit, melyen belül is különösen jelentős a *Streptomyces* nemzetségbe tartozó fajok antibiotikum-termelése – ezek adják az eddig leírt antibiotikumok mintegy kétharmadát.

A *Penicillium* és *Acremonium* (*Cephalosporium*) fajok által termelt, β -laktám-típusú antibiotikumok (penicillinek, cefalosporinok) viszont az antibiotikumok összes kereskedelmi forgalmából közel 70%-ot képviselnek.

10.1.1. Osztályozás:

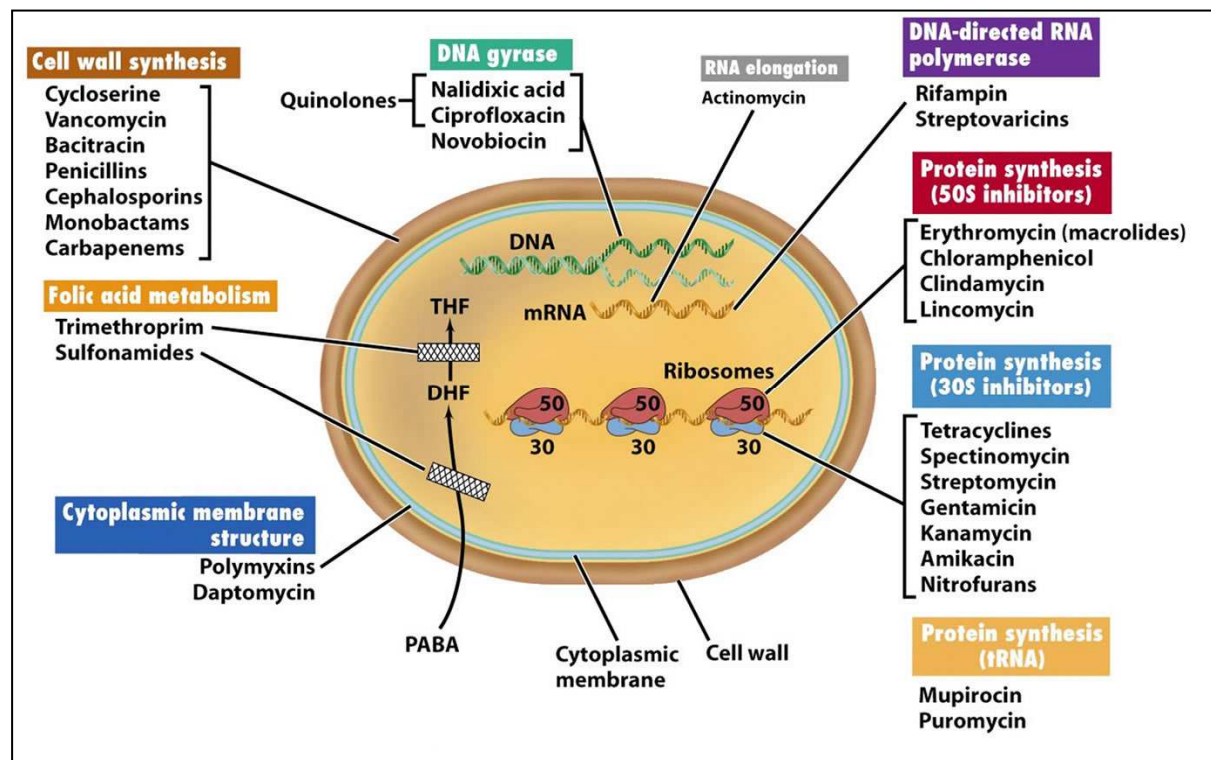
Ezt a sok vegyületet többféle szempontból is lehet csoportosítani. Minden szakember a saját szempontjai szerint kezeli az antibiotikumokat.

Kémiai szerkezet szerinti osztályozást követ a Handbook of Antibiotic Compounds (szerkesztője a Bérty János magyar akadémikus), amely 1974-től évente összesen 13 vastag kötetben jelent meg. Eszerint megkülönböztethetők:

- Aminosav-származékok, peptidek: Cikloszerin, Bacitracin, β -laktám antibiotikumok
- Szénhidrát származékok: Sztreptomycin, Vankomicin
- Makrociklusos laktonok: Eritromicin,
- Kinonok: tetraciklinek, Mitomicin
- Aromások: klóramfenikol
- Szteránvázások, terpénvázások

Ehhez valamennyire kapcsolódik a *bioszintézis utak* szerinti csoportosítás, hiszen a hasonló szerkezetű molekulák hasonló anyag cserefolyamatok termékeként jönnek létre.

Hatásmechanizmus, támadáspont szerint is lehet csoportosítani e vegyületeket. A sejtek életműködését többféle módon is akadályozhatják az antibiotikumok. Gyakori támadáspont a sejtfaleszintézis (β -laktámok, bacitracin), a fehérjeszintézis (tetraciklinek, aminoglikozidok, makrolidok), a sejtmembránok működése (ciklopeptidok, poliének), ritkábban a nukleinsavak (rifamicin, citosztatikumok).



174. ábra Az antibiotikumok támadáspontjai

A felhasználók, azaz az orvosok szempontjai mások. Őket egyrészt az egyes szerek *hatásspektruma* érdekli, azaz hogy mely mikrobák ellen hatékonyak és mikor hatástalanok. A hatássosság nem egyes törzsekre, hanem nagyobb mikrobiológiai rendszertani egységekre vonatkozatható, így például más gyógyszerek alkalmazhatók Gram-pozitív és Gram-negatív törzsekre. A *szűk spektrumú* antibiotikumok csak a mikroorganizmusok egy szűk csoportjára hatnak, míg a *széles spektrumúak* a mikrobák széles körét pusztítják el.

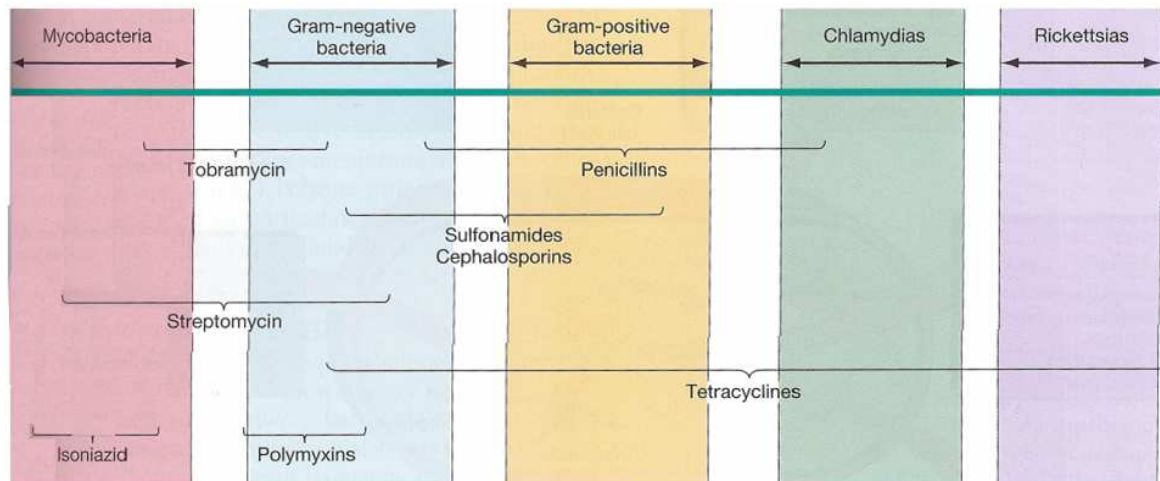
A gyakorlati orvoslás szempontjából a *terápiás alkalmazhatóság* a fő szempont. Más antibiotikumok célszerűek pl. egy tüdőgyulladás kezelésénél, mint a húgy-ivari fertőzéseknél, megint mások egy középfül-gyulladásnál.

Rendező elv lehet még a *termelő törzsek* rendszertani helye, így a baktériumok, sugárgombák és a fonalgombák által termelt anyagok csoportja.

A következőkben elsődlegesen a támadáspont szerinti osztályozást használjuk, ezen belül a kémiai szerkezet szerint haladunk.

10.1.1.1. *Antibiotikum érzékenység és rezisztencia*

A hatásspektrum tárgyalása kapcsán megemlítettük, hogy az egyes antibiotikumok csak bizonyos mikrobák ellen hatékonyak, másokra nézve az adott vegyület hatástalan. Ez utóbbiak rezisztenciája természetes, állandó, örökletes tulajdonság, nagyobb rendszertani egységekre jellemző.



175. ábra Az egyes antibiotikum csoportok hatásspektruma

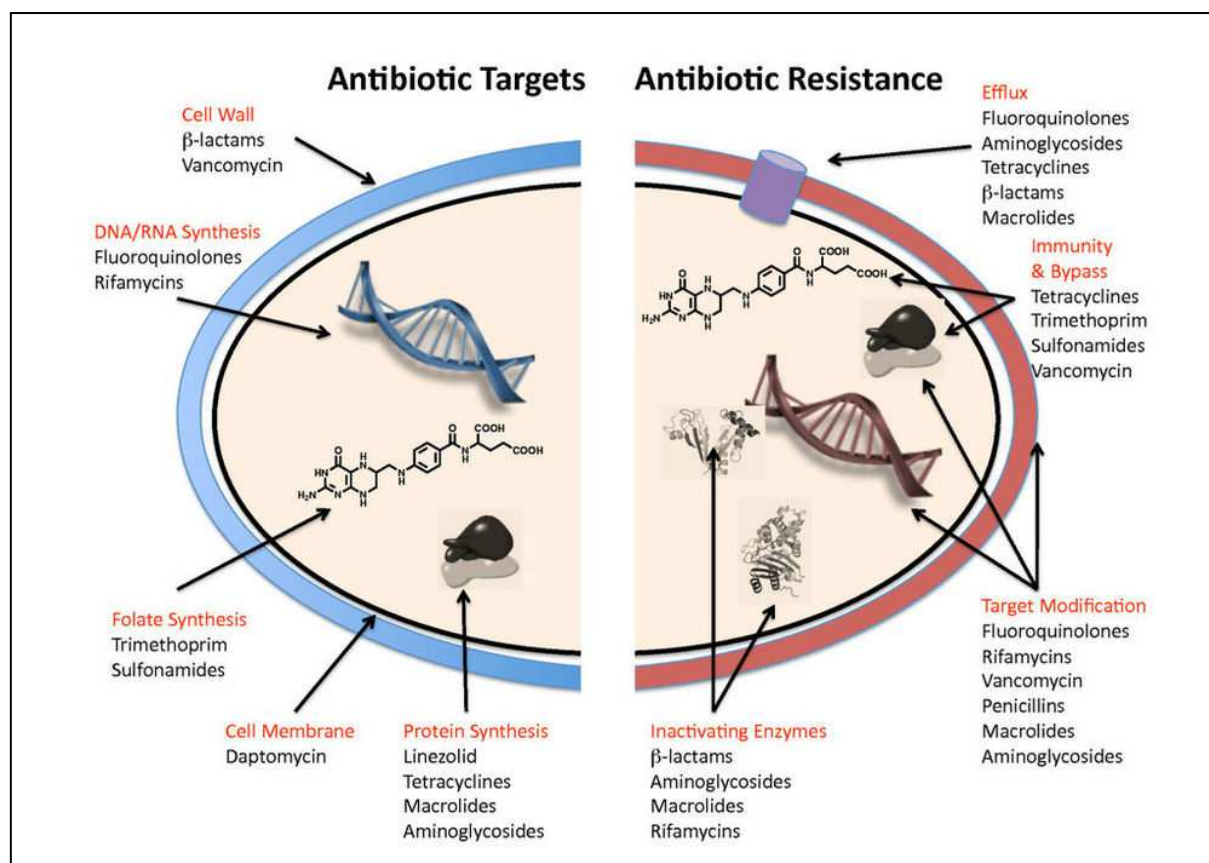
Élesen elkülönül a szerzett rezisztencia. A baktériumok nagy részénél a kezelés/érintkezés során rezisztencia alakul ki az adott antibiotikummal szemben. Az ellenálló képesség megnövekedésének többféle mechanizmusa ismert.

Előfordul, hogy a kérdéses antibiotikum egy változás következtében nem jut be a sejtbe (*permeabilitási mutánsok*), így nem éri el célpontját. Ez csak a sejtben ható gyógyszereknél működik, a sejtfa szintézis gátlása például a sejtmembránon kívül történik.

Másik lehetőség, hogy a *célpont*, általában egy fehérje *szerkezete változik meg*. Biokémiai funkcióját továbbra is betölti, de az antibiotikum nem tud kötődni és ezáltal elveszti hatékonyságát. Jó példa erre a sztreptomycin, amely a fehérjeszintézist gátolja oly módon, hogy a riboszóma 30S alegységének S12 fehérjéjéhez kötődik. Az itt bekövetkező mutáció (Phe–Ile aminosav csere) rezisztenssé teszi a törzset.

Gyakori eset, hogy a bekerülő antibiotikum molekulát enzimek hatástalanítják. Ez történhet a molekula bontásával, illetve ellenkezőleg, csoportok rákapcsolásával, származékképzéssel. Az előbbire példa a penicillin, illetve a β -laktám vázas antibiotikumok inaktiválása. Számos törzs termel β -laktamáz enzimet (>40 különböző enzim), de hatásuk azonos. A β -laktám váz négytagú gyűrűjét nyitják fel, ennek következtében az antibiotikus hatás megszűnik. A származékképzés jól tanulmányozott esetei az aminoglikozid antibiotikumok (sztreptomycin csoport). A cukorszármazékok –OH csoportjaira foszfát, acetil- illetve adenil-csoportokat kötnek a hatástalanító enzimek.

A rezisztencia kialakulásának folyamatát kétféle típusba sorolják. A penicillin típusú rezisztencia fokozatosan, sok generáción keresztül, lépésről lépésre alakul ki, valószínűleg halmozódó mutációk következtében. A sztreptomycin típusú viszont egy lépésben, ugrásszerűen jelenik meg, törzs antibiotikum tűrő képessége hirtelen nagyságrendekkel növekszik. Ennek oka lehet egylépéses mutáció (mint a sztreptomycinénál az S12 fehérje mutációja), vagy génátadással (plazmid fertőzés, konjugáció, transzformáció, transzdukció, rekombináció)



176. ábra Az antibiotikumok támadáspontjai és a rezisztencia

Felhasználás:

Antibiotikumokat nem csak az orvosok használnak, érdemes felsorolni az összes alkalmazási területet. Termelési volumen és piaci érték szempontjából legnagyobb az igény a

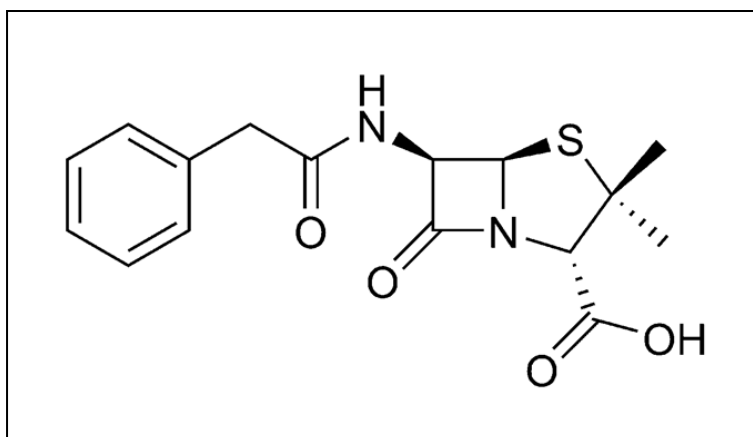
- *Humán gyógyászatban*: mikrobiális fertőzések gyógyítására, ide sorolhatók a citosztatikumok is.
- *Állatgyógyászatban*: analóg a humán alkalmazással.
- *Kutatásban* (biokémia, mikrobiológia): szelektív inhibitorok (fehérje-, DNS-, RNS-, sejtfaleszintézis gátlása)
- *Élelmiszerkonzerválás*: régebben alkalmazták tartósításra, de ma már nem engedélyezik.
- *Növényvédelem*: régebben alkalmazták a növényi kártevők ellen, de ma már nem engedélyezik.
- *Takarmányadalékként*: kis dózisban (nem terápiás mennyiségben, 1–10 mg/kg). Csökkenti a használlatok emésztőszervi megbetegedéseit, javítja a takarmányhasznosítást, jobban gyarapodik az állomány. Az elhullási százalék – különösen a fiatal állatoknál - csökken. Ezt a gyakorlatot a kialakuló antibiotikum rezisztencia miatt több lépcsőben korlátozták. Előbb a SWAN konvenció mondta ki, hogy csak olyan antibiotikumot szabad adni, amely nem jelenik meg a végtermékekben (hús, tej, tojás). Ennek a feltételnek azok az antibiotikumok feleltek meg, melyek nem szívódnak fel, a bélcsatornában maradnak és ott fejtik ki hatásukat (pl. bacitracin). Később az Európai Unióban gyakorlatilag teljesen betiltották ezt az alkalmazást. Jó higiéniai viszonyok között, ahol kisebb fertőzésveszély, nincs is nagy jelentősége, de trópusi területeken ahol nagy a bélfertőzések gyakorisága, számottevő profitot hozhat a takarmányok adalékolása.

10.2. Sejtfal szintézist gátló antibiotikumok

A támadáspont szerinti csoportosításban elsőként vesszük a sejtfal szintézist gátló antibiotikumokat. Ezen belül is mind történetileg, mind piaci súlyuk miatt az első helyre kerülnek a β -laktám-vázás antibiotikumok.

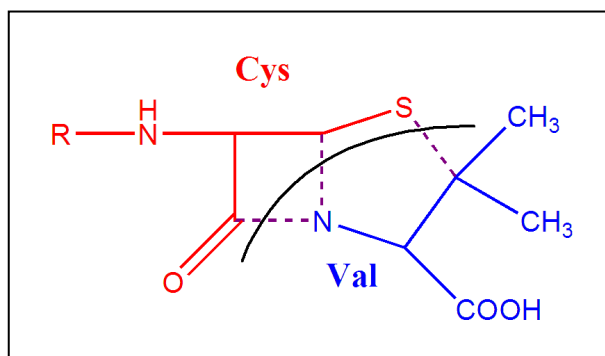
10.2.1. Penicillin

A penicillint Fleming 1929-ben írta le, mint a *Penicillium notatum* fonalas gomba által termelt baktériumellenes antibiotikumot (2-3 $\mu\text{g/ml}$). Csak jóval később, 1940-ben sikerült izolálni és tiszta formában előállítani a penicillint egy oxfordi kutatócsoportnak.



177. ábra A G-penicillin szerkezete

A β -laktám (négytagú) gyűrűt tartalmazó alapváz a 6-amino-penicillánsav (angol rövidítése: 6-APA) amino csoportját egy aromás karbonsav acilezi. Az alapvázat alaposabban megfigyelve felismerhetjük, hogy az voltaképpen két aminosavból (Cys és Val) áll, amelyet a szokásos peptid kötésen kívül még két kovalens kötés kapcsol össze.



178. ábra A 6-APA alapváz két aminosavból tevődik össze

Az **R** savmaradék szerkezete sokféle lehet, ennek kialakításával változtatni lehet a molekula kémiai és gyógyszeres tulajdonságait.

Fizikai tulajdonságait tekintve a penicillin vízben jól oldódó, színtelen anyag, amelynek az UV tartományban sincs elnyelése. Optikailag aktív, 3 aszimmetria-centruma van.

Kémiai szempontból gyenge sav, kationokkal sót képez, alkáli sók formájában hozzák forgalomba.

BOMLÉKONY anyag! Savak, lúgok és oxigén hatására többféle reakcióúton is gyorsan bomlik. A G-penicillin a gyomorsavban is elbomlik, ezért ez a molekula szájon át nem adható.

Érzékenysége miatt nem kerülhet olyan készítménybe, amit hővel sterilizálnak. A β -laktamáz enzimek gyűrűbontással inaktíválják.

Kvantitatív kémiai meghatározás szempontjából érdekes a laktám gyűrű reakciója hidroxilaminnal. A képződő hidroxamát színes vaskomplexe kolorimetriásan mérhető. Másik mérési lehetőség a jodometriás titrálás. Maga az ép penicillin molekula nem köti a jódot, de a lúgos hidrolízis terméke, a penicillosav viszont 7-8 atomnyi jódot is felvesz. Ezek a módszerek viszonylag nagy koncentrációk mérésére alkalmasak, így a gyártásközi ellenőrzéseknél használhatók. Az orvosi gyakorlatban előforduló kis koncentrációk méréséhez nem elég érzékenyek.

Mivel az oldallánc és az ellenion sokfélesége miatt a tömeggel megadott penicillintartalom a különböző készítményekben nem hasonlítható össze, ezért ezt inkább a hatást mérő nemzetközi egységben adják meg. 1 NE/IU = az a penicillinmennyiség, amely 50 ml-nyi standard összetételű tápoldatban éppen meggátolja egy adott *Staphylococcus aureus* törzs szaporodását. 1 IU = 0,6 μ g G-penicillin Na sónak felel meg.

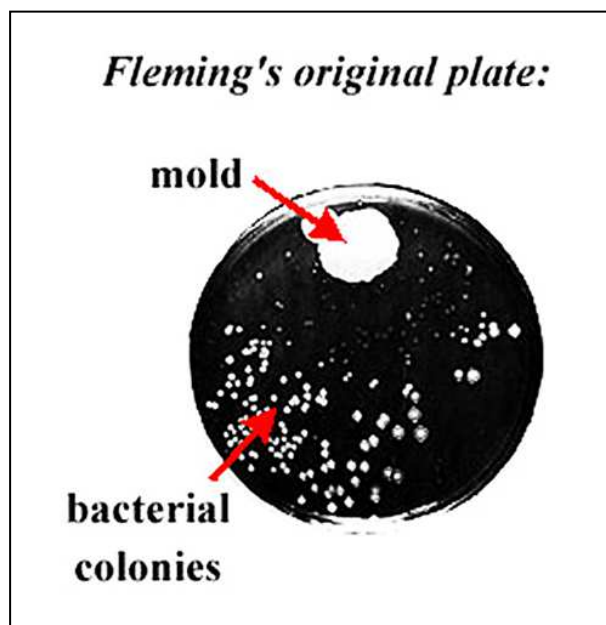
10.2.1.1. A penicillin felfedezése – a penicillin story

A penicillint felfedező orvos - Alexander Fleming – munkája a kórházban kezelt fertőzések esetek, elsősorban a gennyes gyulladások mikrobiológiai vizsgálata volt. A felfedezést, mint annyi más esetben is a véletlen hozta. A kórokozók telepeit tartalmazó Petri csészébe véletlenül (mondhatjuk úgy is, hogy a nem elég steril laboratóriumi munka következtében) bekerült egy, pontosabban két penészspóra.

A másik véletlen (erre is mondhatjuk, hogy gondatlanság) az, hogy a használt Peri csészéket sokáig, legalább egy, de inkább két hétig tárolták a visszasterilizálás előtt. Ezalatt a spóra kicsírázott, telepet növesztett és előregedett, volt ideje eljutni az antibiotikum termelő fázisba. Fleming megfigyelte a telep körül kialakult kioltási gyűrűt, és arra következtetett, hogy a penész valamilyen gátlóanyagot termel, ami a baktériumok szaporodását akadályozza, de a termelő gombát magát nem károsítja.

Remélte, hogy ez az anyag a mikrobák ellen hatékony gyógyszer lehet. Mivel korábban a lizozim enzimmel foglalkozott, amely a baktériumok sejtfalának elbontása révén hasonlóan elpusztítja a mikroorganizmusok egy részét, ezt a még ismeretlen anyagot is fehérjének, enzimnek vélte. A penészt leoltotta, majd a jelenséget reprodukálta. A törzs azonosításáért Thom-hoz, egy profi mikológushoz fordult, aki azt rendszertanilag a *Penicillium notatum*-mal, egy ritkán előforduló fajjal azonosította.

A hatékony komponens izolálásával és szerkezetének felderítésével többen próbálkoztak, de a durva kémiai módszerek hatására az anyag rendszeresen elbomlott a kezük között. 1932-ben Clutterbuck csak annyit közölhetett, hogy a penicillinnek elnevezett hatásos anyag labilis, pH- és hőérzékeny gyenge sav. Orvosi alkalmazásban csak odáig jutottak, hogy a tenyészet szűrletét javasolhatták külsődleges fertőzések kezelésére. Az Oxfordban dolgozó Chain és Florey (későbbi Nobel díjasok) végül liofilizálással tudtak stabil készítményt előállítani, amivel megkezdhetők az orvosi kísérletek.



179. ábra Fleming eredeti felvétele

Az áttörést, mint annyiszor, egy háborús konfliktus hozta el. A második világháború kitörésével megnőtt az igény minden, a sebesült katonák gyógykezelésére alkalmas anyag és eljárás iránt. (Az I. világháborúban a megsebesült katonák nagy százaléka vérmérgezésben halt meg.) Katonai titoktartás mellett több kutatóintézetet és gyógyszergyárat is bevontak. A szellemi és anyagi befektetés eredményeket hozott, felderítették a molekula szerkezetét és egyre hatékonyabb fermentációs és tisztítási eljárásokat dolgoztak ki.

*Adalék: a titoktartás dacára hazafias kampányt hirdettek az amerikai háziasszonyok között, hogy romlott élelmiszereikről küldjenek penészmintákat a szövetségi törzsgyűjteménybe. A beküldött törzsek antibiotikum termelő képességét megvizsgálták. Végül egy háziasszony penészes grapefruit-járól (mások szerint dinnyéjéről) származó *Penicillium chrysogenum* tenyészet bizonyult a legjobbnak, egy nagyságrenddel több penicillint termelt, mint a Fleming által izolált törzs. Máiig ennek a törzsnek a sokszorosán mutált utódaival termelik a penicillint világszerte.*

1943 májusában az új gyógyszert már több száz sebesült esetében alkalmazhatták teljes sikerrel a szepszis kialakulásának akadályozására, illetve gyógyítására. 1944 nyarán, a normandiai partraszállásnál már minden hadikórházban ott volt a penicillin injekció.

Adalék: (Lehet, hogy urban legend.) A klinikai vizsgálatok idején történt, hogy F.D. Rooseveltnél, aki ebben az időben már sokat betegeskedett, tüdőgyulladást kapott. Felmerült az orvostikai kérdés, hogy szabad-e egy szépreményű, de még klinikai kipróbálás alatt álló gyógyszerrel kezelni egy olyan fontos személyt, mint az Egyesült Államok elnöke. Végül úgy döntöttek, hogy lehet, és eredményesen kezelték a fertőzést.

Adalék: A tesztelés során még nagyon rossz határfokú volt a gyártás, nagy ráfordítással kevés hatóanyagot tudtak előállítani, a penicillin unciánkénti ára magasabb volt, mint az aranyé. 100 ezer NE, azaz 60 mg penicillin akkor 20 dollárba került. A kezelése során felismerték, hogy a beadott penicillin 48 órán belül gyakorlatilag teljesen (97%-ban) kiürül a vizelettel. Ezért összegyűjtötték a kezelt betegek vizeletét, és visszanyerték belőle a penicillint. Még egyszerűbb is volt kinyerni, mint a sokkal több idegen anyagot tartalmazó fermentáléból.

A legelső felhasználásra került preparátum mindössze 1% hatóanyagot tartalmazott. A tisztításban való előrehaladás a kémiai szerkezet felderítésének lehetőségét is jelentette. A szerkezetkutatásban 1944-ben már 59 kutatóhely vett részt teljes katonai titoktartás mellett. Abban reménykedtek, hogy a kémiai szerkezet ismeretében a hatóanyag kémiai szintézisére lehetőséget találnak. Ma már köztudott, hogy kutatómunkát az zavarta, hogy a különböző laboratóriumokban előállított gombatenyészetek szűrletei több mint 20 különféle penicillin keverékét tartalmazták, amelyek elsősorban az acilező savcsoport szerkezetében különböztek.

Az USA laboratóriumaiban előállított penicillin készítmények mért fizikai-kémiai adatai jelentős mértékben eltértek az Angliában előállított készítmények vizsgálatánál kapott értékektől. Az egyik esetben G-penicillin (benzil-penicillin), a másik esetben F-penicillin (pentenil-penicillin) volt a főtermék. A különbséget az okozta, hogy Angliában a szeszmoslékot (distillers solubles) használták táptalajként, az US kutatói viszont a fenil-ecetsavat is tartalmazó kukorica áztató lé (Magyarországon: kukoricalékvar) tejsavas erjesztéssel dúsított koncentrátumát alkalmazták a táptalaj nitrogén forrásaként. A tenyésztő táptalaj kémiai összetételének meghatározó jelentőségét felismerve javasolták a prekursorok alkalmazását. A tápközeghez adott fenil-ecetsav jelenlétében a kutató laboratóriumokban főleg benzil-penicillin képződött a fermentáció során. A szerkezetet végül 1945-ben, röntgen-krisztallográfiai módszerekkel sikerült egyértelműen felderíteni.

10.2.1.2. A fermentált alapvegyületek

A G-penicillin nagy tételben gazdaságosan fermentálható, de nagyon érzékeny vegyület. Emiatt kerestek párhuzamosan egy saválló származékot, amit a V-penicillinben (fenoxi-metil-penicillin) találtak meg. Az iparban az adagolt prekursor vegyületek (G - fenilecetsav, V - fenoxiecetsav) megválasztásával benzilpenicillin vagy fenoximetil-penicillin állítható elő.

E két „klasszikus” penicillint viszonylag olcsón, tömegtermékként fermentálják. De gyógyszerként nem ezeket, hanem a belőlük előállított félszintetikus hatóanyagokat használják. A bioszintetikus penicillinekből enzimes hidrolízissel szabadítják fel a 6-APA-t, majd erre egy

másik karbonsav származékot kapcsolva állítják elő a kívánt gyógyszer molekulát. Létezik olyan fermentációs eljárás is, amelyben az alapvázat (6-APA) állítatják elő, azonban ez az eljárás nem tudta kiszorítani a G-penicillin gyártását.

Ez a legnagyobb mennyiségben gyártott anyag, a V-penicillin és 6-APA piaca jóval kisebb. A további szintetikus lépésekkel a G-penicillinből penicillinszármazékokat, a V-penicillinből pedig cefalosporinokat állítanak elő.

10.2.1.3. *A penicillin bioszintézise*

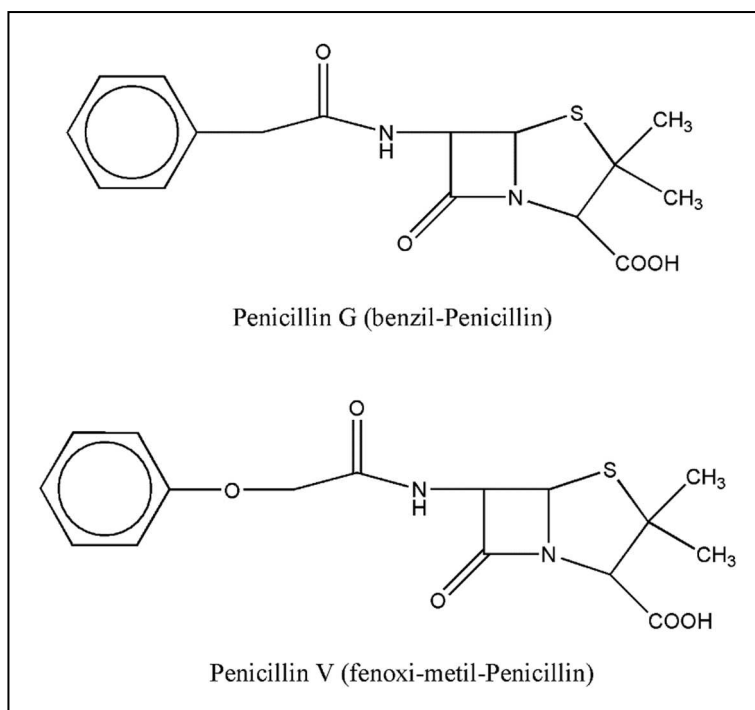
A fehérjeszintézishez felhasználásra kerülő L-cisztein és L-valin a nitrogén anyagcsere természetes terméke. A harmadikként szükséges az α -amino-adipinsav a lizin szintézis köztes termékeként van jelen, mégpedig adenilát formájában, vegyes anhidridként. A három aminosavból lépésről lépésre alakul ki a tripeptid.

Gyűrűzáródás és többszöri gyűrűátrendeződések után alakul ki a β -laktám váz. Az α -amino-adipinsav csak templát, a folyamat végén lecserélődik egy másik savra, felszabadul, és visszakerül a folyamat elejére.

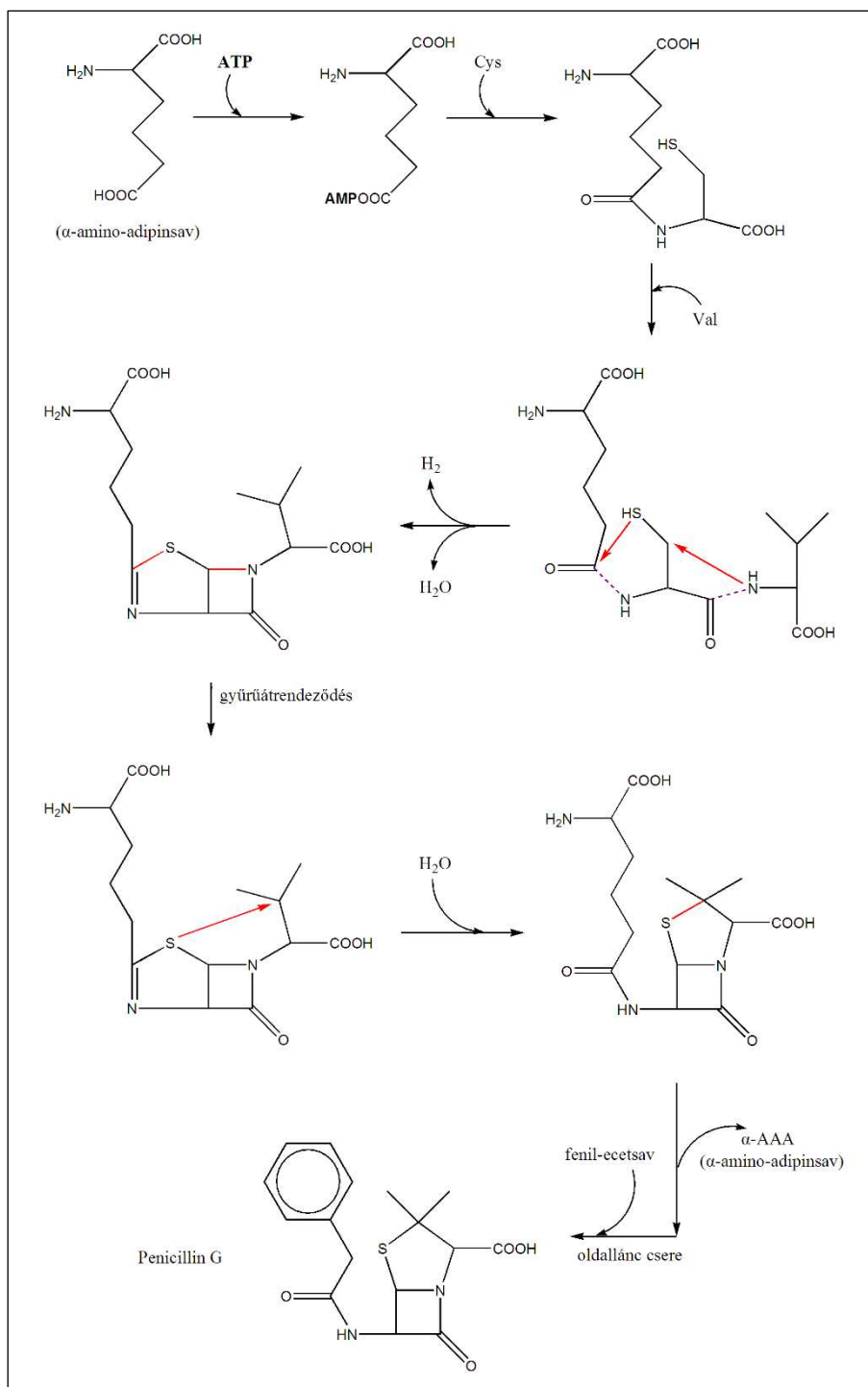
10.2.1.4. *Gyártásfejlesztés*

A penicillin gyártás története alatt óriási utat tett meg.

Az első klinikai kísérlet 1941-ben történt. Ezt követően a kutatás átkerült az Egyesült Államokba, ahol 3 év alatt áttörést értek el a penicillin tanulmányozása és a gyártás ipari realizálása vonalán is. Fleming idejében mindössze 2-3 IU/cm³ termék koncentrációt sikerült elérni (1–2 μ g/ml), melynek már kimutatható antimikrobiális hatása volt. Ezt két év alatt 540 μ g/ml-re fokozták.



180. ábra A G és V penicillin szerkezete



181. ábra A penicillin G bioszintézisének fő lépései

Jelenleg a legjobb penicillint előállító törzsek termelőképessége 30.000 $\mu\text{g/ml}$ körüli.

A termelés mennyiségileg is növekedett, 1943 végére elérte a heti 100 grammot (100 ezer NE = 60 mg penicillin akkor 20 dollárba került, ez ma 1 milliárd NE ára). A fejlődés ütemét jól mutatja, hogy 1944 végére a havi termelés meghaladta a 200 kg-ot, amely 1946-ban évi 32 tonnára emelkedett.

A második világháború után az ún. UNRRA-segély (*United Nations Relief and Rehabilitation Association*) részeként a szabadalmi védeletről lemondva tucatnyi komplett penicillin-gyártó üzemet telepítettek Nyugat-Európába.

Manapság az összes penicillin származékot figyelembe véve az éves termelés százezer tonna körül mozog.

A gyártás fejlesztése iskolapéldája a fermentációs iparban követett komplex stratégiának. A gyártás két fő eleme a törzs és a technológia. A törzs termelőképességének növelésével biológusok (genetikusok, mikrobiológusok) foglalkoznak. A technológia tökéletesítése műszaki, mérnöki feladat. Ezekben belül még az alábbi fő területek/módszerek különíthetők el:

Törzsmunka (genetika, mikrobiológia):

- törzsiszolálás
- indukált mutáció
- szelekció
- törzsfenntartás

Technológia (mérnöki):

- felületi/szubmerz tenyésztés
- prekursorok alkalmazása
- tápoldat optimálás
- anyagcsereszabályozás (koncentrációk)
- levegőztetés, reaktor
- szabályozások (pH, t)

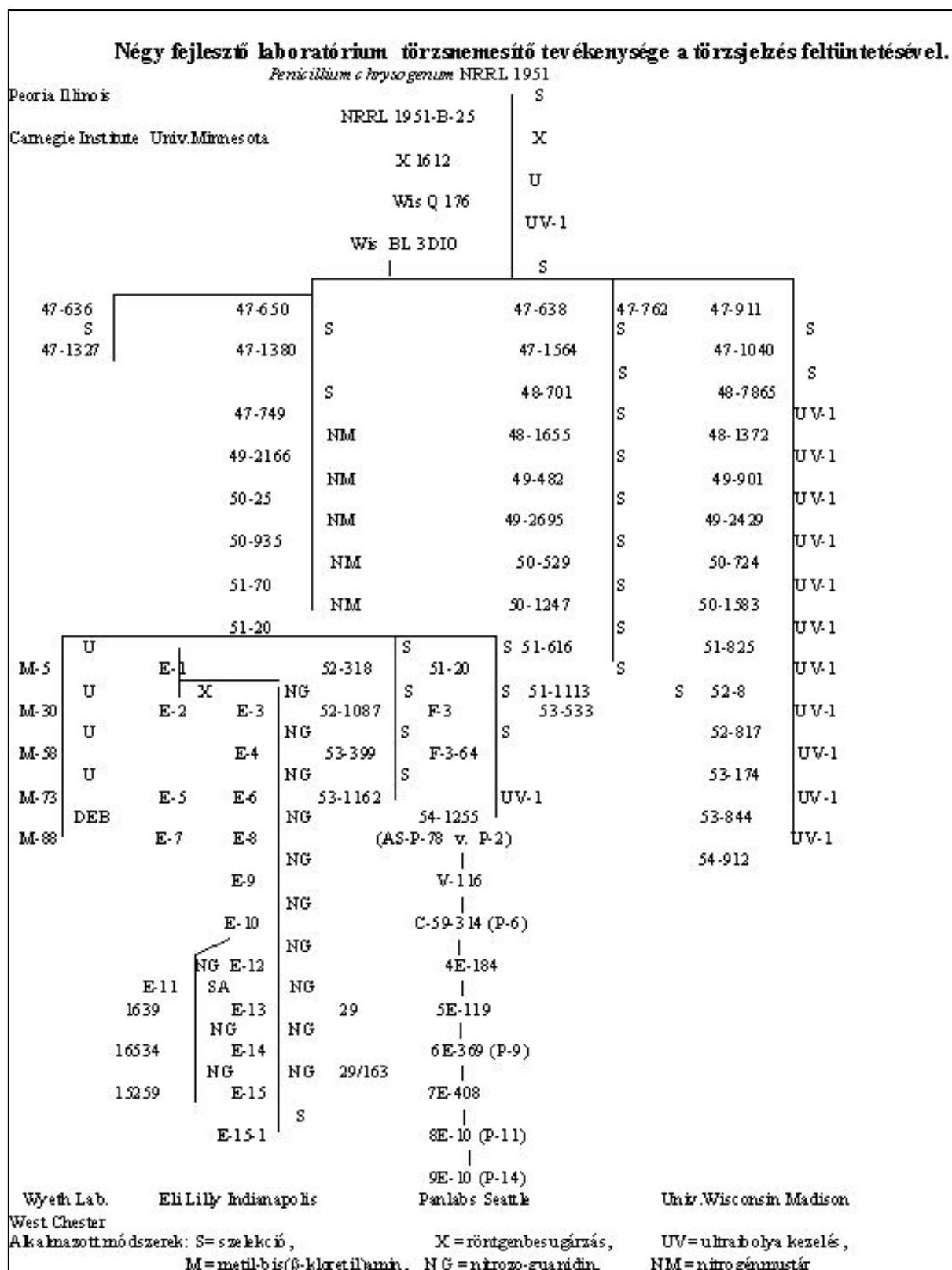
1.2.1.4.1. Törzsmunka

A penicillintermelő vad törzsek gyűjtése és vizsgálata (szakmai szlengben = screening, szkrínelés) az 1940-es évek elején lezajlott. A törzsnemesítés a kiválasztott *Penicillium chrysogenum* törzs termelőképességének fokozását jelentette.

A törzs tulajdonságainak javítására évtizedeken keresztül itt is az indukált mutáció+szelekció módszerét alkalmazták. De mivel az egyes antibiotikum bioszintézisek biokémiája és különösen a regulációja (genetikai és enzimszintű szabályozása) igen bonyolult (esetleg 100 géntől is függhet a bioszintézis), a szekunder metabolitoknál nem lehet a máshol bevált, az anyagcsereutak pontos ismeretén alapuló hiánymutáns és rezisztens mutáns-izolálási technikákat használni. Ehelyett a „black-box” screeninget alkalmazták. A sejt belső működését ismeretlennek (fekete doboz) tekintik, és csak egyetlen célfüggvénnyel, a termelt penicillin titerrel foglalkoznak. Ehhez viszont nagyon sok mutánst kell megvizsgálni. Túlnyomó részük gyengébb termelőképességű, mint a kiindulási tenyészet, de van köztük néhány, amelyik többet képes termelni. Ezeket tenyésztik tovább, és vetik alá újabb és újabb mutációknak. A jelenleg használt törzsek mindegyike több évtized alatt több száz ilyen mutációs cikluson esett át.

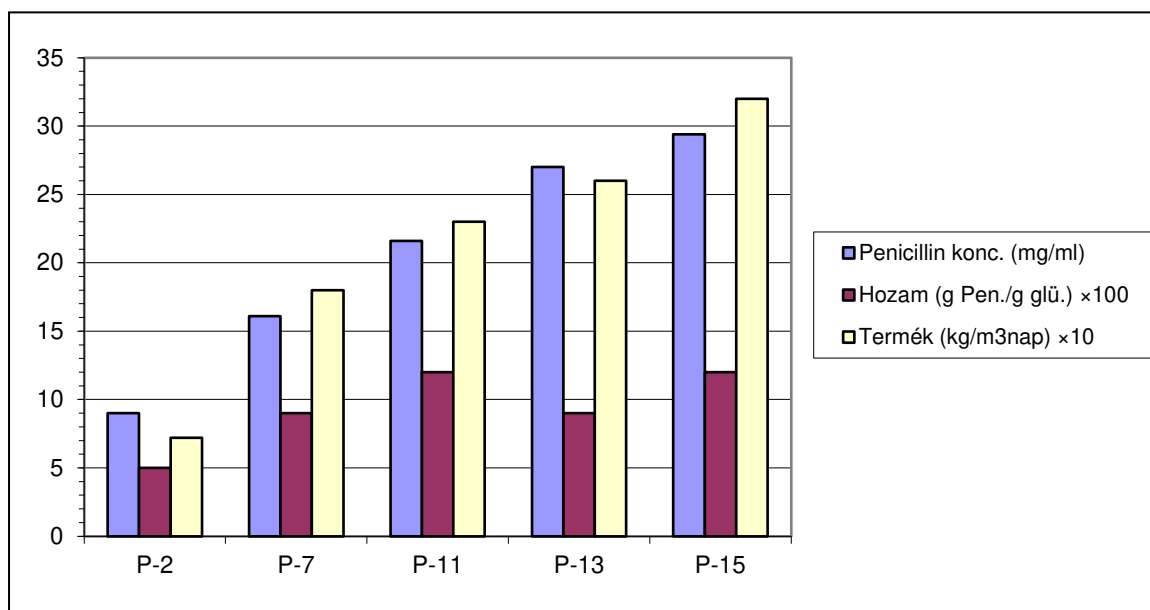
A törzsnemesítés folyamatát mutációs törzsfával lehet bemutatni, melyből az egyes variánsok „szülő-gyermek” viszonya mellett az is látható, hogy egy-egy lépéssel mennyit lehetett javítani a törzseken. A 182. ábra a *Penicillium chrysogenum* törzsfáját mutatja az 1950-es évekből. Magyarországra a 51-20 jelzésű mutáns került, feljavítása évtizedeken keresztül folyt (GYOKI, BIOGAL).

A törzsnemesítések célja alapvetően a hozamnövelés, de emellett más célokat is figyelembe vehetnek: - fermentációs (habzás, viszkozitás csökkentése), illetve - feldolgozási (pigmentmentes termék) kritériumok szerinti hatékonyságnövelés. A *P. chrysogenum* törzs eredetileg sárgás pigmentet is termelt (chrysogenin), mely azonban terhelte a törzs anyagcseréjét a fermentáció alatt, ezért mutációs eljárásokkal működésképtelenné tették a pigment termelés egyik génjét.



182. ábra A *Penicillium chrysogenum* mutációs törzsfája az 1950-es évekből

A másodlagos anyagcsere bonyolultsága miatt a modern rekombináns technikák célzott beavatkozása sokkal nehezebb, mint a primer metabolizmusnál. Törekednek a bioszintézis kritikus pontjainak (szűk keresztmetszet, „bottle neck”) felderítésére és „kitágítására”, de ez sokkal összetettebb feladat, mint a prokariótáknál.



183. ábra A penicillin-termelő törzsek fejlesztése, hozamok alakulása

A termelésben használatos „agyonmutált” törzsek már jelentősen különböznek a vad típusától. Szaporodásuk során érvényesül a „visszatérés az átlaghoz” törvényszerűség, azaz hajlamosak a visszamutálódásra, ami a termelőképeség csökkenésével jár. A jól termelő egyedek eltorzított anyagcseréjük miatt kevésbé életképesek, lassabban szaporodnak, mint a visszamutálódottak, így a szaporodásban lemaradnak, kihígnak a tenyésztéből. Emiatt meg kell oldani a törzsek eltartását, konzerválását olyan módszerekkel, amelyekkel éveken, évtizedeken keresztül megőrizhető a kialakított genetikai állomány. Erre a cseppfolyós nitrogénben tárolt vagy fagyasztva szárított szubkultúrák (master strain bank) alkalmasak. Másrészt az átoltással fenn tartott állománynál is folyamatos szelekciót kell végezni, hogy le ne romoljon a termelőképeség.

1.2.1.4.2. Fermentációs fejlesztések

Kezdetben felületi, tálcás fermentációt alkalmaztak, mivel ez a technika citromsav előállításra már kidolgozott volt. Több négyzetméteres saválló tálcákon 10-20 cm vastag steril tápfolyadék rétegen nevelték az *Aspergillus niger* tenyészetet. A tálcák között steril levegő átfúvatásával vitték be az oxigént és vitték el termelt hőt. Ez a technológia viszont a penicillin gyártás esetén sokkal rosszabbul működött. Probléma volt a sterilitás fenntartása, mivel a citromsav oldat 2-3 pH-ja távol tartotta az idegen mikroorganizmusokat, a penicillin fermentlé viszont közel semleges, érzékeny a befertőződésre. Másrészt a sokkal kisebb volt a kihozatal, a citromsav 8-10%-os koncentrációja helyett a penicillinét csak század százalékokban lehetett kifejezni.

1945-re a felületi fermentációs technikát felváltotta a szubmerz fermentációs eljárás, ennek következtében az elérhető penicillin koncentráció a többszörösére nőtt.

A már említett prekursorok alkalmazása egyrészt egységessé tette a terméket, másrészt egyből 4-8 szorosára növelte a penicillin termelést.

A fermentáció kisméretű reaktorokban kivitelezve bizonyosan nem lesz gazdaságos, ezért nagyobb (több száz m³) reaktorok használata célszerű.

10.2.1.5. Az anyagcsere-folyamatok irányítása a fermentáció során

A tápoldatok optimálásához az első lépcső volt a kukoricaekvár pozitív hatásának felismerése a szeszmoslékhoz (DS, distillers solubles) képest.

A későbbiekben felismerték, hogy a folyamat során a közeg összetételét változtatni kell a mikroorganizmus igényeinek megfelelően. A penicillin termelés jellegzetes szekunder metabolit fermentáció, két szakasza van: a sejtek elszaporítása körülbelül 40 órát vesz igénybe, míg a termelő fázis további 4-7 nap.

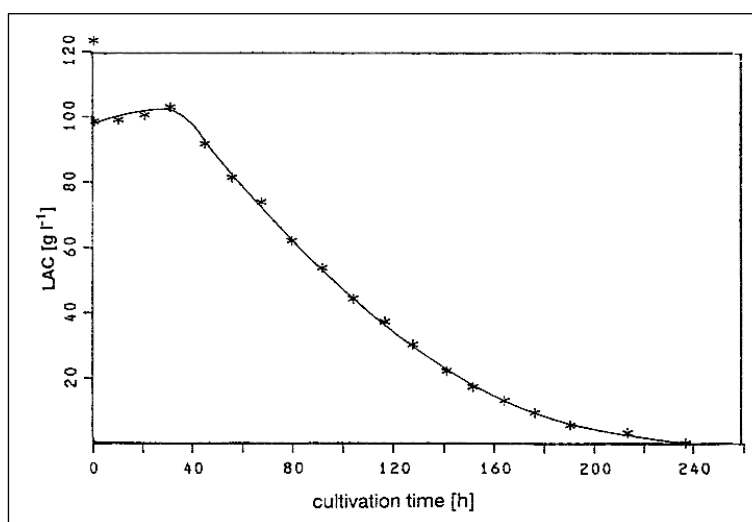
A tenyészet oxigén igénye mindvégig nagy, a levegő bevitel mértéke 0,5-1 vvm. A pH optimum közel semleges, pH= 6-7 között vezetik a fermentációt. Az ipari fermentációk általában rátáplálásosak, más, félfolytonos és kétlépcsős folytonos technológiákról csak kisebb mértékben olvashatunk.

Első, sejt szaporítási szakaszban (kb. 40 h) jó tápanyagellátás, intenzív levegőztetés, keverés mellett az elsődleges anyagcsere jellemző. A tápanyag ellátás bőséges, minden rendelkezésre áll a növekedéshez. Könnyen hasznosítható tápanyagforrások a kritikus feletti koncentrációban. Szénforrásként néhány százalék cukrot (glükózt = keményítő hidrolizátum, szacharózt = melasz) adnak, célszerűen olyan mennyiségben, hogy az a szaporítási szakasz végére elfogyjon, illetve koncentrációja a kritikus alá csökkenjen. Hasonló a nitrogén és a foszfor bevitele is. Az ammónium és foszfát sók könnyen és gyorsan hasznosulnak, de mennyiségüket úgy célszerű megválasztani, hogy koncentrációjuk a növekedési fázis végére a limitáló tartományba csökkenjen.

A termelési szakaszban a törzs anyagcseréjét át kell állítani a szekunder metabolizmusra. Ennek kikényszerítésére többszörös tápanyag limitben tartjuk a sejteket.

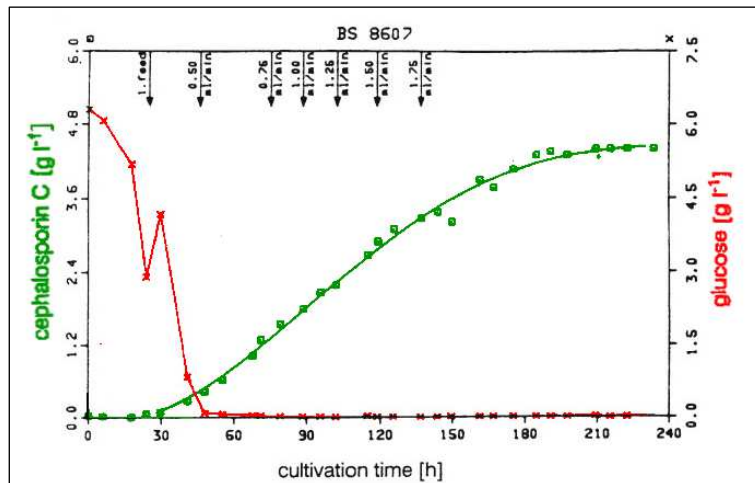
szénforrás: a cukorellátás visszafogására a klasszikus megoldás a nehezen metabolizálható szénforrások alkalmazása. A *Penicillium* törzsek az *Aspergillus*-okkal ellentétben viszonylag kevés extracelluláris enzimet termelnek, ezért csak lassan képesek hidrolizálni a laktózt vagy a keményítőt. Ezek adagolásánál kicsi a metabolizálható szabad cukor koncentrációja, a tenyészet szén-limitbe kerül.

Korszerűbb megoldás kis mennyiségű glükóz oldat folyamatos, vagy gyakori adagolása. Így állandóan jelen van a cukor, de koncentrációja a limitáló szint alatt marad. A glükóz adagolását megoldhatjuk vezérléssel vagy szabályozással. Az első esetben a tapasztalatok alapján kialakíthatunk a betápláló szivattyú számára egy állandó vagy többlépcsős adagolási sebességet tartalmazó programot, ami alacsony cukorszintet biztosít.



184. ábra A laktóz szénforrás hasznosulása a penicillin fermentáció során

Az adagolás szabályozható az oldott oxigén koncentrációjának mérésével: ha magasabb a glükóz koncentráció, akkor gyorsabb a fogyasztás – ehhez több oxigén kell – az oxigén koncentráció kicsi lesz. Amikor a glükóz elfogy, nincs mit oxidálni, ettől az oxigén koncentráció emelkedik – ekkor egy kevés steril glükóz oldatot adagolnak a fermentorba. Ettől az oldott oxigén koncentráció lemegett, és előlről indul a ciklus. Ipari méretű fermentoroknál



185. ábra Penicillin fermentáció glükóz adagolással

nem elegendő egy ponton betáplálni, az egyenletesebb glükóz szint elérésére több szinten, több ponton adagolnak.

nitrogénforrás: a nitrogénforrások közül a *Penicillium*-ok a szerves és szervetlen anyagokat egyaránt hasznosítják. Az ammónium-szulfát jól hasznosul, mind a nitrogén, mind a kén-tartalma beépül, de túl nagy koncentrációja az elsődleges anyagcserének kedvez.

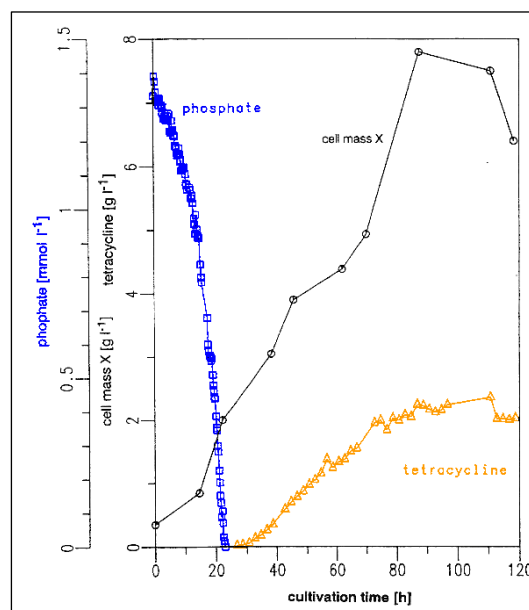
A komplex források (pl. szójadara, kukoricalekvár) nitrogénjéhez sokkal nehezebben férnek hozzá a sejtek, mivel ezeket előbb az extracelluláris enzimeknek el kell hidrolizálni. Ez lassú folyamat, a felhasználható nitrogéntartalmú vegyületek fokozatosan szabadulnak fel, koncentrációjuk kicsi, a tenyészet tartós nitrogén limitben marad.

Ezeknek megfelelően itt is kétféle adagolási stratégia lehetséges. Lehet az ammónium-szulfát oldatot kis térfogatárammal folyamatosan adagolni, illetve lehet a szerves nitrogénforrást nagyobb mennyiségben, ritkábban (pl. naponta) beadni.

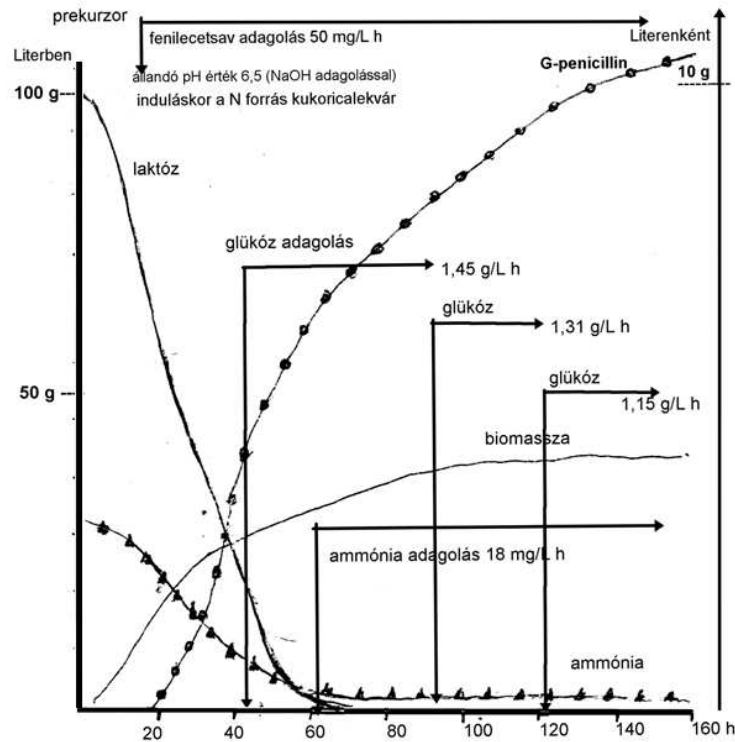
foszfor: jelenléte az elsődleges anyagcserének kedvez, ezért ebben a fázisban már nem adagolnak többet. Sok szekunder metabolitnál a foszfát jelenléte egyenesen megakadályozza a terméképzést.

prekurzor: a G-penicillin esetében fenil-acet-savat adagolnak a termelési szakaszban. Koncentrációját a 2-4 g/l közötti sávban tartják. 2 g/l alatt lelassul a penicillin termelés, 4 g/l fölött viszont már károsítja a tenyészetet. Szerkezetük analóg a benzoáttal, illetve a p-hidroxi-benzoésav-észterekkel (parabének), amelyeket fungisztikumként alkalmaznak élelmiszerek és kozmetikumok konzerválására.

186. ábra Az antibiotikum termelés csak a foszfát teljes elfogyása után indul meg



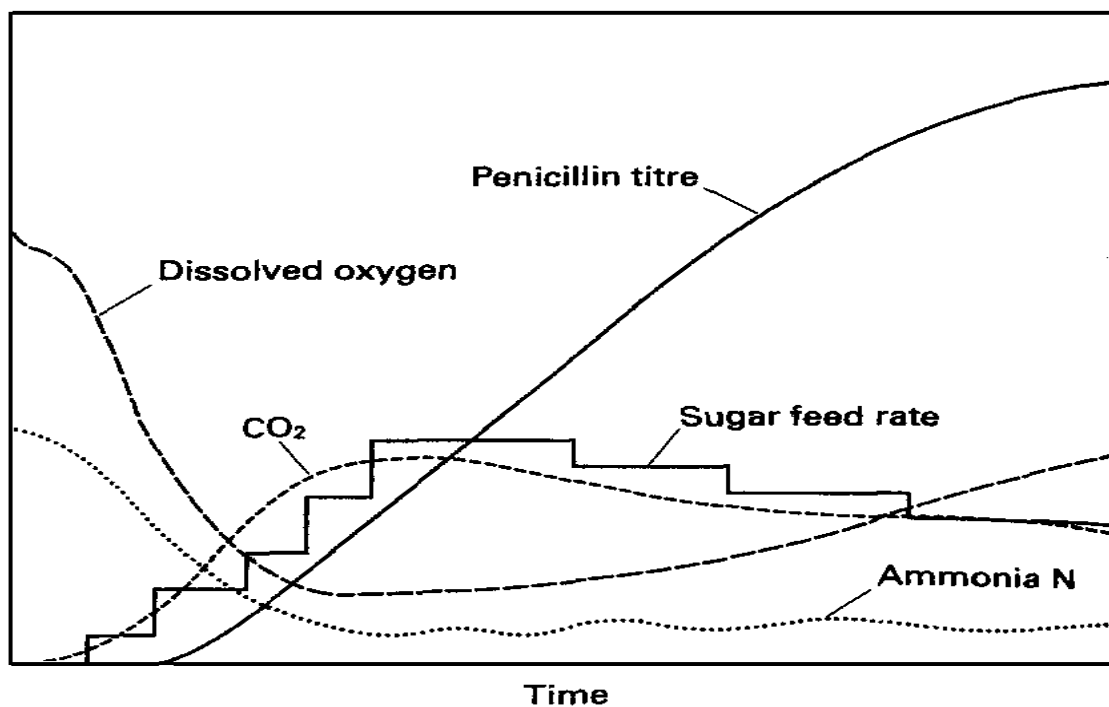
Adalék: a másodlagos anyagcsere kikényszerítésében fontos szerepe van a vas-ionoknak. Jelenlétiük a primer folyamatoknak kedvez, elnyomja az antibiotikum termelést. Ehhez olyan kevés vas is elegendő, ami a készülékek falából oldódik ki. A BIOGAL Gyógyszergyárat az ötvenes években építették, és az első nyolc darab 30 m³-es fermentort nem rozsdamentes, hanem közönséges acélból készítették. Amikor penicillint fermentáltak benne, a folyamat nagyon rossz termeléssel ment, kimutathatóan a beoldódó vas miatt. A rozsdamentes acél készülékekben ez jelenség nem fordul elő.



187. ábra Penicillin fermentáció glükóz, ammónium szulfát és prekursor adagolásával

A fermentáció során arra törekednek, hogy a termékképzési szakaszt minél hosszabbra nyújtsák. Ezzel megnövelik a termékkoncentrációt és a termék mennyiségét.

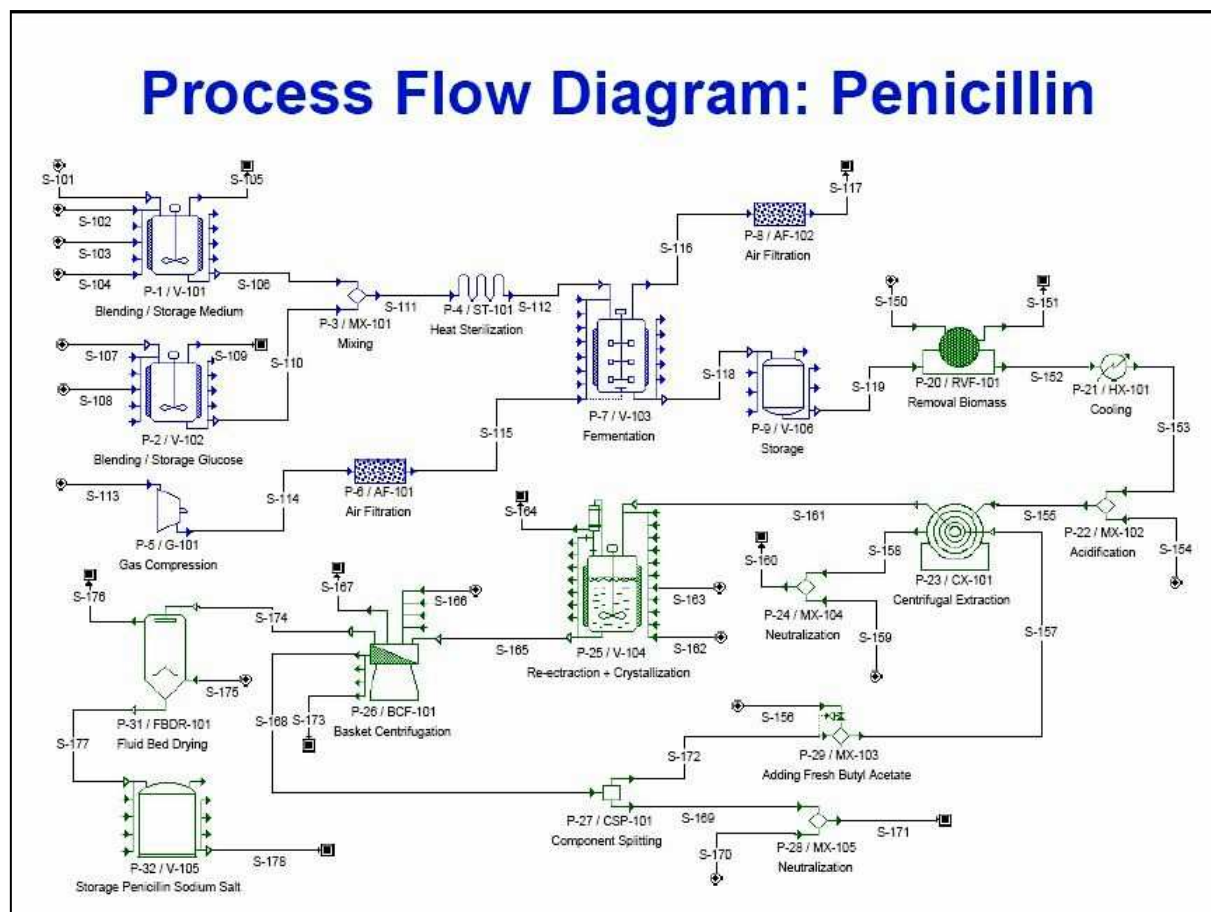
Az anyagcsere paraméterek lefutását a penicillin fermentáció során mutatja be a 187. és 188. ábra. A növekedési szakaszban az oldott oxigén és a nitrogén-forrás koncentráció meredeken lecsökken. Az oxigén szint hosszú ideig alacsonyan marad, majd a tenyészet öregedésével lassan emelkedik. Az amino-nitrogén szintet alacsonyan tartják, a görbe enyhe hullámozása szerves nitrogén-forrás beadagolását jelzi. A penicillin a két szakasz határán jelenik meg, a titer növekedése hosszan lineáris, majd az öregedéssel enyhén lecsökken. Az egyetlen nem-koncentráció paraméter a cukor betáplálási sebesség. Az adagolás lépcsős profil szerint előbb növekszik, majd közel állandó, kissé csökkenő. A termelt szén-dioxid görbéje szinte pontosan követi a cukoradagolást. Összevetve a penicillin termelés sebességével látható, hogy ez a három paraméter együtt mozog. A bevitt cukorból majdnem sztöchiometriai pontossággal állandó arányban képződik penicillin és szén-dioxid.



188. ábra Koncentrációk alakulása a penicillin fermentáció során

10.2.1.6. Feldolgozás

Ipari léptékben a fermentáció vágásánál körülbelül 30 g/l a penicillin koncentráció (kb. 50.000 IU/ml). A termék extracelluláris, csak körülbelül 1% található a micéliumban. A sejtömeget vákuum dobszűrővel választják el és a szűrőn vízzel mossák. A micélium állati takarmányozásra alkalmas, ha nem marad benne prekursor (a fenil-ecetsav kellemetlen, szúrós szagú anyag). Léteznek olyan technológiák is, amelyben nem választják el a sejtömeget, hanem a teljes fermentlevet viszik extrakcióra. A szűrlet további feldolgozásának kulcslépése az extrakció szerves oldószerrel. A penicillin gyenge sav, disszociálatlan formában nem ionos, kicsi a hidratburka, így a szerves fázisban jobban oldódik. A disszociáció visszaszorítható erős savval, pl. kénsavval. Ebben a savas közegben (pH~2) viszont a savérzékeny penicillin gyorsan elbomlik. A bomlási reakció visszaszorítására két mérnöki trükköt alkalmaznak. Az egyik a fermentlé lehűtése – alacsonyabb hőmérsékleten a bomlási reakció sebessége jelentősen csökken, míg a megoszlási hányados alig változik. A másik a rövid kontaktidő, minimálisra csökkentik azt az időt, amit a penicillin a savas közegben tölt. A savanyítást egy kis térfogatú keverő egységben végzik, amelyet közvetlenül a szeparátor centrifuga elé kötnek be. A szűrt fermentlevet, az oldószert és a kénsavat egyszerre táplálják be, összekeverik és azonnal a szeparátorra engedik.



189. ábra A penicillin gyártás folyamatábrája

Ez felfogható egy folytonos működésű kevert reaktornak, ebben a tartózkodási idő a térfogat és a térfogatáram hányadosa. Megfelelő beállítással ez akár másodperces nagyságrendre is leszorítható, így a penicillin csak nagyon rövid ideig érintkezik a savval.

Az extrakcióhoz sokféle szerves oldószer használható, de általában oxigéntartalmúakat (pl. észterek: amil-acetát, butil-acetát) alkalmaznak. A feldolgozás következő lépése a reextrakció közel semleges vizes pufferral. Ha maradtak gyenge sav típusú prekursorok a fermentlében, akkor azok ugyanúgy viselkednek, mint a penicillin: azok is átoldódnak a szerves fázisba, majd vissza vizes közegbe. Az apoláris, nem-ionos habgátlók viszont elválaszthatóak: átoldódnak ugyan a szerves oldószerbe, de a vizes fázisba nem térnek vissza. Ha a reextrakciónál a vizes fázis sok alkáli só (pl. kálium acetátot, nátrium-hidrogén karbonátot) tartalmaz, akkor a penicillin alkáli só formájában egyből kikristályosítható. Egyes technológiákban a finomfeldolgozás során az extrakció-reextrakció-kristályosítás műveletsort megismétlik más oldószerrel. A termék mellől a színyanyagokat aktív szénrel távolítják el.

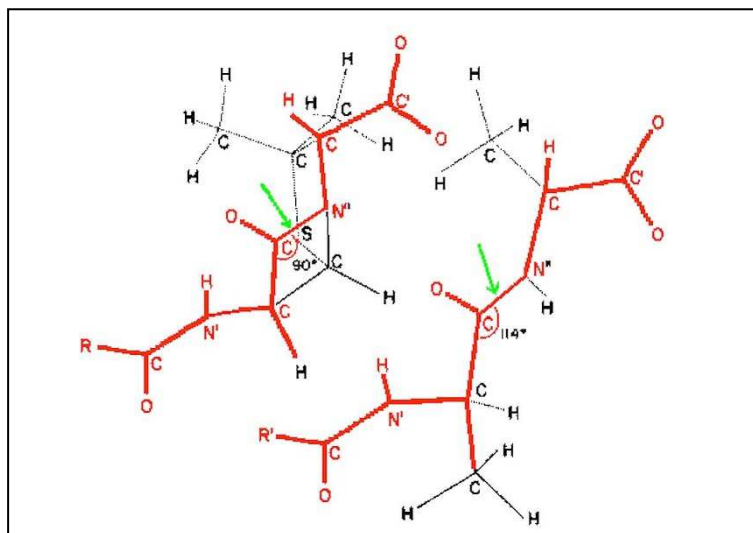
Magyarországon (Debrecen, Biogal) megszűnt a penicillingyártás, annak ellenére, hogy saját fejlesztésű törzsekkel dolgoztak.

10.2.1.7. Hatásmechanizmus

A β -laktám antibiotikumok a Gram-pozitív sejtek sejtfalszintézisét gátolják, így hatásuk következményeként abnormális sejtalakok, protoplasztok képződnek.

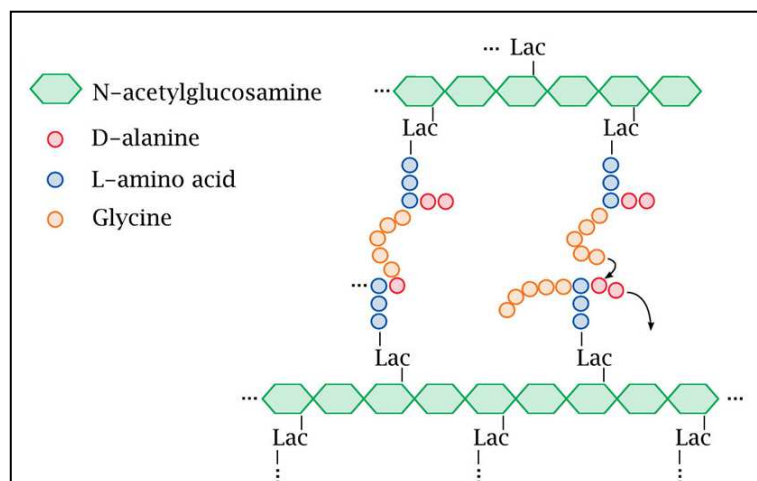
Csak a szaporodó sejteket pusztítják el, a nyugvó sejteket nem, ez a mikrobiológiában törzsszelekcióra használható.

A baktériumok sejtfallszintézise során egy transzpeptidáz enzim az egyik NAG-NAM (N-acetilglükózamin és N-acetilmuraminsav) alapláncához kapcsolódó oligopeptid oldallánc végén lévő D-Ala-D-Ala dipeptid végső alaninját lehasítja és a helyére a másik oldallánc pentaglicinjének terminális aminosavát köti. Így keresztkötések alakulnak ki, a lineáris láncok térhálósá alakulnak. Ennek a lépésnek a gátlásával fejtik ki hatásukat a penicillin típusú antibiotikumok.



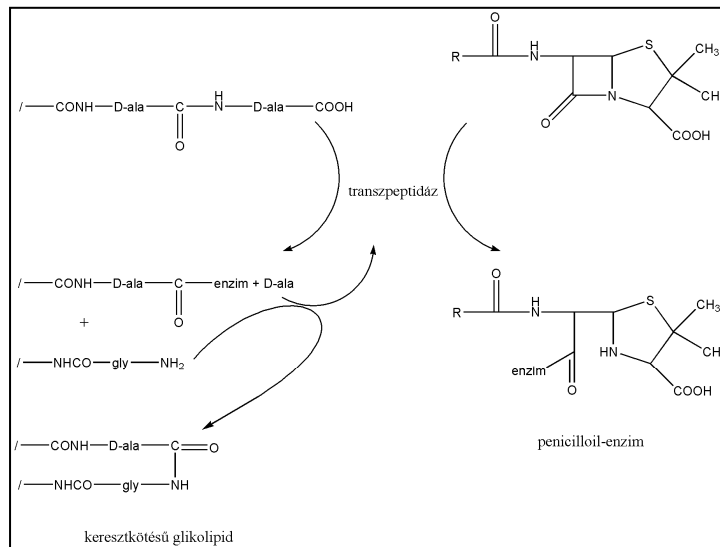
190. ábra A bakteriális sejtfal szerkezete és kialakulása

A penicillinszármazékok hatása azon alapul, hogy β -laktám gyűrűjük a bakteriális sejtfallal pentapeptidjében található terminális D-alanin-D-alanin strukturális analógja. A penicillin-kötő fehérjék penicillin jelenlétében a pentapeptid terminális D-alaninjának lehasítása helyett a penicillinek β -laktám gyűrűjét hasítják, melynek következtében egy stabil penicillin-enzim



191. ábra A penicillin és a D-Ala-D-Ala dipeptid szerkezete

komplex alakul ki, mely a transzpeptidáz irreverzibilis inaktíválódásához vezet. A penicillin az enzim kompetitív, „suicid” inhibitora.

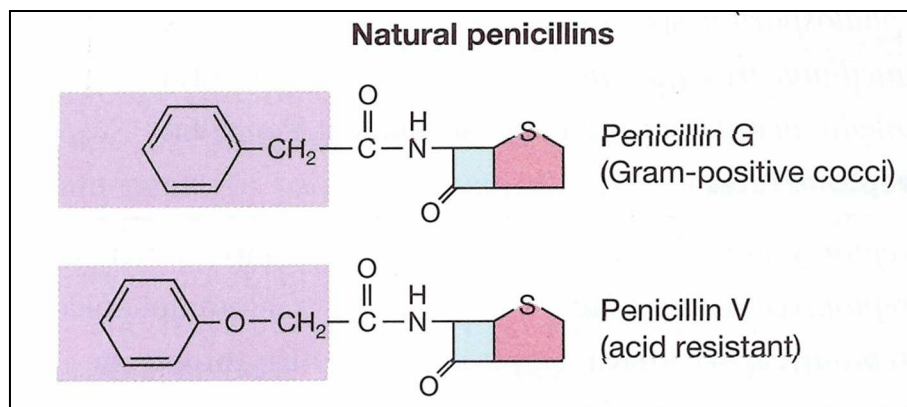


192. ábra A penicillin bekötődése a transzpeptidáz kötőhelyére

A penicillinszármazékok baktériumokra gyakorolt lítikus hatása a sejtfal szintézis egyensúlyának felborulásával magyarázható. A sejt növekedése, a sejtfal tágulása csak úgy lehetséges, hogy a burkot az enzimek folyamatosan lebontják és újraszintetizálják. A penicillinek hatásának köszönhetően a transzpeptidáció gátolt, azonban a bontó enzimek, az ún. autolizinek megtartják aktivitásukat és folyamatosan hasítják a peptidoglikán hálózatot. Ennek következtében a sejtfal meggyengül és ettől a sejtek elpusztulnak. A nyugvó, nem növekvő, nem szaporodó sejtek túlélhetik a penicillines kezelést, mert növekedés hiányában nem történik transzpeptidáció, amit gátolna a penicillin jelenléte és ekkor az autolizinek sem működnek. A túlélő sejtek az antibiotikus kezelést követően újabb fertőzést okozhatnak.

10.2.1.8. Félszintetikus penicillinek

A természetes penicillinek forradalmasították a fertőző betegségek és sebfertőzések kezelését, de az orvosi alkalmazás során akadt néhány hátrányos tulajdonságuk. A G-penicillin szájon át nem adható, csak injekcióban, mert a gyomorsavban elbomlik. A hatásspektrum a



193. ábra Fermentációval előállított penicillinek

patogén mikrobák széles köréhez képest szűk, csak a Gram-pozitív kórokozókra terjed ki. A

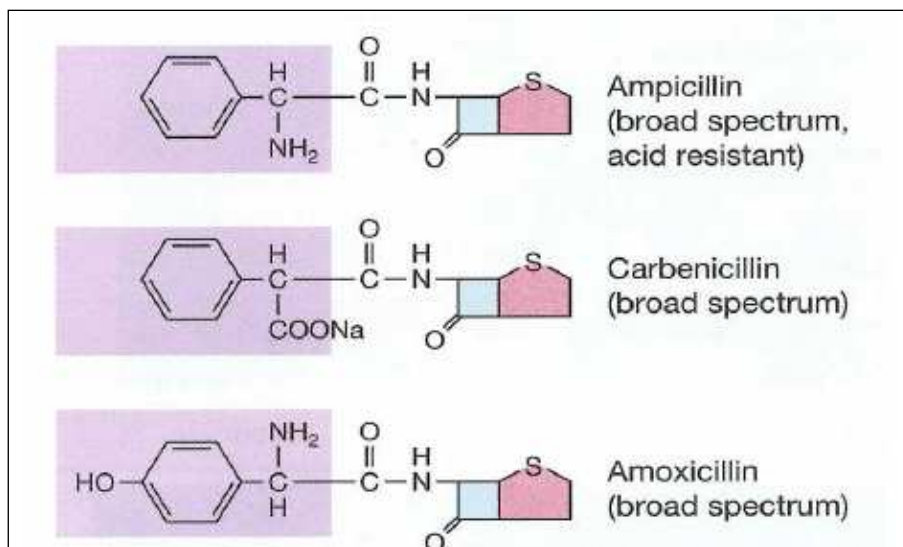
penicillin terjedésével együtt megkezdődött a rezisztencia terjedése is. Egyre több törzsben jelent meg a béta-laktamáz enzim. Emellett emelkedő számban jelent meg a penicillin érzékenység, az allergia. Az első években ennek oka a preparátumok nem megfelelő tisztasága volt, de ma már a tiszta penicillinre is kialakulhat immunreakció (haptén hatás).

A felsorolt nehézségek leküzdésére a penicillin molekula szerkezetét sokféleképpen módosították. A 6-APA alapvázat általában változatlanul hagyták, viszont az oldalláncot sokféle szerves savval helyettesítették. Az alapváz szintetikus előállítás nem gazdaságos, azt mindenképpen fermentációs úton állítják elő. A penicillin származékok előállítása a fermentált G-penicillin oldalláncának lecserélésével történik. Ipari méretekben túlnyomórészt G-penicillint fermentálnak, kisebb mennyiségben termelnek V-penicillint és 6-APA-t is.

Az oldallánc lecserélése szerves kémiai módszerekkel is lehetséges, azonban az átalakításhoz igen alacsony hőmérséklet ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) szükséges, illetve szigorúan vízmentes körülményeket kell fenntartani (absz. butanol), így ez a szintetikus kémiai eljárás nem lehetett versenyképes az enzimes technológiával.

Az oldallánc a félszintetikus penicillin tulajdonságait erősen befolyásolja. Elektronszívó csoportokkal a savamid kötést védeni lehet, ezáltal a molekula savállóbb, mint az eredeti G-penicillin. Sztérikus védőcsoportokkal a penicillináz rezisztencia növelhető. A hatásspektrum változtatható (kiszélesíthető) szubsztituált fenil-ecetsav ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, észter csoportok) beépítésével.

Félszintetikus penicillinek: ampicillin (széles spektrumú, savtűrő), amoxicillin (szélesebb spektrumú), carbenicillin (szélesebb spektrumú). A nevekben az *am*- előtag az rákötött csoporton található amino-, a *carben*- a karbonsav csoportra utal.



194. ábra Félszintetikus penicillinek

A félszintetikus penicillinek előállítása kétlépéses folyamat:

1. Hidrolízis, a molekula két részét összetartó savamid kötés szelektív bontása.



2. N-acilezés, az új oldallánc rákötése



Az acilezés karbonsav helyett legtöbbször karbonsav-származékkal (pl. észterrel) történik, mert a savcsoport disszociációja akadályozza a reakciót. Acil-donorként pl. fenil-glicin-metilésztert, illetve p-OH-fenil-glicin-észtert alkalmazva, létrejön a savamid kötés a 6-APA-val. Ez a reakció az enzim „eredeti funkciójának” technológiai megfordítása. Így a két ellentétes irányú reakció katalizálható ugyanazzal az enzimmel, célszerűen eltérő körülmények között. Ez az enzim a *penicillin-aciláz/penicillin-amido-hidroláz* – mindkét név helyes, attól függően, hogy a reakció melyik irányát tekintjük.

Mivel a hidrolízisnél gyenge sav szabadul fel, ezért a pH-t szabályozni kell. A pH=8 értéken az enzim a bontás irányába katalizál, míg a pH=4 értéknél a szintézis irányába tolja el az egyensúlyt ugyanaz az enzim. A termelt 6-APA oldatban még a penicillinnél is érzékenyebb (reagál a levegő széndioxidjával is, valamint hajlamos a polimerizációra), ezért érdemes kikristályosítani, vagy gyorsan lehűteni, hogy stabil maradjon.

Számos törzs termel ilyen aktivitású enzimet, ezek két fő csoportba sorolhatók:

Az I. típus penész eredetű (pedig a penészekre nem is hat a penicillin), jellemző pH optimuma pH ~10, az optimális hőmérséklet t ~50 °C. Inkább a stabilabb V-penicillinre alkalmazható, mint a G-re.

A II. típust baktériumok termelik, jellemzői: pH_{opt} ~8, t_{opt} ~40 °C. Számos törzs termeli, de ipari célokra főleg *E. coli* mutánsokat és manipulált törzseket használnak. Az enzim képződése fenil-ecetsav adagolással indukálható, ettől az enzim aktivitás kb. ötszörösére nő. A megtermelt enzimet kétféle formában is fel lehet használni. Alkalmazható nyugvósejtes tenyészet formájában, illetve tisztított, rögzített enzimeként.

A sejttömeg felhasználásánál a biomasszát kimossák és szakaszos üzemben pH=8; t= 37 °C mellett hozzák össze a penicillinnel. A keletkező 6-APA-t a penicillinnel analóg módon savazással extrahálják (az oldószer pl. MIBUK = metil-izobutil-keton).

Immobilizált enzimpreparátum készítésénél a sejteket centrifugálással választják el a fermentlétől, egy kisebb térfogatú puffer oldatban felfuszpendálják, majd nagynyomású homogenizátorral feltárlják. Ezt kétlépéses kisózás követi: először a sejttörmelékeket és a nukleinsavakat csapják ki, majd az enzimet. Az újraoldott enzimet tovább tisztítják, majd a tisztított fehérjét polimer golyókra immobilizálják (ma főleg az ún. Eupergit polimerre rögzítik). Ezeket az immobilizált enzimirészeket kereskedelmi forgalomban meg lehet vásárolni, és eléggé stabilak az ipari felhasználáshoz, felezési idejük több hónapos.

Magára az enzimes átalakítás technológiájára több alternatíva is létezik a reakció eléggé különleges viselkedése miatt. A dezacilezési reakció kinetikai viselkedése ugyanis erős *termék-és szubsztrát-inhibíció*t mutat, azaz mind a 6-APA, mind a penicillin-G inhibitorai a reakciónak. Részletes számítások azt mutatták, hogy töltött oszlop használata lenne az optimális ebben az esetben. Amint azonban a reakció előrehalad, a pH csökken, hiszen savas karakterű karboxilsav (fenil-ecetsav) az egyik bomlástermék. A pH-csökkenés viszont egyrészt a 6-APA termék bomlásához vezet, másrészt ellentétes irányba fordítja a reakciót, ezért pH-szabályozást kell megvalósítani. A pH-szabályozás azonban töltött oszlopban nem lehetséges a keveredés hiánya miatt.

Ezért a Toyo Ozo (japán cég) klasszikus eljárása során recirkulációs technikát használnak. A rögzített enzimmel töltött, párhuzamosan kötött oszlopokon (18 darab) folyamatosan áramlik a penicillin oldat. Az oszlopokról lejutó egyesített térfogatáram egy kevert tartályreaktorba kerül, ahol a pH-t visszaállítják, és az oldatot visszaviszik az oszlopokra. A ciklust 3 órán keresztül folytatják, ezalatt 86%-os konverziót érnek el.

Egy másik eljárás során a tartályreaktor–oszlopreaktor közti ellentmondást úgy oldották fel, hogy négy tagból álló kaszkád reaktort építettek. Így megoldható, hogy a keveredés is jó

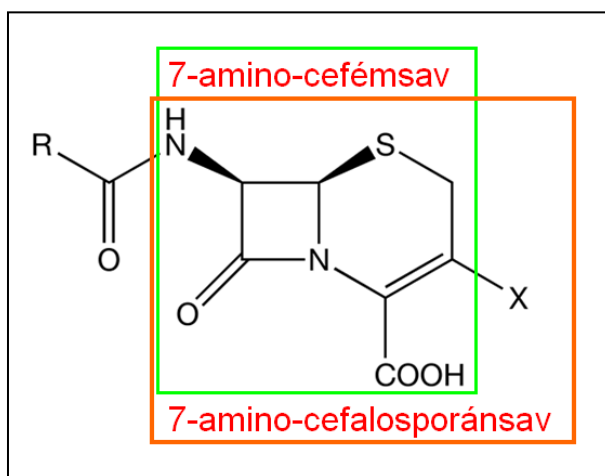
legyen és a plug-flow üzemmódot is megközelítsék. Így több mint 95%-os Penicillin-G konverziót sikerül elérni.

Mindkét eljárás esetében a reaktorokból távozó reakcióelegyből a pH izoelektromos pont-ra (pH=4,3) állításával kicsapják a 6-APA-t, majd szűrés és mosás után szárítják.

10.2.2. Cefalosporinok

A cefalosporinok szerkezete hasonlít a penicillinek szerkezetéhez. A β -laktám gyűrűvel kondenzált másik gyűrű itt nem öttagú tiazolidin, hanem egy taggal nagyobb dihidrotiazin gyűrű. A váz alapja a 7-amino-cefémsav, angol rövidítéssel 7-ACA.

Az R oldallánc mellett egy másik, X-el jelölt szubsztitúciós lehetőség is található a hattagú gyűrűn. Ez alapesetben metil csoport, de legtöbbször acetilezett formában van. A fermentált alapvegyület a Cefalosporin C (röviden: Cef-C), amelyben R= α -amino-adipinsav, az X pedig $-\text{CH}_2\text{-O-CO-CH}_3$.



195. ábra A cefalosporin molekula szerkezete

A cefalosporin fermentációs gyártásával párhuzamosan felismerték, hogy a vegyület előállítható penicillin-V-ből kémiai úton is, sőt ez az eljárás ipari léptékben is rentábilis. A cefém váz a viszonylag olcsó V-penicillinből három lépésben kialakítható. A világszerte megtermelt penicillin-V túlnyomó részét erre a célra használják fel. Ha már megvan a hattagú gyűrűs váz, sor kerülhet a két szubsztituens rákapcsolására.

A biológiai úton keletkező cefalosporint Brotzu észlelte először 1945-ben egy korzikai szennyvíz csatornából izolált tenyészet szűrletében. A törzs különböző antibiotikumok keverékét állította elő, köztük a Cefalosporin C-t, penicillin N-t és Cefalosporin P₁-P₅-öt. Emiatt a Cef-C azonosítására csak 1953-ban került sor. A faj neve eredetileg *Cephalosporium acremonium* volt, később pontosították a rendszertani helyét és *Acremonium chrysogenum* néven sorolták be.

Bioszintézis

A penicillin és cefalosporin bioszintézisének első lépései azonosak. A három aminosavból (L- α -aminoadipinsav, L-cisztein és L-valin) ugyanúgy képződik a tripeptid, és az első gyűrűzáródások is azonos módon mennek végbe. Az elágazás az izopenicillin-N után következik, a ring-expandáz (REX) enzim hattagúvá alakítja a tiazolidin gyűrűt. A folyamat végén az α -amino-adipinsav rajta marad a molekulán, nem cserélődik le, nem kerül vissza templátként a bioszintézis elejére.

10.2.2.1. Cefalosporin fermentáció

Az eredeti „Brotzu törzs” antibiotikum termelését a penicillinnel analóg módon mutációs törzsfeljesztéssel javították fel. A termelőkéesség a bioszintézis út és a reguláció jobb megismerésével tovább növelhető.

A tápoldat összetételének kialakítása, illetve időbeli változtatása is hasonló elvek szerint történik, mint a penicillinnél, illetve a többi másodlagos anyagcsereterméknel.

A szénforrás kiválasztásánál is ugyanazok a szempontok. A C-limitáció elérésére vagy nehezen bontható vegyületeket (növényi olaj, keményítő) adnak, vagy könnyen asszimilálható cukrokat adagolnak olyan ütemben, hogy a koncentráció a limitáló tartományban maradjon.

A laktóz ebben az esetben jól hasznosuló cukornak minősül, mert a törzs indukálhatóan képes laktázt termelni.

A tápoldatban lévő foszfát és ammónia is elnyomhatja az antibiotikum termelést. Ezért a szaporodási szakaszban alkalmazott bőséges tápanyagellátás után a termelési fázisban a nitrogén- és foszforszintet alacsonyan kell tartani. Nitrogénforrásként a kukorica-lekvár mellett húslisztet, szójalisztet lehet adni.

A foszfát- és amino-nitrogén szintet célszerű sűrűn vagy on-line módon mérni, és ennek alapján adagolni. A főlegben lévő ionokat egy kémiai trükkal is megköthetjük. MgO hozzáadásával rosszul oldódó (0,023 g/100 ml) $Mg(NH_4)PO_4$ csapadék képződik, melyből a foszfát és ammónia csak a fogyasztás ütemében szabadul fel.

Feltűnően nagy az eljárás oxigén igénye, elsősorban az alternatív oxidáció működtetése miatt. Nem kielégítő oxigénellátottság esetén először a képződő termékek aránya eltolódik a dezacetil-cefalosporin C irányába. Tartós oxigénhiány esetén leáll az antibiotikum képződés. Az oxigén ellátás visszaállása után csak néhány órányi aktív növekedés szükséges az enzimszisztem kifejlődéséhez.

A cefalosporin fermentációs úton történő előállítás a prekursorokat tekintve értelemszerűen eltér a benzil-penicillin gyártástól. A tripeptid kialakításához három prekursor molekula szükséges, az α -amino-adipinsav a cisztein és a valin.

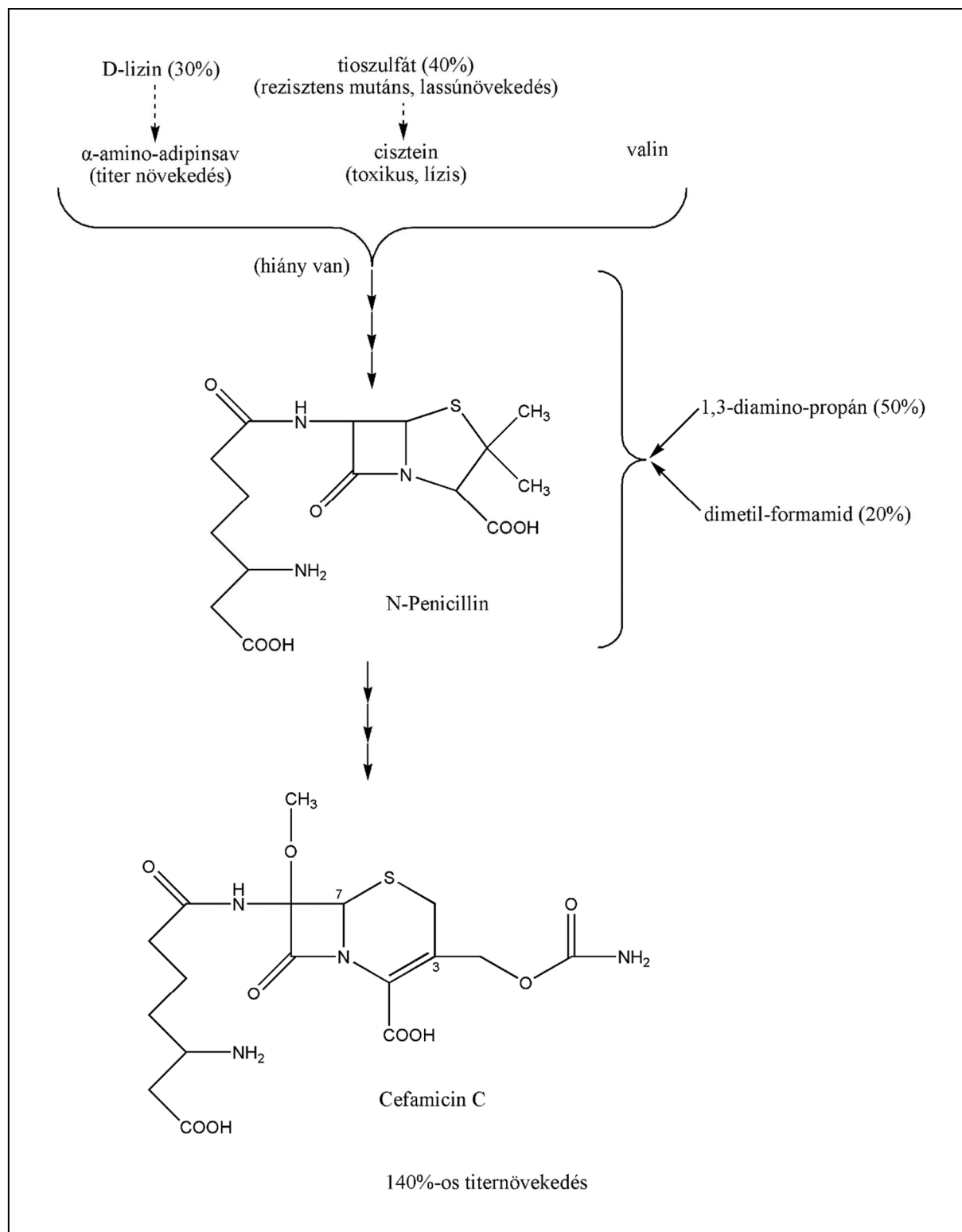
Alfa-amino-adipátot adva titer növekedés tapasztalható, tehát beépül a molekulába – ez azonban túl költséges, ezért inkább lizint adagolnak, melynek eredményeként 30%-os titer növekedés tapasztalható. Az α -AAA helyett szerves aminokat is lehet adagolni, például kadáverint, 1,3-diamino-propánt, vagy dimetil-formamidot.

Kén prekursorok: úgy találták, hogy a cisztein gyorsan beépül, azonban a sejtek lízisét okozza, ezért kénforrásként inkább tioszulfátot adagoltak, amely 40%-os növekedést idézett elő. A sejt-növekedés így azonban lelassult, ezért tioszulfát rezisztens mutánsokat izoláltak. Előnyös hatású a táptalajhoz adott kis mennyiségű metionin is.

A tenyészetben a főtermékként képződő Cef-C antibiotikumon kívül ennek dezacetil és dezacetoxi származéka is megjelenik, sőt kis mennyiségben a vegyület 7-metoxi származékának képződését is kimutatták.

Downstream: A cefalosporin-C kémiai szerkezetéből következően a fermentléből való kinyerés módszere is eltér a penicillinnél megismert eljárástól. Szerves oldószeres extrakció helyett ioncserélő gyantán kötik meg. A szokásos ioncserélő gyanták helyett a környezetbarát, erre a célra kifejlesztett makropórusos adszorpciós gyanták használata terjed el.

Félszintetikus cefalosporinok: A cefalosporinok gyűjtőnéven összefoglalt antibiotikumok (természetes és félszintetikus származékok) mindegyike a Cefalosporin C-ből vezethető le. A C. *acremonium*-mal végzett fermentáció során Cefalosporin C-t állítanak elő, melyből oldallánc



196. ábra Cefalosporin prekurzorok

cserével/substitúcióval különböző származékokat képeznek. A cefalosporinok nagyobb stabilitása miatt az, amid kötés hidrolízise és létrehozása kémiai úton is megvalósítható.

A 7-amino-cefalosporánsavból a C-7-es és a C-3-as szénatomokon megvalósítható acilezések révén a félszintetikus cefalosporinok széles választéka állítható elő, melyek a gyógyászatban fontos szerepet töltenek be. Stabilitásuk jobb, mint a penicillineké, hatásspektrumuk szélesebb (az Ampicillinéhez hasonló). Számos β -laktamáz enzimmel szemben ellenállóak, így

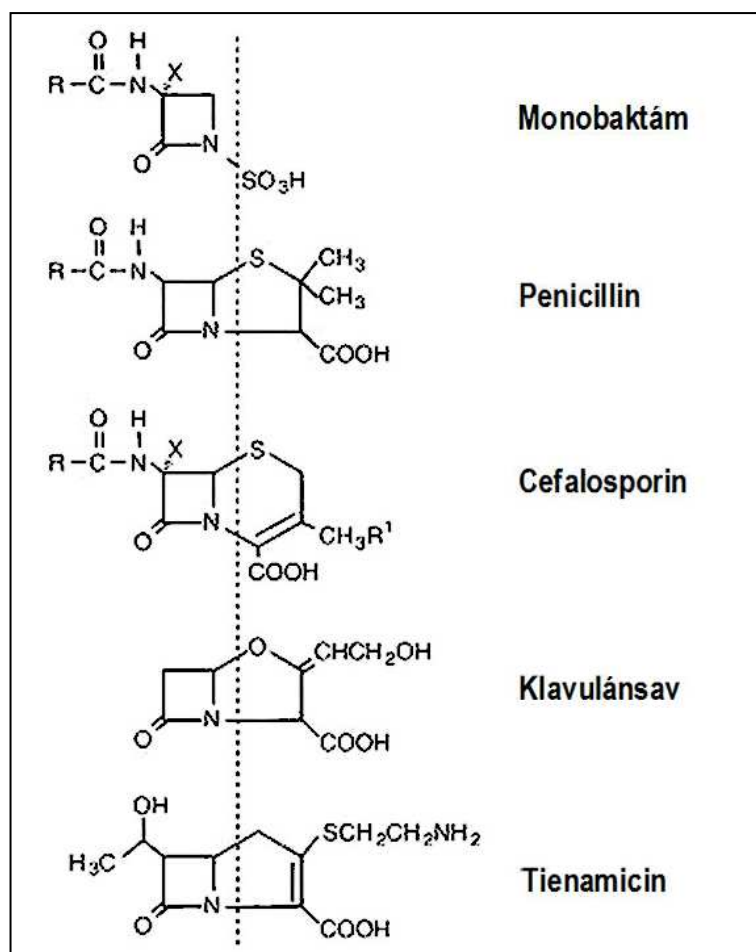
sok penicillin-rezisztens törzs ellen is hatékonyak. Előfordulnak ugyanakkor olyan cefalosporin-laktamázok, amelyek viszont a penicillineket nem tudják bontani. Penicillinre allergiás betegek esetében is alkalmazhatóak.

A különböző rezisztens kórokozók elleni hatékonyság szerint az eddig engedélyezett kb. 60 cefalosporin származékot generációkba sorolják. Jelenleg az ötödik generációnál tart a fejlesztés.

10.2.3. További β -laktám vázas antibiotikumok

Az 1970-es évek óta új β -laktám gyűrűs antibiotikumokat fedeztek fel, elsősorban kétféle technikával: (1) β -laktám antibiotikumokra igen érzékenyen reagáló (hiperszenzitív) teszt mikroorganizmusokat alkalmaztak; (2) β -laktamáz inhibitor vegyületeket kerestek. A felfedezett β -laktám gyűrűs vegyületek felépítése a hatáshoz szükséges négytagú gyűrű mellett változatos heterociklikus szerkezeteket tartalmaz. A monobaktámok esetében pedig ez a szerkezeti rész teljesen hiányzik. Az új β -laktámok és származékaik széles spektrumú antibiotikumként és/vagy β -laktamáz enzim inhibitoroként használhatók fel.

Különleges a klavulánsav felhasználása. Ennek a molekulának nincs antibiotikus aktivitása, viszont szubsztrát analógnak bekötődik a β -laktamázok kötőhelyére, és szerkezet analóg



197. ábra Béta-laktám vázas metabolitok

kompetitív inhibitoroként gátolja a penicillinbontó enzimeket. A terápiában penicillinekkel együtt adják, ezzel a rezisztens kórokozók védtességét csökkentik, amitől hatékonyabb lesz a kezelés (Augmentin = amoxicillin + klavulánsav).

11. CITOSZTATIKUMOK

11.1. Mikrobiális citosztatikumok

11.2. Növényi citosztatikumok

11.3. Eptonok

12. NÖVÉNYI SEJTENYÉSZETEK

A biológiai iparban a különféle mikroorganizmusok nagy léptékű alkalmazása széles körben elterjedt a legkülönbözőbb célokra. Kevésbé ismert és alkalmazott, de nagy lehetőségekkel kecsegtető terület a növényi sejtek és szövetek *in vitro* tenyésztése.

A növényi szövettenyésztés céljai túlnyúlnak az ipari termelés szempontjain:

- Biológiai, biokémiai kutatás – sok folyamatot egyszerűbben és hatékonyabban lehet tanulmányozni a teljes növény helyett izolált szöveti és sejttenyészetekben.
- Unikális biokémiai utak lehetősége – a növények biokémiája egészen más evolúciós utat járt be, mint akár a mikroorganizmusoké, akár az állati sejteké. Nagyon sok olyan új enzimet, illetve termék molekulát találhatunk, amely egyedi az élővilágban.
- Vegetatív mikroszaporítás – a mezőgazdaságban korlátot jelent a vegetatív szaporítású kultúrnövényeknél (pl. burgonya, szőlő) az, hogy egy kedvező tulajdonságú egyednek csak korlátozott számú utóda lehet. Laboratóriumban ezerszámra oszthatók a klónok, így szaporítóanyagot biztosítanak a nagyüzemi termeléshez is.
- Szekunder metabolitok előállítás – a növények számos faja termel olyan szekunder metabolitokat, amelyeket az emberiség különböző célokra felhasznál: tartoznak ide illat- és színyanyagok, gyógyhatású anyagok egyaránt. A növényi eredetű gyógyszerhatóanyagok mennyisége az összes, ma ismert és alkalmazott gyógyhatású vegyületek között igen nagyarányú. Közülük sok nem, vagy csak részben állítható elő szintetikusán, de akad olyan eset is, amelyben a mesterséges előállítás módja ugyan ismert, de nem gazdaságos. Más esetekben ezeket a vegyületeket veszélyeztetett, és/vagy lassan növekvő növényfajok termelik. A felsorolt problémákra megoldást jelenthet az *in vitro* növényi sejt- és szövettenyésztés.
- GM növények előállítása – a növényi génmanipuláció jellemzően sejtszinten történik, kihasználva a totipotenciát, a növényeknek azt a tulajdonságát, hogy egyetlen sejtből megfelelő laboratóriumi technikával regenerálható a teljes növény.

Az *in vitro* növényi sejt- és szövettenyésztésnek számos előnye van, hiszen a tenyésztési, illetve fermentációs körülmények kontrolláltak, reprodukálhatóak, függetlenek a természetben általunk nem befolyásolható változóktól, mint például az időjárás, az évszakok váltakozása, a talajviszonyok. A steril körülmények között történő szaporítás által a betegségek megjelenése is kiküszöbölhető, a kártevők, konkurensok távol tarthatók. Nem szükséges növényvédő szerek alkalmazása sem. Adott kultúrák a megfelelően optimalizált körülmények között igen nagy termelékenységet és növekedést mutathatnak. Optimalizálni tudunk gyorsan növekedő, sok hatóanyagot akumuláló sejtvonalt kiválasztásával, az alkalmazott táptalaj összetételének módosításával, a megvilágítás idejének és intenzitásának változtatásával, és számos más paraméter segítségével.

A számos előny mellett azonban leküzdendő nehézségek is akadnak: a gazdaságos termelés megoldása minden új technológia, új növény, új hatóanyag esetén felmerülő probléma. A termelt hatóanyagoknak egyes esetekben lehet fitotoxikus hatása (pl. podophyllotoxin), és egyes esetekben a termék kinyerése is jelenthet problémát: ha a kérdéses vegyületet a tápközegbe bocsátják ki a sejtek, ez egyszerűbb, de ha sejten belül raktározza (pl. vakuólumban), bonyolultabb. Szintén problémát jelenthet a növényi sejt- és szövettenyészetek genetikai instabilitása. A problémák egy részének kiküszöbölésében sokat segíthet a bioszintetikus útvonalak megismerése és megértése, ezek feltérképezésével számos kutatás foglalkozik.

12.1. Történeti áttekintés

Minden sejtenyésztés előzményeként meg kell említenünk Schleiden és Schwann munkásságát, ők mondták ki (1838), hogy minden élőlény sejtekből áll, és élő sejt csak élő sejtől keletkezhet.

Az in vitro növényi sejtenyésztéssel elsőként Haberlandt (1854–1945) próbálkozott, eredményeit 1902-ben publikálta. A kísérlet mai szemmel nézve sikertelen volt, a sejtek nem voltak képesek a mesterséges környezetben szaporodni. Az osztrák botanikus nem tudta, hogy az intakt növényből vett szövetdaraboknak milyen speciális tápanyag- és hormonális környezeti igényeik vannak, ezért mindössze szervesen sokat tartalmazó táptalajon próbálta azokat tenyészteni. Ezen kívül in vitro körülmények között máig nehezen tartható fajokat választott kísérletéhez, s ezek erősen differenciálódott sejtjeit használta fel, melyek eleve kevésbé hajlamosak osztódásra.

Philip White jelentős áttörést ért el a területen az 1930-as években: élesztőkivonatot, szacharózt, és szervesen sokat tartalmazó folyékony tápközegében sikerült paradicsom hajtáscsúcsából kultúrát indítania. A kísérlet több mint egy éves időtartama alatt a tenyészetek növekedési sebessége nem csökkent. Eredményei 1939-es publikálását követően hat héten belül Gautheret és Nobécourt francia kutatók hasonló pozitív eredményeket jelentettek meg. Tulecke és Nickell 1959-es publikációja az első, növényi sejtek nagy léptékű szaporításával kapcsolatban megjelent írás. Három évtizeddel később már kifejezetten növényi sejtek számára fejlesztett, akár 75 köbméteres bioreaktorokban folyt a termelés.

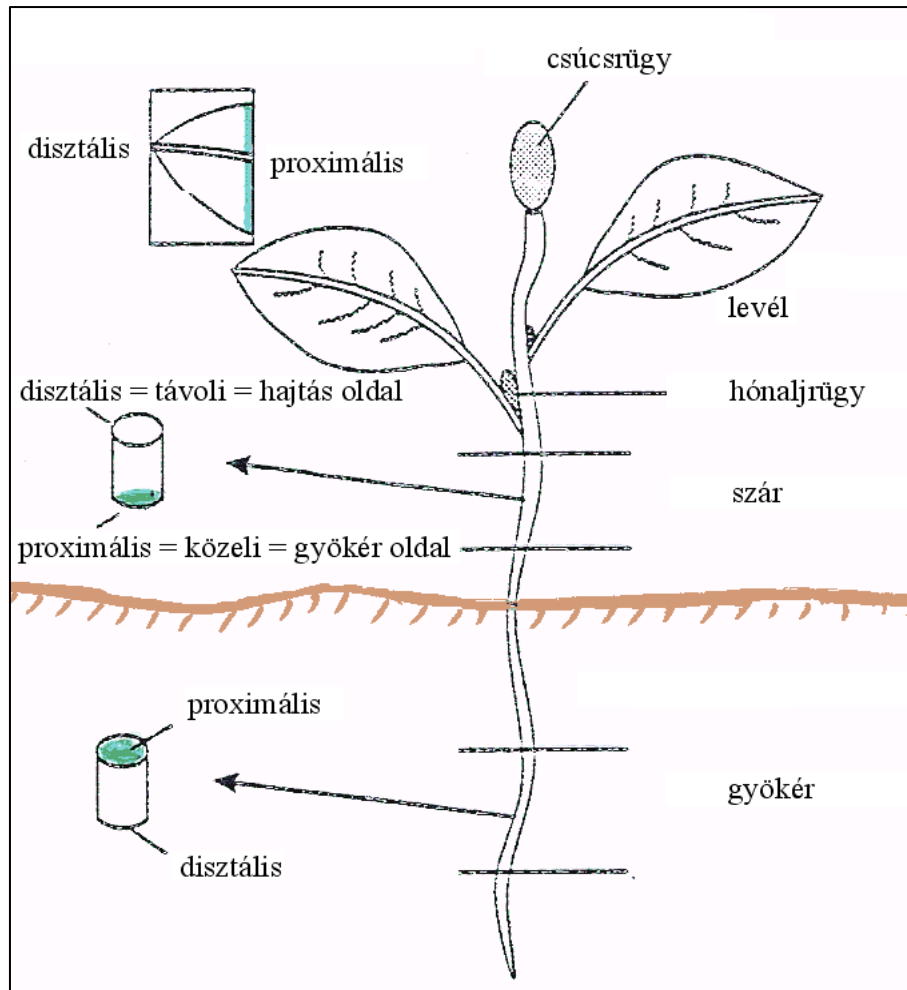
Az első növényi sejtfermentációs technológiával előállított terméket a japán Mitsui Petrochemical Industries hozta kereskedelmi forgalomba. A *Lithospermum erythrorhizon* által termelt sikonin nevű vegyületet Japánban sérülések kezelésére, illetve hagyományos selyemfésztékként használják. A japán kozmetikai ipar 1984 óta alkalmazza a *Lithospermum* sejtek által in vitro termelt sikonint ajakrúzsok színezésére. Becslések szerint a sikonin termelés esetében az in vitro megoldás körülbelül 800-szor hatékonyabb, mint a vegyület szabad földön termesztett növényekből való kinyerése.

Ma a technológia egyik legsikeresebb alkalmazása kétségtelenül a paclitaxel (taxol) gyártása. A vegyület meglehetősen drága gyógyszer, melyet hatékonyan alkalmaznak bizonyos ráktípusok kezelésében. Eredetileg tisztafélek kergéből vonták ki. A kémiai szintézis nem gazdaságos, a leghatékonyabb előállítási módszer a növényi sejtek (*Taxus* fajok) tenyésztése.

12.2. A növényi tenyészetek fajtái

12.2.1. Explantátum

Növényi szövettenyészet indításához először is szükség van explantátumra. Ezek az intakt növényből származó sejtcsomók, illetve szövetdarabok, melyből az in vitro tenyészet megfelelő körülmények között létrejöhet. Az explantátum származhat a növény bármely részéből, beleértve a hajtásokat, leveleket, szárakat, virágot, gyökereket, differenciálódott és differenciálatlan sejteket is, amelyek osztódásra képesek. A növényi részek kivágását szigorúan steril körülmények között kell végrehajtani. A kivágott növény darabot steril táptalaj felületére, vagy steril tápoldatba helyezik. Az életben tartás feltétele, hogy a sejtek számára minél pontosabban reprodukálják az eredeti, a növényben lévő környezetet, a kémiai és fizikai paramétereket.



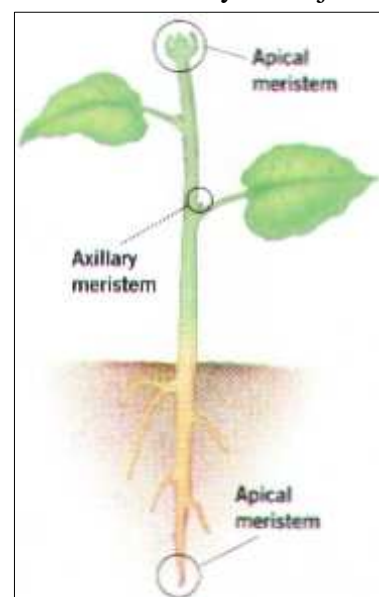
199. ábra Explantátumok polaritása

Sok növényi explantátum **polaritást** mutat. Ez azt jelenti, hogy az adott szerv növekedési iránya meghatározott. Azaz a növénydarab „emlékszik” arra, hogy melyik vége (pólusa) állt a csúc (növekedő vég) felé és melyik a bázis (rögzítő rész) felé. Az előbbi irányban fejleszt hajtást, az utóbbi irányba pedig gyökérkezdeményeket. Megjegyzendő, hogy a polaritás iránya a talajszintnél megfordul. A talaj feletti részekenél a felső vég a hajtás oldal, a föld alatt viszont az alsó, a gyökércsúcs felé álló vég indul növekedésnek.

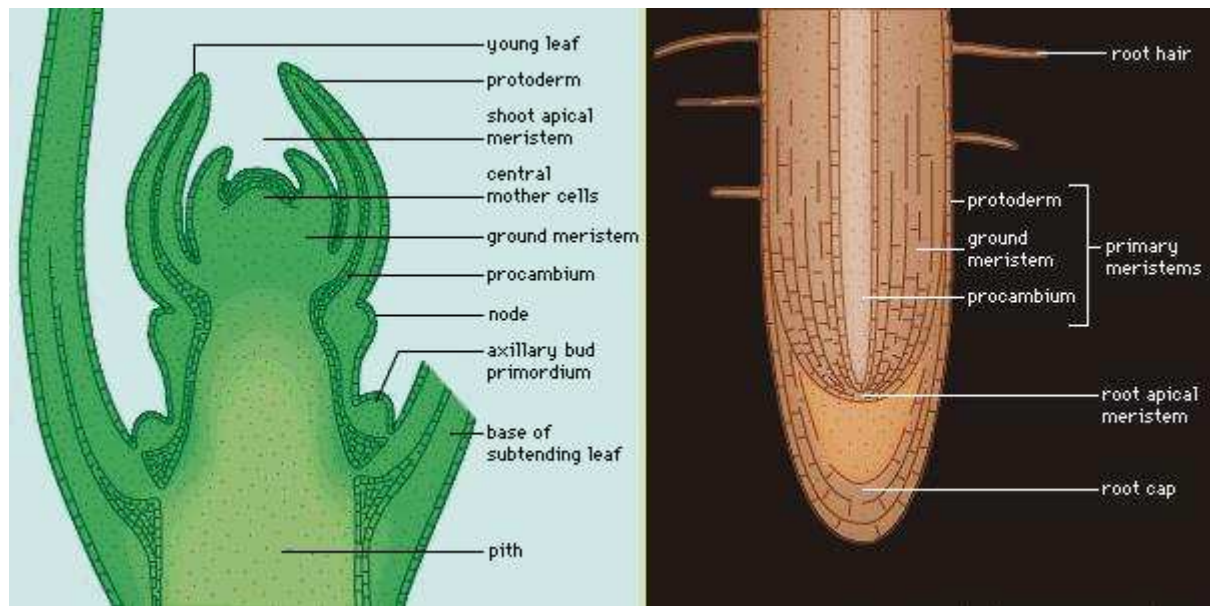
12.2.2. Merisztéma

Az explantátum egyedi esete, a növényből speciális, osztódó, még differenciálatlan sejteket tartalmazó szövetet vágnak ki. Ezek az aktívan növekedő hajtás- és gyökércsúcsok belsejében találhatóak, de inaktív állapotban lévő a rügyekből és alvórügyekből is izolálhatók. Ezek a sejtek hasonlóak az állati szervezetek őssejtjeihez, az osztódás után még nem mentek át szöveti differenciálódáson, de erre sok irányban is képesek.

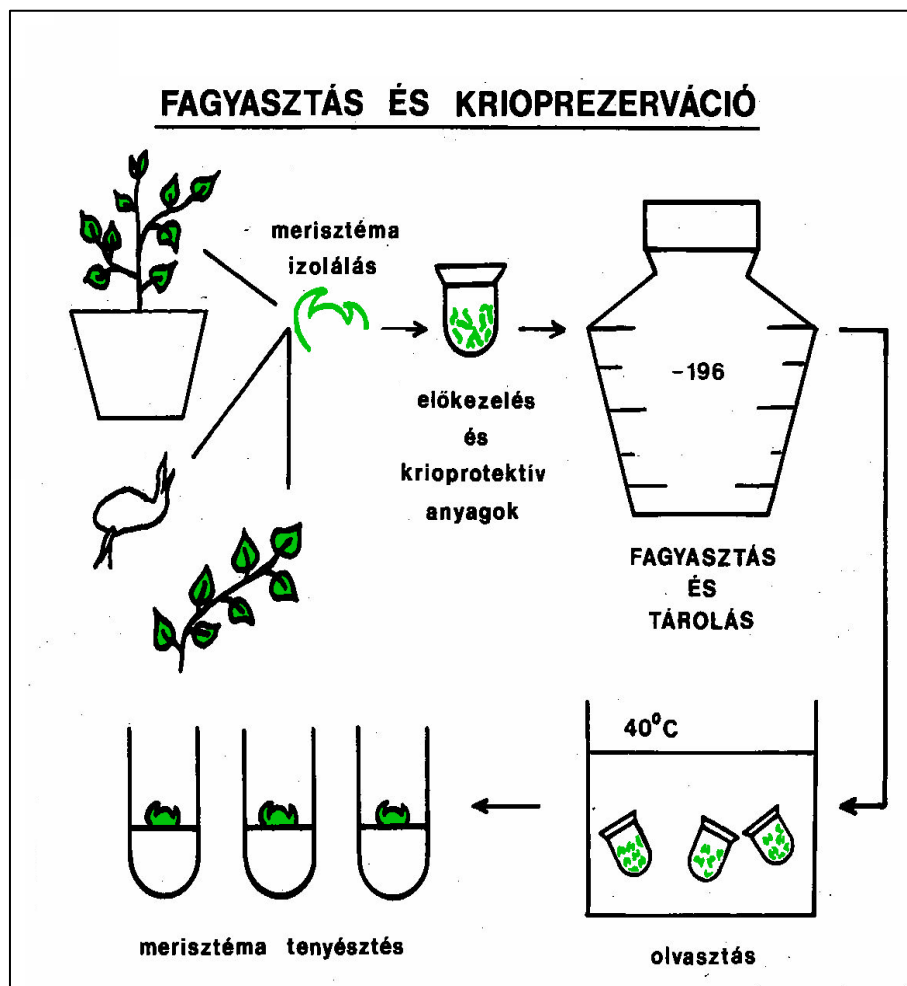
Merisztémából viszonylag könnyen regenerálható az egész növény. Így különösen alkalmasak vegetatív mikroszapóritásra.



200. ábra Merisztémák elhelyezkedése



201. ábra Merisztéma szövetek elhelyezkedése a növekvő csúcsokban



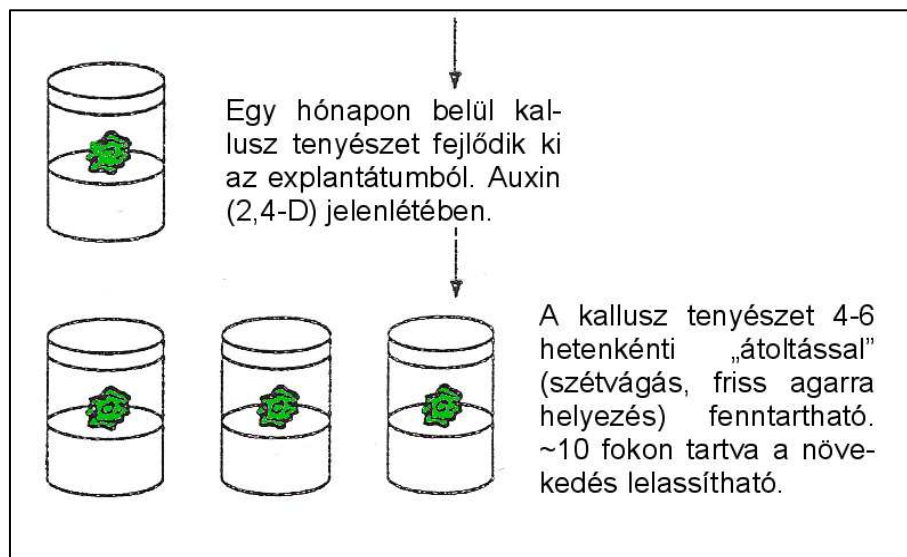
202. ábra Merisztémák tárolása mélyfagyasztással

Merisztéma állapotban a növényi sejt kultúrák mélyhűtve jól tárolhatók, alkalmasak sejtbankok kialakítására. A tárolás előkészítését még a kioperálás előtt meg kell kezdeni.

Célszerű a növényt három napig +4 fokon tartani, így növelhető a túlélés valószínűsége. A kioperálás után a sejteket védőközegbe helyezik. Az oldat a tápanyagokon (szacharóz, ásványi sók) kívül ozmolitikumokat (glicerin, mannit, szorbit) és krioprotektív anyagokat (dimetil-szulfoxid) tartalmaz. A tárolás hőmérséklete $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cseppfolyós nitrogénben). Fagyasztás sebessége a növénytől függ. A „fokozatos” hűtésnél előbb $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ sebességgel lehűtik $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig, majd 30 perc tartás után teszik a folyékony nitrogénbe. A „direkt” fagyasztásnál azonnal belemártják a cseppfolyós nitrogénbe. Ezen a hőmérsékleten a tenyészet évekig eltartható. A felhasználáshoz a kultúrát tartalmazó csövet $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben rázatva felolvasztják, a folyadékot lecserélik, ezáltal eltávolítják a DMSO-t, majd a tenyészetet táptalajra helyezik.

12.2.3. Kallusz tenyészet

A kallusz differenciálatlan, illetve különböző mértékben differenciálódott sejtek amorf, burjánzó csoportja. A kalluszon belül a sejtek genetikailag meglehetősen instabilak, a mutációk sokkal gyakoribbak, mint intakt növény esetében. Megfelelő körülmények között megindulhat a sejtek differenciálódása – erre egyes kalluszok hajlamosabbak, míg mások kevésbé - melynek egyes esetekben fontos szerepe lehet a kultúra szekunder metabolit termelésében.



203. ábra Kallusz tenyészetek fenntartása

A kalluszok legtöbb esetben alkalmasak a teljes növény regenerálására is.

Attól függően, hogy adott kallusz milyen növényi szervre való differenciálódásra mutat nagyobb hajlandóságot, illetve mely szerv irányába indult meg a differenciálódás, megkülönböztetünk különböző kallusztípusokat, így a rooty (gyökér jellegű), shooty (hajtás jellegű), embryonic (embrió jellegű) illetve semleges kalluszokat.

A kallusz kultúrák állaga lehet tömör vagy törékeny, morzsálódó is. Az első kalluszokból átoltáskor a számunkra kívánatos tulajdonságú darabokat kiválasztva befolyásolható a tenyészet későbbi konzisztenciája. Jellemzően a törékenyebb, lazább szerkezetű kalluszok ideálisak szuszpenziós tenyészetek indítására, mivel ezek sejtjei könnyebben elválnak, azokat kevesebb stressznek kiteve hozható létre belőlük a lehetőleg egyenletes sűrűségű szuszpenzió.

Színük különböző lehet, zöld (klorofill tartalom esetén, fotoszintézisre képes kultúrák), fehér (fotoszintézisre nem képes kalluszok), vagy egyéb szín (pigmentek, mint szekunder metabolitok termelése esetén).

Kalluszok létrejöhetnek természetes körülmények között, fertőzések hatására, fizikai sérülés eredményeképp a gyógyulási folyamat részeként, vagy in vitro közvetlenül indukálhatók a kiválasztott növény különböző szomatikus sejtjeiből auxinok és citokininek megfelelő egyensúlyának alkalmazásával, ám mindenképp osztódásra képes, de legalábbis osztódásra képes állapotba hozható sejtek szükségesek az indukcióhoz. Az arányok eltolása az auxinok irányába hajtásszövetek, míg a citokininek arányának növelése a gyökérszövetek kialakulását eredményezi.

Kalluszok in vitro indukálására és fenntartására az ideális a szilárd táptalaj. A kallusz indukcióhoz alkalmazott ideális táptalaj-összetétel, és a legmegfelelőbb kiindulási szövettípus az egyes növényfajoknál más és más. Ugyanakkor elmondható, hogy legtöbb esetben a legjobb eredménnyel járó megoldás szomatikus embrió, vagy a növény levelének felhasználása.

A tenyészetek fenntartásához szükséges az időről időre történő átoltás, mely céltól és növényfajtól függően általában 2-6 hetes periódusokat jelent. A növényi sejttenyészetek által adott növekedési görbék általában igen hasonlóak a mikroorganizmusokéhoz - ugyanúgy megfigyelhető a lag fázis, a gyorsuló növekedés szakasza, az exponenciális növekedés szakasza, a hanyatló és a pusztulási fázis -, azonban szaporodásuk sokkal lassabb azoknál.

Az átoltás mindig steril körülmények között kell, hogy történjen, mivel a növényi szövettenyésztéshez használt táptalajok a legtöbb mikroorganizmus szaporodásához is ideális körülményeket biztosítanak. Befertőzött kultúra a továbbiakban nem használható fel. A tenyészetek tárolásához is szükségesek a steril, jól ellenőrizhető, állandó körülmények, legjobb a légkondicionált helyiség. Megvilágítás nem minden esetben szükséges, ez a kallusz típusától és a kísérlet céljától függ.

A kallusz genetikailag módosításával az anyanövény tulajdonságai megváltoztathatók. A genetikai módosítás két alapvető eszköze a génpuskával történő génbevitel, illetve az *Agrobacterium tumefaciens* fertőzése révén annak TI-plazmidja segítségével történő génbevitel. *Agrobacterium rhizogenes* plazmidja pedig alkalmas hairy root kultúrák indukálására is.

12.2.4. Hajszálgöyökér (hairy root) kultúrák

A hajszálgöyökér kultúrát az *Agrobacterium rhizogenes* fertőzés hozza létre. A törzs RI (root-inducing) plazmidja beépít néhány gént a növény genomjába. Ez nem pusztítja el a növényt azonnal, hanem a működését több ponton megváltoztatja. Egyrészt differenciálódást okoz: hajszálgöyökér jellegű, de rendezetlen sejtek halmaza jön létre, ezek gyakorlatilag rákosnak tekinthető sejtek. A természetben az észlelhető, hogy a fertőzött növény „kiszőrösödik” (Hairy Root Disease). Más részről megváltozik a sejtek anyagcseréje, megindul az opinok (aminosav származékok) bioszintézise, amelyeket a hordozó *Agrobacterium* használ fel tápanyagként.



204. ábra Több hetes kallusz tenyészetek



205. ábra Hajszálgöker tenyészet sárgarépából



206. ábra Hajszálgöker tenyészet laboratóriumi fermentorban

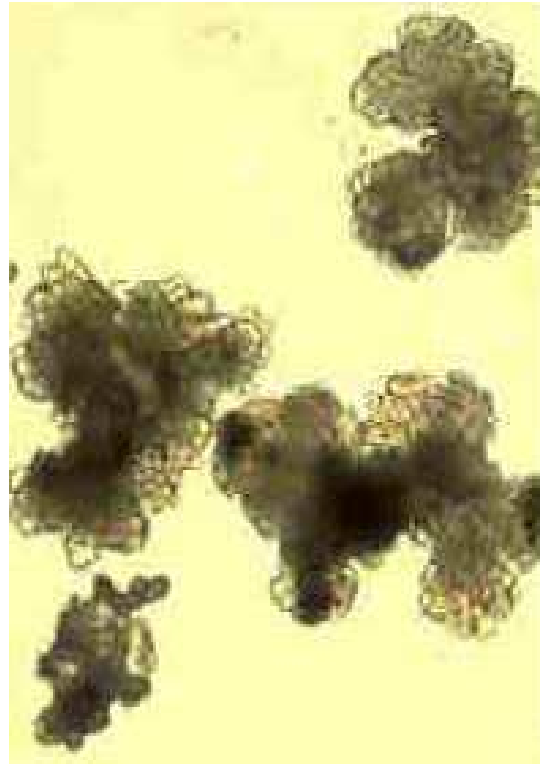
A mechanizmus analóg az *Agrobacterium tumefaciens* fertőzéssel. Ez utóbbi a TI (tumor indukáló) plazmidjával visz be egy DNS szakaszt (tDNS) a fertőzött sejt kromoszomális genomjába, megindítja az opin szintézist és tumor formájú sejtburjánzást okoz.

A hajszálgöker tenyészet gyorsan növekszik és nagy a termelékenysége. Előnye még, hogy nincs szükség fitohormonok adagolására, a táptalaj egyszerű szervesen sókból áll. Hátrány ugyanakkor, hogy makroszkopikus szálak szerkezete miatt sem kevert, sem air lift fermentorokban nem tenyészthető. Emiatt a tenyésztés léptéknövelése igen nehézkes. Nagyobb léptékű alkalmazásról nem tesznek említést, de a benne rejlő potenciál igen nagy.

12.2.5. Szuszpenziós tenyészet

A szuszpenziós kultúrák hasonlítanak legjobban a mikrobákkal végrehajtott fermentációkhoz. Mégis van különbség, a növényi sejtek rendszerint nem különállóan növekednek, hanem sejtsomókat alkotnak (akár 50-100 sejt együtt). E sejtek differenciálatlanok, legtöbb tulajdonságukban igen hasonlóak a kallusz kultúrák sejtjeihez. Előállításuk is legkönnyebben kalluszból történik. A sejtuszuszpenzió létrehozásához célszerű törekeny, könnyen széteső kalluszokat kiválasztani. A szövetet sejtfalbontó enzimektel kezelik, ez fellazítja a sejtfal anyagát és ezzel szétválasztja a sejteket. Ugyanakkor a sérült sejtfalú sejtek érzékennyé válnak az ozmózisnyomásra, ezért ozmolitikumot (pl. szorbitot) is kell adni tápoldatba. Auxin hatására a tenyészet osztódása felgyorsul, a kallusznál megszokott 4-6 hetes átoltási ciklus lerövidül kb. két hétre.

Ahhoz, hogy a szuszpendált sejtek képesek legyenek növekedni, szükséges egy kritikus inokulum méret (10-20%) alkalmazása. Ez alatt a növekedés általában meg sem indul, de a kritikus feletti, nagyobb inokulum méret további pozitív hatásokkal is járhat, egyrészt a sejt-, másrészt a szekunder metabolit termelés tekintetében is.

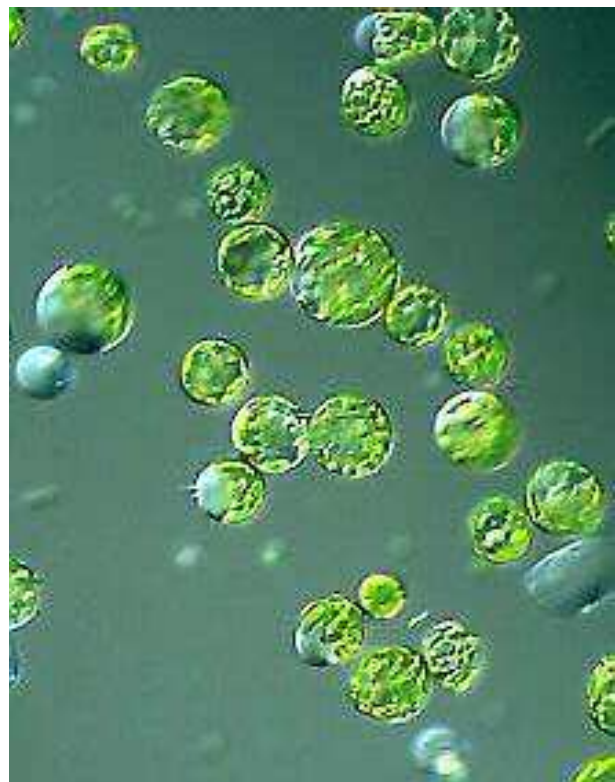


207. ábra Szuszpenziós tenyészet

12.2.6. *Protoplaszt tenyészet*

Maga a **protoplaszt** egy sejtfaletől megfosztott sejt. A sejtfalet hiányában a citoplazmát csak a sejtmembrán, a lipid kettősréteg borítja. Protoplaszt állapotban a sejt elveszti megszokott formáját, és viszkózus folyadékcséppként viselkedik. A felületi feszültség hatására lekerekített, gömbszerű alakot vesz fel.

Protoplasztok spontán, maguktól nem jönnek létre, a sejtfalet célzottan, enzimés (celluláz + pektináz) kezeléssel emésztik le. Az így létrehozott tenyészet rendkívül érzékeny a külső hatásokra. A citoplazma membrán könnyen szétszakad, ami a sejt pusztulásával jár. Mindenekelőtt pontosan be kell állítani a közeg ozmolaritását, hogy ne keletkezzen nyomáskülönbség a sejten belüli és kívüli tér között. Ezt nem-metabolizálható szénhidrátok (mannit, xilit, szorbit, 10-13%) alkalmazásával célszerű megoldani. A szénforrásként adott szacharóz azért nem megfelelő, mert az az anyagcsere során felhasználódik, és a csökkenő koncentrációval az ozmolaritás is csökken. A védtelen sejteket óvni kell a mechanikai hatásoktól is, a keverés, rázás, áramoltatás nyíróerőket hoz létre, ami elszakíthatja a membránt. Még a pipettázást is lassan, kíméletesen kell végrehajtani, mert a



208. ábra Növényi protoplasztok

pipetta csúcsában, a szűk csatornában a gyors áramoltatás örvényeket hozhat létre, ami a protoplasztok pusztulását okozhatja.

Ha sikerül a protoplasztokat életben tartani, akkor szinte azonnal megindul a sejtfal re-szintézise. A sejtek néhány hét alatt újraépítik sejtfalukat. Más életfolyamatok is zavartalanul folytatódnak, az anyagcsere, a növekedés, a sejtosztódás működik. A regenerálódó sejtek a tápoldatban előbb sejtcsoportokat képeznek (szuszpenziós tenyészetet), szilárd táptalajra helyezve kallusz képződik. Ezekből lehet később a teljes növényt is regenerálni.

12.3. A növényi szövetek tenyésztése

12.3.1. Tápoldatok

A biológiai iparban a tenyésztési körülmények közül elsőként a tápoldat összetételét szoktuk említeni. A növények alapvetően fotoautotrófok, azaz a fotoszintézishez szükséges szén-dioxidon és vízen kívül csak szervesetlen sókra van szükségük. A fotoszintézis gyakran nem elegendő az anyagcseréhez, ezért gyakran adnak a tápoldatba heterotróf szénforrásként szacharózt. A növényeknél ez az univerzális cukorforrás a sejtek számára, ellentétben az állatvilágban általános glükózzal (=vércukor). Az ásványi sókon kívül kis mennyiségben szükségesek a növényi tenyészetek számára vitamin és hormon jellegű szerves molekulák is. Általánosan elterjedt a Murashige-Skoog (MS) és a Gamborg B5 tápoldat. Ezt, illetve ennek módosított változatait használják laboratóriumban és ipari méretben egyaránt. Emellett aktív szén adagolása egyes esetekben elősegíti a gyökérképződést.

MS tápoldat		Gamborg B5	MS tápoldat		Gamborg B5
<i>Makrokomponensek (g/l):</i>			<i>Mikrokomponensek, mg/l</i>		
Szacharóz	30	20	KI	0,83	0,75
NH ₄ NO ₃	1,65		H ₃ BO ₃	6,2	3
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O		0,15	MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3	10
(NH ₄) ₂ SO ₄		0,13	ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	2
KNO ₃	1,9	2,5	Na ₂ MoO ₄	0,25	0,25
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,44	0,15	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,37	0,25	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025
<i>Vitaminok (mg/l)</i>			<i>Vas, kelát formában</i>		
mio-inozit	100	100	FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8	28
nikotinsav	0,5	1	Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37,3	
piridoxin-HC	0,5	1			
tiamin-HCl	0,5	10	pH	5,7 -5,8	5,5
glicin	2				

32. táblázat Gyakran használt növényi tápoldatok összetétele

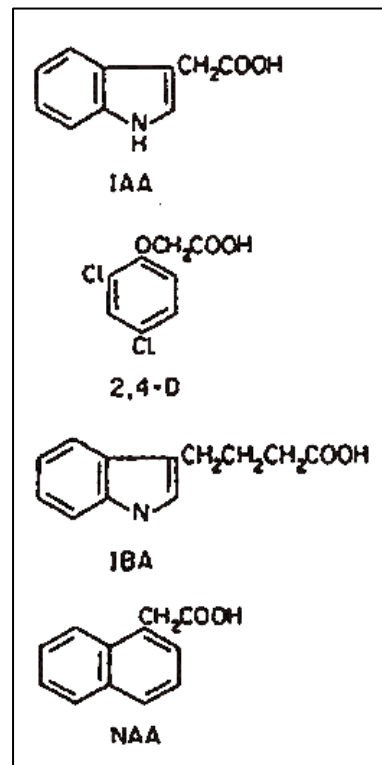
A táptalajba adagolt növényi hormonok kémiailag és hatástanilag egészen más jellegű anyagok, mint az állati hormonok. Fő csoportjaik:

- Auxinok
- Citokininek
- Gibberellinek

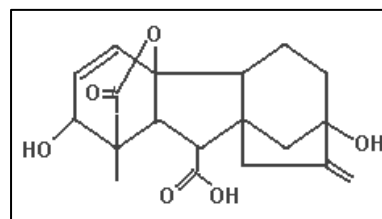
A tápközeghez adott növényi hormonok általában mesterséges auxinok és citokininek: e növényi hormonként alkalmazott vegyületek többsége a természetben nem található meg, de hatásuk közelítőleg megfelel a természetes anyagokénak, továbbá egyes esetekben stabilabbak, és sokszor hatékonyabbak azoknál.

Az **auxinok** a sejtosztódást és a lineáris növekedést serkentik, ezzel a gyökér, szár, virág, a gyümölcs növekedését szabályozzák. Kémiailag az auxinok aromás karbonsav származékok. A természetben előforduló molekula az indol-ecetsav (IAA). Ez szintetikus is előállítható, de az a hátránya, hogy bomlékony, a sterilizésnél, illetve a hosszú tenyésztési idő során átalakul. Ezért kerestek hasonló hatású szintetikus analógokat. Elterjedt a nagyon stabil 2,4-diklór-fenoxiecetsav (2,4-D), valamint az indol-vajsav (IBA) és a naftil-ecetsav (NAA) használata.

A **gibberellinek** elsősorban a lineáris növekedést, csírázást, virágzást, gyümölcstermést fokozó hormonok. Az anyagcserében nagyon sokféle gibberellin származék keletkezik, de ezek közül csak néhánynak van tényleges hormon hatása. A táptalajokba a fermentációsán is előállítható GA3 molekulát adagolják.



209. ábra Auxinok



210. ábra Gibberellinsav

A **citokininek** az auxin hatását moderálják. Valójában nem is az egyes hormonok koncentrációja határozza meg a hatást, hanem a két típus aránya. Együtt a sejtosztódást stimulálják, de a citokininek visszafogják az auxin által kiváltott szármegnyúlást. A növényregenerálásnál az auxin/citokinin arány szabályozza, hogy a kallusból szár vagy gyökér lesz. Több auxin a hajtások kialakulásának kedvez, míg az auxin elvételével a gyökeresedés indul meg.

Kémiailag a citokininek adenin származékok, az aminos-csoporthoz kapcsolódik egy nagyobb méretű apoláris oldallánc.

A szükséges **vitaminok** között találunk olyanokat, amelyek az állati/emberi szervezet számára is nélkülözhetetlenek (nikotinsav, piridoxin, tiamin), de emellett vannak a csak a növények számára fontos anyagok (inozit, glicin) is.

12.3.2. Tenyésztési körülmények

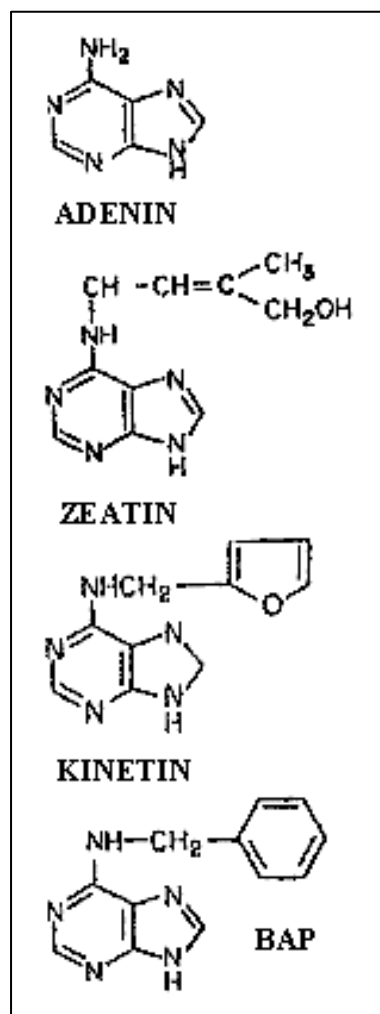
A növényi szövetek tenyésztése kapcsán már említettük a szükséges sterilítást. A lassan növekvő növényi kultúrákat igen gyorsan túlnövik a konkurens mikroorganizmusok. A fertőzés lehet specifikus, a növényt a természetben is megbetegítő kártevő mikrobák (baktériumok, gombák, vírusok) jelenhetnek meg. Lehet emellett általános is, a táptalajon jól növekvő mikroorganizmusok a növény jelenlététől függetlenül is elszaporodhatnak. A növényi szövetek manipulációját a mikrobiológiai laborokban megszokott sterilitás fenntartásával kell elvégezni, sterilizált táptalajokon, zárt, sterilizált edényekben, melyeket csak steril légtérben (sterilfülke, laminár box) szabad felnyitni.

A növényi tenyészetek növekedésének és a termékképzésnek is megvan az optimális hőmérséklete. Ez igen széles határok között mozoghat, akár 15 és 32 °C között, célszerű mindenképpen kísérletesen meghatározni.

A tápanyagok között nem említettük a fotoszintézishez szükséges szén-dioxidot. Az esetek nagy részében elegendő az atmoszférában található 0,02-0,03% CO₂, de egyes tenyészetek serkenthetők a gáztérbe adagolt 1-5% CO₂-dal. A növényeket körülvevő gáztér páratartalma magas, a laboratóriumi edényeken belül közel 100%.

A mikrobák szaporításához képest eltérést jelent a növények fényigénye. A növényi laboratóriumok felszereléséhez hozzá tartozik a szabályozható fényasztal, manapság már ledes fényforrásokkal. Az elsődleges paraméter a fény intenzitása. Ennek mértéke is széles határok között mozog, 1-2 ezer luxos megvilágítástól egészen 8000 luxos fényerőig terjedhet. Hatással van a növényi szövetekre a fény hullámhossza is. A kék fény a hajtás, a vörös fény a gyökérzet fejlődését segíti elő.

Befolyásoló tényező a világos-sötét periódusok hossza is. Ez a természetben is változó érték. Az egyenlítő közelében gyakorlatilag állandó a napéjegyenlőség (12+12 óra), a mi mérsékelt égövünkön a nyári vegetációs időszakban a 16+8 óra jellemző, a sarkköri zónában pedig a megvilágítás akár a 20-24 órát is elérheti.



211. ábra Citokininek

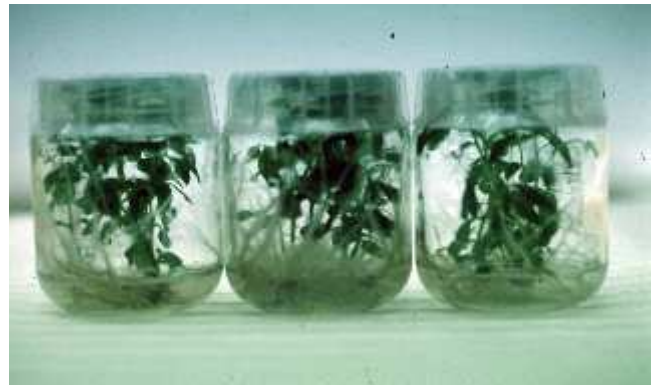
12.3.3. Laboratóriumi edények, eszközök

A növényi sejtek, szövetek tenyésztéséhez használatos edények hasonlítanak a mikrobiológiai laborokban megszokottakhoz, de mivel a növények fölfelé, a táptalajból kiemelkedve is nőnek, az edények belmagasságát meg kell növelni, hogy elférjenek benne a növények. Az edények anyaga hagyományosan üveg, ezek ismételtelen felhasználhatók, mivel hővel sterilizálhatók, autoklávozhatók. Manapság elterjedtek az egyszer használatos műanyag eszközök is, amelyeket sterilen szállítanak, és felhasználás után a hulladékba kerülnek. Kis növénykéek esetén megfelelő a kémcső, hiszen abban bőven van felső légtér. Ebből viszont nehéz a növényt sértetlenül kiemelni. A Petri csészék viszont már csak sejtes tenyészetek, esetleg kalluszok nevelésére alkalmasak. A Petri csésze klasszikus megfelelője a növényeknél a konzerviparban használatos befőttesüveg. Az alja megfelel a Petri csésze méretének, e fölött van viszont 10-15 cm szabad tér a hajtások növekedéséhez. Emellett olcsó, könnyen beszerezhető, anyaga hőálló, hiszen a konzerveket is autoklávban sterilizálják. Átlátszó, így a fotoszintézishez szükséges fény bejuthat a növényhez. Az egyedüli változtatás, hogy a csavarzáras kupakon egy kis lyukat ütnek, amelybe egy kis szivacs dugót helyeznek. Ez lehetővé teszi a légcserét a külső légtérrel, de megszüri a levegőt, így nem fertőződik be a tenyészet. A műanyag edények esetén már nem ragaszkodnak a hengeres alakhoz, a négyzetes forma jobb helykihasználást tesz lehetővé.

Ipari méretekben általában szuszpenziós tenyészeteket szaporítanak fermentorszerű készülékekben. Legtöbbször keverő nélküli, air lift megoldásokat alkalmaznak.



212. ábra Hajtástenyészetek kémcsőben



213. ábra Növények „befőttes” üvegben



214. ábra Műanyag nevelő doboz

12.3.4. A léptéknövelés lépései

Növényi sejt- illetve szövetkultúrák esetén a léptéknövelés egyik nehézsége, hogy annak során a laboratóriumi körülmények között termelt, számunkra lényeges produktumok termelése sok esetben megszűnik. A sikeresség fokmérője a produktivitás: amennyiben az a reaktorban megegyező vagy nagyobb, mint a rázatott lombikokban, a művelet sikeresnek tekinthető.

A léptéknövelési folyamat során első lépésben az intakt növényből izolált szövetekből indítunk kallusz kultúrát. Ez a fázis a legalkalmasabb alapvető mérések elvégzésére, mint a növekedési görbék felvétele, illetve az egyes sejtvonalak termelékenységének folyamatos monitorozása, amely alapján kiválaszthatjuk a továbbiakban célunknak legmegfelelőbb sejtvonalat.

Ez után következik a szuszpenziós fázis. Célszerű a növekedés mértékét továbbra is ellenőrizni, egyúttal általában a léptéknövelésnek ebben a szakaszában végzik a legtöbb optimalizációt, a korábban szelektált sejtvonala produktivitásának további növelésének érdekében.

A következő fázist a különböző méretű bioreaktorok jelentik, fokozatosan növekedve a laboratóriumtól a félüzemig át az ipari léptékig. A rázatott kultúrák bioreaktorba való áthelyezésével a legnagyobb probléma, amely már a tápközeg optimalizációjánál is felmerült: az egyes körülmények kölcsönhatásai igen bonyolultak lehetnek, közel sem biztos, hogy a lehetőség szerint azonos körülmények fenntartása mellett a termelékenység nem változik. Ekkor (újra) optimalizálandók a kultúra körülményei, figyelembe véve az eddig is jelenlévő körülmények mellett – tápközeg összetétele, hőmérséklet, pH, stb. – azokat a faktorokat is, amelyek kisebb léptékű termelésnél még nem voltak jelen – így a keverés és levegőztetés megoldásának a kérdése, stb. Ekkor dönthető el, milyen lesz az optimális üzemeltetési mód: folyamatos üzemeltetésű, rátáplálásos, félfolyamatos vagy szakaszos. A kisebb reaktoroktól a nagyobbak irányába történő léptéknövelésnél folyamatosan figyelemmel kell kísérni valamennyi paraméter változását, és szükség esetén beavatkozni a folyamatba.

A léptéknövelés során fontos határ a megvilágítás lehetőségének megszűnése. Kisméretű üveg-, vagy ablakkal ellátott fermentorokban még lehetséges a fotoszintézis fenntartása. Bizonyos méret fölött viszont már technikailag nem valósítható meg a megfelelő világítás. Százliteres nagyságrendben, illetve e fölött már fém készülékekben, világítás nélkül teljesen heterotróf anyagcserét folytatnak a sejtek.

12.3.5. Növekedés, sejtaggregáció, falnövekedés

Növényi sejtszuszenziók esetén sokszor megfigyelhető a falnövekedés és az aggregátumképzés. Az aggregátumok képződésének oka többnyire a sejtek osztódás utáni szétválásának sikertelensége, vagy extracellulárisan kiválasztott poliszacharidok jelenléte. Az aggregáció mértéke különböző lehet, a finom szuszpenziótól akár 500 µm-es, vagy milliméteres mérettartományig is, nagyságrendileg több száz sejt összetapadása által. Az aggregátumok képződése függ a kultúra korától, körülményeitől, és a sejtvonaltól is, tehát célszerű a léptéknövelés folyamán figyelemmel kísérni a morfológiai változások trendjét.

Az aggregátumok jelenléte technológiai problémákat vet fel: mivel ülepedésre hajlamosak, szükséges a megfelelő intenzitású kevertetés biztosítása, amely azonban a sejtek sérülését eredményezheti. Problémák léphetnek fel a homogenitás terén is: az aggregátumok belsejében elhelyezkedő sejtekhez nehezebben jut el az oxigén, illetve a tápanyag, a biokémiai reakciók diffúziólimitálttá válhatnak, amelynek hatása megjósolhatatlan.

Mind a falnövekedés, mint a túl nagy aggregátumok problémájára megoldást jelenhet például a pektináz enzim adagolása. A sejtek bizonyos mértékű összetapadása ugyanakkor elkerülhetetlen, és számos folyamathoz elengedhetetlen a sejt-sejt kapcsolat fennállása.

12.3.6. Levegőztetés

A növényi sejt kultúrák oxigénigénye azok lassú növekedése miatt általában kisebb, mint az aerob mikroorganizmusoké vagy az emlőssejteké, ám a növényi sejtek többnyire aggregátumokat képeznek, amelyek környezetében az oxigénigény magas. A túl magas oxigénkoncentráció viszont esetenként akár toxikus is lehet. Az átlagos oxigénfogyasztás nagyságrendje növényi sejt kultúrák esetén 3-4 mg/g sejt/óra. A tervezés során vizsgálandó paraméterek a keverés intenzitása, a buborékok mérete és eloszlása, a tápközeg oxigénfelvő-képessége, és a hidrodinamikai stressz mértéke. Ez utóbbi a pektinázzal fellazított sejt falú sejtek számára veszélyes lehet.

A szükséges mértékű anyagátadás biztosításához a reaktorokban turbulens áramlást hoznak létre. A megfelelő intenzitású kevertetés feltétlenül szükséges a sejtek megfelelő oxigén- és tápanyagellátásához, de ügyelni kell a hidrodinamikai feszültségekre: a növényi sejtek a nyírófeszültségekkel szemben sokkal kevésbé ellenállóak.

Nagy termelékenységhez sűrűbb sejt szuszpenzió létrehozása szükséges, ennek azonban a nagyobb az oxigén-szükséglete, és nehezebb a megfelelő anyagátadás biztosítása a sejtek károsítása nélkül. A nagy sejt sűrűség és a sejt aggregáció nagy viszkozitást eredményezhet, ezek a sűrű szuszpenziók a newtonitól eltérő viselkedést mutatnak. A sejtek az alkalmazott szénforrástól illetve fajtól és sejt vonaltól függően a fermentáció későbbi szakaszában poliszacharidokat is kiválaszthatnak, ami a viszkozitás hirtelen megugrását eredményezheti.

A túlzott levegőztetés habzást okozhat a bioreaktorban, de szerepe van a lé fehérjekoncentrációjának is. A habképződés számos vegyület alkalmazásával csökkenthető, amelyek azonban befolyásolhatják a sejtek növekedését és életképességét, ezért alkalmazásuk előtt további kísérletek végzendők, a habképzés csökkentése melletti további hatások vizsgálatára.

12.4. Bioreaktorok

Az első próbálkozások mikrobiológiai sejt fermentációs technológiákban alkalmazott reaktortípusok átvételével történtek. Sokáig azt gondolták, hogy növényi sejt fermentáció céljára csak az airlift típusú bioreaktorok lesznek hatékonyan alkalmazhatók a növényi sejtek a nyírásérzékenysége miatt, erre azonban ellenpélda a világ egyik jelenleg legnagyobb növényi sejt kultúraüzeme Németországban, Ahrensburgban, ahol 5 db kevert, 75 m³-es tartályreaktort alkalmaznak kaszkádrendszerben, Paclitaxel termelésére.

12.4.1. Keverős tartályreaktorok

A mikroorganizmusoknál rendszerint általánosan alkalmazható keverős tartályreaktorok növényi sejt kultúrák esetében csak kellő körültekintéssel használhatók, azok nyírásérzékenysége miatt. A keverőlapátok tervezése, illetve kiválasztása során arra kell törekedni, hogy azok minél kisebb hidrodinamikai feszültséget keltsenek a közegben, így nagyobb keverési intenzitás esetén is a lehető legkevesebb kárt okozzák a sejtekben. A fellépő nyírófeszültségek mellett hátrányt jelent még a nagy energiaigény. Ennek ellenére ez ma a gyakorlatban ez a legelterjedtebb reaktortípus a növényi sejt fermentáció terén, mivel a léptéknövelés könnyen megvalósítható. A költsége sem túl magas, és igen sok féle keverő választható, amellyel nagyban befolyásolható a sejteket érő stressz mértéke, könnyen megvalósítható a megfelelő kevertetés.

12.4.2. Airlift reaktorok

Az airlift reaktorok általános előnyei érvényesülnek (kisebb nyírófeszültség, nincs mozgó alkatrész, kisebb energiaigény). Hátránya viszont, hogy nagy sűrűségű szuszpenziók esetén jelentősen csökken a keverés hatékonysága.

12.4.3. Perfúziós bioreaktorok

Ezeket eredetileg emlős sejtek szaporítására fejlesztették ki, lényegük, hogy a reaktorteret két részre osztják egy membrán vagy szita segítségével, amely az oxigént átengedi, de a sejteket nem. Az oxigén oldott állapotban a membránon keresztül éri el a sejteket, így azok nem találkoznak buborékokkal.

12.5. Fermentációs technikák

A szakaszos üzemeltetési módot a kísérleti fázisban általánosan alkalmazzák, és a léptéknövelésnél ezt nagyítják fel, azután térnek át más technikára. Szakaszos üzemben mind primer, mind szekunder metabolitok előállíthatók. A szubsztrát fogyása és a sejtömeg gyarapodása miatt a körülmények folyamatosan változnak. Mérésekkel követve a folyamatot kvantitatív információt szerezhetünk az anyagcsere működéséről. Ugyanakkor a változó körülmények miatt csak a folyamat egy szakaszában működik optimálisan a rendszer, így nem mindig ez a leghatékonyabb megoldás.

Rátáplálásos fermentációt akkor célszerű választanunk, ha a termelékenységre jelentős hatást gyakorol a nagy induló szubsztrát koncentráció. Rátáplálás esetén is optimalni kell az adagolást, mert a fellépő ozmotikus sokk kárt tehet a sejtekben.

A félfolytonos eljárást olyan esetben célszerű választani, ha a termékképzés a növekedéshez kötött. Ellenkező esetben, szekunder metabolitoknál kétlépcsős szakaszos, vagy kétlépcsős folytonos termelést érdemes megvalósítani. Ekkor az első lépés egy növekedési környezet létrehozása, melyben a növényi sejteket felszaporítjuk, majd második lépésként azokat új környezetbe, eltérő összetételű tápközegbe helyezve megindítjuk, illetve fokozzuk az általunk kinyerni kívánt szekunder metabolit termelését.

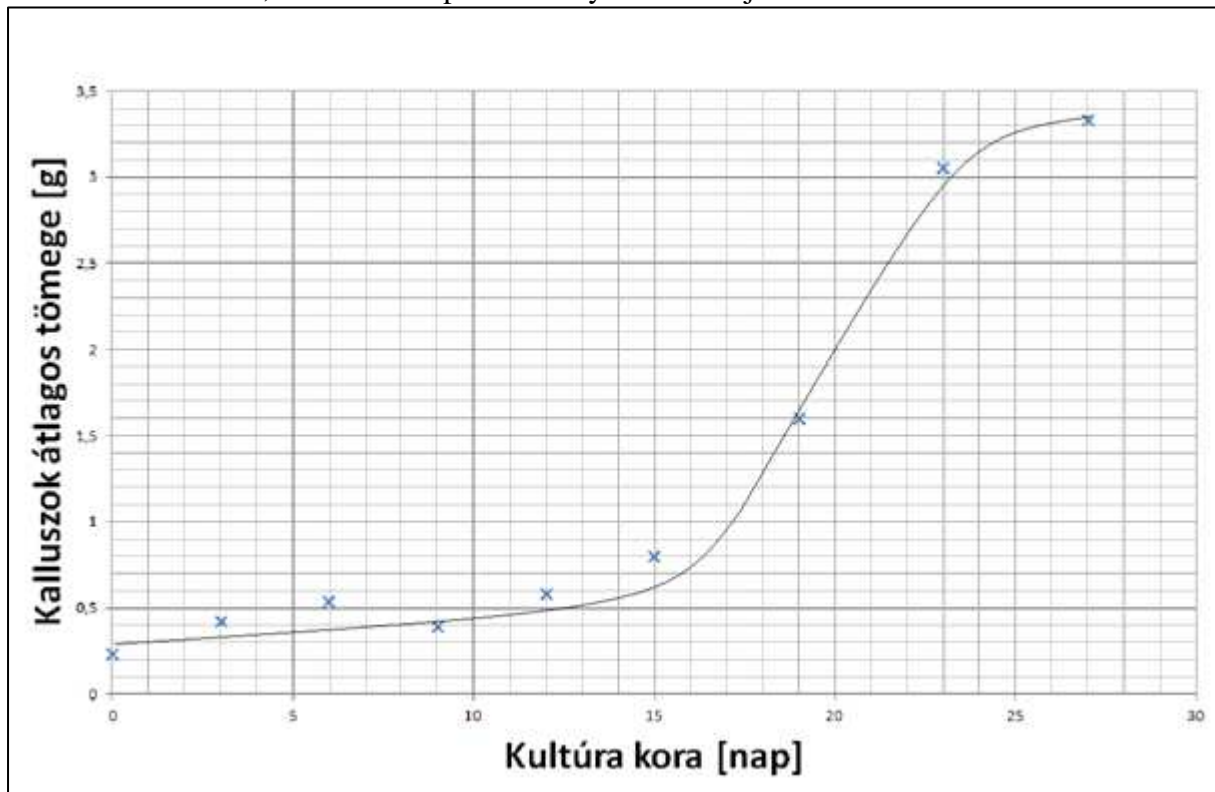
Folyamatos fermentáció alkalmazása általában a növekedéshez kapcsolódóan termelődő metabolitok esetében célszerű, de az esetlegesen fellépő termékkihibíciót is ki lehet vele küszöbölni. Sejtviisszatartás alkalmazásával még további javulás is elérhető, mind sejt-, mind termékhozamban.

Napjainkra a legtöbb növényfaj laboratóriumi *in vitro* kultivációja már megoldott, ezért a kutatások és fejlesztések fókuszja folyamatosan eltolódott a termelékenység növelése és a léptéknövelés, az ipari léptékű *in vitro* növényi sejtfermentáció megvalósításának irányába. Míg mikrobiális sejtfermentációs technológiák esetén a megfelelő bioreaktorok tervezése és üzemeltetése napjainkra szinte rutinfeladat, növényi sejttenyészetek esetében ez jóval bonyolultabb, kevesebb ismeret halmozódott fel.

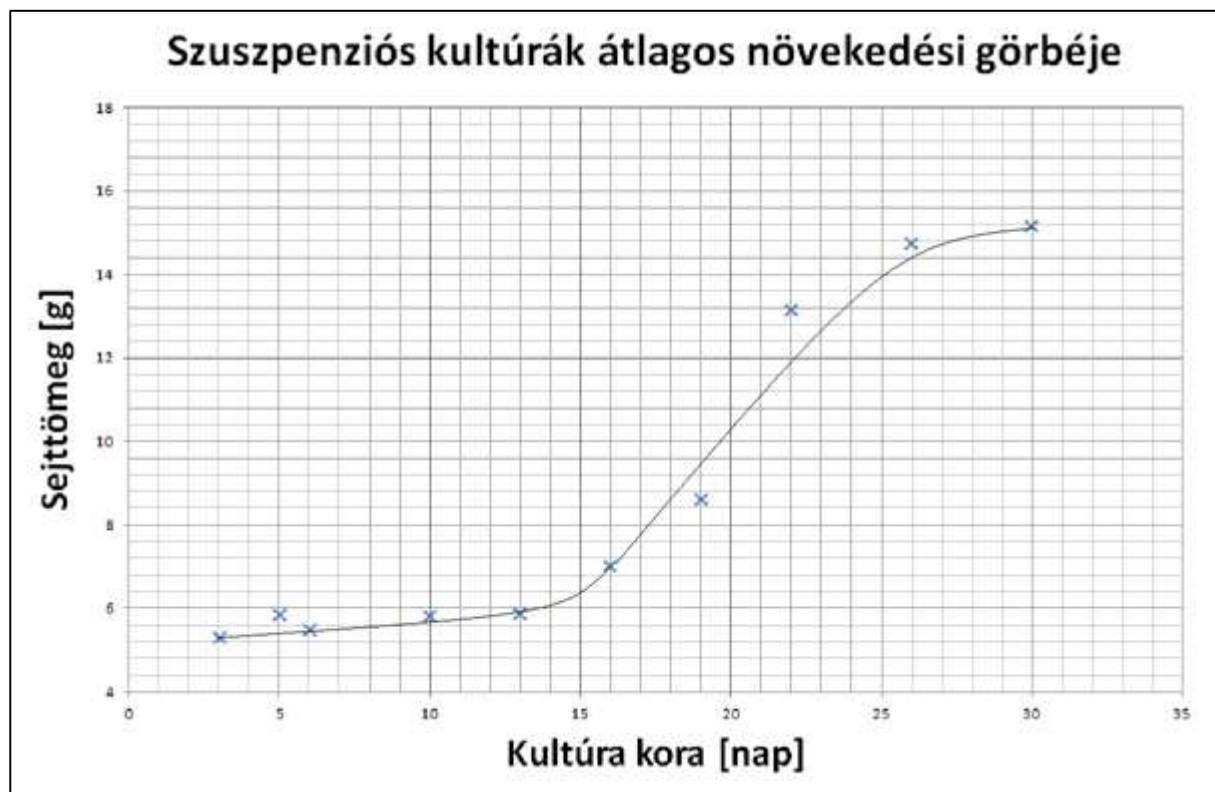
12.6. A tenyészet jellemzése: sejtömeg mérés

A tenyészetek növekedésének mérése nehezebb, mint a mikrobáknál. A szilárd táptalajon nevelt kultúrák zöldtömegének mérése csak kiemeléssel, azaz a szövetek károsításával lehetséges. A folyadékban szaporodó sejtek mérése is kissé eltér a mikrobiális sejtszuszpenzióktól. A protoplaszt kultúrák megszámolhatók mikroszkóp alatt Bürker kamrában, vagy akár citométerrel is. Az ipari léptékben is használt szuszpenziós tenyészetek viszont a sejtek csomósodása miatt nehezen mérhetők. Lemérhetjük a biomassza nedves és száraz súlyát, centrifugálással ülepitve a térfogatát. Ezek nem igazán pontos és nagy felbontású mérések, nem különböztetik meg az élő és elpusztult sejteket, így csak tendenciák meghatározására alkalmasak. Alkalmazhatunk közvetett méréseket, mérhetjük a minta klorofill-, fehérje- vagy DNS tartalmát. A sejteket teljesen szétválasztani csak roncsoló kezeléssel lehet, például króm-trioxidos melegítéssel. Az így elpusztított sejteket azután megszámolhatjuk a szokásos módszerekkel, mikroszkóp alatt, sejtszámlálóval vagy áramlási citométerrel.

Még egy egyszerű nedves súly méréssel is jól követhető, hogy a tenyészetek a mikrobákhoz hasonlóan szigmoid görbe szerint növekednek. A növekedési görbe alakulása, fázisai mind a kallusznál, mind a szuszpenziós tenyészeteknél jól követhetők.



215. ábra Kallusz tenyészet növekedése



216. ábra Szuszpenziós tenyészet növekedése

12.7. Növényregenerálás

A növényi genetikai manipuláció változatos módszereire itt nem térünk ki. Valamennyinek közös eleme viszont, hogy a módosítás sejtszinten történik, majd a klónok minőségi és mennyiségi szelekciója után a kiválasztott sejtekből a totipotenciát kihasználva szöveteket, illetve egész növényt regenerálnak. A növény-regenerációnak alapvetően két útja van:

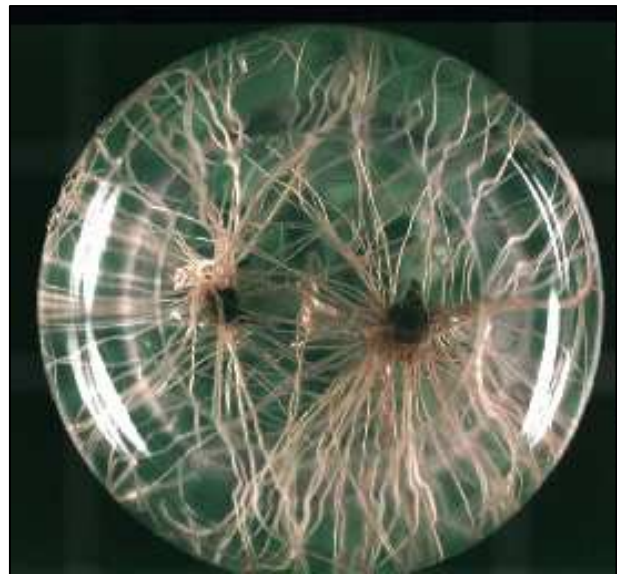
Organogenezis: egy növényi szerv regenerálódik (hajtás, gyökér, hagyma, gumó), ebből alakítjuk ki az egész növényt

Embriogenezis: a manipulált sejtől egy embrió jön létre (van sziklevele, gyökere) és ebből lesz a növény.

A növényregenerálás többféle tenyésztéssel is kiindulhat (protoplaszt, kallusz, merisztéma), de más-más lépések célszerűek.

Merisztémából az organogenezis indítható meg könnyebben. A létrehozott növényi részek azután kiválóan alkalmasak a vegetatív mikroszaporításra.

Protoplasztok esetében a sejttal regenerálás után kallusz tenyésztet alakítható ki. Ebből auxinok (pl. 2,4-D) adagolásával megindítható az embriogenezis. Az auxin és kék fény hatására erőteljes hajtásképződés indul meg. Steril körülmények között, kiegészített MS tápoldaton, 3-5 hét alatt létrehozható egy minimális gyökérszerű növényke. Ennek energiaellátása kettős. Felhasználja egyrészt a tápoldathoz adott szacharózt, másrészt megindul a fotoszintézis is. Ennek elősegítésére, a zöld színtestek számának növelése érdekében nagy fényerőt biztosítanak, ami elérheti a 8000 luxot is. A megvilágítási ciklus 16+8 óra. A hajtás kifejlődése után kerül sor a gyökereztetésre. Az addig fejletlen gyökérszerű növekedésnek indul, ha a tápoldatban megváltoztatják a hormonok arányát, csökkentik az auxin arányát a citokininekhez viszonyítva. Emellett a kék fény helyett vörös fényre váltanak. Néhány hét alatt kifejlődik a gyökérszerű is. A növényke teljes, minden része kialakult, elvileg életképes a szabad természetben. Gyakorlatban azonban még nagyon érzékeny a környezeti hatásokra. Emiatt csak egy fokozatos szoktatási folyamat után lehet mezőgazdasági termesztésbe venni.



217. ábra Gyökerezített tenyésztet (alulnézetben)

12.7.1. Edzés, kiültetés

Az edényből kivett növényt speciális talajba ültetik, majd először fitotronba helyezik. Itt a fény, a hőmérséklet szabályozott, de nagyobb légtérben, kisebb páratartalom mellett adaptálódik. A következő lépés az üvegház, a fóliasátor, amit később a nappali órákra kinyitnak. A szoktatás eredményeként a növény ugyanúgy kezelhető, mint a természetben élő egyedek. Növekszik, virágot, termést hoz, ivarosán szaporítható, kellő elszaporítás után termesztethető.

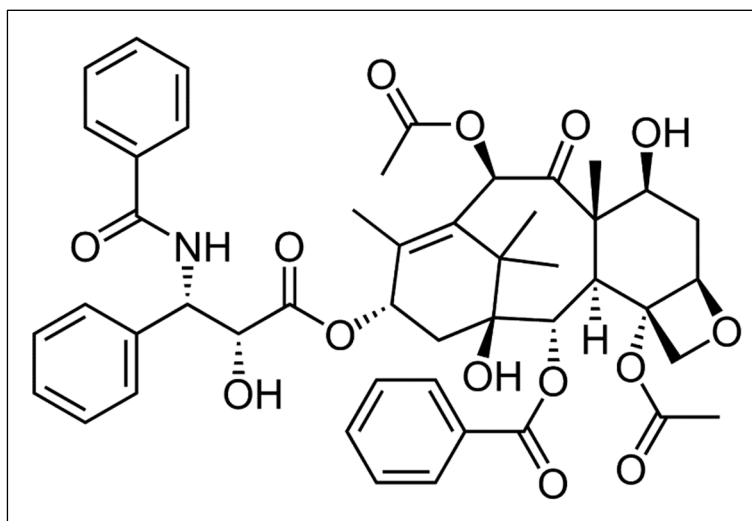
Erre a hosszadalmas eljárásra elsősorban a kialakulatlan vízháztartás miatt van szükség. Alapesetben a növény a gyökerein keresztül folyamatosan vizet vesz fel, ez feláramlik a levelekbe, ahol a légzőnyílásokon keresztül elpárolog. Erre a tenyésztőedényen belül 100% páratartalom mellett nincs se szükség, se lehetőség. A légzőnyílások állandóan nyitottak, nem zárulnak a körülményeknek megfelelően. A gyökérzet és a levélfelület nagysága nem hangolódott össze, ha pedig a levelek többet párologtatnak, mint amennyit a gyökerek felvesznek, akkor a növény elfonnyad és kiszárad. Emellett a kültakaró sem erősödött meg kellőképpen, hiányzik a viaszos védőréteg is. Így védtelen a kártevőkkel, kórokozókkel, mechanikai sérülésekkel szemben.

12.8. Esettanulmány: a taxol gyártása növényi sejtenyészettel

A tumoros megbetegedések kezelése még mindig kihívás az orvostudomány számára. A tumorok sokféle változatának nincs igazán jó és egyértelmű terápiája, a kezelési alternatívák:

- sebészeti beavatkozás
- besugárzás
- kemoterápia
- monoklonális antitestek

A kemoterápiás gyógyszerek nagy része szintetikus, a biológiai eredetű szerek részaránya csak kb. 10 %. Hatásuk azon alapul, hogy a gyorsan osztódó sejteket károsítják (citosztatikumok), azaz a rákos sejteken kívül más testi sejteket is. Ezek egyike a taxol, másnéven paclitaxel.



218. ábra A taxol szerkezete

Hatását úgy fejt ki, hogy sztöchiometrikan kapcsolódik a húzófonalakba beépült tubulinhoz, ezzel a mikrotubulusok (kromoszóma húzófonalak) lebomlását akadályozza.

A természetben a tiszafafélék (*Taxaceae*) kérgében és tűlevelében fordul elő, igen kis koncentrációban, emiatt igen korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre.

12.8.1. A taxol előállítási lehetőségei

A taxol felfedezése óta jelentős energiát fordítottak a kitermelés növelésére. A legfőbb akadály a taxol alacsony koncentrációja, még a legnagyobb hatóanyagtartalmú fajban, a *T. brevifolia*-ban is csak 10-500 ppm található. Egy kilogramm taxol kinyeréséhez kb. 10 000 kg tiszafa kéreg szükséges, ami mintegy 3000 kifejtett fa kivágását jelenti. Egy páciens kezeléséhez 2,5-3 g paclitaxelre van szükség, azaz minden beteg kezeléséhez körülbelül nyolc 60 éves tiszafát kell kivágni. Más *Taxus* fajok taxol tartalma hasonló: például a CEC China

Pharmaceuticals szerint is 1 kg taxol izolálásához 10 000 kg *T. chinensis* tűlevel és kéreg szükséges. Ehhez a nehézséghez járul, hogy a taxán koncentrációja szezonálisan változik a tiszafában. Továbbá a taxol tiszafából történő kinyerése komplex és drága technológiát igényel. Mindezek indokolják, hogy a vadon növő fák feldolgozása helyett más alternatívát kellett találni.

A taxol előállításának egyik módja a kémiai szintézis, ezt már 1994-ben megoldották. Viszont sokgyűrűs szerkezete és aszimmetriacentrumai miatt a totálszintézis sok lépésből áll és az eredő hozam alacsony. Emiatt a szintetikus gyártás gazdaságtalan. Egyedül a Cayman Chemicals (USA) gyárt tisztán kémiai úton Paclitaxelt és származékokat, nagy tisztaságú standardként, milligrammos tételben.

1997 óta a Kanadai Erdészeti Szolgálat - Atlanti Erdészeti Központ kidolgozta a tiszafa ökológiailag fenntartható betakarítási protokollját, amelyben a vadon élő fajok legjobb változatait ültetvényeken nevelték. A kanadai Biolyse Pharma a világ legrégebbi taxol gyártója a kanadai tiszafa (*Taxus canadensis*) taxol tartalmát extrahálja, de nem károsítja a növényt a kéreg eltávolításával, hanem az újra növő tűlevelekből vonja ki.

Hasonló módon, 2004-ben a Yewcare vállalat *T. chinensis* ültetvényeket létesített a Da Huan hegység természetvédelmi területén, Yunan tartományban (Kína). Ennek területe ma már több mint 30 km², ez a legnagyobb tiszafa ültetvény a világon. Iparági források szerint a kínai vállalatok többsége még mindig az ültetvényeken termelt tiszafából vonja ki a természetes taxolt.

Egy másik alternatíva a félszintetikus gyártás, ami a bioszintézis út olyan köztes intermediereiből indul ki, mint a bakkatin-III vagy a 10-deacetyl-bakkatin-III. Ezek a tiszafák tűleveleiben is megtalálhatók. A tűlevelek megújulnak, így nem kell a fát elpusztítani az alapanyag kinyeréséhez, hanem évente „learatható” a tűlevelek egy része. A BMS, a taxol vezető globális szállítója, kiterjedt ültetvényeiről gyűjti be a szükséges kérget és tűleveleket.

2007-ben az Indena (Olaszország) is kifejlesztette a taxol félszintézisét, a *T. baccata* ültetvényekről származó 10-deacetyl-bakkatin-III-ból saját szabadalmaztatott eljárással állítják elő a taxolt.

A félszintetikus paclitaxel_másik gyártója a Novasep, amely a 10-deacetyl-bakkatin (10-DAB) tiszafa levélből történő kivonásán alapuló félszintetikus taxol termelési útvonalat fejlesztett ki és szabadalmaztatott.

A Fresenius Kabi (USA) szintén félszintetikus eljárást használ a taxol termeléshez a *Taxus baccata* növényi anyag_használatával.

A taxol félszintetikus analógját, a docetaxelt (Taxoter®) szintén 10-deacetyl-bakkatin-III-ból gyártja a Sanofi-Aventis. A docetaxel szabadalma 2010-ben lejárt. Ezért hoztak forgalomba két új taxol származékot, a karbazitaxelt és a larotaxelt, amelyek alkalmazhatósága jobb, mint a docetaxelé volt.

A növénytermesztéstől független, ezért környezetkímélő és fenntartható eljárás a növényi sejt kultúrák használata. Ennek több előnye is van. Nem függ az időjárástól, az évszakoktól, talajtól vagy termőhelytől. Ugyanakkor a növényi sejt kultúrák létrehozása fásszárúaknál és a

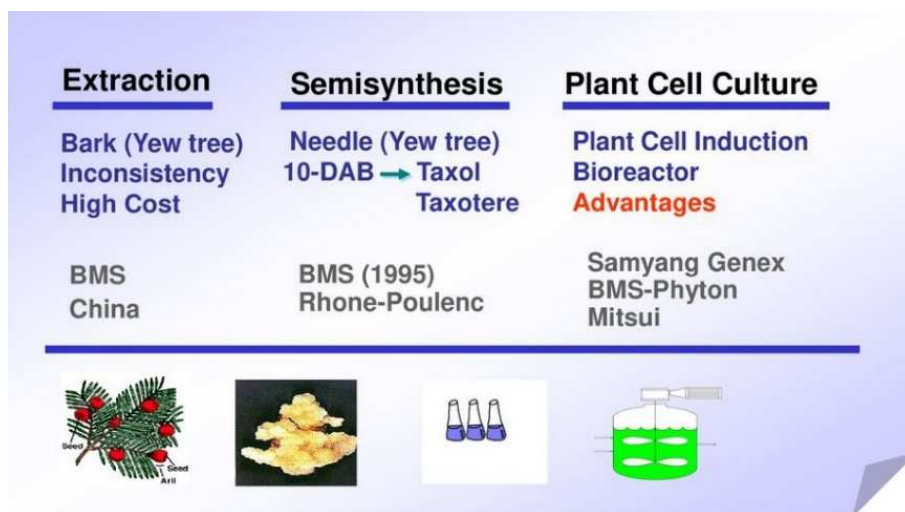


219. ábra A tiszafa hajtása és termése

nyitvatermőknél sokkal nehezebb feladat, mint a lágyszárú növényeknél. A sejt kultúrák termelőképessége növelhető a tenyésztési körülmények optimalizálásával, a sejt vonalak szelekciójával, valamint elicitorok, prekursorok adagolásával. Sejttenyésztéssel jelenleg a legtöbb paclitaxel a Python Biotech gyártja, ipari méretű, 75 m³-es fermentorokban.

Németországban évi 1000 kg taxolt, Kanadában mintegy 150 kg docetaxel állítanak elő *Taxus chinensis var. marei* sejt vonalak segítségével. Szorosan együttműködnek a Bristol Myers Squibb (BMS) céggel, mely növény extrakcióval gyárt taxolt.

Szintén *Taxus* növényi sejt kultúrával gyártja és Genexol[®] márkanéven értékesíti a taxolt a Corean Samyang Genex Biopharm gyógyszeripari vállalat.



220. ábra A taxol különböző előállítási lehetőségei

1993-ban egy endofita taxoltermelő gombafajt (*Taxomyces andreanae*) fedeztek fel a tiszafában, ezzel megnyílt az elvi lehetőség a taxol fermentációs előállítására. A tenyésztés azonban kis koncentrációt és nehezen reprodukálható eredményeket hozott. A Cytoclonal Pharmaceuticals, Inc. 1994-ben szabadalmaztatta ezt az eljárást, majd 2001-ben megállapodást írtak alá a BMS-szel a mikrobiális alapú új technológia közös kifejlesztésére. Azóta sem jelent meg közlemény az üzemi léptékű gyártásról.

A szabadalmak lejárása után a generikus gyártmányok megjelenése újabb molekula-változatok megjelenését kényszerítette ki. Így például a Cell Therapeutics engedélyeztette a Xyotax-ot (poliglutamát paclitaxel) és az Abraxis Oncology az Abraxane-t (albumin nanorészecskékhez kötött paclitaxel). Ezeknél kevesebb a mellékhatás és kedvezőbb a gyógyszer bevitel a szervezetbe.

12.8.2. A taxánok előállítása növényi sejt kultúrával

A szuszpenziós kultúrák indításánál a törékeny kalluszokat folyékony tápközegbe (rázott lombikba) oltják át, ahol 3-10 nap alatt egy- vagy néhány sejtes aggregátumokká esnek szét. Ezekkel a gyorsan növekvő tenyészetekkel ipari léptékben termelhetünk értékes anyagokat. A *Taxus* fajok sejtjei optimalizált körülmények között in vitro képesek taxolt és kapcsolódó vegyületeket előállítani. A tenyésztések során tucatnyi új bioaktív taxoidot is izoláltak.

A technológiák fejlesztése során több irányban folytattak kutatásokat. Keresték a legjobb termelő képességű sejt vonalakat, optimalizálták a tenyésztési körülményeket. Célszerű a folyamatot két szakaszra bontani és külön megkeresni a sejt szaporodás és a termék képzés számára kedvező körülményeket. A tápoldatba a szokásos C- és N-forráson kívül a növényi hormonok, fémionok, elicitorok, induktorok és prekursorok koncentrációját és adagolását is optimalni kell. A másodlagos anyagcsere folyamatok szabályozása igen összetett, sok vegyület együttes hatása

irányítja a termékképzést. A szuszpenziós tenyésztést lehet kombinálni vagy helyettesíteni immobilizációs technikák alkalmazásával is.

12.8.2.1. Nagy hozamú sejt vonalak kiválasztása

A növényi szuszpenziós kultúrák sejtjeinek termelőképessége igen változó. Ennek okai egyrészt a genetikai eltérések, másrészt a sejtek eltérő előélete. Az eltérő eredetű *T. baccata* sejt vonalak azonos körülmények között vizsgálva különböző mennyiségű taxolt termeltek. Nagy a különbség mind a különböző egyedek azonos típusú explantátumából mind ugyanazon anyanövény különböző részeiből származó sejtek növekedése és termelése között. A legjobb eredményeket a friss (1-3 hónapos) túlevelekből nyert explantátumokkal érték el.

Az iparban hosszú távon alkalmazható sejt vonal kiválasztásánál sok tenyésztet kell megvizsgálni, screenelni a növekedés sebessége, a taxol termelés és a stabilitás szempontjából.

12.8.2.2. A tenyésztési körülmények

A taxol termelése nem függ a megvilágítástól. Megvilágításban közel ugyanannyi taxán vegyület keletkezik, de ezen belül az egyes komponensek aránya változik és nagyobb hányaduk lép ki a sejtből.

A levegőztetés szükséges, az oldott oxigén koncentráció nem mehet 25% alá. 1-2% CO₂ bevezetése növeli mind a szaporodást, mind a termékképzést.

A levegőztetésnél többféle bioreaktor típus is számításba jöhet. Sokáig azt gondolták, hogy növényi sejtfermentáció céljára csak az airlift típusú bioreaktorok lesznek hatékonyan alkalmazhatók a növényi sejtek a nyírásérzékenysége miatt, erre azonban ellenpélda a világ egyik jelenleg legnagyobb növényi sejt kultúra-létesítménye Németországban, Ahrensburgban, ahol 5 db kevert, 75 ezer literes tartályreaktort alkalmaznak kaskádrendszerben, paclitaxel termelésére. Az oxigénigény kicsi, és szén-dioxidra is szüksége van a tenyésztetnek, ezért enyhe keverést, mérsékelt levegőztetést alkalmaznak.

12.8.2.3. A fermentációs folyamat

A szuszpenziós tenyésztetben a kalluszából származó dedifferenciált növényi sejtek nem egyesével lebegnek a tápoldatban, hanem változatos méretű, akár milliméteres nagyságú csomókat alkotnak. A szakaszos (batch) tenyésztet általában a hetedik napon jut el az exponenciális fázisba (generációs idő ~2,5 nap) és ~10 nap után áll le a sejt növekedés. Értelemszerűen az inokulumot 7 napos korban oltják tovább. Mivel a tenyésztés során a lassú szaporodás miatt csak néhány generáció követi egymást, nagy mennyiségű, ~20%-nyi inokulummal kell oltani.

Más szekunder metabolitokhoz hasonlóan a taxol az exponenciális növekedési fázis befejezése után, a stacioner fázisban képződik. Emiatt a fermentációnak két szakasza van, előbb a sejteket felszaporítják, majd megindul a taxán termelés. Ebben a második fázisban adják hozzá a prekursorokat és elicitorokat.

A 10 napos szaporítás után indulhat a tápoldatcsere vagy a rátáplálás. A tápoldatcserénél a második, termelő szakasz is kb. 10-12 napos. Lehetséges a csere többszöri megismétlése is, ez tulajdonképpen félfolytonos fermentáció, de sejtviisszatartással kombinálva. A rátáplálásos (fed batch) tenyésztésnél nagyon kis térfogatárammal (pl. 10 ml/l/nap) visznek be tömény tápoldatot, ezzel a termelési szakasz akár 20 napra is elnyújtható.

12.8.2.4. Tápoldat

A növényi sejtek tenyésztése során háromféle szénforrás jön számításba: szacharóz (a növények természetes energiaforrása), és ennek alkotói, a fruktóz és a glükóz. Az indításnál kb. 3%-nyi szacharóz mellett a fruktóz adagolása általában fokozza a termékképzést, a glükóz pedig inkább a primer anyagcserét segíti elő, ezzel fékezi a szekunder termékek, így a taxánok

képződését. A tápoldatban az ásványi sók (makro- és mikroelemek) mellett a szükséges vitaminok is szerepelnek. A második, termelési szakaszban a makroelemek (sók) koncentrációját jelentősen csökkentik.

12.8.2.5. Fitohormonok

A szuszpenziós tenyészetekben az ismert növényi hormonok és származékaik különböző koncentrációit és kombinációit kellett optimálni, mind a növekedési, mind a termelési szakaszra. Sokféle auxin analógot használnak (NAA = naftil-ecetsav, 2,4-D = 2,4-diklór-fenoxiecetsav, 2,4,5-T = 2,4,5-triklór-fenoxiecetsav, Picloram = 4-amino-3,5,6-triklór-pikolinsav) 5 mikromól/liter körüli koncentrációkban. A citokinineket (kinetin, BAP = benzilamino-purin) egy nagyságrenddel kisebb, 1 mikromól/liter alatti koncentrációban alkalmazzák.

Az etilén, mint növényi hormon erősíti a sejtek szenszcens hajlamát, a tenyészet előregedését és pusztulását. ezért célszerű etilén antagonistákat alkalmazni. Ezek legegyszerűbb képviselői az ezüstsók. Rendszerint ezüst-tioszulfát ion formájában adagolják, kb. 10 μM koncentrációban.

12.8.2.6. Elicitorok használata

Az elicitor olyan szabályozó anyag, amely kis mennyiségben az élő növényi sejthez adva elindítja vagy felgyorsítja egyes szekunder vegyületek bioszintézisét. Az elicitálás pedig ennek alkalmazása, a növényi szekunder metabolitok termelésének indukálása vagy fokozása az elicitorok hozzáadásával. Az elicitorokat csoportosíthatjuk, mint abiotikus (például fémionok, vanádium-, kobaltsók), és biotikus eredetűeket. Ez utóbbiak közül gyakran használnak metil-jazmonátot (10 – 200 μM), szalicilsavat, glutamint, sőt mikroba sejtfal preparátumokat (glikoproteineket) is. Más szekunder metabolitokhoz hasonlóan a taxánok megjelenése is egy biokémiai válasz bizonyos külső ingerekre. A jazmonátok kulcsfontosságú jelátalakítók a növények védekező génjeinek szabályozásában, adagolásuk másodlagos metabolitok felhalmozódásához vezet, hatásuk nem korlátozódik a *Taxus* fajokra.

12.8.2.7. Prekurzorok és inhibitorok

A taxán alapvázhhoz tartozik egy fenil-propionsav oldallánc is. Ennek ráépülését elősegíti a fenilalanin prekurzor molekula adagolása. Ugyanakkor létezik egy lebontó reakciósor, a fenilpropanoid út, ami eltünteti ezt fontos molekulát. Ennek gátlásával a taxánok termelése fokozható. A gátlás szerkezetanalóg vegyületek, így pl. aromás karbonsavak (fenilpropionsav, fenilecetsav, benzoésav, fahéjsav) 3,4-metiléndioxi-származékainak adagolásával érhető el.

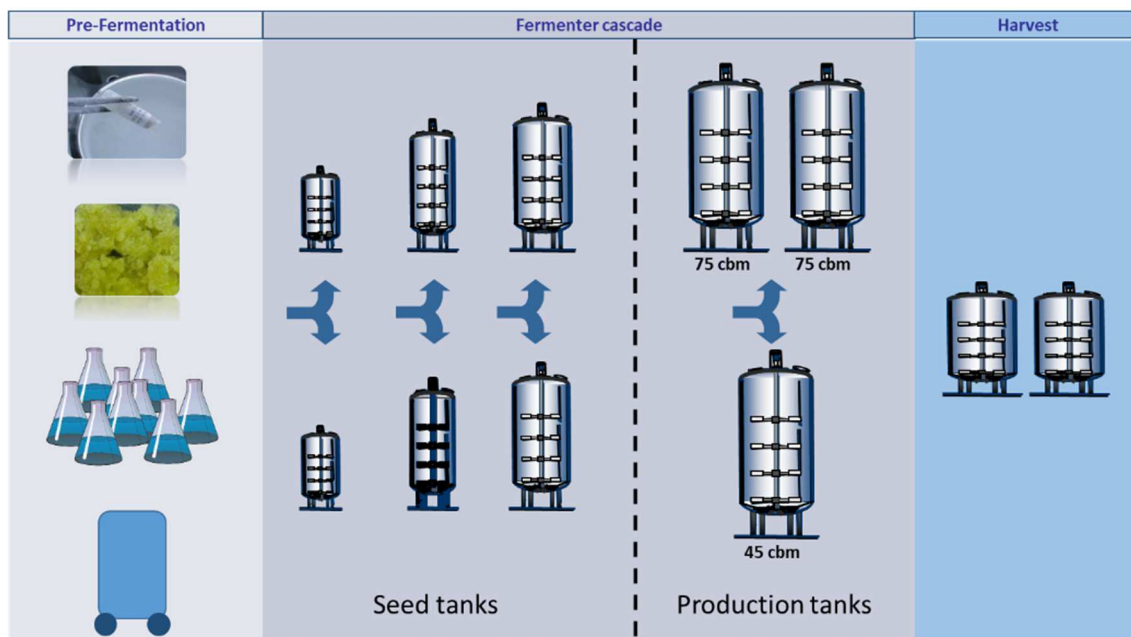
A másodlagos anyagcsere során a növényi sejtekben fenolos vegyületek képződnek, ami jellegzetes barna szín megjelenésével jár. Ennek kivédésére „barnulásgátlókat” pl. aszkorbinsavat adnak, kb. 1 ppm koncentrációban.

A felsoroltak pozitív hatása a taxoidok termelésére egyenként is megmutatkozik, de kombinált alkalmazásuk esetén szinergikus hatások lépnek fel. A hatások nem egyszerűen összeadódnak, hanem megfelelő kombinációban felerősítik egymást. Ilyen tapasztalati optimum, hogy a jazmonát/ezüst arány legyen 1 és 5 között, az auxin/ezüst arány pedig legyen 30 alatt.

A taxol jelentős része a sejteken belül marad, a lében csak 5-50% jelenik meg. A bakkatin-III nagyobb mértékben oldódik ki, a felső érték elérheti a 70%-ot is. Ez a megoszlás különösen nagy problémát jelent a gélben immobilizált sejteknél, itt a megtermelt mennyiségnek csak 2-8%-a jelenik meg a folyadékban. A tápoldat áramoltatása, cseréje növelheti a kihozatalt, de a koncentrációt nem. Emiatt a sejtek rögzítését nagyobb léptékben nem alkalmazzák.

A kilépést elősegíthetjük azzal, hogy a terméket a léből extrakcióval folyamatosan eltávolítják.

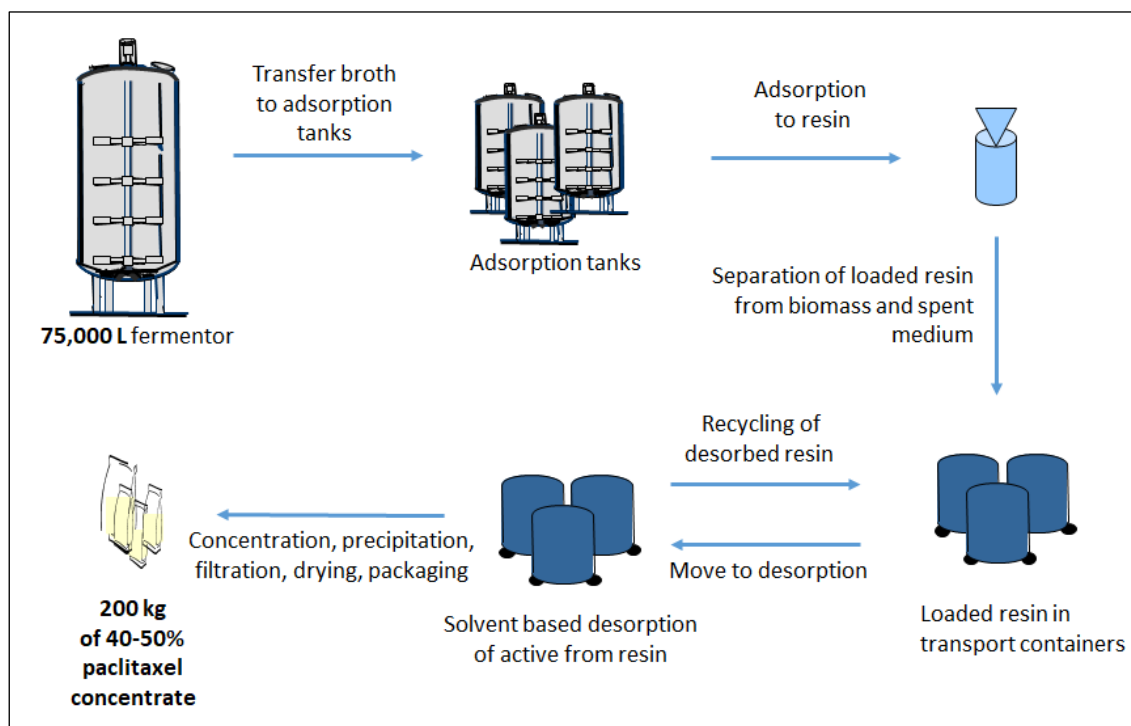
Mindezek szem előtt tartásával 15-30 nap alatt 300-500 mg/liter taxol koncentráció érhető el. Emellett kb. ugyanennyi más taxán vegyület (pl. bakkatinok) is képződik.



221. ábra A paclitaxel előállítása növényi sejtenyészettel (Python eljárás)

12.8.2.8. A taxol izolálása

Ezzel eljutottunk a feldolgozási műveletekhez. A taxán vegyületek apoláris jellegét kétféle eljárásban is kihasználják. A taxánokat meg lehet kötni makropórusos gyanta szemcséken, illetve ki lehet oldani szerves oldószerekkel. A gyantáról is oldószerral eluálják a taxánokat, ezután a finomfeldolgozás lépései hasonlóak. A sejteket a direkt oldószeres feldolgozásnál



222. ábra A paclitaxel kinyerése makropórusos gyantával

vízzel elegyedő szerves oldószer, metanol (esetleg etanol, aceton) hozzáadásával legalább három órán keresztül áztatják. Az erősen apoláris oldószerekben (hexán, diklórmétán) ugyan jobban oldódik a taxol, de ezek rosszul nedvesítik a vizes sejtanyagot, ezért itt még nem alkalmazzák. A lebegő anyagot kiszűrik, majd a vizes metanolt bepárolják. Ezzel az összes taxoid koncentrációját nagyságrendekkel megnövelik, de ezen belül a paclitaxel részaránya (tisztasága) nem javul.

A következő lépés egy újabb extrakció erősen apoláris oldószerrel. A vizes metanolból hexánnal vagy diklórmétánnal átoldva mind a koncentráció, mint a tisztaság javul. A paclitaxel molekula több (három) fenilcsoportot tartalmaz, mint a többi taxoid, karaktere apolárisabb, így érthető, hogy az extraktumban feldúsul. Az oldószer elpárologtatásával a koncentráció beállítható.

Jelentős tisztítást lehet elérni direkt fázisú kromatográfiával. Szilikagél tölteten erősen apoláris eluensekkel (hexán-aceton, diklórmétán-etilacetát párokkal) a melléktermékek jelentős része elválasztható. A tisztább frakciókat poolozzák, majd szárazra párolják.

Kevés acetonban felvéve töményebb oldatot kapnak, amihez vizet adva a legapolárisabb komponens, a paclitaxel csapódik ki először.

A kromatográfiás és a csapadékos lépéseket többször ismételve a tisztaság növelhető. Végül a hatóanyagot pentánból kristályosítják, a tisztasága >98,5%.

13. BIOPESTICIDEK, *B. thuringiensis* TOXIN

A botanikai rovarirtószereket évezredek óta ismerték és használták, de amikor a mezőgazdaság nagyüzemivé vált (az 1940-es évek közepén) az olcsóbb, hatékonyabb és iparszerűen gyártható szintetikus növényvédőszer terjedtek el. A második világháború idején jelentek meg az első rovarirtásra használt szerves klórvegyületek. Jellemző képviselőjük a diklór-difenil-triklór-etán, közismert nevén a DDT. 1945 és 1970 között jelentek meg a piretroidok, majd a szerves foszforsav-észterek.

A biológiai eredetű növényvédő szerek növényvédelemre való felhasználása iránti érdeklődés akkor újult meg, amikor a szintetikus rovarirtók negatív hatásait felismerték. Rachel Carson: *Néma tavasz* című könyvének 1962-es kiadása lett a fordulópont, amely végül számos szintetikus rovarirtó szer, így a DDT betiltásához vezetett. Ezután egyre többen foglalkoztak a biológiai eredetű növényvédő szerek kutatásával és gyártásával.

Adalék: a DDT-t nem csak a mezőgazdaságban használták rovarirtásra, hanem pl. a maláriaszúnyog irtására is nagy mocsaras területeket permeteztek le. A fő probléma ezzel az anyaggal az, hogy a természetben nem bomlik le. Az a sok tonna DDT, amit 50-70 évvel ezelőtt legyártottak és kiszórtak, az ma is itt van a bioszférában. És valószínűleg ezer év múlva is itt lesz. Mint apoláris, zsírban oldódó anyag került be a táplálékláncba és elterjedt az egész bolygón. Kellően érzékeny analitikával kimutatható az antarktisi pingvinek májában, sőt az anyatejben is. A ragadozóknál felhalmozódik, és a madaraknál a tojáshej elvékonyodását okozza. A törött tojások miatt a madaraknál sokkal kevesebb utód kel ki, megbomlik a szaporodási egyensúly, az egyedszám akár a kihalásig csökken. Erre utal a könyv címe, a madárdal hiányára utaló Néma tavasz. Amerikában még az Államok címerállatának számító fehérfejű halászsas állománya is veszélyesen lecsökkent emiatt.

A biopeszticidek használatának előnyei:

- A biopeszticidek általában eredendően kevésbé mérgező anyagok, mint a hagyományos peszticidek.
- A biopeszticidek általában csak a célkártevőt és a rokon organizmusokat érintik, szemben a széles spektrumú, hagyományos peszticidekkel, amelyek az összes rovarrá hatnak és ezen kívül kihatással vannak a madarakra, halakra és emlősökre is.
- A biopeszticidek gyakran nagyon kis mennyiségekben hatásosak és gyakran gyorsan lebomlanak, ami alacsonyabb expozíciót eredményez, és nagymértékben elkerüli a hagyományos peszticidek által okozott környezetszennyezés problémáit.
- A gyors lebomlás miatt kicsi az esély a rezisztencia kialakulására.

Hátrányai:

- Éppen a rövid hatásidő miatt gyakrabban kell alkalmazni, több munka és anyag szükséges.

13.1. A biológiai eredetű szerek csoportosítása

A biokémiai növényvédő szerek a természetben előforduló anyagok, amelyek nem toxikus mechanizmusok révén károsítják a kártevőket. A hagyományos peszticidek ezzel szemben általában szintetikus anyagok, amelyek közvetlenül elpusztítják vagy inaktíválják a kártevőt. A biokémiai peszticidek közé tartoznak a párosodást zavaró anyagok, például a rovarok nemi feromonjai, valamint a különféle illatos növényi kivonatok, amelyek csapdádba vonzzák a rovarokat. Mivel néha nehéz meghatározni, hogy egy anyag megfelel-e a biokémiai peszticideként való besorolás kritériumainak, az EPA külön bizottságot hozott létre az ilyen határozatok meghozatalához.

Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (EPA) a biopeszticideket biokémiai szerekként, mikrobiális növényvédő szerekként és GMO növényekként kategorizálja. Maguk a szerek tehát lehetnek növényi és mikrobiális eredetű készítmények.

13.1.1. Növényi eredetű szerek

A növények is képesek másodlagos anyagcseretermékek előállítására. Ezek egy része a termelő növényt védi kártevőktől. Egyes vegyületek keserű ízűek vagy akár toxikus hatásúak is lehetnek, így taszítják vagy elrettentik a növényevő rovarokat. A növényi szekunder metabolitok kémiaiilag három fő csoportba sorolhatók: terpének, fenolok és alkaloidok. Az azadiraktinok (*Azadirachta indica*), az egyik legaktívabb rovarellenes vegyületcsoport tagjai például triterpenoidok. A molekulák szerkezete hasonlít az ekdizonhoz, a rovarok egyedfejlődését szabályozó hormonhoz. A hormonanalóg megzavarja a rovarok fejlődését, elpusztulnak vagy életképtelen alakok kelnek ki.

Másfajta hatóanyag csoport található a citrusfélékben. Kaliforniában a gyümölcsfeldolgozás melléktermékeiből nagy mennyiségben nyerik ki a D-limonént, és ennek kétharmadát (kb. 18 tonna) használták fel kártevőirtási célokra (2011-es adat).

Adalék: ugyanez az elv érvényesül abban a népi tapasztalatban, hogy a ruhásszekrénybe elhelyezett levendula illóolajai távol tartják a molyokat.

13.1.2. GMO növények

A növénybe beépített védőszerek (PIP: Plant Incorporated Protection) olyan peszticid szerek, amelyeket a növények a beléjük klónozott gén(ek) alapján termelnek. 1996 óta a kultúrnövények közül többnek a genomjába is beültették a megfelelő *Bacillus thuringiensis* toxin génjét (pl. a kukorica, burgonya, gyapot és a szója). Ezek a növények a szövetekben állandóan termelik a toxint, így az a növényt megrágó rovarokat mérgezi meg. Ez esetben a toxin hosszú ideig jelen van a természetben és ez kedvez az alkalmazkodásnak, a rezisztencia kialakulásának. Néhány év múlva világszerte meg is jelentek a rezisztens rovarok, a „superbug”-ok. A GMO növényekkel ez az előadássorozat nem foglalkozik, valamint termesztésük Magyarországon tilos, így ezt a területet nem tárgyaljuk.

13.1.3. Mikrobiális eredetű szerek

A természetes élő rendszerekben minden élőlénynek megvannak a természetes ellenségei, parazitái, kompetitorai. Így van ez a növényeket károsító rovaroknál és mikrobáknál is. Logikus gondolat, hogy ezekkel korlátozzuk az általunk kártevőnek minősített fajok terjedését.

A közönséges *Trichoderma* spp. többféle növényi kórokozót is képes antagonizálni akár parazitizáció, antibiózis vagy verseny révén. Más gombák, mint a *Beauveria bassiana*, számos rovarfajban entomopatogénként működnek. Ezt a két gombafajt palántázásnál, faiskolákban és szántóföldi kultúrákon a kártevők elleni védekezésre nagyobb léptékben is használják.

A gombák mellett a baktériumok is termelnek a növényvédelemben felhasználható anyagokat. A legismertebb és legszélesebb körben használt mikrobiális növényvédő szer a *Bacillus thuringiensis* (Bt.) és a *Bacillus sphaericus* (Bs.) toxinja. Ezek olyan fehérjék, amelyek célzottan elpusztítják a *Lepidoptera* (pikkelyesszárnyú), a *Coleoptera* (fedeles szárnyú) vagy a *Diptera* (kétszárnyú) fajok lárváit. A fehérje a rovarkártevők bélcsatornájába jutva fejti ki hatását. A Bt készítményeket több mint 50 éve használják a mezőgazdaságban. Az összes biopeszticidek piacán a legnagyobb értékesítési tétel (mintegy 63%) a *Bacillus thuringiensis*-szel és alfajaival termelt toxin.

A vírusokat is felhasználhatjuk a rovarok elleni védekezésre. A *Baculovirus*-ok családjába nagy, rúd alakú vírusok tartoznak, amelyek a rovarsejtekben szaporodnak. (Ezért gyakran

használják ezeket rovarsejtek genetikai manipulációjánál vektorként.) A leggyakrabban használt fajok a granulózis vírus (GV) és a nukleáris polihedrózis vírus (NPV), mert ezek számos rovar ellen hatékonyak. A fertőzés a bélcsatornában történik, az elfogyasztott vírusok tokja feloldódik, és a vírus megfertőzi a bélhámsejteket. A fertőzés 3-8 nap alatt elpusztítja a lárvát.

13.2. A *Bacillus thuringiensis* törzs

A *Bacillus thuringiensis*-t először Ishiwata Shigetane bakteriológus izolálta Japánban 1901-ben, mint a selyemhernyók lárváit megbetegítő fajt. Megfigyelte, hogy a fiatal baktérium kultúrák nem patogének, ezzel szemben az előregedett, spórás kultúrák erősen mérgezőek voltak. Az első teljes leírás Ernst Berliner német tudóstól származik, ő izolálta az *Anagasta kuehniella* molylepke beteg lárváiból 1911-ben. Ő nevezte el *Bacillus thuringiensis*-nek, Tübingia német tartományról, a lepkék gyűjtési helyéről.

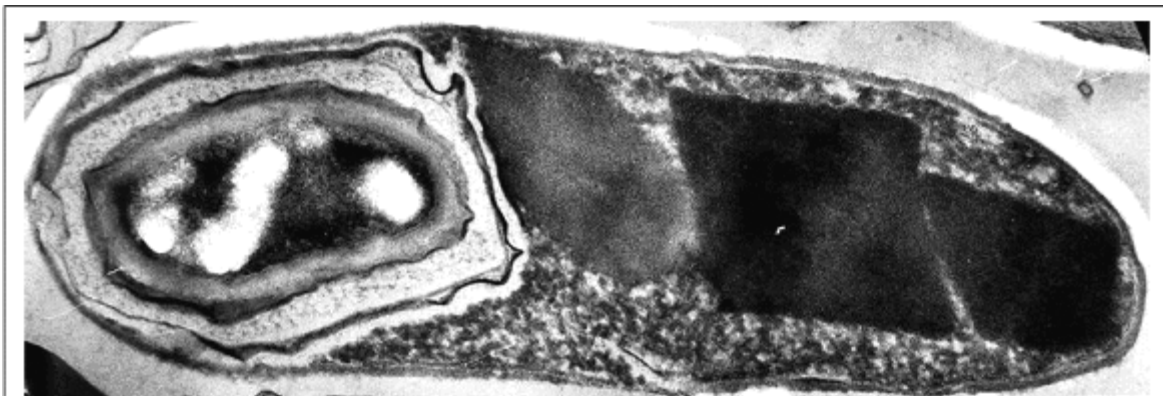
A *Bacillus thuringiensis* egy mindenütt jelenlévő Gram-pozitív, pálcá alakú talajbaktérium, kb. 1 μm átmérőjű, 2-5 μm hosszú pálcá. Spórája ellipszis alakú, 0,8x1,6-2 μm nagyságú.

Anyagcsereje komplex, fakultatív anaerob, aerob közegben a szénhidrátokat szerves savakká, majd CO_2 -dá alakítja. A glükózt a glikolízissel hasznosítja, míg az acetát ionokat a citromsav ciklusba viszi. Az exponenciális növekedési fázis alatt a sejtek aerob körülmények között ecetsavat is termelnek, majd a spórázás kezdeti szakaszában ezt felhasználják. Érdekes adat, hogy az acetát hasznosítás már akkor elkezdődik, amikor még kis koncentrációban glükóz is jelen van, szemben az *E. coli*-val, ami csak a glükóz teljes elfogyásával kezdi az acetát ionokat fogyasztani.

Életciklusa a többi spóráképző baktériumhoz hasonlóan három szakaszra osztható:

- Spórák csírázása
- Vegetatív növekedés, szaporodás
- Spórázás és kristályképződés

A törzset világszerte az ökoszisztémák széles skálájától izolálták. Előfordul talajban, a vízben, elpusztult rovarokban, a silókból származó porban, a lombhullató és tűlevelű fákon, rovarévó emlősökben A *Bacillus thuringiensis* egyedi tulajdonsága, hogy a spóráképzés során fehérjéből álló egy, néha több kristályos szerkezetű szemcsét, zárványtestet képez. A parasporális kristályok anyagai a δ -endotoxinok (Cry és Cyt), amelyek közül jó néhány a rovarok különböző rendjeinek lárváira toxikus hatású. A toxinképzés a baktérium számára szaporodási előnyt jelent, mivel a kristályokkal együtt a spórák is bejutnak a lárva testébe, és az elpusztult rovar megfelelő tápanyagot biztosít a spórák csírázásához.



***Bacillus thuringiensis*; bacterial spore, mother cell and parasporal crystals**

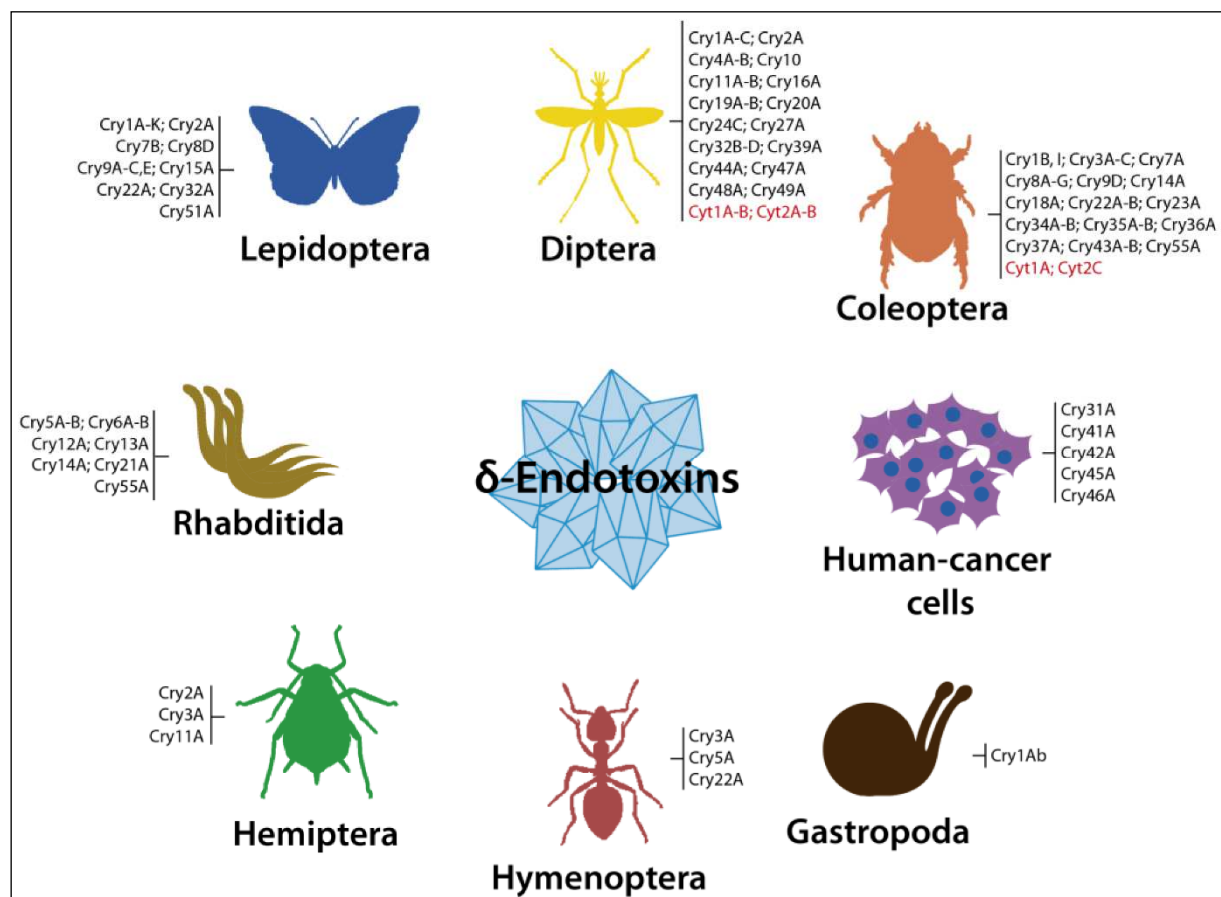
223. ábra *Bacillus thuringiensis* érett sejtje, benne a spóra és a kristályok

A Bt toxinokat 1933 után alkalmazták tudatosan rovarirtóként, és 1938-ban, Franciaországban került először kereskedelmi forgalomba. 1958-ban jelent meg az Egyesült Államokban, és az 1980-as évektől az egész világon alkalmazott peszticiddé vált.

13.3. A δ -endotoxin

A Bt-törzsek a stacionárius növekedési fázisban, a spórázással együtt kristályos (Cry) és citolitikus (Cyt) endotoxinokat szintetizálnak. A kilenc alaptípus közül a δ -endotoxinok a legalkalmasabbak a rovarok elpusztítására. A vegetatív növekedési fázisban viszont más toxinfehérjék termelődnek, ezek a vegetatív inszekticid fehérjék (Vip), amelyek kiválasztódnak a táptalajba (exotoxinok). Ezek a fehérjék szinte hihetetlen változatosságban jelennek meg. Az aminosav szekvenciák alapján a Cry fehérjék 75 családba sorolhatók, összesen 800 különböző Cry génnel, míg a Cyt fehérjék három családot alkotnak, 38 különböző génnel. Elnevezésükre négy tagból álló decimális kódot dolgoztak ki. Például a Cry(53Aa1) jelzés az 53-as családot, az **A** ezen belül az első osztályt, az **a** az első alosztályt, az **1** pedig ezen belül az első alcsoportot jelöli. Egy családba azokat a fehérjéket sorolják, amelyeknél az aminosav homológia nagyobb, mint 45%. A minden elemében azonos kódú fehérjék aminosav homológiája 95% fölötti.

Ezen a nagy változatosságon alapul a toxinok a szelektivitása. Egyes fehérjék egyes rovar csoportokra hatnak, másokra nem. Megfelelő alfajok, változatok szelektálásával célzott hatású toxinokat állíthatunk elő.



224. ábra A különböző típusú toxinok hatásossága

1970-ben az USDA Agricultural Research Service törzsgyűjteményében már több tucat altörzset tároltak, azóta ez a szám jelentősen emelkedett.

A számtalan *Bacillus thuringiensis* alfaj közül négynek adtak önálló nevet: *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis aizawai* (elsősorban a pikkelyes szárnyúak elleni toxinokat termel), a *Bacillus thuringiensis israelensis* (a szúnyogok ellen), a *Bacillus thuringiensis morrisoni* (korábban *tenebrionis*) pedig a burgonyabogár ellen használatos. Ezeken belül sokféle szerotípust írtak le.

13.3.1. Bti toxin

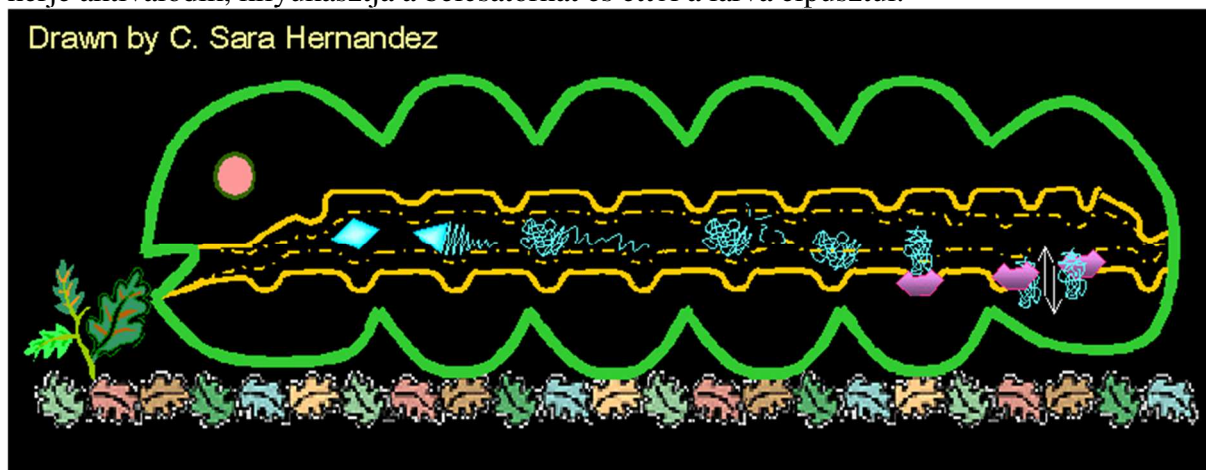
A *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*-t (Bti) egy tóból izolálták a Negev sivatagban, és ez volt az első törzs, amelyek toxinja a *Lepidoptera*-kon kívül más rovarokra is hatékony volt. A Bti egyik szerotípusa (H-14) négyféle toxint (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, és Cyt1Aa) termel, amelyek kifejezetten a *Diptera*-k (kétszárnyúak, így a szúnyogok, púpos szúnyogok, stb) ellen hatékonyak. Ezek a rovarok nem is növényekben tesznek kárt, hanem betegségek terjesztésével komoly közegészségügyi veszélyt jelentenek. A Bti Cry4Ba jelzésű toxinja elsősorban az *Anopheles* és az *Aedes* szúnyogok ellen hatásos, és nem mutat toxicitást a *Culex* fajokra, míg a Cry4Aa toxin éppen a *Culex* lárvákra mérgező.

Környezetre gyakorolt hatás:

A *Bacillus thuringiensis* által termelt növényvédő szerek nagyon specifikusan egyes rovarokra hatnak. Sokirányú vizsgálatokkal bizonyították, hogy a toxinok emberre, állatokra és környezetre is ártalmatlanok. A fehérjék gyorsan lebomlanak, igen rövid ideig vannak jelen a bioszférában. A rezisztencia kialakulásnak veszélye – éppen a rövid behatási idő és a gyors lebomlás miatt csekély.

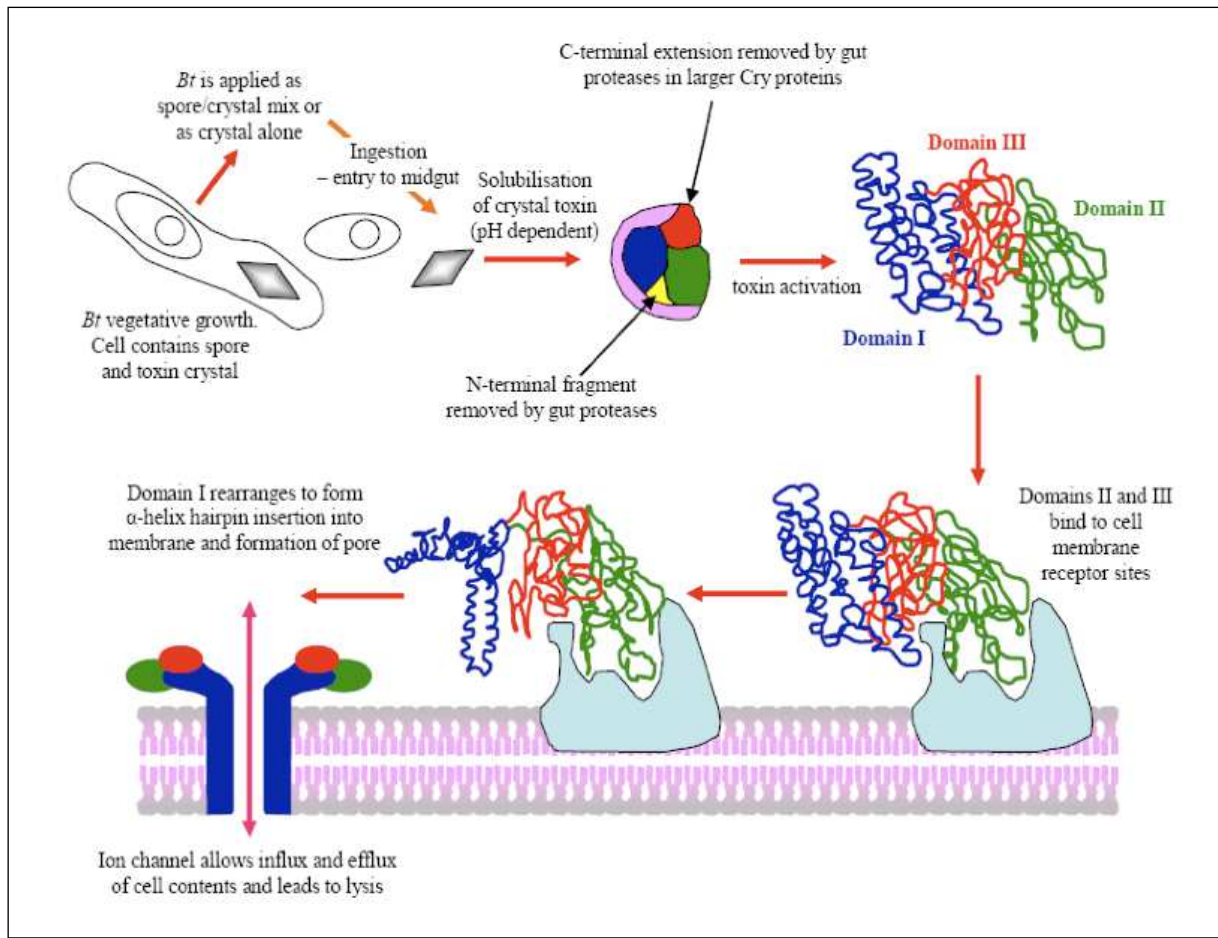
13.3.2. A δ -endotoxin hatásmechanizmusa

A toxin leegyszerűsítve úgy működik, hogy a lárva a növényi anyaggal együtt megeszi a kristályokat is. Ezek a bélsatornában feloldódnak és az emésztő enzimek hatására a toxinféhéreje aktiválódik, kilyukasztja a bélsatornát és ettől a lárva elpusztul.

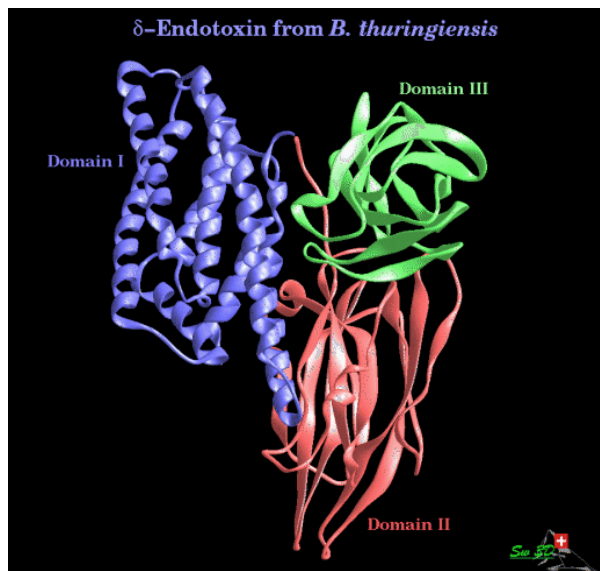


225. ábra A δ -endotoxin leegyszerűsített hatásmechanizmusa

Részletesen megvizsgálva a bélsatornában az emésztő enzimek az oldott fehérje C- és N-terminális végéről lehasítanak egy-egy peptidet. Az így aktivált fehérje három domént tartalmaz (az ábrákon színekkel jelölve). A II. és III. domén hozzákötődik a bélhámsejt felületén található fehérje mintázathoz (cadherin-BT-r1). A receptorhoz kapcsolódás során a fehérje 3D szerkezete átalakul és az I. domén ionofor csatornát nyit a bélhámsejt membránján. Ezen keresztül a sejt vizet és ionokat vesz. Több ilyen sérülés a sejt pusztulásához vezet, sok bélhámsejt elvesztése pedig a lárva halálát okozhatja. A receptor fehérje mintázatán alapul a toxinok

226. ábra A δ -endotoxin részletes hatásmechanizmusa

szelektivitása. A genetikailag jelentősen különböző, nagy evolúciós távolságú rovarcsoportok receptorai különbözőek, így az egyes toxinok csak bizonyos rendek fajaira hatnak.



A másik oldalról nézve a szelektivitást nem lehet kihegyezni egyetlen konkrét rovarfajra, hiszen a rokon fajokban a bélhámsejtek felületi mintázata hasonló, a toxin a rokon fajokat is elpusztítja.

227. ábra Az endotoxin harmadlagos szerkezete (az előző ábrával azonos színezéssel)

13.4. A *Bacillus thuringiensis* toxinok fermentációs előállítás

A kiválasztott altörzsnek a megfelelő inszekticid spektrumon kívül más követelményeknek is meg kell felelni. Szempont a megfelelő produktivitás (hatóanyag per fermentor térfogat per idő); olcsó tápoldat; egyszerű technológia; genetikai és tárolási stabilitás. A törzs ne termeljen exotoxint, tartsa benn a terméket. A genetikai változékonyság miatt az átoltások számának minimalizálására törekednek, mindig visszanyúlva a törzsbankok (MCB, WCB) szubkultúráihoz.

A szokásos upstream és downstream optimalizáláson túl külön problémát jelent a készítmény hatásosságának kvantitatív mérése, a laboratóriumi és a szabadföldi eredmények összehangolása. Módszert kell kidolgozni a fermentléből végzett mérésekre, és a kinyert anyag hatásosságának formulázás előtti és utáni meghatározására.

13.4.1. Fermentacio, upstream

Az inokulumot komplex táptalajon nevelik, 28 fokon egy napig. Az oltási arány 1-5%.

A toxinok szekunder metabolitok, a spórázás során képződnek. A fermentáció kezdeti szakaszában a tenyészet exponenciális növekedő szakaszban van, majd amikor bizonyos tápanyagkoncentrációk a kritikus érték alá esnek, beindul a spórázás. A spórázás befejeztével a sejtek lizálnak, és kiszabadulnak a spórák és a toxinzárványok.

A *Bacillus thuringiensis* a glükózt a glikolízissel hasznosítja, míg az acetát ionokat a citromsav ciklusba viszi. Az exponenciális növekedési fázis alatt a sejtek az acetát ionokat felhalmozzák, majd ezt a spórázás kezdeti szakaszában felhasználják. Érdekes adat, hogy az acetát hasznosítás már akkor elkezdődik, amikor még kis koncentrációban glükóz is jelen van, szemben az *E. coli*-val, ami csak a glükóz teljes elfogyásakor kezdi az acetát ionokat hasznosítani.

Az exponenciális fázisban a fajlagos szaporodási sebesség (μ) értékére 0,5 és 0,8 1/h -t kaptak. A végső sejtkoncentráció fontos paraméter, ez arányos a termékkel, hiszen sejtenként egy spórával és egy kristállyal számolhatunk. A legnagyobb értékek $1,25 \cdot 10^{10}$ spóra/ml körül mozogtak.

Többnyire glükózt tartalmazó szén-forrást használnak, de a nagy (>40 g/l) glükóz koncentráció gátolja a növekedést, ezért rátáplálásos technikát alkalmaznak. Olcsóbb C-forrás lehet még keményítő, glicerin, dextrin, vagy melasz. A cukor koncentrációt mérni kell, nem mehet 2 g/l alá. A biopeszticidek előállítási költségének csökkentése azért is fontos, hogy árban is versenyképesek legyenek a kémiai növényvédőszerrel szemben. Rengeteg mezőgazdasági mellékterméket teszteltek sikeresen a táptalajban, de ipari méretű alkalmazásokról kevés az információ. A törzs szénforrásként hasznosítja az acetátot is, de ilyen ipari technológiáról nem publikáltak.

A nitrogénforrás-igényéről kimutatták, hogy a szervetlen nitrogén-sók (pl. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) nem elégségesek, szerves nitrogénforrásra is szükség van (kukorica lekvár, szójaliszt, húskivonat, pepton.). Egyéb tápanyagok (K^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , élesztő extraktum) hiánya is okozhat limitációt.

Bár a törzs fakultatív anaerob, a spóra- és kristályképzéshez sok oxigént használ, az oldott oxigén szint nem csökkenhet 20% alá. Ehhez legalább egy VVM levegőbevitel szükséges.

A *B. thuringiensis* esetében a fermentáció előregedését és végpontját könnyű követni a sejtek morfológiai változásai alapján. Már 18 óra elteltével megjelennek az első spórák és kristályok. A tenyészet általában 28-32 óra alatt jut el az érett, spórás stádiumba. Amikor a tenyészet körülbelül 80%-a lizált, akkor a levet gyorsan lehűtik 4°C-ra és a pH-t 4,5-re állítják. Mire a hűtési szakasz befejeződik a tenyészet teljesen lizált, és csak szabad spórák és kristályok vannak a folyadékban.

Az optimális pH: 6,5-7,5 között van. A tenyészet nem pH érzékeny, de nagyobb titer érhető el pH szabályozással. Szabályozás nélkül a pH az ecetsav termelés miatt csökken, majd ennek felhasználása révén visszaemelkedik. Ha a pH 5,5-re csökken, akkor a fermentáció lelassul és megáll.

Az optimális fermentációs hőmérséklettartomány 26-30 °C között van. Alacsonyabb hőfokon (akár +10 °C-on) a tenyészet lassan, de spórásodik. 35 °C-nál és efölött viszont nem, megmarad a vegetatív állapot.

13.4.2. Feldolgozás, down stream

A vágási fermentlé általában 6-8% szilárd anyagot tartalmaz. Ebből 1-3% a spóra és a kristály, a fennmaradó rész pedig oldható és oldhatatlan szénhidrátokból és fehérjékből áll. Ebből a léből kell hatékonyan és olcsón kinyerni az aktív hatóanyagot. Az elválasztásra centrifugálást, mikroszűrést vagy a kettő kombinációját alkalmazzák.

A lebegő anyag kinyerésének leggyakoribb és legolcsóbb módja a folytonos centrifugálás 8000 g-vel. A centrifugálás hatékonyságának javítására flokkulánsokat is lehet adagolni. A centrifugálás 4% szilárd anyag tartalom fölött hatékony, és a szuszpenzió 15-30%-osra koncentrálható. Ha a sejttömeg kevésbé sűrű, a centrifugálás nem elég hatékony, mivel a szilárd szemcsék kiülepítéséhez hosszabb tartózkodási idő szükséges a készülékben. Ez pedig nagy sarzs térfogatok (>30 m³) esetén időigényessé és költségessé teszi a feldolgozást. Ha a centrifugálás az egyedüli koncentráció művelet, akkor általában 10-15%-os termékvesztéssel kell számolni, a kisebb toxin kristályok elúsznak.

A centrifugálás alternatívája a mikroszűrés lehet, a 0,1-0,2 mikron pórusméretű membránok használhatók. Megfelelően megválasztott szűrőfelülettel még a nagy, (>70 m³-es) sarzsok is feldolgozhatók a következő fermentáció ideje alatt (~30 óra). A mikroszűrés a szilárd anyagok 100%-át visszatartja, a kis toxin kristályokat is. A szűrőberendezésben a lebegő anyagokat tiszta vízzel folyamatosan mossák (diaszűrés), ezzel csökkentik a nemkívánatos metabolitok koncentrációját. A térfogatarány 1:1, egy térfogatnyi fermentlé mosására ugyanolyan térfogatú mosóvizet adnak.

A folyamatos centrifugáláshoz képest a mikroszűrő berendezések beszerzése és működtetése költségesebb. Gazdaságosabb megoldás a két művelet kombinálása. Előbb a centrifugálással a nagyobb szemcséket sűrítik be, majd a felülúszót dolgozzák fel a mikroszűrővel. Ezzel a megoldással csökkenteni lehet a szükséges szűrőkapacitást, és lerövidül a feldolgozás ideje is. A kihozatal itt is gyakorlatilag 100%-os.

Mivel a termékünk egy labilis fehérje, meg kell óvni a káros hatásoktól, a magas hőmérséklettől, a lúgos közegtől és a befertőződétől. Ez a fehérjés szuszpenzió kiváló táptalaj minden mikroba számára, megfelelő védelem hiányában nagyon könnyen berohad. A hűtés és az enyhén savas pH bizonyos védelmet jelent, de a feldolgozás és tárolás során minden berendezést és szerelvényt gondosan szanitizálni kell. Védekezésképpen gyakran antimikrobiális szereket is adnak a folyadékhoz.

13.4.3. Formulázás

A sűrített biomasszát a felhasználó számára formulázni kell. Mit is jelent ez? Az aktív anyagot olyan formába kell hozni, hogy az egyrészt biztonságosan szállítható és tárolható legyen (a kereskedelem, logisztika számára), másrészt a végfelhasználó egyszerűen és hatékonyan tudja alkalmazni akár terepi körülmények között is. A toxint a felhasználó igénye szerint nagyon sokféle formában hozzák forgalomba. Létezik vizes szuszpenzió, nedvesíthető por, vízben diszpergálható granulátum, olajos emulzió, szuszpenzió, pálca granulátum, szemcsés granulátum, pellet, brikett vagy por. Mivel a kristályok és spórák diszkrét, oldhatatlan részecskék, nem lehet belőlük homogén oldatot kialakítani.

13.4.3.1. Folyékony készítmények



Tulajdonképpen már maga a fermentlé is alkalmas lenne a növények permetezésére, ha a gyártás után azonnal, helyben fel lehetne használni. A valóságban ez nincs így, meg kell oldani a sűrített koncentrátum tartósítását. Ez nehéz feladat, kevés olyan folyékony termék van a piacon, amely 18-24 hónapig tárolható. A tartósítást az alacsony pH értékkel (4,5) és kémiai antimikrobiális konzerváló szerekkel (K-szorbát, parabének, propionsav, izotiazolin származékok) érik el.

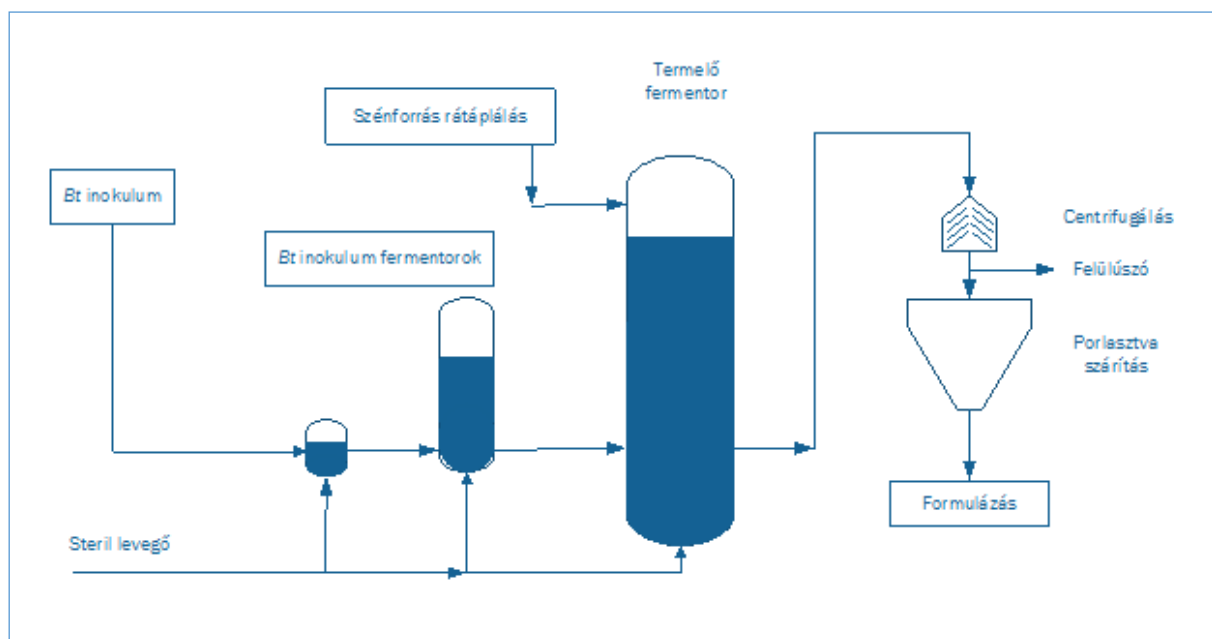
Speciális folyékony készítmények az olajos szuszpenziók. Ha víz helyett olaj a hordozó közeg, akkor romlási folyamatok túlnyomó része megszűnik. Léteznek tisztán olajos szerek, másoknál a felhasználás előtt vizes emulziót készítenek és így viszik ki a területre.

228. ábra Folyékony toxin készítmény

13.4.3.2. Szilárd készítmények

A feldolgozás során besűrített biomassa tartósítására kézenfekvő megoldás, hogy elvonjuk a víztartalmát. Víz hiányában a mikroorganizmusok nem növekednek és a szállítandó/kezelendő tömeg is sokkal kisebb. A víz eltávolítására az anyag hőérzékenysége miatt a bepárlás és a nagyobb hőterhelésű szárítási műveletek nem jöhetnek számításba. Általánosan használják viszont a porlasztva szárítást. Ennél a kontaktidő egy perc alatt van és a cseppekben lévő anyag hőmérséklete a magas belépő levegő hőmérséklet (180-210 fok) dacára nem haladja meg a nedves hőmérő hőmérsékletét, azaz jóval 100 fok alatt marad. Mire a csepp porszemcsévé szárad, már lehűlt kilépő levegővel érintkezik (70-80 fok.) A megfelelő száradás elérésére és a tapadás megakadályozására a bevitt anyagba segédanyagokat adagolnak. Ezek lehetnek inert szerves vagy szerves anyagok (ásványi porok, növényi lisztek stb.) A megfelelő nedvesedés szempontjából az 50 mikronnál kisebb szemcsék ideálisak.

A szilárd termék másik előállítási módja a granulálás. Ennél is az a feltétel, hogy a szer vízzel elkeverve gyorsan homogén szuszpenziót alkosson, kipermetezhető legyen.



229. ábra Poralakú toxinkészítmény gyártási folyamata

Adalék: Célszerű olyan formák kialakítása, amelyek alkalmazkodnak a megcélzott rovar életteréhez. Ha például burgonyabogár ellen védekezünk, annak lárvája a növény levelét rágja. Tehát a kipermetezett folyadék

csepp akkor hat, hogyha ragadós, rátapad a levélre és nem pattan le róla. A földre pattant/gurult cseppek kárba vesznek. A szúnyognál pont fordított az eset. Ennek lárvája a vízben él, a szer akkor jut célba, ha nem tapad meg a nád vagy más növények levelein, hanem leperreg és a vízbe esik.

13.5. Minőség-ellenőrzés - analitikai módszerek

A hatóanyag tartalom meghatározása bonyolult feladat, lehet

- Közvetett módszerrel, a spóraszám meghatározásán keresztül (arányos a kristályok mennyiségével)
- Megbízhatóbbak, de nagyon munkaigényesek a „rovar-bioesztek”. Petri csészében vagy más lapos edényben gyapot leveleket helyeznek el, erre ismert számú *O. nubilalis* lárvát helyeznek. Erre a felületre viszik fel a vizsgálandó toxin mintát és meghatározzák a lárvák pusztulási arányát. Ebből számítható az International Toxic Unit (ITU).
- HPLC-vel: a lepidopteran vagy dipteran toxin fehérje mennyisége mérhető, de a fehérje pontosabb azonosítására nem alkalmas.
- Immun-biológiai módszerekkel (ELISA)

A készítmény ártalmatlanságát minden egyes kibocsátott sarzson, legyen az folyékony vagy por alakú, biztonsági egérteszttel kell igazolni. Öt egérbe fecskendeznek szubkután 10^6 spórának megfelelő mennyiséget és hét napig megfigyelik ezeket.

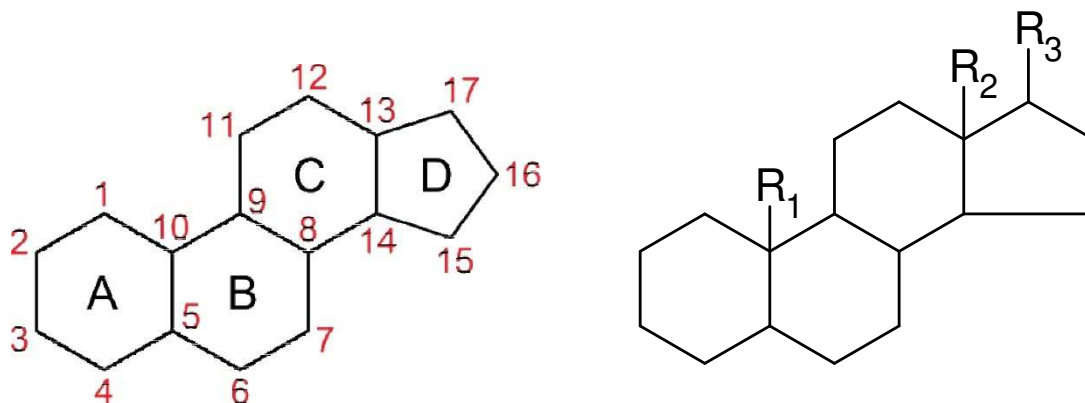
14. SZTEROIDEKONVERZIÓK

A gerinces állati szervezetekben megtalálható szteroidok nagy csoportját alkotják a szteroid hormonok. Ezek közé tartoznak a nemi hormonként számolt szteroidok, melyek három fő csoportja az androgének, az ösztrogének és a gesztagének. Másik szteroid hormoncsoport a mellékvese kéreg által termelt kortikoszteroidok, melyek képviselői egyrészt a só- és vízháztartás szabályozásáért felelős mineralokortikoidok (aldoszteron), másrészt a szénhidrát anyagcserét és gyulladáshoz vezető folyamatokat – azaz immunfunkciókat – is befolyásoló glükokortikoidok (kortizon). A szteroid hormonok továbbá az anabolikus szteroidok, melyek az ún. androgén receptorokkal lépnek kölcsönhatásba, így fokozzák a nitrogén visszatartáson keresztül az izom- és csontszintézist.

A gyógyszeripar sok szteroid hormont és hormon-analógot állít elő, e gyártások egy része biotechnológiai lépéseket tartalmaz. Előállításuk általában soklépéses folyamat, amelyben a biokémiai és szintetikus lépések egyaránt előfordulnak. A biokémiai lépések rendszerint egyetlen enzim átalakítást jelentenek, azaz biokonverziókról van szó. Az átalakítások során élő vagy nyugvósejtes fermentációt (olyan elszaporított sejtörmeg, melynek nincs szénforrása, nem szaporodik) alkalmaznak.

14.1. A szteroidok felépítése és csoportjai

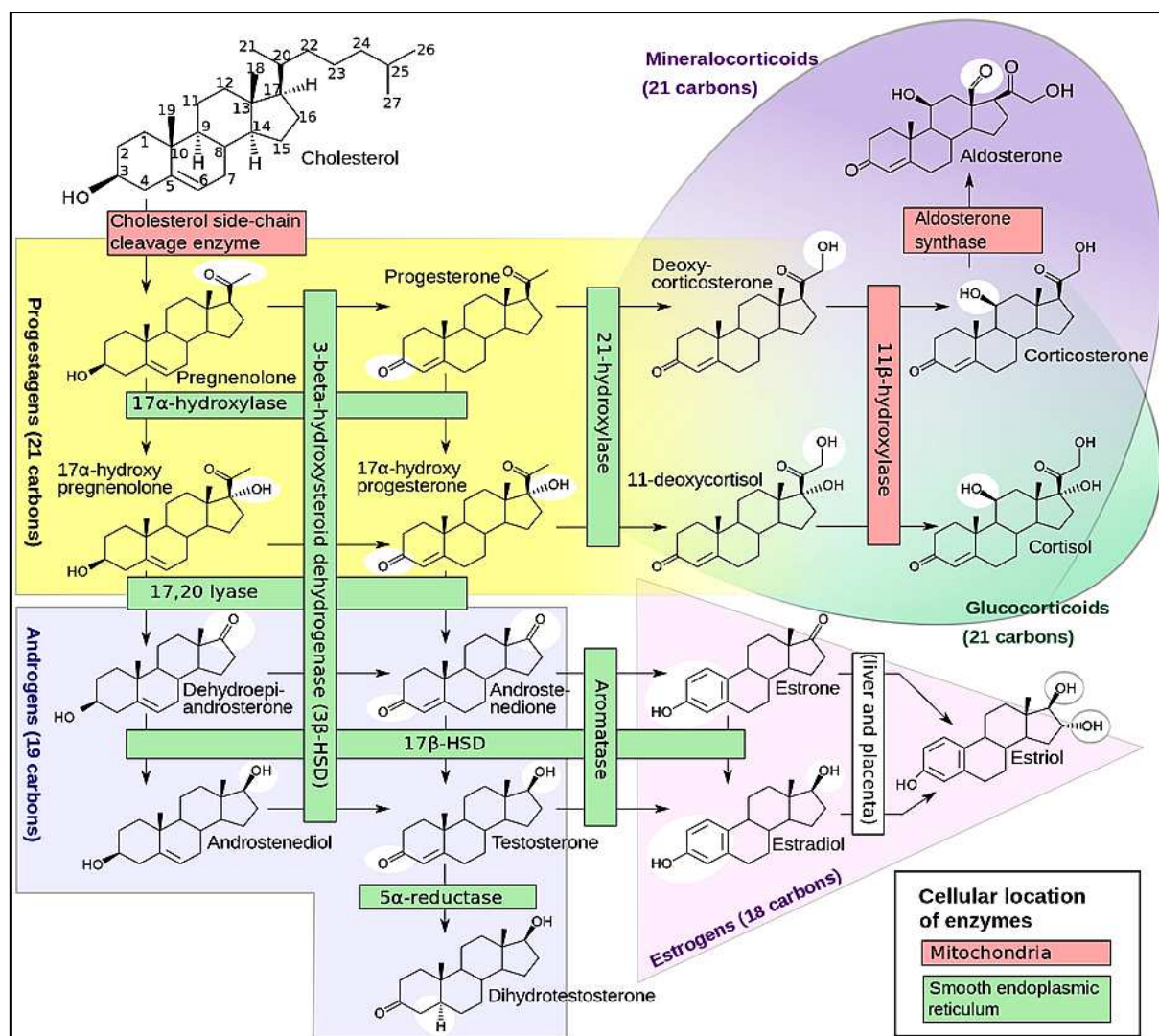
A szteroidok négy cikloalkán gyűrű specifikus egymáshoz kapcsolódása során alakulnak ki. A molekula vázát tizenhét szénatom képezi, melyek a szorosán kapcsolódó gyűrűk felépítői. Három ciklohexán – A, B és C – és egy ciklopentán – D – alkotja a gonán alapvázát (198. ábra).



230. ábra A szterán váz felépítése

A szteroidok változatosságát a gyűrűk telítettsége és a hozzájuk kapcsolódó funkcionális csoportok adják. A biogén szteroidokban a bioszintézis a szkvalénből indul (hexaterpén) emiatt a C-10 és C-13 szénatomokhoz metilcsoportok kapcsolódnak, valamint a 17-es szénatomhoz egy nyolc-tíz tagú alkil oldallánc. A vegyületek változatosságához hozzájárul még az oldallánc konfigurációs helyzete, a kapcsolódó metilcsoportok száma és a gyűrűn található további funkcionális csoportok. Ilyen csoport például a szterinek családjára jellemző, a C-3 szénatomon található hidroxilcsoport. A szterinek képviselőire jellemző továbbá, hogy a kolesztán molekulából származtathatóak.

A szteroid konverziók tárgyalása előtt tekintsük át, hogy miként szintetizálódnak az emberi szervezetben az egyes hormonok.



231. ábra A humán szteroid hormonok bioszintézise

A szteroid konverziók tárgyalása előtt tekintsük át, hogy miként szintetizálódnak az emberi szervezetben az egyes hormonok.

A sémából látható, hogy a szerkezet-hatás kapcsolatok nem különülnek el élesen, sőt egyféle aktivitású hormomból kialakulhat egy más hatású szteroid. Így a férfi hormon (androgén) tesztoszteronból létrejöhethet női hormon, az ösztadiol; a női hormon progeszteronból anyagcsére ható kortikoszteron és a vesére ható aldoszteron. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a szteroidok hatásspektruma nem tiszta, a főhatásuk mellett mindig észlelhetünk egyéb, más szteroidokra jellemző mellékhatásokat is. A szteroid kutatás egyik fő iránya, hogy olyan molekulákat állítsanak elő, amelyek a célzott hatás mellett minimálisan befolyásolják, terhelik az emberi szervezetet.

14.2. Előállítás, alapanyagok

A teljes szterán váz kémiai szintézise lehetséges ugyan, de bonyolult és drága, ezért a gyártások a természetből „készen” vett vázból indulnak ki, és ezt alakítják át sok lépésben a kívánt vegyületté.

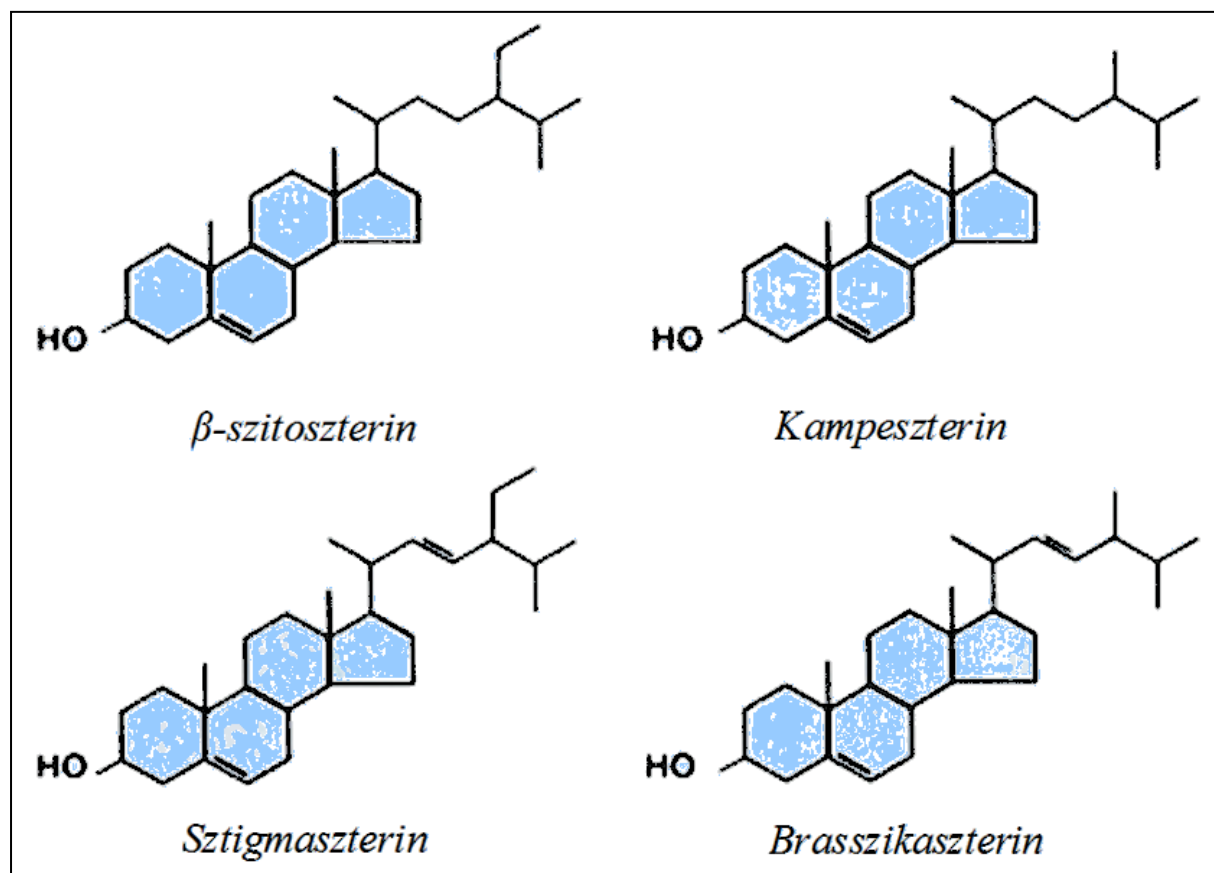
A sokféle szteroid hormon előállítására a gyógyszeripar különböző kiindulási vegyületeket alkalmaz. Ezek közül a legjellemzőbbek a növényi szterinek közé tartozó sztigmaszterin, β -

szitoszterin és kampezsterin, továbbá a dioszgenin, a szolaszodin, és a hecogenin mint a szapogének képviselői, vagy az állati eredetű koleszterin. Két oka van, hogy a gazdaságilag megvalósítható folyamatok fejlesztése az előbbi szubsztrátokon alapszik. Egyrészt az alacsony nyersanyagköltségek, másrészt a rájuk jellemző egyszerű átalakíthatóság.

Növényi eredetű szteroid a **szitoszterin**, mely a szójaolajban és egyes fafajták anyagában található, illetve a **sztigmaszterin**, amely a babfélékben fordul elő. A **koleszterin** állatok epiváladékából nyerik, míg szintetikus úton hasonló vegyületeket pl. β -naftol és borostyánkősav-anhidrid reakciójával állíthatunk elő.

14.2.1. A fitoszterinek képviselői, kinyerése és felhasználása

A fitoszterinek – vagy növényi szterinek – olyan természetesen előforduló vegyületek, melyek szerkezetükben igen nagy hasonlóságot mutatnak a koleszterinnel. Mindkettőnek a négy gyűrűs rendszer adja az alapvázát, kapcsolódik hozzájuk 3β helyzetben hidroxil csoport, és igen gyakori a 5 és 6 helyzetű szénatomokat összekapcsoló kettős kötés. A szerkezetük mellett biológiai szerepük is hasonló, tekintve a sejtek foszfolipid membránjában kifejtett stabilizáló hatásukat. Ám jelentős különbséget jelent az, hogy amíg a koleszterinen található oldallánc nyolc szénatomból áll, addig a fitoszterinek jellemzően kilenc vagy tíz szénatom nagyságú oldalláncot tartalmaznak. Növényfajokból eddig több mint száz különböző féle fitoszterint azonosítottak, melyek közül a leggyakoribb képviselők (200. ábra) a szitoszterin, a sztigmaszterin, az ergoszterin és a kampezsterin.



232. ábra A leggyakoribb növényi szteroidok

14.2.2. Források

A növényi szterinek ipari léptékben történő izolálásának két nyersanyaga van, a növényi olajok feldolgozásakor keletkező dezodorálási iszap és a fagyanta, amely a faiparnak egy mellékterméke. A kinyert anyagot – eredetére való tekintet nélkül – felhasználják a gyógyszer- és élelmiszeriparban. A nyers növényi olajokat több lépéses kezelésnek kell alávetni, hogy megtisztítsák azokat szennyező összetevőiktől. A növényi olajok finomításában nyálkátlanító, savtalanító, derítési, valamint viasztalanító és dezodoráló lépéseket alkalmaznak. A fitoszterinek elkülönítése a dezodoráló lépésben következik be. Ez a művelet nyújt lehetőséget az egyébként kis százalékban jelenlévő szterinek koncentrálására (33. táblázat). Szterinek kinyerése céljából felhasznált nyersolajok közt a leggyakoribb a kukoricaolaj, a kukoricarost olaj, a búzacsíra olaj és a szójaolaj.

Növényi olaj	Szterin tartalom (mg/100g olaj)	
	Nyers	Finomított
Kukorica	850	730
Repce	820	770
Napraforgó	430	350
Szója	350	260

33. táblázat Növényi olajok szterin tartalma

14.2.2.1. Kinyerés dezodorálási párlatból

A fitoszterinek szterin tartalmú anyagokból való kinyerésére több módszert is alkalmaznak. Ezeket főképp az határozza meg, hogy a szterinek egy része észter formában van jelen a forrásaiban. Ilyen esetekben a kiindulási anyagot hidrolízisnek vetik alá, minek hatására a szterinek felszabadulnak az észter formából. A szteroid-észter tartalmú anyagok hidrolízise megvalósulhat vizes közegben, nagy nyomáson (1,5-50 Mpa) és magas hőmérsékleten (200°C) vagy elszappanosítással, melynél enyhe túlnyomást, magas hőmérsékletet és keverést alkalmaznak. Utóbbi módszer előnyösen kapcsolja össze a hidrolízist és az elszappanosítást. Az összetevők elválasztását és koncentrálását extrakcióval vagy (molekuláris) desztillációval végzik.

14.2.2.2. Kinyerés fagyantából

Fitoszterinek kinyerésére szolgáló másik forrás a folyékony fagyanta, amely a fa- és cellulózipar egyik mellékterméke. Elsősorban, de nem kizárólag, a fenyőfélékből származó puhafa feldolgozása során képződik. A nyers fagyanta el nem szappanosítható összetevőinek aránya jellemzően 5-35% között változik, a fa fajtájától függően. Ilyen alkotók például a viaszok, a hosszúlancú alkoholok, a zsírsavészterek, a szterinek és a szteroid észterek. Ezen belül az összes szterin kiteheti a teljes tömeg 3-7%-át, főként észterezett formában.

A termelés vagy fagyanta szappanból vagy fagyanta szurokból történik, mindkét anyagnak vannak előnyei és hátrulói is. Szterinek feldolgozását az utóbbi anyagból már az '50-es években leírták. A szurokban a szterinek mellett előforduló szennyezők nagy molekulásúlyú savak – olajsav, sztearinsav – és a nagy molekulásúlyú alkoholok, melyek nehezen választhatók el a szterinektől.

A korábbi évtizedekben különböző oldószeres extrakcióval történt a szterinek kinyerése és tisztítása ebből a nyersanyagforrásból. Ezek a módszerek egyre kevésbé fejleszthetőek, kö-

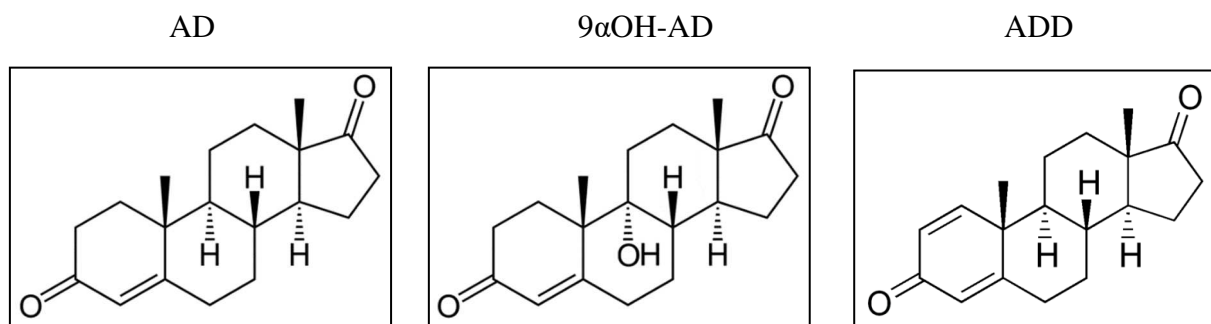
szönhetően az oldószerek használatára vonatkozó szigorú szabályozásoknak. A nagy tisztaságú végtermékkel kapcsolatos elvárások nehezen is teljesültek. Utóbbi okok vezettek a desztilláción alapuló eljárások kifejlesztéséhez.

A szterin frakción belül a β -szitoszterin a legáltalánosabban használható vegyület. Ennek dúsítására, tisztítására további műveletekre van szükség. Jellemzően frakcionált kristályosítást alkalmaznak, a szterin frakciót forró szerves oldószerben (pentanol, ciklohexanon, vizes alkoholok) oldják, és fokozatosan lehűtik, néha oltókristállyal gyorsítják a kristályok kiválását. A tiszta anyag előállítása csak több lépésben lehetséges, emiatt nagyon drága. Emiatt az ipari technológiákban gyakran beérik kevésbé tiszta, de olcsóbb alapanyaggal, különösen, ha a mellékkomponensek is hasonló szerkezetű, hasznosítható szteroidok.

A sztigmaszterint gyakran előbb progeszteronná oxidálják kémiai eljárással, mivel a benne található C22-es kettőskötés gátolja az alkalmazott mikrobatorzsek metabolizmusát.

14.2.2.3. *Az oldallánc lehasítása*

A szitoszterin (a gyakorlatban β -szitoszterin és kampezterin keveréke) és a koleszterin oldalláncát mikrobiálisan bontják le, és oxidálják 17-ketoszterinekké, elsősorban androszt-4-én-3,17-dionná (AD), 9 α -OH-AD-ná és androszta-1,4-dién-3,17-dionná (ADD).



233. ábra androsztén-dion

9 α OH-androsztén-dion

androsztén-dién-dion

Ez a három vegyület sokféle további gyártás alapanyaga, az első kettő éves világpiaca egyenként is ezer tonna fölött van.

A kiválasztott szteroid alapanyagból a kívánt gyógyszerhatóanyag kialakítása többlépcsős folyamat, amelynek során a szterán váz megőrzésével mindig csak egy-két funkciós csoportot alakítanak át, vagy kettős kötést hoznak létre. Egyes lépéseket kémiai úton is meg lehet valósítani, de számos esetben a biokonverzió előnyösebb. A szteroid gyártó üzemek így szintetikus és fermentációs átalakításokra egyaránt alkalmasak, a kémiai és biológiai üzemegységek egymásnak adják az intermediereket.

A biokonverzió előnyei:

- enyhe kémiai és hőmérsékleti körülmények közt mennek végbe
- sztereoselektív átalakítások lehetségesek
- nem szükséges védőcsoportokat rákapcsolni, majd eltávolítani.

Hátrányai:

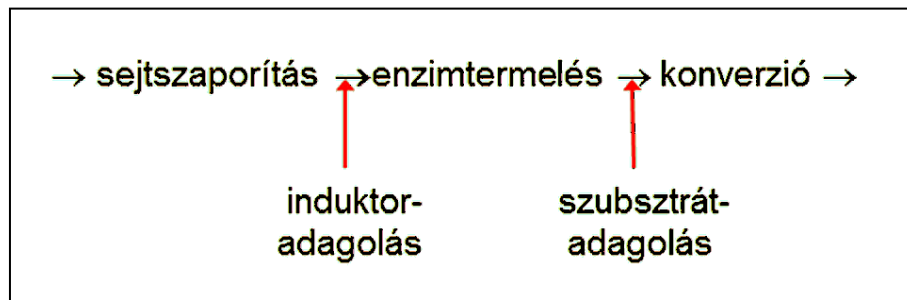
- Minden konverziós lépéshez külön enzimet (=törzset) kell keresni. Az alkalmazott törzsek nagyon sokfélék, lehetnek baktériumok, élesztők, fonalas gombák. A bennük azonosított, és a technológiában kihasznált enzimek eredeti szubsztrátja sokszor nem is az átalakítandó szteroid, hanem valamilyen más molekula, csak a szerkezeti hasonlóság miatt az enzim a szterán váz bizonyos régióját ismeri fel, köti meg és alakítja át = régióspecifikus enzimek. (A prokarióták nem termelnek szteroidokat, ugyanazt a szerepet a membránokban a hopanoidok töltik be.)

- Emiatt a megfelelő mikrobatorzsek keresése (screening) nem tervezhető és nagyon munkaigényes.

A szükséges enzimeket általában nem izolálják, hanem (nyugvó)sejtes tenyészetben használják.

14.3. A konverziók általános lefolyása

Számos különböző technológia létezik, az alábbiakban egy olyan „állatorvosi ló” technológia kerül bemutatásra, amely az összes lehetséges technológiai lépést, megoldást tartalmazza. A folyamat lépései tehát:



234. ábra A biokonverziós technológia lépései

A technológia ugyanúgy egy vagy több oltótenyészet szaporításával indul, mint bármely más fermentáció. A megfelelő sejtszámú és állapotú inokulummal oltják a főfermentációt.

Ennek első szakasza a sejtszaporítás a törzs igényeinek megfelelő tápoldaton.

A sejtek elszaporodása és a táptalaj részleges kimerülése után a konverzióhoz szükséges enzimet indukálják - induktor anyagot adagolnak. Ez lehet a szteroid szubsztrát kis adagja, lehet egy olcsóbb szteroid molekula vagy egy szintetikus molekula, pl. naftol-származék. Az indukció hatékonyságát enzimaktivitás mérésel lehet ellenőrizni. Az aktivitás általában 10-24 óra alatt éri el a kívánt szintet.

A szteroid szubsztrát beadagolása. Komoly problémát jelent, hogy a szteroidok rosszul oldódnak vízben, ezért a szubsztrát kristályok formájában van jelen a lében, a vizes fázis telített oldatnak tekinthető. Az enzim/mikroba az oldatból felveszi a szubsztrátot, átalakítja, és leadja a terméket. A termék is rosszul oldódó szteroid, koncentrációja gyorsan eléri az oldhatósági határt, és ez is kikristályosodik a fermentléből. Ezt a jelenséget kristályfermentációnak nevezik. Látszólag nem történik semmi, a mikroszkóp alatt a sejtek mellett kristályokat látunk. A folyadékban a kristályok mennyisége nem változik, a szubsztrát és a termék koncentrációja állandó (telítési), a konverzió mégis folyik. Végtermékgátlás nem lép fel, hátránya viszont, hogy tömegátadási problémák léphetnek fel. Két folyamat működik egyidejűleg, az enzim fogyasztja

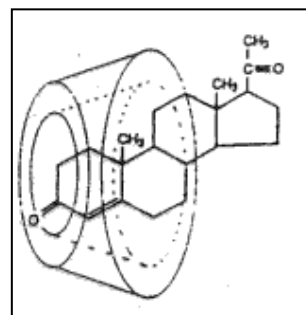


235. ábra Szteroid kristályok mikroszkópos képe (300x)

a szubsztrátot, ettől az oldat koncentrációja kissé lecsökken a telítéshez képest, és a kristályok oldódása pótolja az átalakított anyagot. Az egymást követő folyamatok közül mindig a leglassabb a sebességmeghatározó. A mérnöki cél az, hogy használjuk ki teljes mértékben az enzim kapacitását, tartsuk fenn a maximális (telítési) koncentrációt, az átalakítás sebessége legyen a meghatározó (=reakció rezsím). Ehhez viszont minél nagyobbra kell növelni az oldódás sebességét – ez pedig a kristályok fajlagos felületének megnövelésével érhető el. Ez indokolja, hogy a szubsztrát bevitelénél a mikrokristályos szerkezet elérésére törekednek. Ennek elérésére kétféle technikát is alkalmaznak, mindkettő azon alapul, hogy a folyadékot sokkal egyszerűbb diszpergálni, mint a szilárd anyagokat.

- A szubsztrátot felveszik oldószerben (olyan szerves oldószer kell, amely a vízzel elegyedik, és emellett nem károsítja a tenyészetet, pl.: etanol), és lassan a fermentorba engedik. Az alkohol kihígulása következtében a szteroid kikristályosodik, megfelelő kivitelezéssel igen apró, nagy felületű kristályokat kapunk.
- Vizes közegben glicerinnel, tenzidekkel és detergenssekkel megolvasztják a szteroidot (138 °C-on), és az olvadt anyag apró cseppekre diszpergálható (emulzió képzés). Lehűtve az apró cseppekből apró szemcsék/kristályok lesznek, nagy fajlagos felülettel.

A szubsztrát bevitel megoldható ciklodextrinekkel is. A ciklodextrinek molekulája alkalmas apoláris jellegű molekulák befogadására, így a szteroidokkal is zárványvegyületet képez. Ez egy reverzibilis folyamat, a szabad és kötött molekulák kémiai egyensúlyban vannak. Ahogy az átalakulás során a szabad szubsztrát molekulák fogynak, a komplexből felszabadulva folyamatosan pótlódnak, így végbemehet a teljes konverzió.



236. ábra Szteroid-ciklodextrin komplex

Lipofil szubsztrátot és termékeket tartalmazó folyamatok produktivitását igen gyakran kétfázisú rendszerekkel szokták javítani. A megoszlás révén a vízzel oldhatatlan szerves fázis egyaránt tárolja a szubsztrátot és a terméket is. A szubsztrát koncentráció a vizes fázisban közel állandó értéken van, mivel annak oldhatósága a szerves fázisban sokkal magasabb. Hasonlóképp oszlik meg a képződő termék is a két fázis közt, következésképpen a termékkinyerés igen egyszerű.

Például fitoszterin szubsztrát esetében szójaolajat, napraforgó olajat, PPG-t és szilikonolajat használtak a szteroid feloldására és bevitelére. A szerves fázis jelentősen növelte a fitoszterin hozzáférhetőségét, ezáltal a képződő AD mennyiségét is. PPG-nel az AD-ra számolt hozam elérte a 80%-ot is 30 g/l kiindulási fitoszterin koncentráció mellett.

Az itt bemutatott sémánál egyszerűbb technológiák is használatosak. Létezik olyan megoldás, amelynél a szubsztrátot a már a fermentáció elején teljes egészében bemérik, így a külön indukció, és az enzimaktivitás mérés feleslegessé válik.

Feldolgozás. A szteroid egy része oldott, a másik része szilárd fázisban van, ilyenkor rendszerint előbb teljes/totál extrakciót végeznek erősen apoláris oldószerrel, pl. diklór-metánal, mely minden apoláris anyagot kiold. A fázisok szétválasztása és az oldószer lehajtása után szilárd vegyes anyag marad vissza (pl. szubsztrát, termék és melléktermékek együtt). A következő lépésben olyan oldószert alkalmaznak, mely ebből szelektíven old ki egy komponenst = ez a szelektív-, vagy differenciál-extrakció.

14.4. Szitoszterolból előállított vegyületek

14.4.1. Androszténdion (AD)

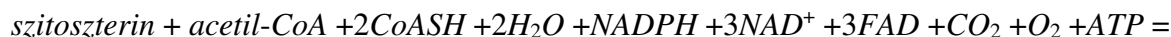
A gyógyszerhatóanyagok gyártásában az egyik legfontosabb köztitermék az androszténdion (androszt-4-én-3,17-dion). Az AD egy tizenkilenc szénatomból álló szteroid hormon, mely a magasabb rendű szervezeteknél a mellékvesében és az ivarmirigyekben termelődik. Mesterséges úton előállítható szerves szintetikus módszerekkel (drága) vagy a szterinek oldalláncának mikrobiológiai hasítása révén. Az androszténdiont régóta alkalmazzák androgén és anabolikus készítmények előállításnak kiindulási anyagaként. Ennek következtében az AD világpiaci éves igénye meghaladja az ezer tonnát is.

Növényi és állati eredetű szterinek oldalláncának hasítására, és ezáltal AD termelésre több mikrobafajta is alkalmasnak találtak (34. táblázat).

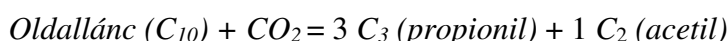
Szubsztrát	Mikroorganizmus
Koleszterin	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter simplex</i> , <i>Brevibacterium lipolyticum</i> , <i>Nocardia ahena</i>
Szitoszterin	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium flavum</i>
Koleszterin, szitoszterin, sztigmaszterin, ergoszterin	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3805

34. táblázat AD termelésére alkalmas mikrobafajok

A szitoszterin AD-ná alakításának enzimikus lépéseiben összesen 11 katabolikus enzim játszik szerepet, 14 egymást követő lépésben. A teljes folyamat a kofaktorok regenerációját igényli. Az első lépés egy támadás az oldallánc végén. A C27 terminális metil csoporthoz egy hidroxilcsoport kapcsolódik, mely ezután karbonil csoporttá oxidálódik. Ezt követi egy karboxilációs lépés a C28 pozícióban. Az első lépést három enzim együttesen hajtja végre, melyek telített oligoizoprén származékok és az oxigén alacsony parciális nyomása által indukálhatóak. A második lépés szén-dioxid fixálással jár, így az oldott szén-dioxid koncentráció pozitív hatást gyakorol a β -szitoszterin AD-ná történő biotranszformációjában. Az 1% szén-dioxidot tartalmazó levegőt több kísérletben előnyösnek találták. Ezekből következik, hogy a túl intenzív levegőztetés negatívan befolyásolja a termékhozamot (sok a bevitt oxigén, a szén-dioxidot pedig kihajtja). Sztöchiometriailag egy szitoszterin molekula oldalláncának lehasításakor 3 molekula propionil-CoA, 3 molekula FADH₂, 3 molekula NADH és egy molekula ecetsav képződik. A keletkezett propionátok és az acetát a Krebs ciklusba jutva energiaként hasznosulnak. Az AD biológiai úton történő előállításának nehézségeit a szteroid váz felbomlása és az androszténdion által kifejtett termékkinhibíció jelentik.



Szénatomokra nézve:



A kettős kötés „átfordulása” annak köszönhető, hogy így konjugált helyzetbe kerül az oxo-csoport kettős kötésével, ami energetikailag kedvezőbb.

A szterinekből kiinduló androszténdion ipari gyártásakor döntően *Mycobacterium* törzseket alkalmaznak. A *Mycobacterium* nemzetség képviselői a *Nocardia*-k és *Rhodococcus*-ok családjába tartoznak. A mikobakteriális sejtek Gram-pozitívak, (fakultatív) aerobok, enyhén hajlított pálcá alakúak. A csoportba tartozó baktériumok néha elágazó, fonalas növekedésűek; a fonalszerű képletek a legkisebb beavatkozásra egyedi sejtekké esnek szét. A *Mycobacterium* fajok egyik csoportosítása alapján lehetnek obligát patogének (*M. bovis*, *M. tuberculosis*), lappangó patogének (*M. avium*, *M. fortuitum*) vagy szaprofita fajok (*M. phlei*, *M. smegmatis*). Szaprofitákat talajból, sós- és édes vizekből izolálták.

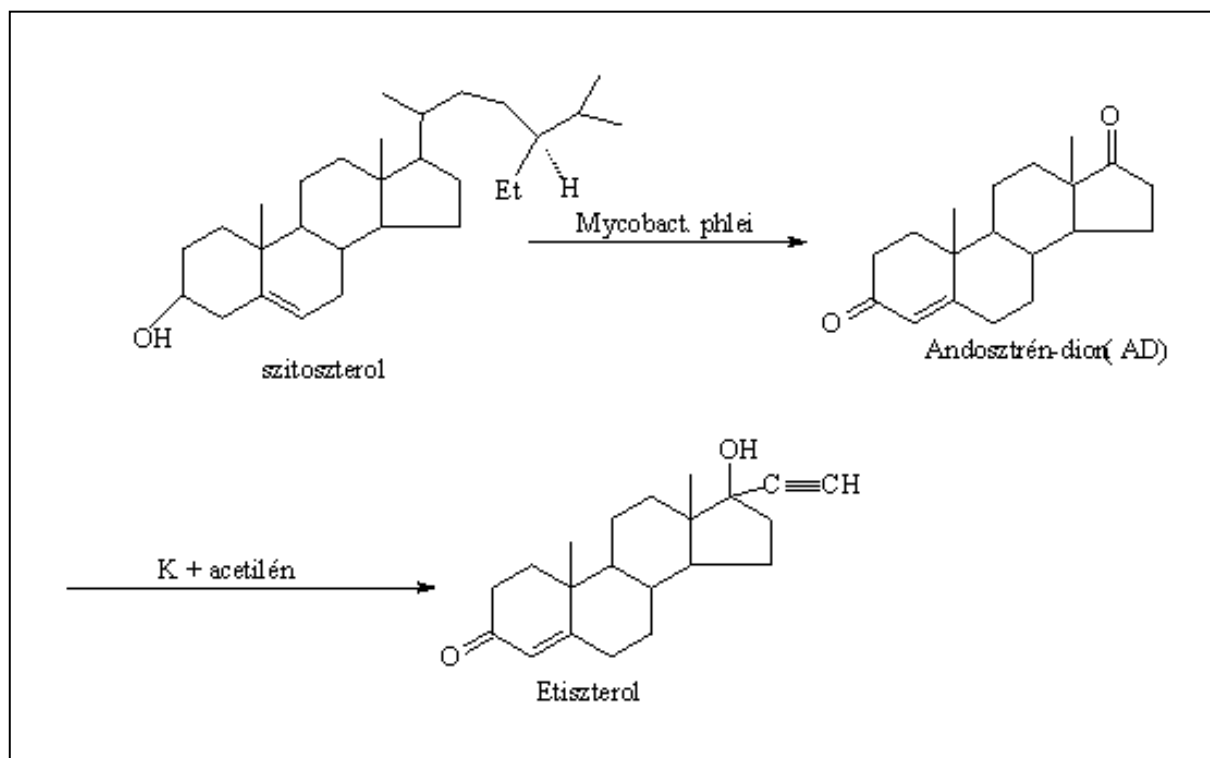
A mikobakteriumok rendkívül lassan növekednek. Esetenként 40 napos inkubáció után képződnek csak látható telepeik a komplex táptalajok felületén.

Az eljárásban használt, az ún. *Mycobacterium. sp. BM6* egy gyors növekedésű, apatogén mikobaktérium, amely a *Mycobacterium phlei* fajnak egy mutánsa. A sejtek pálcá formájúak, kicsik, átlagosan 1 μm hosszúak, és 0,2-0,5 μm az átmérőjük. A különálló sejtek az apoláris felületű, viaszos sejtfal okán hajlamosak aggregátumokba összeállni. A sejtfal védő hatása miatt a sejtek savval, alkohollal, és egyéb kémiai és fizikai hatásokkal szemben ellenállóak. Amorf telepeket képez, amelyeket a termelt pigment narancssárgára színez. A *Mycobacterium sp. BM6* törzsnek fontos jellemzője, hogy szteroid-1,2-dehidrogenáz és 9α -hidroxiláz hiánymutáns, emiatt a szteroid váz bontására nem képes. Telítetlen szterineken növekedve androszténdiont állít elő.

Esettanulmány: a Richterben kidolgozott technológia sajátosságai:

A törzs szénforrásként hasznosítja a szitoszterin oldalláncát. Ehhez viszont el kell kerülni a katabolit repressziót, azaz nem szabad cukrot adni a tápoldatba. Emiatt a konverziós szakaszban kiegészítő szénforrásként növényi olajat adagolnak. Ez nem pörgeti az elsődleges anyagcserét, nem lassítja a konverziót.

A szubsztrátot az ömlesztéses technológiával apró kristályok formájában már a tápoldat-készítés során beviszik a rendszerbe, így sem indukcióra, sem menet közbeni szubsztrát bevitelre nincs szükség. A konverzió csak akkor sikeres, ha a mikrobajetek rátapadnak a kristályok felületére és biofilmet alkotnak. A kötődést elősegíti, hogy a *Mycobacterium*ok tokja viaszos,



237. ábra Az AD intermedier gyártása

apoláris, így könnyebb kapcsolatba lép az apoláris kristályok felületével.

A konverzió hatásfoka a megnövelt szitoszterin bevitel (27 g/l) esetén is eléri a 93%-ot. Mellette jelen van a maradék szitoszterin és közel 1g/l egyéb anyag. A termék tömege kis értéknek tűnik, de vegyük figyelembe, hogy a molekula tömegének közel egyharmadát elveszti az átalakítás során.

A teljes fermentlevet diklór-metánnal extrahálják, majd elválasztják és lehajtják az oldószert. A szelektív extrakciót 85%-os metanollal végzik, amely az androsztén-diont oldja, a szitoszterint viszont nem.

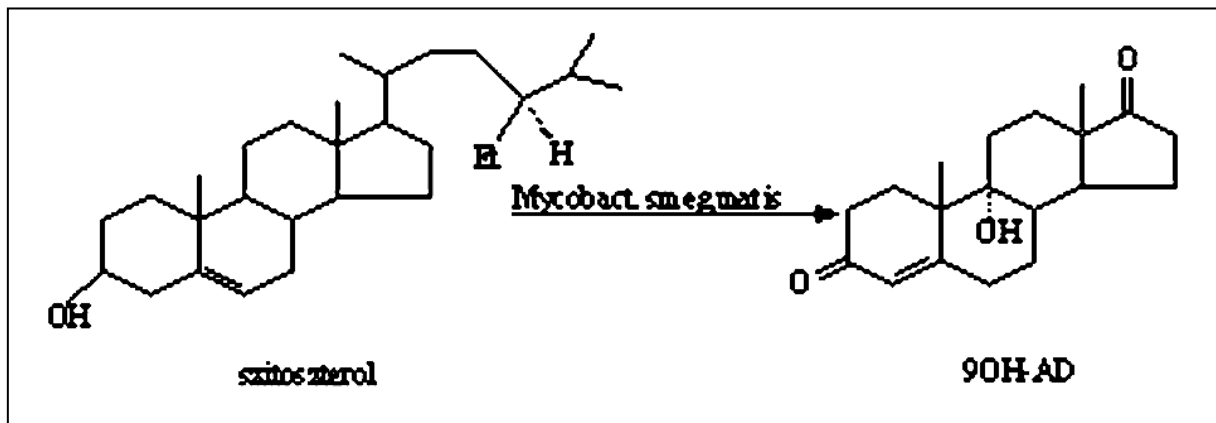
Az AD maga is hormon, androgén hatása kb. 20%-a tesztoszteronénak, de számos további termék intermediere. AD-ból állítják elő többek között a spironolaktont, a finaszteridet és a drospirenont is.

Az AD technológia második lépése kémiai reakció, acetilén gázzal vízmentes THF-ben fém kálium jelenlétében acetilidet képeznek. A keletkezett etiszterol maga is gyógyszerhatóanyag (progesztagén hatású), de többféle úton is továbbalakítják.

14.4.2. 9 α -hidroxi-androsztén-dion (9 α OH-AD)

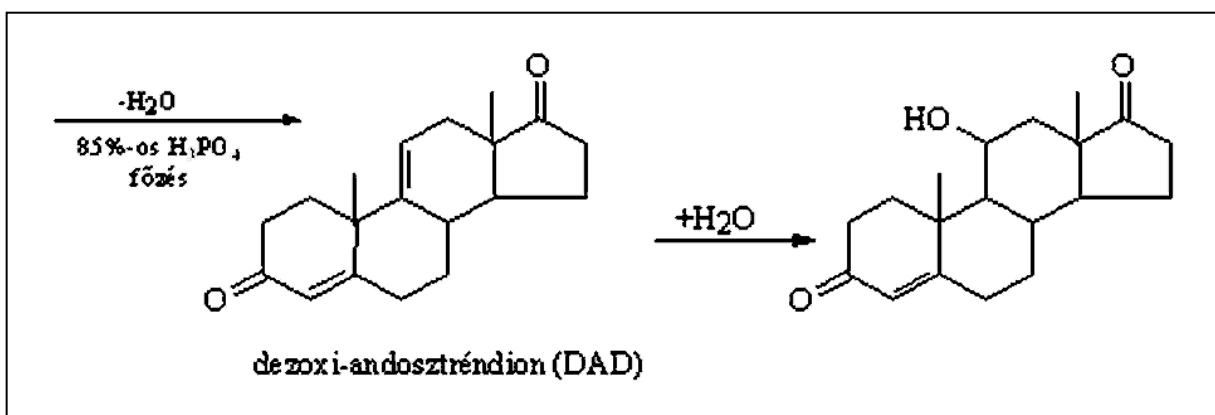
Mikroorganizmus: *Mycobacterium smegmatis*

A biokonverzióban 30 g/l-es koncentrációban bevitt szitoszterinből a mólsúly csökkenést és a melléktermék képződést figyelembe véve 14,5 g/l elméleti konverzió érhető el. Az üzemi fermentációnál 10-11 g/l-es átlagszint érhető el. (Konverziós fok ~ 70%).



238. ábra A 9 α OH-AD létrehozása

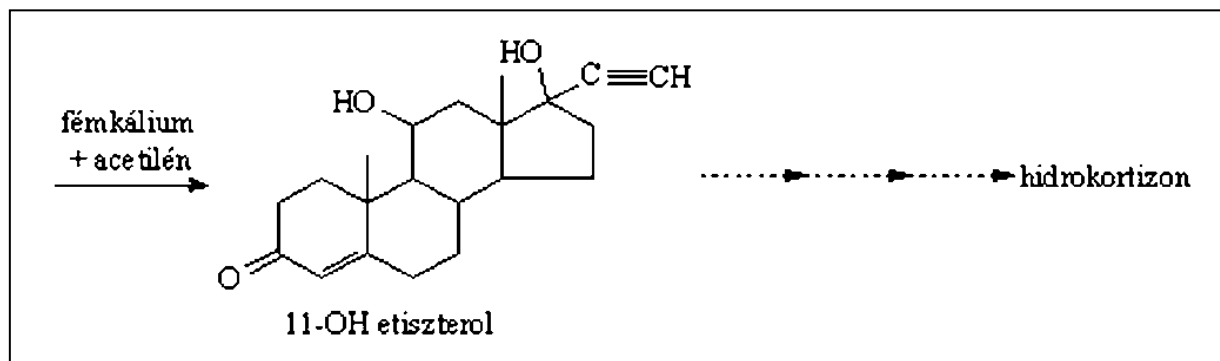
Feldolgozás: szelektív oldószerként di-izopropil-étert alkalmaznak, amely a szitoszterolt oldja, a 9 α OH-AD-t nem.



239. ábra A 9 α OH-AD átalakítása

A második lépés itt is kémiai, a vízelvonáshoz 85%-os H_3PO_4 -ban főzik, melynek hatására a 9. és a 11. szénatom között kettős kötés alakul ki, erre később könnyen addíciónáltathatunk pl. vizet, vagy HF-ot. Mindkét esetben az elektronszívó csoport a 11 C atomra orientálódik, ez a kialakuló szerkezet a gyulladásgátló szteroidok alapja.

Víz addíciónál az OH csoport a 11-es szénatomra kötődik. A 11-OH-AD-hez fém káliumot és acetilént adva **11-OH etiszterol** keletkezik, melynek C2 oldalláncát több lépésben átalakítva hidrokortizon állítható elő.

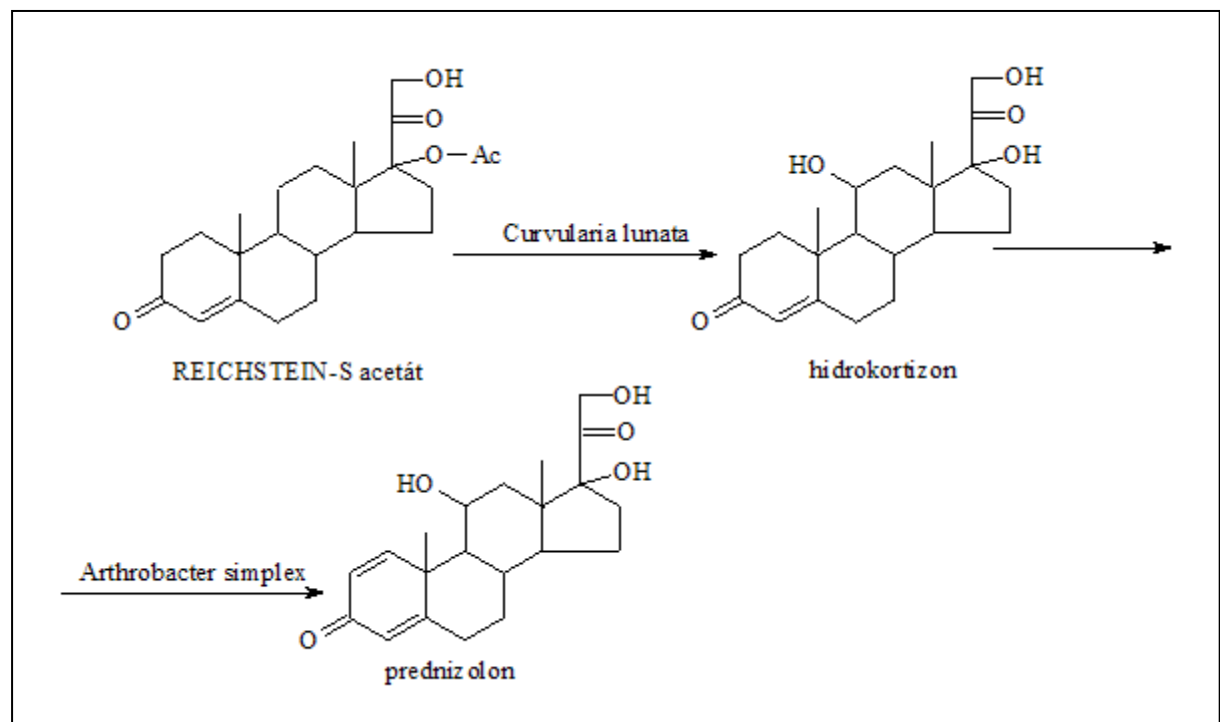


240. ábra Gyulladásgátlók kialakítása

14.5. Gyulladásgátlók

A kettős kötésre hidrogén-flouridot addíciónáltatva fluorid származékokat, szuperkorticoidokat (nagyhatású gyulladásgátlókat) kapunk.

A **hidrokortizon** (szinonim neve: **kortizol**) maga is gyulladásgátló és további gyulladásgátlók alapanyaga, amelyet a klasszikus úton REICHSTEIN-S acetátból állítottak elő, de a

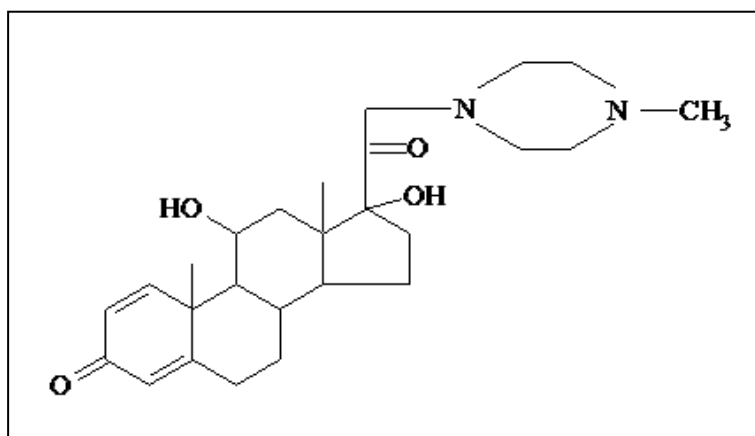


241. ábra A klasszikus gyulladásgátlók

11OH-etiszteronból is kialakítható. A hidrokortizon is hatékony gyulladásgátló, de kedvezőtlenül hat a só- és vízháztartásra, ezért kis módosítással **prednizolont** állítanak elő belőle, amely szintén jó gyulladásgátló, azonban kevesebb a mellékhatása. A harmadik kettős kötés bevitele az A gyűrűt „kifeszíti”, az eredetileg szék konformációjú gyűrű majdnem koplanárisá alakul, ettől megváltozik a molekula kötődése a receptorokhoz. Ezt az átalakítást további hormonanalógok kialakításánál alkalmazzák, lásd később az anabolikus szteroidoknál.

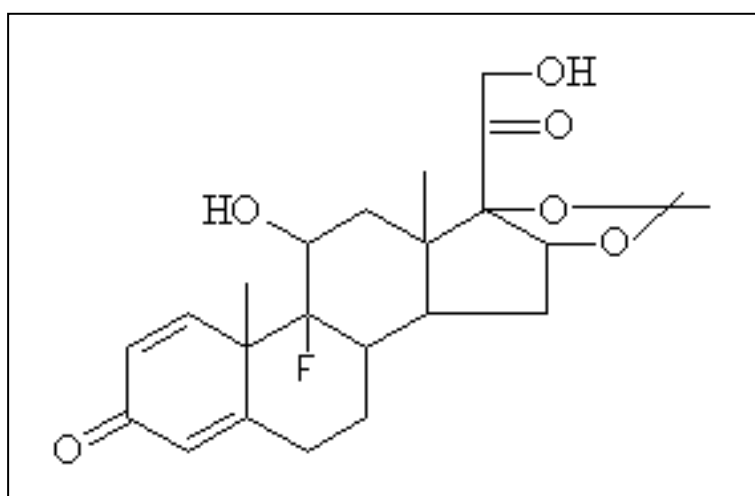
Érdekes mellékreakció, hogy a 20-keto vegyületek jelenléte indukálja egy 20-dehidrogenáz enzim termelését. Ez viszont a mind a szubsztrátot, mind a célterméket átalakítja, hatástalanítja. Ennek elkerülésére azt a trükköt alkalmazzák, hogy az indukcióra oldallánc nélküli vegyületet, például AD-t adnak, ennek hatására termelődik a Δ -1 dehidrogenáz, de a 20-dehidrogenáz nem. Amikor az enzimaktivitás eléri a maximumát, hozzáadják a szubsztrátot, és hogy az ezáltal indukált enzimtermelést megakadályozzák, egyidejűleg kloramfenikolt is adnak a fermentorba. Ez a fehérjeszintézist gátló antibiotikum leállítja az enzimfehérjék termelését.

A prednizolon vízoldhatósága különböző szubsztituensek hozzákapcsolásával növelhető:



242. ábra Depersolon

A prednizolonból állítják elő a FTOROCORT kenőcs hatóanyagát, a **triamcinolon-acetonid**ot:



243. ábra Triamcinolon-acetonid

14.6. Nemi hormonok

14.6.1. Androgén szteroid hormonok

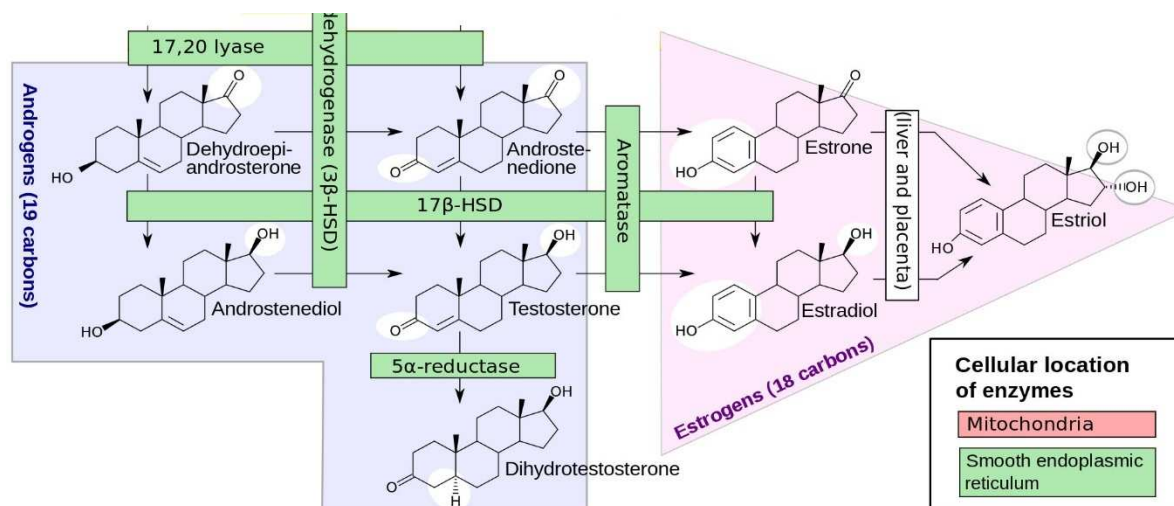
Ahogy a fejezet elején bemutattuk, a nemi működéseket szabályozó szteroid hormonok között elkülöníthetjük a férfi (androgén) hormonokat. Az androgén hatás az emberi szervezet számos működésében érvényesül:

- A férfi nemi szervek kifejlődése és növekedése
- A normális férfi szexuális működés fenntartása
- A másodlagos nemi jellegek kialakítása
- Szükségesek a hímivarsejtek éréséhez
- Megnövelik a vörös vérsjtek számát (androgén többlet)

Ugyanakkor ezen hormonoknak jellemzően van valamilyen mértékben anabolikus hatása is:

- Nitrogén visszatartás a szervezetben fehérjék formájában
- Izomtömeg növelése
- Fékezik a katabolizmust és a lebontó folyamatokat

Az emberi szervezetben az androgének bioszintézise jellegzetesen a molekula két végén az oxidációs állapot felcserélésével jár. A 3-OH csoport oxidálódik, a 17-ketocsoport pedig redukálódik. Érdeemes megjegyezni, hogy az ösztrogének, azaz női nemi hormonok a férfihormonokból képződnek. Androgén hormonok tehát a női szervezetben is képződnek köztitermék-ként, de tovább alakulnak ösztrogén származékokká. Míg a férfiakban a tesztoszteron képződése nagyrészt a herékben történik, a nőkben a májban és a petefészekben jelenik meg kis mennyiségű férfihormon. A változó korban a hormonális egyensúly eltolódásának egyik eleme, hogy a férfihormonok kisebb mértékben alakulnak át női hormonokká, és ettől a másodlagos nemi jellegek is férfias irányba tolnak el.



244. ábra A szteroid nemi hormonok bioszintézise

A férfi hormonok hatáserősségét összehasonlítva látható, hogy a legerősebb hatása nem a közismert tesztoszteronnak van, hanem a belőle képződő dihidro-tesztoszteronnak.

Az emberi szervezetben végbemenő bioszintetikus utak és az ipari gyártás reakciósora nem esik egybe. A humán út a koleszterinből indul, az ipari gyártásnál az AD a megfelelő kiindulási anyag. A korábban bemutatott gyártású androsztendion maga is a férfi nemi hormonok közé tartozik.

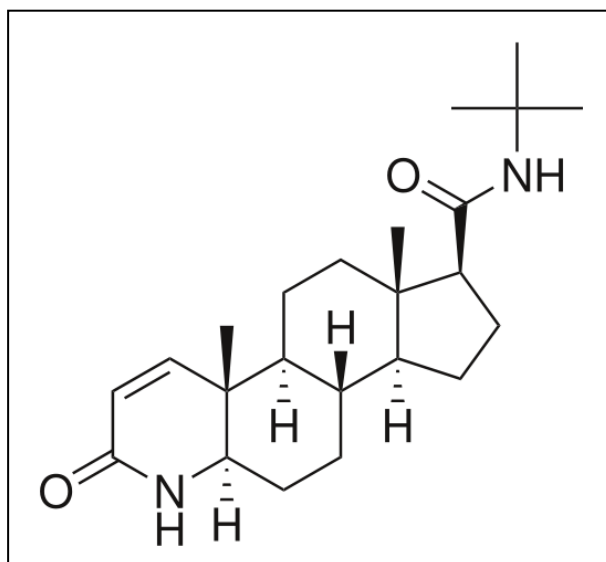
Hormon	hatás, %
tesztoszteron	100
5-dihidrotesztoszteron (DHT)	90-500
Androsztándiol	60
Androszténdion	20
Dehidro-epi-androszteron	10
Androszteron	10

35. táblázat Férfihormonok androgén hatásának összehasonlítása

Orvosilag az androgén hatásra csak extrém esetekben van szükség. Viszont szükség lehet az androgén hatás ellensúlyozására. Ez többféle mechanizmussal valósítható meg, lehet:

- Szerkezetanalóg molekulákkal lefedni az androgén receptorokat (lehetnek szteroid és nem-szteroid vegyületek)
- Megakadályozni az androgének képződését.

Ez utóbbira jellemző példa a finaszterid működése. Ez szerkezetanalógnaként, kompetitív inhibitoraként akadályozza a tesztoszteron → dihidrotesztoszteron átalakulást. Ezzel csökkenti a jóval nagyobb androgén aktivitású DHT termelését. Jóindulatú prosztatamegnagyobbodás ellen alkalmazzák, a csökkentett androgén hatás lassítja a prosztata növekedését. Gyártástechnológiájában kémiai és biokonverziós lépések egyaránt szerepelnek. Elsőként a progeszteront kell előállítani, ebből kémiai reakciókkal alakítják ki a finaszteridet. De alternatív útként lehetséges az 1-2 kettős kötés kialakítása *Corynebacterium* (*Arthrobacter*) *simplex*-el is. Ez a lépés analóg a hidrokortizon – prednizolon átalakításával.

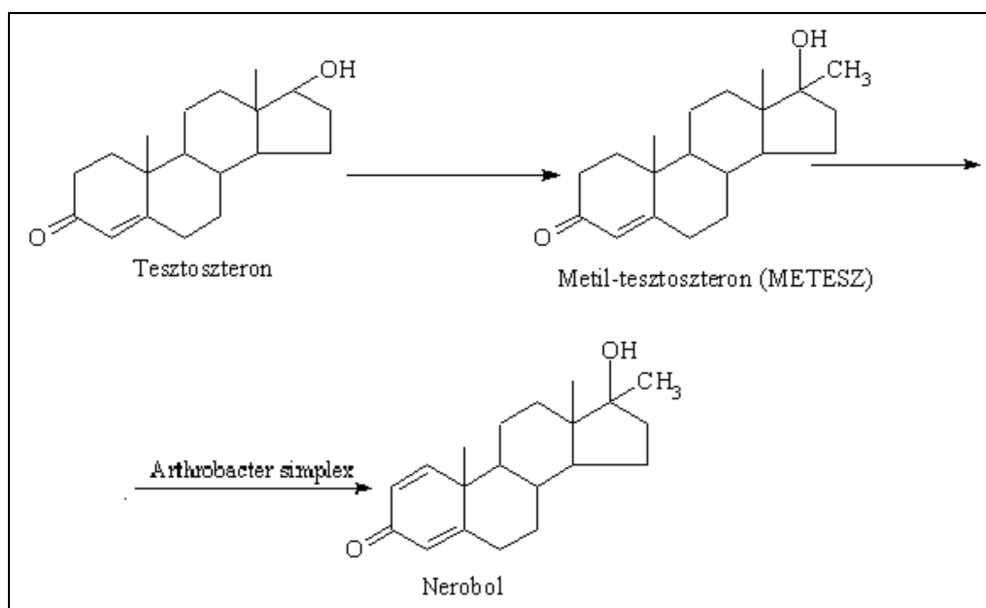


245. ábra A finaszterid szerkezete

14.6.1. Anabolikus doppingerek

A másik orvosi, terápiás cél lehet a roborálás (=felerősítés), vagyis ekkor az anabolikus hatás a kívánatos. Ehhez olyan származékokat keresnek, amelynél az anabolikus hatás nagyobb, az androgén pedig kisebb. Ezeket a szereket viszont egyes sportolók és a testépítők doppingszerként is alkalmazzák (Sztanozolol, Nandrolon). Valamennyi anabolikum tesztoszteron analóg, gyártásuk is a tesztoszteronból indul. A tesztoszteron az androszténdionból egy lépésben ketoredukcióval állítható elő. A konverziót szelektált *Saccharomyces cerevisiae* élesztő törzssel végzik.

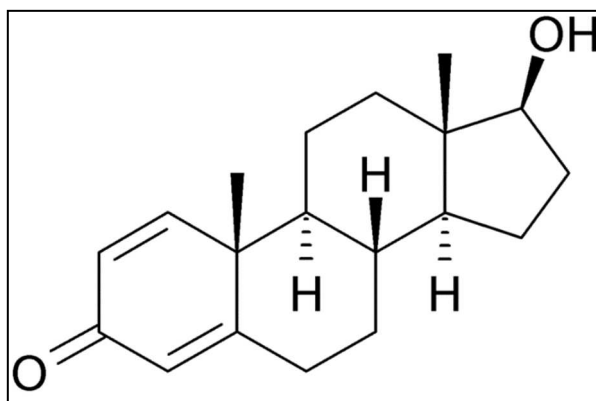
Magyarországon is gyártott anabolikus jellegű tesztoszteron származék a **Nerobol**, melyet roborálásra fejlesztettek ki, de doppingszerként is használják. Gyártása során a tesztoszteronból indulva előbb metilezik a 17 ponton, majd dehidrogénezéssel kialakítják az 1,2 kettős



246. ábra A Nerobol gyártási lépései

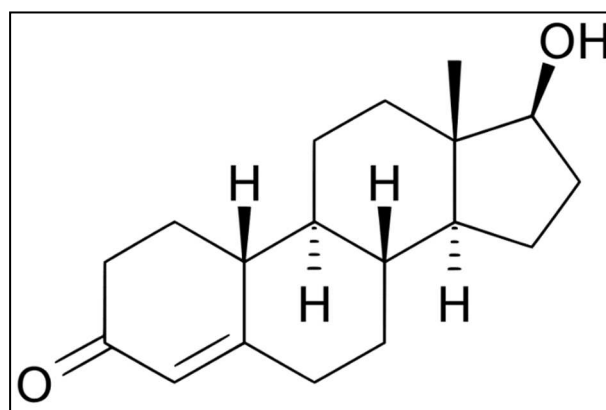
kötést. Ez a reakció analóg a hidrokortizon \rightarrow prednizolon átalakítással, ugyanazzal a *Corynebacterium* (*Arthrobacter*) törzssel végzik. Az A gyűrű a három konjugált kötés miatt síkba meredek, ennek eredményeként az anabolikus hatás megmarad, az androgén hatás viszont csökken

További anabolikus szteroid a **Boldenon**. Ez kimondottan lovak számára kifejlesztett anabolika, emberi használata nem engedélyezett, a mégis előfordul visszaélés. Tipikus androgén változásokat okoz, fokozza a nitrogén visszatartást, a fehérjeszintézist, növeli a vörös vérszámot. Doppingszerként való alkalmazását korlátozza, hogy nagyon hosszú ideig marad a szervezetben, még 18 hónap után is kimutatható. Gyártása két irányból is egyszerűen megoldható. ADD-ből egy lépésben 17-redukcióval, vagy tesztoszteronból 1,2-dehidrogénezéssel.



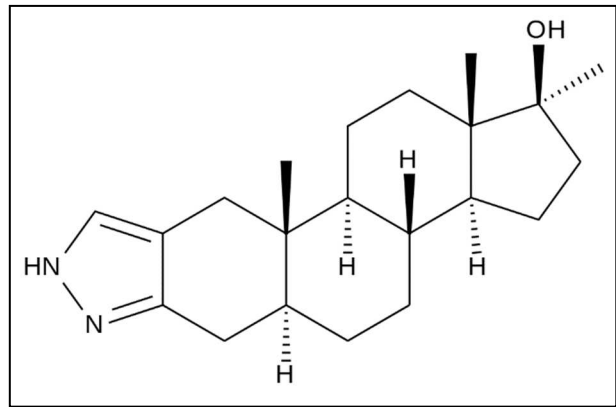
247. ábra Boldenon

A **Nandrolont** (19-nor-tesztoszteron) is eredetileg roborálószerként fejlesztették ki. Csontritkulásra, vérszegénységre és általános roborálásra adják idősebb hölgyeknek, a változó kor után. Általános anabolikus hatásai mellett jellemzően mindkét nemből károsítja a szexuális működést. Tesztoszteronból állítható elő a 19-metilcsoport eltávolításával, erre utal a kémiai névben a nor- előtag, ami egy szénatom hiányára utal.



248. ábra Nandrolon

A sporthírekben a súlyemelőknél sokszor előfordulni a Stanozolol dopping kimutatása. Ennél a molekulánál a D gyűrű szubsztituálása a metil-tesztoszteronnal analóg, az A gyűrűn viszont nitrogén az elektronszívó hetero-atom. A 17-metil csoport miatt a szert a máj nem bontja le, hosszú a féléletideje. Alkalmazásánál a szokásos anabolikus hatások lépnek fel, embernél és állatoknál egyaránt. Gyártása a dihidro-tesztoszteronból indul, szerkezetét több lépésben kémiai szintézissel alakítják ki.



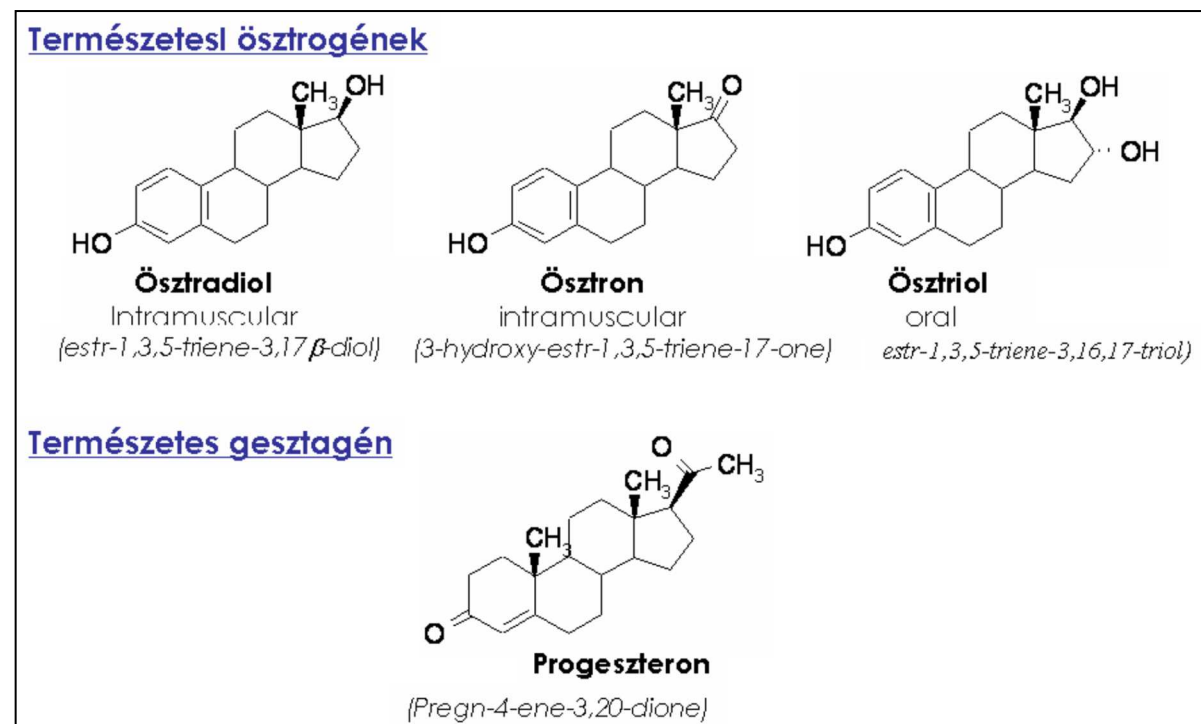
249. ábra Stanozolol

Érdekesség: a doppingvizsgálatoknál minden ellenőrzés bekerül a sportoló biológiai útlevelébe, és a változásokból is tudnak következtetéseket levonni. Az elemzésnél nem csak az egyes hormonok és analógok koncentrációját mérik, hanem azok arányát is figyelik. Például a tesztoszteron szint mellett figyelik a dehidro-epi-androszteron (intermedier metabolit) és a tesztoszteron arányát is. Ebből lehet következtetni arra, hogy a vizsgált személy szervezetében lévő tesztoszteron természetes úton szintetizálódott-e a szervezetben, vagy kívülről adták be. Ennek határszáma hosszú időn keresztül hat volt. Egy bizonyos személynél éveken át ezek az értékek éppen a határ alá, 5,5-6,0 közé estek. A WADA néhány évvel ezelőtt megváltoztatta a szabályozását és a határértéket lecsökkentette négyre. Különös módon az adott személy mintáiban ettől kezdve az arány 3,5 és 4,0 közé esett. Következtetés: a versenyző nyilván kapott tesztoszteront, de olyan jó orvosi/laboratóriumi háttérrel rendelkezett, hogy a szint mindig a határérték alatt maradt.

14.6.2. Női szteroid hormonok

A női nemi működéseket szabályozó szteroid hormonok két, eltérő szerkezetű és hatású csoportba sorolhatók:

1. A természetes ösztrogének (C18 szteroidok) fiziológiai szerepe:
 - A női nemi szervek kifejlődése
 - A másodlagos nemi jellegek kialakítása (női, férfi)
 - A peteérésben és a fogamzásban
 - A csontsűrűség szabályozásában (női, férfi)
 - Anyagcserében
2. A természetes gesztagének (C21 szteroidok) fiziológiai szerepe:
 - A terhesség megtartása
 - A peteérés és ovuláció gátlása
 - A spontán méhösszehúzódások gátlása

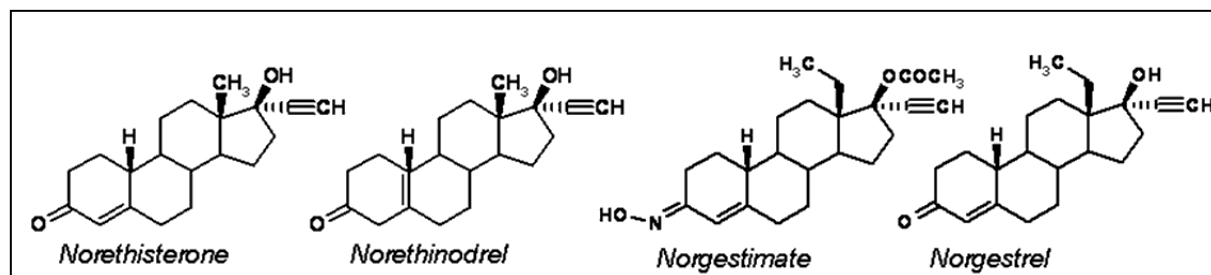


250. ábra Női nemi szteroid hormonok

A progesteron a „terhességet megtartó” hormon. Ennek szintetikus szerkezet-analógiáit alkalmazzák hormonális fogamzásgátlásra. A hormonális fogamzásgátlás a gesztagén hatáson alapul: a szintetikus progesteron analógok „elhitetik” a szervezettel, hogy a fogamzás megtörtént, így az újabb peteérésre nincs szükség.

Az egykomponensű tabletták csak progesztagén hatóanyagot tartalmaznak.

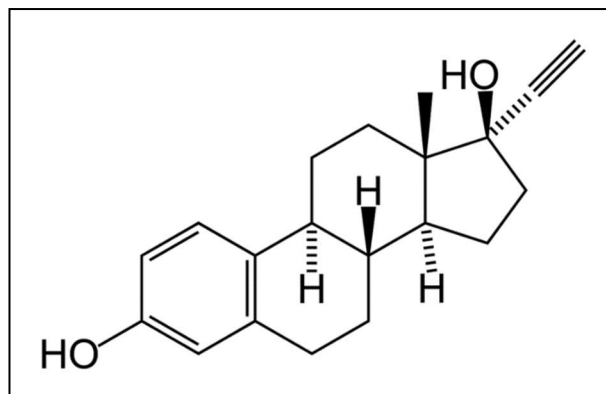
Ezek részben 19-nor-szteroidok (a 19-es metil csoport hiányzik), illetve más, szintetikusan előállított származékok.



251. ábra 19-nor-szteroidok

Szerkezetükben a természetes 17 α OH-progesteronra hasonlítanak, a 20 és 21 szénatomot az etinil csoport helyettesíti.

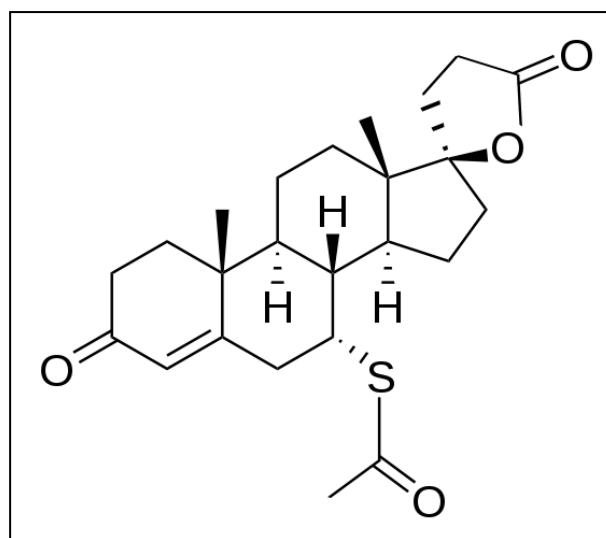
A kétkomponensű tabletták a progesztogén hatóanyag mellett egy ösztrogén típusú molekulát is tartalmaznak. Ezek változó arányával (két, illetve három szakasz a szedési ciklusban) jobban modellezik a női hormonális ciklust. Ez lehet például az etinil-ösztradiol. A B-C-D gyűrűk a Norethinodrellel azonosak, de az A gyűrű viszont az ösztrogénekre jellemzően aromás, a 3 pozícióban fenolos OH csoport van rajta.



252. ábra Etinil-ösztradiol

14.7. Mineralokortikoid antagonisták

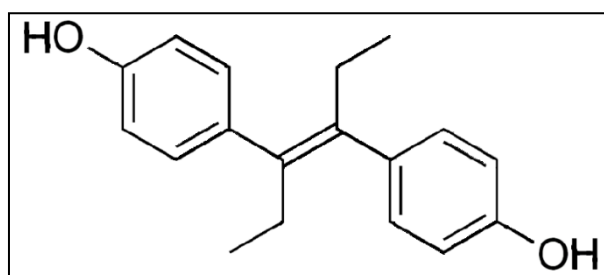
A szteroid hormonok külön csoportja hat a víz- és ionháztartásra. A veseműködés befolyásolására alkalmas szerkezetanalóg a Spirinolakton. Kompetitív inhibitorként lefedi az aldosteron receptorokat a vesében. Ennek megfelelően vízajtó hatású, de más vízajtókkal ellentétben hatása nem jár kálium ion veszteséggel. Gyártásának kiindulási anyaga az etiszterol, több kémiai átalakítással (lánc-hosszabbítás CO₂ kötéssel, hidrogénezés, gyűrűzárás, reakció tioecetsavval) alakul ki a végső szerkezet.



253. ábra Spirinolakton

14.8. Szintetikus szteroid(analóg)ok

A biológiai, biokonverziós technológiák mellett folyamatosan dolgoztak azon, hogy kémiai szintézissel hozzanak létre hormonhatású szteroid analógokat. Ezen a területen általános tanulságokkal szolgál a sikeres fejlesztésnek induló, engedélyezett gyógyszer, a dietil-sztilbösztrol esete. 1940 és -70 között használták ösztrogén analógnaként, több célra, pl. terhes nőknek adták a vetélés kockázatának csökkentésére. Nem kívánt mellékhatásaira csak egy generációval később derült fény. A vizsgálatok kimutatták, hogy az így kezelt terhességek-ből született gyermekeknél mindkét nemből rendellenességek jelentek meg. A

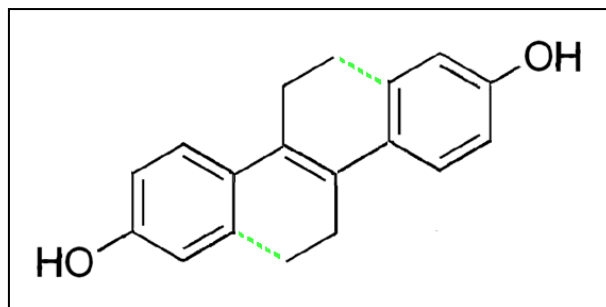


254. ábra Dietil-sztilbösztrol

leánygyermeknél egyes adenokarcinómák gyakorisága a negyvenszeresére nőtt a hasonló korcsoporthoz képest. A fiúknál testi- és mentálisan is csökkent a férfias jelleg.

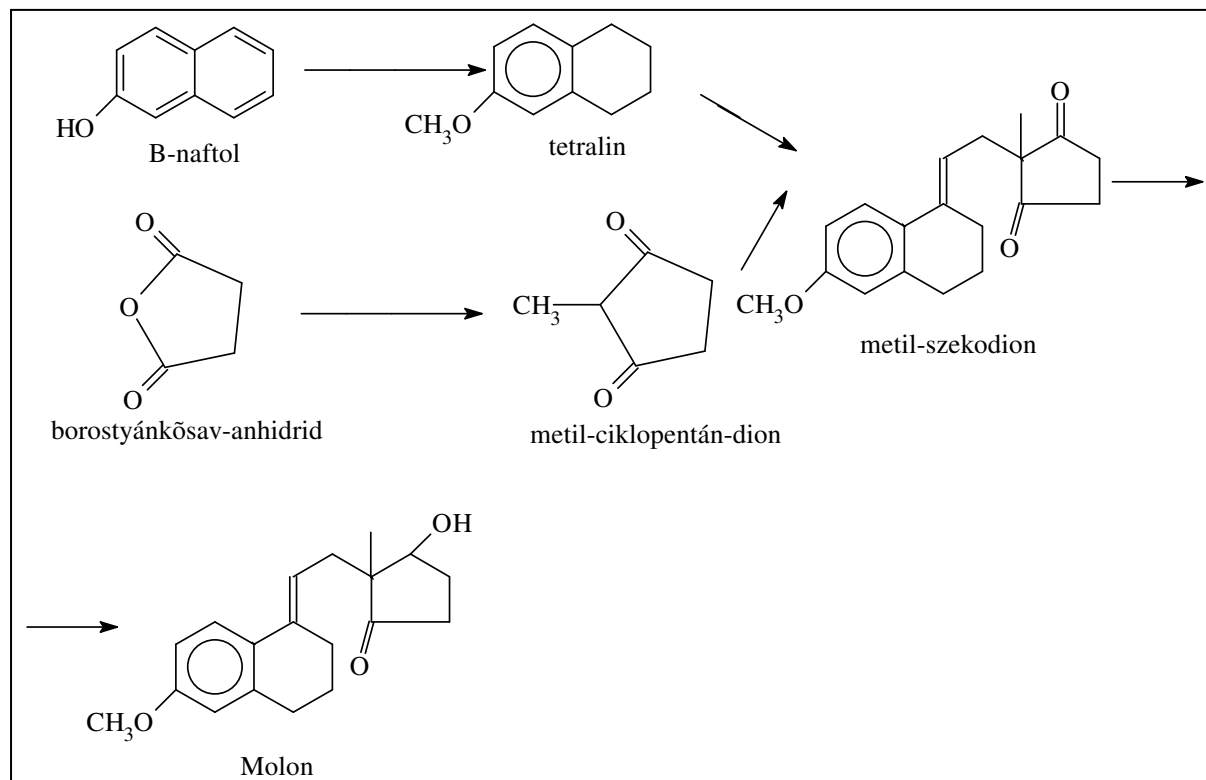
Végül is nem vonták vissza, mint gyógyszert, csak 1971-ben megtiltották használatát terhes nők esetében. A hölgyeknek a változó kor után adható csontritkulás és egyéb tünetek ellen.

A 254. ábrán bemutatott szerkezet alapján első ránézésre még a szakember számára sem világos, hogy ez a molekula mennyiben hasonlít a szteroidokra. A képletet tükrözve és segédvonalakkal ellátva viszont már egyértelműen látszik a hasonlóság.



255. ábra A dietil-szilbösztrol - átrajzolva

E fejezet bevezetésében azt mondtuk, hogy a szterán váz előállítása nagyon bonyolult, ezért végzik a gyártást biológiai eredetű szteroid alapanyagok konverziójával. Ugyanakkor a szterán vázat – pontosabban az ösztrogének aromás A-gyűrűs szerkezetét – fel lehet építeni kémiai szintézissel is.



256. ábra A metil-szekodion előállítása

Egy ilyen technológiával csak azért foglalkozunk, mert ebben a folyamatban is van egy biokonverziós lépés.

A szintézis β -naftol és borostyánkősav-anhidrid alapanyagból indul. A naftolon metilezik az OH csoportot, majd részleges hidrogénezéssel tetralint képeznek. Oxidáció után egy vinil-csoportot visznek be. A borostyánkősav-anhidridből metil-ciklopentán-diont állítanak elő. A két molekula összekapcsolásával jön létre a metil-szekodion. A szeko- előtag a vegyületben egy nyitott gyűrűre utal, itt a C gyűrű nyitott, a 8-14 kötés hiányzik. Ezután következik a biokonverziós lépés, a két keto-csoport egyikét sztereoselektíven redukálják a *Saccharomyces*

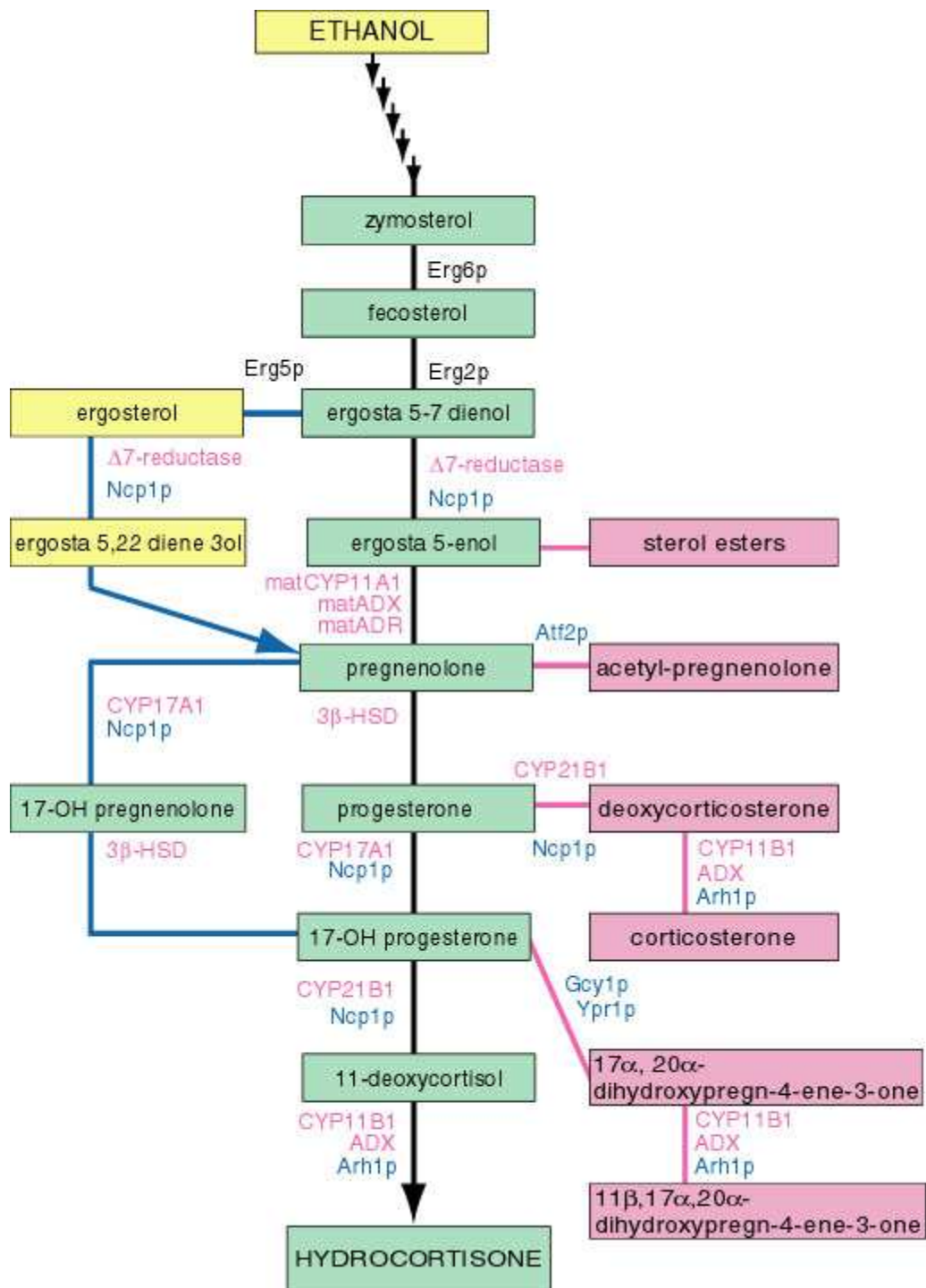
bayanus törzssel. A reakció analóg az androszténdion → tesztoszteron átalakítással, ugyanazokkal a szelektált élesztőtörzsekkel végzik. A terméket rövid néven molonnak nevezik. Ezt követően újabb kémiai lépések következnek, a kapott OH csoportot acilezéssel megvédik és a ketocsoporton keresztül bezárják a C gyűrűt. További reakciókkal el lehet jutni az ösztradiol-metiléterhez. Gyártják az 13-etil származékot is, előállításuk teljesen analóg a módon történik, etil-ciklopentán-dionból.

14.9. Törzsfelnevelés

A szteroid konverziós törzseknél a klasszikus törzsfelnevelési módszereket alkalmazták. Az elsődleges technika a vad törzsek szelektálása, screening-je. Ez munkaigényes, nehezen tervezhető folyamat, amiben analógiák és félempirikus módszerek segítik a kutatót. Ha már megvan egy megfelelő enzimaktivitású törzs, akkor azt a klasszikus genetikai módszerekkel fejlesztik tovább. Indukált mutációval el lehetett távolítani a nemkívánatos mellékaktivitásokat, illetve javítani a konverzió sebességét, hatásfokát.

A modern genetikai módszereknek is megvan az alkalmazási területe. A konverziós enzim termelését fokozni lehet például egy erősebb promóter beépítésével. Másik lehetőség, hogy az alapvetően induktív enzim termelését konstitutívá tesszük, termelését állandósítjuk.

Több, elsősorban francia kutatócsoport közös célul tűzte ki a de novo szteroid termelést heterológ expresszióval. Célul a hidrokortizont (kortizol) választották. Összehangolt munkával több év alatt sikerült egy élesztő törzsbe beépíteni a szükséges nyolc emlős gént. Emellett meg kellett oldani az élesztő önját génjének inaktiválását is, mivel ezek félrevitték volna az anyagáramot. Végül sikerrel jártak, a törzs laboratóriumi körülmények között közel 10 g/l kortizolt termelt. Az eredmény több igen rangos tudományos elismerést kapott, de az azóta eltelt évtizedben évben ipari alkalmazásáról nem jelent meg információ.

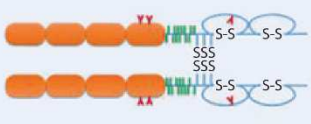
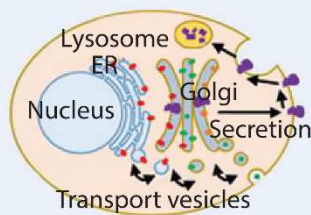




257. ábra Hidrokortizon termelése élesztőben, heterológ expresszióval

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA

A következő termékcsoporthoz, aminek gyártását megvizsgáljuk a rekombináns fehérjék köre. Mit is jelent ez? Nem a sejt saját genomjában szereplő, az evolúció által kialakított fehérjét termeltetünk, mint az enzimeknél, hanem olyan fehérjét állítunk elő biotechnológiai úton, amelyeknek kódoló DNS-ét mesterségesen, célzott génmanipulációval vittük be a termelő organizmusba. A rekombináns DNS technikával termeltetett fehérjék, röviden rekombináns fehérjék termelő törzseinek létrehozása a törzsfelisztés következő szintje, a „targeted metabolizmus”, 5. ábra). E termékek tárgyalásánál annyiban térünk el az eddigiektől, hogy szétválasztjuk a Biotermék technológiát. Előbb általánosságban vizsgáljuk meg a rekombináns fehérjék által megkövetelt technológiai megoldásokat és csak azután térünk át esettanulmányyszerűen az egyes konkrét termékek tulajdonságaira, gyártására és felhasználására. Nem egy-egy technológia specifikus érdekességeit tárgyaljuk, hanem a sok gyártásban előforduló közös elemeket, amelyeket érdemes az adott terméktől és technológiától függetlenül, műveletként vagy műveletsorként vizsgálni. Ezután jönnek a biotermékek, a konkrét technológiák, esettanulmányok vizsgálatánál már csak az általános megoldások konkrét, egyedi alkalmazását kell megmutatni.

A közös részfolyamatok áttekintésénél is követjük a bevezetésben felvázolt sémát, vizsgáljuk a termék tulajdonságait, a termelő törzset, a fermentációt (upstream), és a feldolgozást (downstream processing). Ezzel a sorrenddel követjük a technológia kifejlesztésének menetét (4. ábra újra).

Protein		Molecule design N-linked glycan recognition sequence C-terminal peptide Polysialylation acceptor Linker sequence
Cells		Host selection Strain engineering Glycosyltransferases Glycosidases
Upstream		Growth conditions Temperature, pH, CO ₂ , NH ₄ Additives Inhibitors Precursors
Downstream		Chromatography Anion exchange Hydrophobic interaction Hydroxyapatite

258. ábra A rekombináns fehérjék gyártásának fejlesztési lépései

15. Rekombináns fehérjék gyártásának technikai megoldásai

Fehérjék esetében ezek a szakaszok összetettebbek, az első két fázis további részfeladatokra osztható:

1. A molekula megismerése, megtervezése (aminosavsorrend, glikozilálás)
2. Megfelelő analitika kidolgozása
3. Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról
4. Kodonoptimálás
5. A génszerelvény összeállítása (promóterek, operátorok, célgén, kísérő fehérjék, terminátor)
6. Klónozás, expresszió, szelekció
7. Sejtbankok létrehozása

15.1. A molekulától a termelő törzsig

15.1.1. A molekula megismerése, megtervezése

Termékünk pontos ismerete különösen fontos a rekombináns fehérjéknél. Nem lehet megúszni a hosszadalmas és drága vizsgálatokat:

- Az aminosav sorrend elemzés (MS – MS)
- A glikozilációs mintázat elemzése (MS – MS), izoformák előfordulása
- A másodlagos/harmadlagos szerkezet felderítése (legalább a diszulfid hidak), (Röntgen-krisztallográfia)
- Domén-szerkezet,
- Természetes érési/aktiválási útvonal
- Aktiváló/inaktiváló hatások, bomlékonyság

15.1.2. A megfelelő analitika kidolgozása

Az analitika a „szemünk”, amivel követhetjük a fejlesztés minden lépését. Már a fejlesztés elején megfelelő érzékenységű módszereket kell kidolgozni a fő és melléktermékekre. Ezzel elkerülhetjük az olyan kellemetlen meglepetést, hogy már a tisztítás kidolgozása után derül ki, hogy a termékünk nem egységes, hanem több komponensből áll, kezdhetjük előlről a downstream optimálását.

Az analitikai vizsgálat irányulhat a molekula fizikai-kémiai tulajdonságaira (töltés, méret, polaritás, optikai tulajdonságok), pl. a kromatográfiás, elektroforézises, MS-MS módszerek. Másrészt vizsgálhatjuk a fehérje hatásosságát, biokémiai aktivitását, immunanalitikával, szövettényeszetekken, avagy kísérleti állatokon.

Példa1: inzulin vizsgálata. Azonos-e termelt rekombináns inzulin az emberi szervezet által termelttel? A lehetséges módszerek:

Kémiai analízis:

HPLC elválasztás, retenciós idő alapján

- Egész molekula felvitele. Azonosítható a csúcs, kvantitatív mérésre is alkalmas, de kicsi a felbontása. Az 51 aminosav mellett pl. egyetlen aminosav cseréje vagy hiánya alig észlelhető.
- Hasítás után (fingerprint technika). A V8 proteáz (szelektív endoproteáz) ötfelé hasítja az inzulin molekulát, és az öt kisebb peptid retenciójában már a kis különbségek is előjönnek. Ráadásul az eltérés helye is behatárolható.

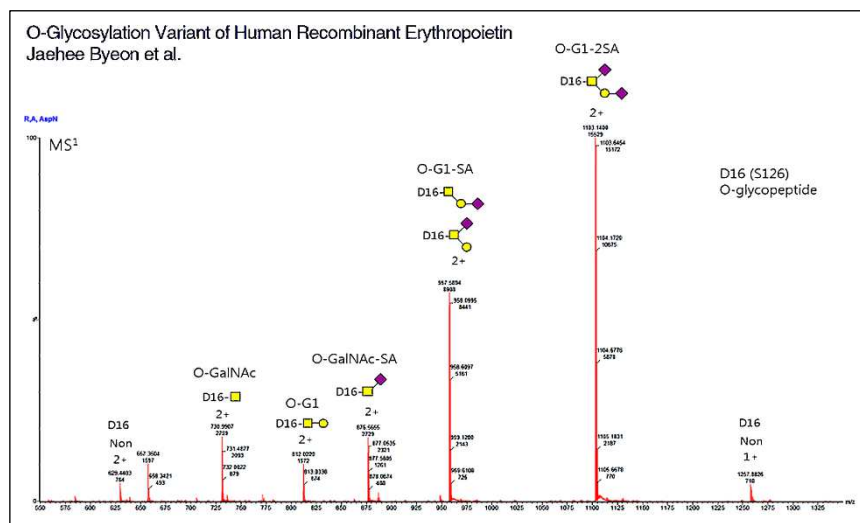
Teljes aminosav-analízis (hidrolízis után). Az aminosavak százalékos arányát adja meg, a számbeli eltéréseket lehet kimutatni.

Biológiai hatás:

Vércukorszint-csökkenés nyúlban. Adott mennyiségű fehérje beinjekciózása után mennyivel változik meg az állat vércukorszintje. Lassú, drága és állatvédelmi szempontból sem elfogadható mérés.

Immunanalitika: Specifikus ellenanyagokkal az inzulin komplexbe vihető és ez egy színreakcióval követhető.

Példa2: rekombináns eritropoietin hormon O-glikozilációs láncának MS-felvétele. A nagyfelbontású tömegspektrométerrel jól azonosíthatók az izomer és hiányos izoformák.



259. ábra Rekombináns humán eritropoietin O-glikozilációs láncainak MS felvétele

15.1.3. Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról.

Még a génmanipuláció előtt fontos döntés a megfelelő gazdaszervezet kiválasztása. Nem csak a genetikai átalakítás módját és nehézségét kell figyelembe venni, hanem a termelődő fehérje hatékonyságát, mennyiségét és gazdaságosságát is. A sokféle lehetőséget három fő csoportba sorolhatjuk be:

15.1.3.1. Prokarióták (baktériumok)

A rekombináns fehérjék termelésénél, ahol csak lehetséges, előnyben részesítették a prokariótákat, közöttük is az *Escherichia coli*-t, mivel használatuk számos előnnyel jár. Nagy a növekedési sebességük, egyszerű, olcsó tápoldatot igényelnek, könnyen kezelhetők, nagy hozamok érhetők el alacsony költségek mellett. Ugyanakkor a prokarióta gazdaszervezeteknek megvannak a sajátos hátrányai is. A termék sokszor intracelluláris, és nem is oldatban van, hanem szilárd szemcse, zárványtest (inclusion body) formájában keletkezik, ami megnehezíti a feldolgozási műveletsort (downstream processing). A baktériumok (a *Campylobacter jejuni* kivételével) nem képesek a fehérjék poszttranszlációs módosítására, elmarad a folding, a glikozilálás, és sokszor a diszulfid hidak kialakítása is. Zavart okozhat a plazmidvesztés, a téves indukció és az endotoxin termelés is. A prokarióták esetében eltérő a tRNS-ek előfordulási gyakorisága, így a transzláció sebessége sokkal lassabb lehet, mint az eukariótáknál, emiatt kodon-optimalizálás szükséges.

15.1.3.2. *Élesztők*

Az élesztők is gyakran használt gazdatörzsek, mert egyrészt mikroorganizmusok, azaz könnyen fermentálhatók, másrészt eukarióták, azaz képesek a termelt fehérjék posztranszlációs módosítására, foszforilálásra, O- és N-glikozilációra, acetilezésre és acilezésre. A rekombináns fehérjéket oldható formában fejezik ki, és funkcionálisan aktív formába hajtogatják. A termelt glikoproteinek humán terápiás alkalmazásánál viszont gyakori probléma, hogy az élesztő N-glikozilálása „high mannose” típusú. Ez egyrészt hiper-immunogénné teszi a fehérjét, másrészt megváltoztatja az in vivo felezési időt. Az élesztők „fukarok” abból a szempontból, hogy kevés fehérjét választanak ki a környezetbe. A termeltetett rekombináns fehérje is alapesetben intracelluláris lesz, a sejten belül marad, ami sejtfeltárást, és utána bonyolultabb tisztítást tesz szükségessé. Ez a nehézség kiküszöbölhető, ha a fehérje génje elé egy megfelelő szakaszt, egy leader faktor gént illesztünk. Az élesztők közül a legtöbb technológia a *Saccharomyces cerevisiae*-re épül, annak ellenére, hogy a *Pichia pastoris* több szempontból is kedvezőbb lenne. Ennek elsősorban az az oka, hogy a már engedélyezett törzsekre az újabb technológiáknál a hatóságok könnyebben megadják az engedélyt, kevesebb vizsgálatot írnak elő.

15.1.3.3. *Állati sejtenyészetek*

Számos humán terápiás fehérjét, így hormonokat, vérfehérjéket, monoklonális antitesteket emlős sejtvonalakkal termelnek. Leggyakrabban a CHO (=chinese hamster ovary, kínai hörcsög petefészek) és BHK (=baby hamster kidney, újszülött hörcsög vese) sejtvonalakat használnak. Az emlős sejtekben kifejezett rekombináns fehérjék reprodukálják a legjobban a kiválasztott humán fehérjét. Foldingjuk és glikozilációs mintázatuk alig megkülönböztethető, legfeljebb az izoformák arányában van eltérés. Az így kapott fehérje funkcionálisan aktív és a szervezeten belüli viselkedése (pl. félléletidő) is azonos. Ugyanakkor ennek a gazdasejt típusnak is megvannak a hátrányai. A sejtek nagyon „kényesek”, igen drága, pontosan összeállított tápoldatot és magas műszaki színvonalú berendezéseket igényelnek. A folyamat lassú, sokszor egy hónapig is eltart. Ennek megfelelően a gyártási költségek igen magasak.





















A sejtvonalak nagy része csak felülethez kötve növekszik, azon egy sejt vastagságú réteget képez (monolayer). Emiatt szaporításukhoz speciális tenyésztő edényekre van szükség. A további rétegek kialakulását a *kontakt gátlás* akadályozza meg. Ha a sejtek a növekedés során egymással érintkeznek, akkor abban az irányban nem terjeszkednek tovább. Ez a gátlás a tumorsejtekénél nem érvényesül. Létezik néhány módosított sejtvonal, ami szuszpenzióban is szaporodik (CHO, BHK, VeRo, HeLa), ezeknél a klasszikus, fermentorszerű készülékek alkalmazhatók.

A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztódik az izolálást követően, azaz a tenyészet előregszik (szeneszcencia). Ezeknél a sejtvonalaknál törzskönyvszerűen nyilván kell tartani, hogy hány osztódáson esett már át az adott tenyészet, és még hány osztódás várható kellő vitalitással. Csak a tumor- és a rovarsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).

Általában emlős sejteket tenyésztenek, de előfordul madár és rovar sejttenyésztése is.

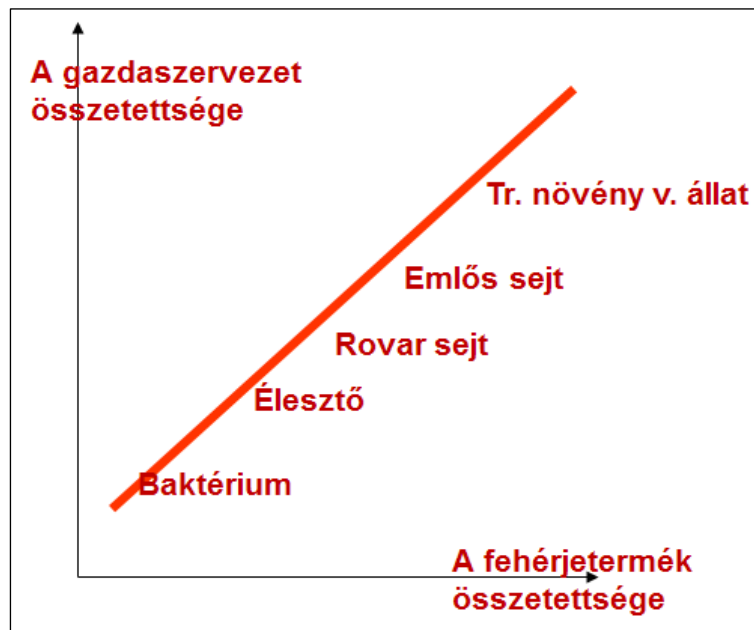
Rovarsejtek tenyésztése

A teljesség kedvéért meg kell említeni a rovarsejt tenyésztéseket is, bár használatuk az ipari léptékű technológiákban minimális. Közös jellemzőjük, hogy jóval ellenállóbbak, robusztusabbak az emlős sejtekénél, azaz tenyésztésük olcsóbb lehet. Ugyanakkor anyagcseréjükben, annak szabályozásában nagyon távol állnak a gerincesektől.

	LOW			HIGH
SPEED	 MAMMALIAN	 BEVS/INSECT CELL	 YEAST	 BACTERIA
COST	 BACTERIA	 YEAST	 BEVS/INSECT CELL	 MAMMALIAN
TYPICAL YIELD	 MAMMALIAN	 BEVS/INSECT CELL	 BACTERIA	 YEAST
POST – TRANSLATION MODIFICATION	 BACTERIA	 YEAST	 BEVS/INSECT CELL	 MAMMALIAN
FDA APPROVAL	 BEVS/INSECT CELL	 YEAST	 BACTERIA	 MAMMALIAN

260. ábra A különböző gazdaszervezetek összehasonlítása

Általánosságban elmondhatjuk, hogy az egyre komplexebb, bonyolultabb élő szervezetek egyre bonyolultabb, komplexebb fehérjéket állítanak elő.

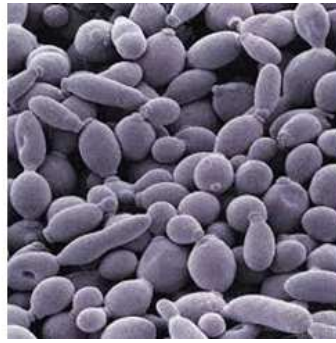


261. ábra Az élő szervezetek és fehérjék komplexitása

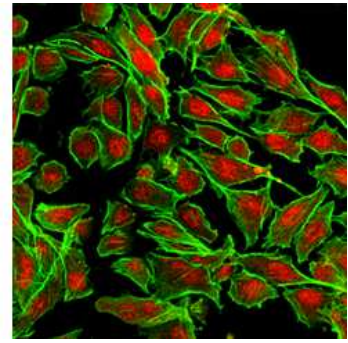
A jelenleg jóváhagyott technológiák 95%-a ezt a három gazdaszervezetet használja:



262. ábra *E. coli*

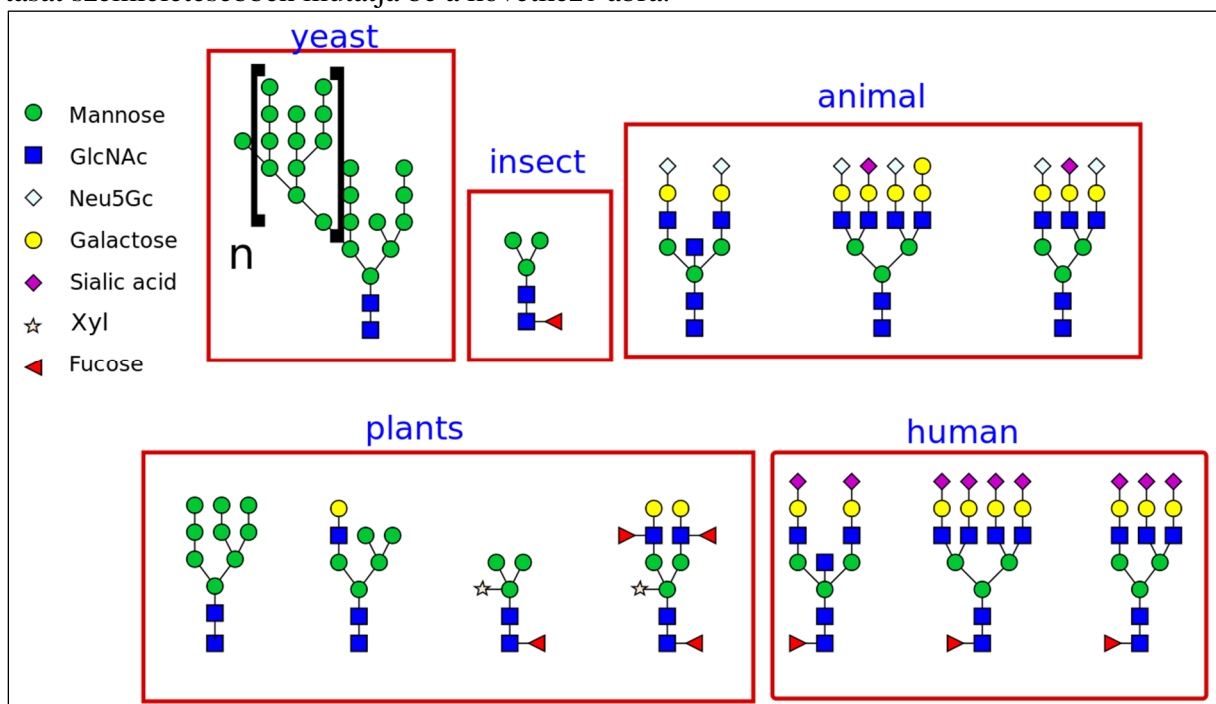


S. cerevisiae



Chinese Hamster Ovary, CHO

Mindegyik gazdaszerv típusnál megemlíttük a glikozilálás módját, de ezek összehasonlítását szemléletesebben mutatja be a következő ábra.



263. ábra A különböző eukarióták jellemző glikozilációs mintázatai

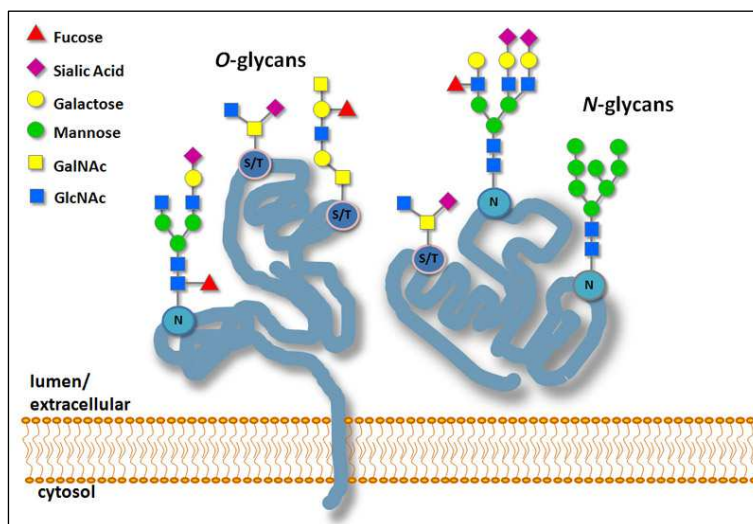
Látható, hogy az oligoszacharidok alsó négy „szintje” konzervatív, minden eukariótában azonos. Efölött az élesztősejtek akár több tucatnyi mannóz molekulát is ráépítenek a fehérjékre. A növényi sejtek által termelt fehérjék cukorláncai igen változatosak, gyakran tartalmaznak fukózt és xilózt. A rovarok egyszerű kis cukorláncokat alakítanak ki. Az emlős és humán fehérjék szénhidrát részei a legösszetettebbek. Teljes kiépítésben hétszintesek, a negyedik szinten két-, három- vagy négyfelé ágaznak el. Az ötödik-hatodik „szint” az emlősöknél közös, erre épülnek rá a fajra és az adott fehérjére jellemző „dekoráló” cukrok. A legfelső szinten cukorsavak (pl. neuraminsav származékok) jellemzőek.

15.1.4. Fehérjék glikozilálása

Amint az előzőekben láttuk, a fehérjék biológiai aktivitásához nemcsak az aminosavlánc megfelelő elsődleges, másodlagos és harmadlagos szerkezete szükséges, hanem a lánchoz kapcsolódó oligoszacharidok mintázata is hozzájárul a működéshez. Ezért a tananyagban belül tegyünk egy kitérőt és vizsgáljuk meg a glikozilálás folyamatát.

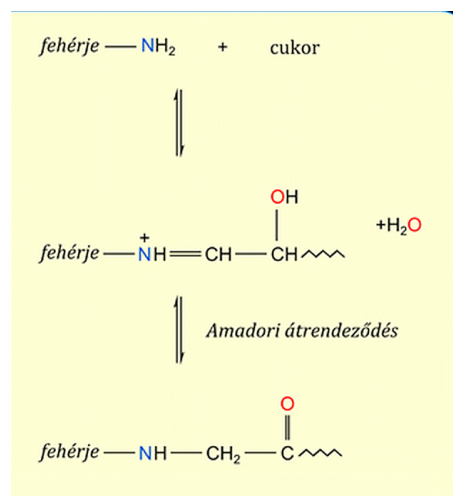
A cukorrészek az aminosavlánc elkészülte után kerülnek rá a molekulára. Ez csak bizonyos funkciócsoporthoz rendelkező aminosavakon lehetséges. A kötődési pont szerint a glikozilálás kétféle alaptípusát különböztetjük meg. A két típus kialakulási mechanizmusa is eltérő.

- **N-glikozilálás:** az Asn-X-Ser/Thr/Cys aminosavhármashoz az asparagin savamid nitrogénjén kapcsolódik. Az X bármely aminosav lehet, a harmadik pedig egy poláris csoportot tartalmazó aminosav.
- **O-glikozilálás:** Ser vagy Thr aminosav -OH csoportján kapcsolódik.



264. ábra N- és O-glikánok

Fontos megkülönböztetni a glikozilálás és a glikáció folyamatát. A kettő nem azonos, bár mind a kettő cukor molekula kapcsolódása egy fehérjéhez. Az előbbi a fehérje érésének része és a sejt membránszerveiben enzimek katalízissal, célzottan végbemenő, viszonylag gyors folyamat. A glikáció viszont egy spontán kémiai, nem-enzimes folyamat, ami utólag, a fehérje működése során, lassan, napok, hetek, hónapok alatt fokozatosan megy végbe. A redukáló cukrok (glükóz, fruktóz, galaktóz) aldehid csoportja Schiff-bázist képezve reagál a fehérjék valamely $-NH_2$ csoportjával. Ez később lassan átalakul Amadori terméké. Példa: a hemoglobin A-láncának N-terminális valinjára glükóz (a vércukorból) kapcsolódik. A vörös vértest három hónapos élettartama alatt a hemoglobin tartalom egyre nagyobb hányada alakul át HgA1c terméké. Az átalakulás sebessége függ vércukorszinttől,



265. ábra A glikáció folyamata

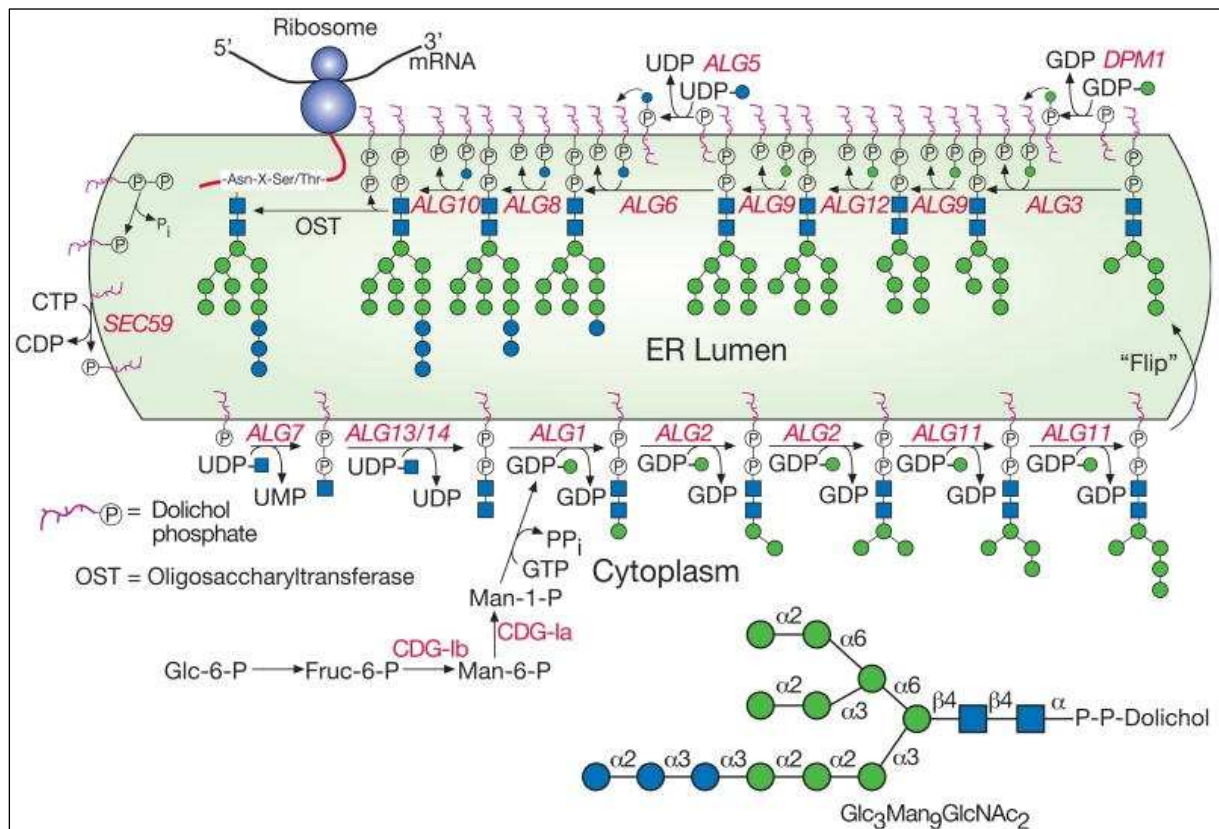
így az arányból vissza lehet következtetni a háromhavi átlagos vércukorszintre, ami a diabetesznél fontos diagnosztikus jellemző.

15.1.4.1. N-glikozilálás

A fehérjékben előforduló Asn-X-Ser/Thr triádoknak csak mintegy kétharmad részéhez kapcsolódik cukorrész. A továbbiak sztérikus okok vagy az X aminosav savas jellege miatt fedetlenek maradnak.

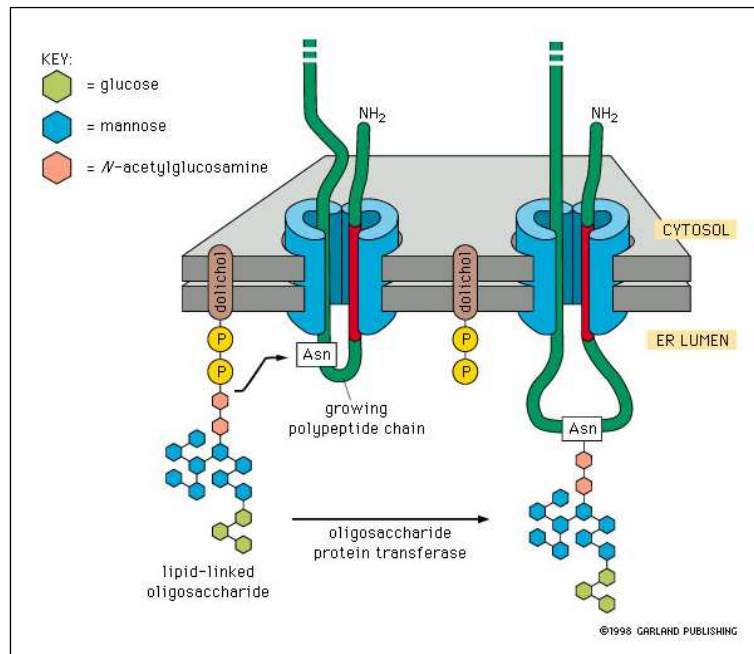
Az N-glikozilálás során nem egyesével épül fel a monomerekből a cukorrész a fehérjén, hanem egy 14 cukor egységből álló egység helyeződik át a nitrogén atomra. Ennek a bioszintézise soklépéses folyamat. A 14 cukoregységből álló oligoszacharid szerkezet lépésről lépésre alakul ki, és ez lép át a fehérje megfelelő N-atomjára. A bioszintézis az ER membránjába horgonyozott dolichol (poli-izoprenil-pirofoszfát molekula, 16-21 izoprén egységből áll) templáton megy végbe. Ez erősen apoláris molekula, a lipid kettősréteg belsejébe illeszkedik, a pirofoszfát csoportot a belső és a külső térbe egyaránt ki tudja „nyújtani”, és a pozícióját megváltoztatni (flip-flop mechanizmus).

Az első hét egység ráépülése az ER külső felületén történik, aztán „befordul” a lumenbe (flip) és ott folytatódik a másik hét cukorrész hozzákapcsolásával. A citoplazma felől a monoszacharidok aktiválva, nukleotidokhoz (UDP, GDP) kötött formában érkeznek a szintézisbe. A második szakaszban, a lumenben viszont egy másik dolichol molekula közvetítésére van szükség. A nukleotidok a citoplazma oldalon átadják a cukor molekulát egy, a membránba horgonyozott dolichol-monofoszfátnak. Ez átzsilipeli (flip) a poláris molekularészt a lumen oldalra és innen tevődik át az épülő oligoszacharid végére.



266. ábra A 14-tagú oligoszacharid kialakulása

Ha kész a cukor-”legező”, akkor ez kerül át a fehérje megfelelő nitrogénjére. A képződő fehérjét a riboszóma a transzlokonon keresztül egyre táguló hurok formájában tolja be az ER-be. Az oligoszacharid-transzferáz (OST) enzim a transzlokon mellett „figyeli”, hogy a betolódo fehérje láncon mikor jelenik meg az Asn-X-Ser/Thr hármás. Ennek felbukkanása esetén helyezi át a 14-oligoszacharidot a dolicholról a fehérjére. A glikozilálások már menet közben, még a peptidlánc teljes elkészülése előtt bekövetkeznek. A dolichol templát ezután üresen visszafordul a „gyártósor” elejére (flop).

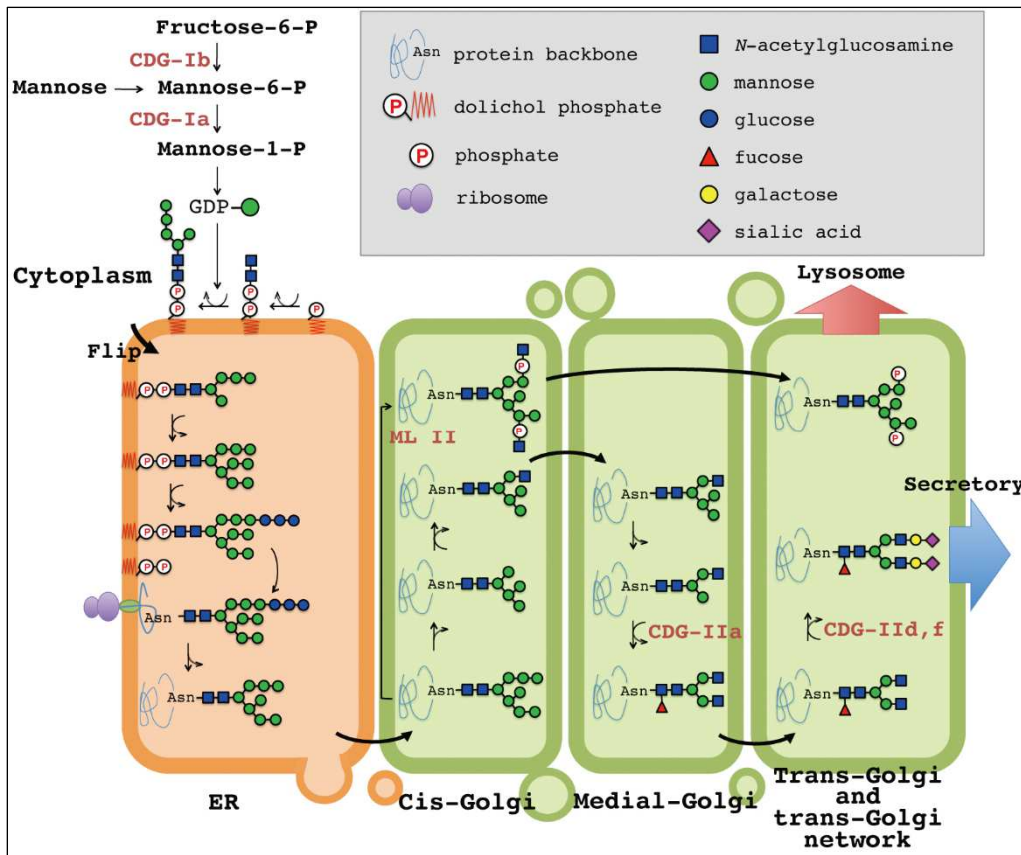


267. ábra Az oligoszacharid-transzferáz működése

A fehérje teljes betolódása után a szignálpeptid levágódik. Az ER lumenében kezdődik a fehérje érés. A cukorrészről sorban leválik az utolsóként felvitt három glükóz egység. A fehérjelánc a chaperonok segítségével felveszi a megfelelő háromdimenziós alakot. Ezek után átesik egy „minőségellenőrzésen”, a „selejt” a proteozómákba kerül és lebomlik.

A további érési folyamat során a fehérjék hosszú utat tesznek meg a sejten belül. A riboszómáról az ER lumenjébe kerülnek, onnan átjutnak a Golgi komplexbe, végighaladnak a cisz-, médium- és tranz rétegeken és csak ezután kerülnek a felhasználási helyükre. Az útvonal minden állomásán lokalizált enzimek végeznek egy-egy átalakítást az oligoszacharidokon, a folyamat hasonlít a gyárak szerelőszalagjaihoz.

Az ER külső rétegéről membránnal borított cseppek, transzport vezikulák fűződnek le, ezek belsejében jutnak át fehérje molekulák a Golgi apparátus cisz rétegébe. Itt a további bioszintézisút elágazik, más az élesztőkben és az emlős sejtekben. Az élesztők több tucat további mannóz egységet építenek a „legező” végére, miáltal nagy, immunogén oligomannánok jönnek létre. Emiatt az élesztők sokszor nem alkalmas gazdaszervezetek humán terápiás rekombináns fehérjék előállítására. Az emlős sejtekben viszont lehasad három mannóz egység. A Golgi komplex középső ciszternáiban fokozatosan lecserelődnek az ötödik szint mannózái N-acetilglükózaminra. A külső, tranz-Golgiban épül fel a hatodik szint a galaktózzal, és itt kerülnek rá a dekoráló szialinsavak és fukóz. Innen a kész fehérjék a vezikulákkal többfelé távozhatnak (citoplazma, lizoszóma, extracelluláris tér).



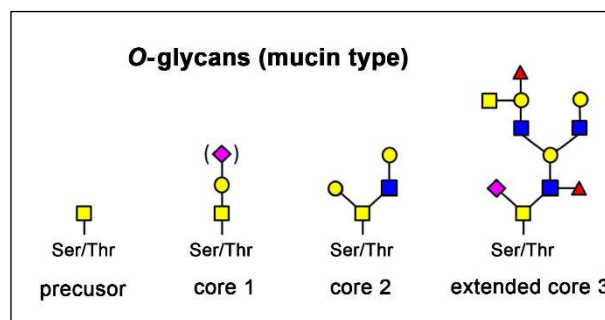
268. ábra A fehérjék útja az érés során

A képződő fehérjék glikozilációs mintázata sohasem teljesen egyforma, a változatokat izoformáknak nevezik. Érzékeny analitikai módszerekkel ezek egymás mellett meghatározhatók, arányaikat a gyógyszer engedélyeztetési eljárás során meg kell adni, és a gyártás során bizonyos határok között állandóan tartani.

Adalék: a vörös vértestek termelését stimuláló hormon, az eritropoietin molekula sok cukorrészt tartalmaz (kb. 40%). Állóképességi sportokban doppingszerként használják, sejtenyészettel előállított hormont adnak a versenyzőnek. A cukorrészek alapos vizsgálatával viszont kimutatható az emberi és a gyári EPO közötti különbség, az izoformák aránya más. Még azt is meg lehet mondani, hogy melyik gyógyszergyár termékét használták fel. Más kérdés, hogy egy ilyen akkreditált vizsgálat költsége elérheti a millió forintot is.

15.1.4.2. O-glikozilálások

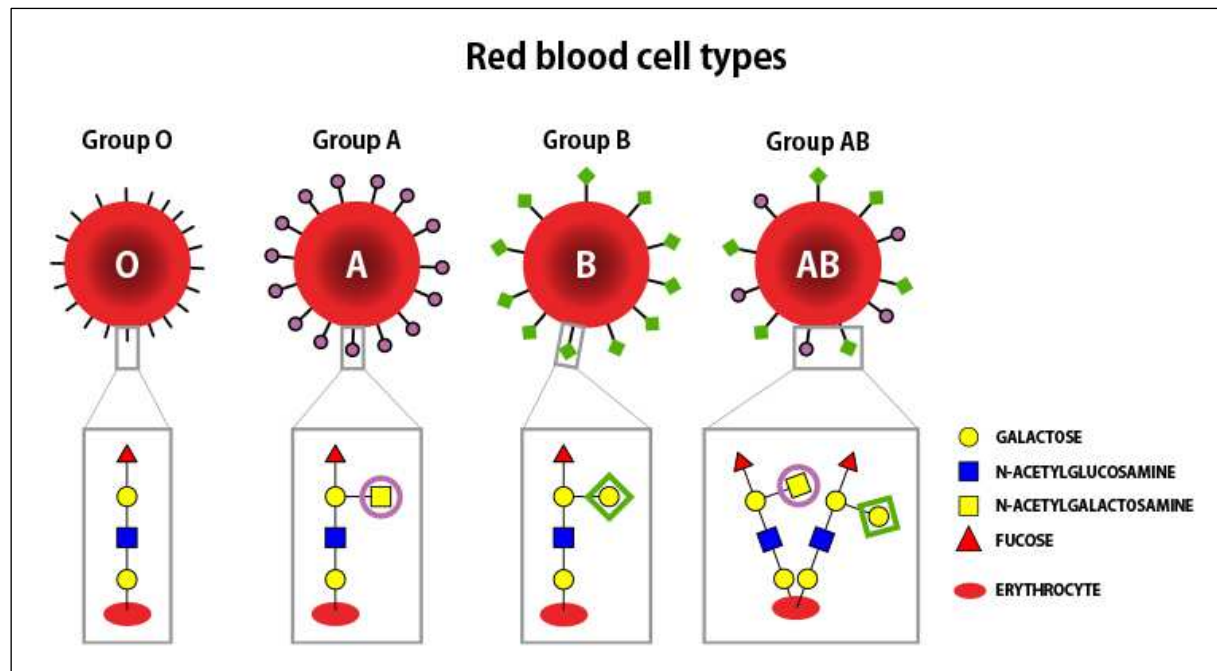
Ezek a cukorláncok lényegesen kisebbek és más mechanizmussal jönnek létre. A kész fehérjelánc megfelelő OH csoportjára a transz-Golgiban egyenként kapcsolódnak a cukrok UDP-aktivált formában. Ezek az oligoszacharidok általában kevesebb elágazást tartalmaznak. Az első cukor az N-acetil-galaktózamin, erre épül a második szinten egy galaktóz és egy N-



269. ábra Az O-glikoziláció felépülése

acetil-glükózamin. Erre az elágazó triszacharidra épülhet még sokféle, változatos felépítésű cukor.

Az emberi szervezet fontos immun determinánsát, a vércsoport tulajdonságokat is O-glikozilálások hordozzák. Orvosi szempontból a vörös vértetek felületén megjelenő glikoproteinek (glikoforinok, Band3 fehérjék) cukorláncai a legfontosabbak, mert vérátömlesztésnél ezek határozzák meg az egyedek vérenek kompatibilitását. Az AB0 vércsoportot egyetlen galaktóz molekula jelenléte, hiánya, illetve acilezettsége határozza meg.



270. ábra A vércsoportot meghatározó O-glikozilálások

15.1.5. Kodonoptimálás

A rekombináns fehérje expressziós szintjének meghatározásában a gazdasejt kodonhasználata is fontos szerepet játszik. Ha a heterológ fehérjét eredetileg termelő szervezet kodonhasználata jelentősen eltér a gazdasejt kodonhasználától, az nagyon alacsony expressziót eredményezhet. Általában nagy a különbség az emlős sejtek és a prokarióták transzlációja között, míg a baktériumok csoportján belül, illetve az emlős sejtek között lényegesen kisebb. Tipikus eset, hogy a humán fehérjéket az *E. coli* nehézkesen és lassan termeli. A fehérjeszintézis sebességét az egyes tRNS-ek gyakorisága, kópiaszáma jelentősen befolyásolja. Az egyes tRNS-ek ritkasága a szintézis lassúságán kívül idő előtti lánceválást és fals aminosavak beépülését is okozhatja. Ennek a problémának kétféle megoldását alkalmazzák. Vagy „megtanítják” a coli-t a ritka tRNS-ek többlettermelésére, vagy átírják a fehérjét kódoló tripletteket gyakoribb kodonokra. Ez utóbbi eljárás a kodonoptimálás.

Kereskedelmi forgalomban is vannak olyan *E. coli* törzsek, amelyek a ritka kodonok tRNS-eit intenzívebben termelik, ilyenek az AGG, AGA, CGG (arginin), AUA (izoleucin) és CUA (leucin), CCC (proline) és GGA (glicin).

A kodonoptimálás alapja az a tény, hogy a genetikai kód redundáns, vagyis egy aminosavat többféle bázishármas (akár 6 különböző) is kódolhat.

Már viszonylag régóta ismert azonban az a jelenség is, hogy léteznek az egyes gazdasejtek által „kedvelt”, vagyis gyakrabban használt triplettek az azonos aminosavat kódoló triplettek között. Ezzel szemben léteznek olyan bázishármasok, amelyek nagyon ritkán kódolnak egy adott aminosavat, helyettük inkább más, gyakrabban használt kodonok jelennek meg. Ezek a „ritka” triplettek általában kis gyakorisággal előforduló tRNS-eken fordulnak elő. A tRNS-ek

mennyisége a kutatási tapasztalatok alapján a transláció sebességét erősen befolyásolja. A gyakoriság mellett szerepe van a kodon-antikodon illeszkedés pontosságának is. Egyes párosítások „lötyögnek”, a kapcsolat nem olyan erős, mint az a bázispárosításból elméletileg következne. A pontatlan illeszkedés lassabb szintézist és gyakoribb hibákat eredményez.

Összességében tehát elmondható, hogy nem mindegy, hogy melyik homológ tripletet használjuk, mert ez nagyban befolyásolja a fehérjeszintézis sebességét.

A kodonoptimalás lényege, hogy a kifejezendő gén eredeti bázisszekvenciája helyett a kodonok helyettesítésével olyan DNS-t tervez(tet)ünk, amelyről az átírt mRNS az adott gazdaszerzetben gyors translációt tesz lehetővé.

A tervezés során az alábbiakat érdemes figyelembe venni:

- a „gyakori” tRNS-ek kópiaszáma és a megfelelő illeszkedés
- a G+C arány (legyen 40-60% között)
- eukarióta fehérjék prokarióta kifejezése esetén az intronokat ki kell hagyni
- a mRNS-ből ne képződjenek hurkok (hairpin), ne legyenek komplementer szakaszok
- lokális szekvenciaelemek: rövid motívumok, restrikciós hasítóhelyek, splice felismerőhelyek

Az említett faktorok hatása a gazdatörzsektől függően is változik. A tervezést különböző programcsomagok segítségével végzik, mint pl. a GeneArt GeneOptimizer nevű programja. Célszerűen ezt a feladatot erre szakosodott cégekkel végeztetik el.

A kapott bázissorrend alapján a DNS lánc szintézisét kémiai módszerekkel hajtják végre. Az egyszerre felépíthető DNS szakasz hossza a technikai fejlődés következtében évről évre növekszik, de a nagyobb fehérjék génjét több darabban kell létrehozni, majd ezeket összekapcsolják. Ezt a részfeladatot is érdemes erre szakosodott cégekkel vagy laboratóriumokkal elvégezteni.

15.1.6. *A vektor létrehozása, génbevitel, expresszió*

A célgén elkészítésével megnyílik a lehetőség a tényleges génmanipuláció előtt. A génszakaszt be kell építeni a kiválasztott vektorba, rendszerint ingázó (shuttle) vektorba. Össze kell állítani a megfelelő génszerelvényt. A célgén elé egy (rendszerint indukálható) promotert, utána egy terminátor szakaszt illesztnek, így jön létre az expressziós kazetta/keret. Gyakran más génszakaszok (pl. leader szekvencia) beépítésére is szükség van. A vektor behatolása után a transzfekció és az expresszió sikerének ellenőrzéséhez további molekuláris szerkezetek kialakítása is szükséges lehet.

Ezeket a molekuláris biológiai technikákat más tárgyakban nagyon részletesen tárgyalják, így itt éppen csak megemlítem.

15.1.7. *Sejtbankok.*

Ha már minőségi és mennyiségi szelektálás eredményeképpen a kezünkben van egy jó termelő képességű törzs/sejtvonal, ezt hosszú távon is változatlan formában meg kell őrizni. A fejlesztések, a termelések, a klinikai kezelések stabil ismételtetésének alapja az azonos és változatlan képességű sejtek biztosítása. Ennek módszere a törzsbankok létrehozása. A szelekció során a legjobbnak bizonyult klónból viszonylag kevés osztódással (hogy minél kevesebb mutációra adjunk lehetőséget) homogén tenyészetet nevelünk. Ezt a tenyészetet osztjuk szét több száz kis adagra, pl. ampullákba vagy kriocsövekbe. Ezeket azután konzerváljuk, a megfelelő törzseltartási módszerekkel (cseppfolyós nitrogénben, -180-190 fokon, vagy liofilizálva) tartósítjuk.

A banki állomány előállításánál használt módszereket és reagenseket, a tenyészet előéletét, valamint a tárolási körülményeket dokumentálni kell.



272. ábra Szubkultúrák



271. ábra Tárolás cseppfolyós nitrogénben

273. ábra Nitrogén tartály és a bemeülő tartóedények



A technológiai fejlesztés során kötött sorrendben háromféle törzsbankot építenek fel, ezek funkciója eltérő. Időben első a:

15.1.7.1. Research Cell Bank (RCB)

A termelő manipulált törzs kialakításának lezárásaként a legjobb klónból készítének kutatási sejtbankot. Sokszor a biztonság kedvéért a második legjobb (követő, follower) klónt is tárolják, arra az esetre, ha az elsőből kiderülne valami, ami miatt nem lehet termelésbe fogni. Néhány ampulla sejtjeit alapos vizsgálatoknak vetik alá, másokat az upstream és downstream fejlesztésekhez használnak fel, de egy részüket mindig megőrzik, hogy bármikor vissza lehessen nyúlni a kiindulási állapothoz. A sejtbank homogenitása szavatolja, hogy minden kísérletben azonos sejtek azonosan viselkednek, az egyik szubkultúrával kapott eredmények érvényesek a többire is. A sejteken természetesen lehet további genetikai változtatásokat végezni, de ezután újabb sejtbankot kell felállítani.

15.1.7.2. Master Cell Bank (MCB)

A Master Cell Bankot az RCB-ből hozzuk létre akkor, amikor a teljes gyártási technológiát kidolgoztuk és eljutottunk az engedélyeztetés fázisába. Az engedélyezéshez a sejtek nagyon sok tulajdonságát kell szigorú kritériumok szerint vizsgálni és az eredményeket dokumentálni. Ez garantálja, hogy a gyártás hosszú távon, akár évtizedekig mindig azonos, biztonságos

sejtekkel folyik, jogviták esetén is ehhez nyúlnak vissza. A sejtbankoknál minden beavatkozást, eseményt dokumentálni kell, hogy felmerülő kérdések esetén minden visszakereshető legyen.

A sejtbankok vizsgálatánál a fő tesztelési területek:

- Azonosság igazolása (expressziós szerkezet)
- Tisztaság igazolása (esetleges fertőzések)
 - vírusok (ezen belül: retrovírusok)
 - prionok
 - Általános sterilitás: Baktériumok és gombák jelenléte
 - Mycoplasma: két módszer paralell használata: folyékony táptalajba és agarba.
 - Külső vírusfertőzés
 - Invitro assay indikátor sejtvonallal
 - Invivo assay csirkeembrióval tojásban
 - Retrovírus (rágcsáló sejtvonalaknál):
 - XC plaque assay
 - S⁺L⁻ focus assay
 - Transmissziós elektromikroszkópia (TEM)
 - Reverztranszkriptáz enzim jelenlétének mérése
 - Product enhanced RT (PERT), Különleges enzimek retrovírusokban, cDNA teszt PCR-rel
- Genetikai stabilitás (a terméket kódoló régióban, 33, máshol 100 generációon keresztül)

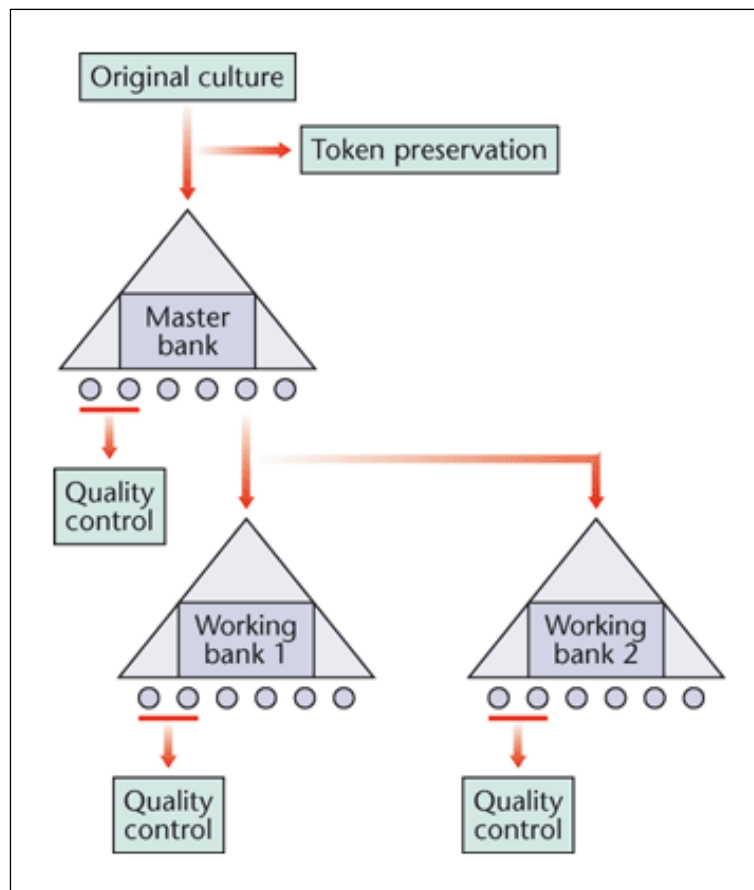
Ráadásul ez csak a sejtek minőségét garantáló minőségbiztosítási folyamat első lépése, a bankban lévő sejtekre vonatkozik. A vizsgálatok a tenyésztésre, gyártásra is vonatkoznak, a fermentáció végén is meg kell vizsgálni a tenyészetet, hogy milyen mértékben változott meg a folyamat során (end-of-production/post production cells (EPC/PPC)) vizsgálatok.

A vizsgálati protokollhoz az is hozzá tartozik, hogy nem elegendő egyszer, az engedélyeztetéshez minősíteni a tenyészetet, hanem évente rendszeresen néhány ampullát kiemelnek és bizonyos tesztekkel újra elvégzik.

A MCB értéke igen nagy, mivel hosszú kutató és fejlesztő munka eredménye és rengeteg drága vizsgálatot kellett elvégezni. Emiatt a tárolókat különleges védelemmel látják el, és ha lehet, több, földrajzilag is távoleső helyen helyezik el, hogy súlyos katasztrófa esetén is maradjon ép kultúra. A Richter Gedeon pl. megosztva, Budapesten és Debrecenben tárolja a sejtbankjait.

15.1.7.3. Working Cell Bank (WCB)

Az üzemi sejtbankra (Working Cell Bank) azért van szükség, hogy a gyártás színhelyén a sarzsok indításához állandó, ellenőrzött minőségű oltótenyészet álljon rendelkezésre. Kialakítása az MCB-ből indul ki, egy vagy két csövet kiemelnek, a sejteket elszaporítják és az így kapott tenyészetet szétosztják és tárolják. Az így kapott WCB-t is alaposan ellenőrizni kell, de a protokoll kevesebb vizsgálatot ír elő, mint a MCB-nál. A sejtbank szerepe az, hogy a hetente, vagy más gyakorisággal indított gyártásokhoz egy-egy csövet kivesznek és ennek lépcsőzetes szaporításával készítik el az inokulumot a fermentációkhoz. A WCB egy-két évig szolgálja a termelést, azután újat készítenek.



274. ábra A sejtbankok egymásra épülése

15.2. Gyártási technológiák (upstream, downstream) fejlesztése, optimalálása

A táptalajok, a technológiák, a berendezések alapvetően eltérnek génmanipulált baktériumok és az állati sejtenyészetek esetében, ezért célszerű ezeket külön fejezetben tárgyalni.

15.2.1. Rekombináns fehérjék gyártása génmanipulált baktériumokkal

Bakteriális gazdasejtként az esetek túlnyomó részében az *E. coli* törzseket használják.

15.2.1.1. Indukció

A génműködés szabályozásának alapvető mechanizmusa a transzkripció ki-be kapcsolása. A konstitutív gének állandóan bekapcsolt állapotban vannak, az indukálhatók kiírását kémiai anyagok jelenléte, illetve hiánya szabályozza. A klasszikus operon modellhez hasonlóan a szabályozott gén(ek) elé egy indukálható promótert illesztnek. A szabályozás ezekben az esetekben pozitív, azaz az indukáló hatás következtében a fehérjeszintézis megindul. Leggyakrabban a coli alaposan tanulmányozott lac operonját használják, de az induktor molekula a laktóz helyett a szerkezetanalóg IPTG (izopropil-tio-galaktozid), ami nem alakul át az anyagcserében, nem fogy el.

Some inducible promoters used for separation of the production of recombinant proteins into a cell growth phase and a production phase.

<i>Host</i>	<i>Promoter</i>	<i>Induction method</i>
<i>E. coli</i>	P_R and P_L	Temp. shift 30 to 40°C
	<u>lac</u>	<u>IPTG addition</u>
	pho	Phosphate starvation
	trp	trp starvation or addition of IAA
	tac	IPTG addition
<i>S. cerevisiae</i>	GAL1	Galactose addition
	PHO5	Phosphate starvation

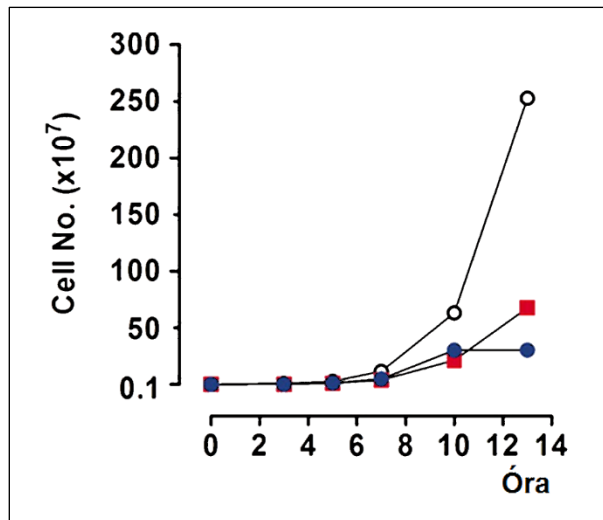
IPTG: isopropyl β -thio-D galactoside IAA: β -idolyl acrylic acid

275. ábra Különböző indukciós hatások

Felmerül a kérdés, hogy miért van egyáltalán szükség az indukcióra. Miért nem jó, ha a lag szakasztól kezdve végig fehérjét termelnek a sejtek? Az egyik érv az, hogy az idegen fehérje termelése erősen megterheli a sejtek anyagcseréjét. Az ATP felhasználásnak mintegy negyven százaléka a rekombináns fehérje termelésére fordítódik. Így a termelés jelentősen lelassítja a szaporodást.

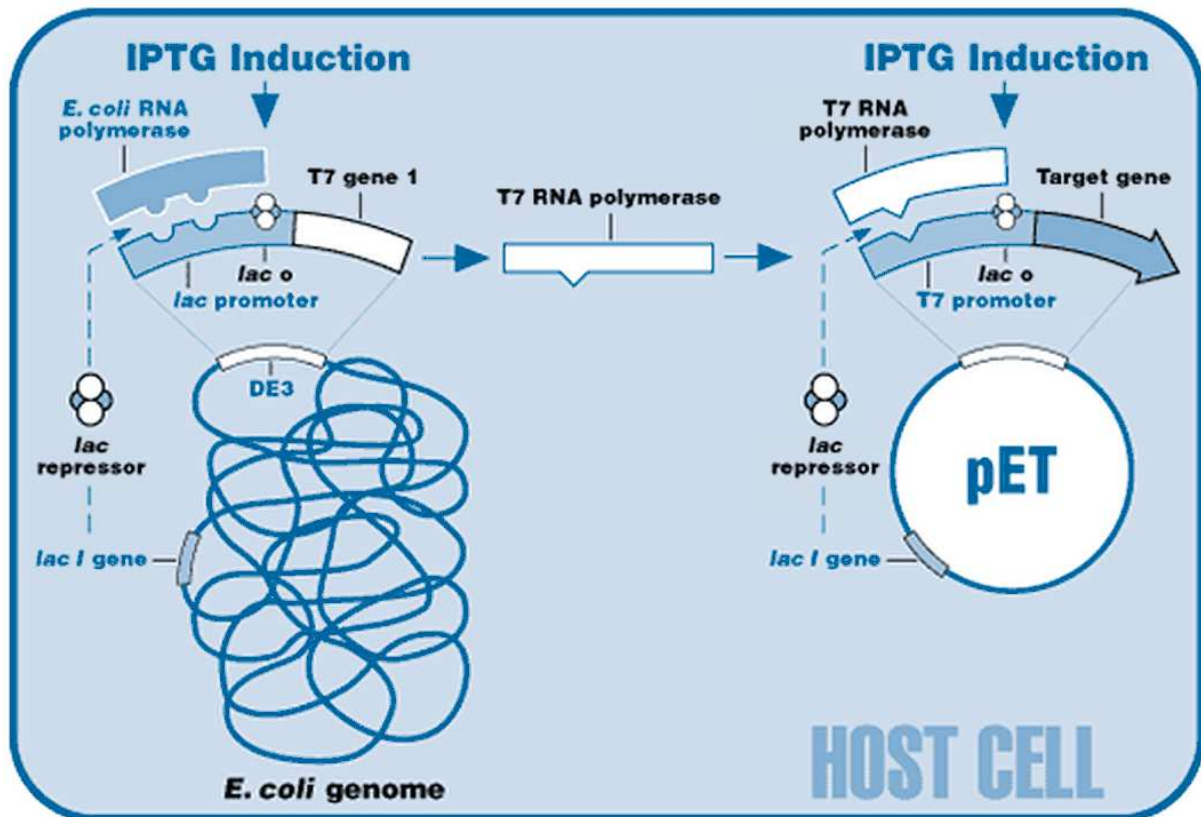
Gazda : E.coli; szénforrás: glükóz; 100 plazmid/sejt;		
A plazmid móltömege 2.9 MDa;		
A rekombináns fehérje 50% -a az összes fehérjének.		
	<i>Plazmid-mentes sejtek</i>	<i>Rekombináns sejtek</i>
	10 e(-16) mol/cell	10 e(-16) mol/cell
ATP felhasználás:		
poliszacharidok	5.75	5.73
sejt saját fehérje	57.39	57.22
termék fehérje	0.00	57.22
RNS	12.24	12.20
kromoszóma DNS	2.96	2.95
plazmid DNS	0.00	0.27
bioszintézisére		
transzportra	11.88	20.82
összesen:	97.17	163.38

A másik érv az, hogy a szaporodás során előfordulhat plazmidvesztés. Vagy a plazmidban történik olyan változás, hogy nem képződik róla termék, vagy a sejtosztódásnál az összes plazmid az egyik leánysejtbe kerül, míg a másikba egy sem. Ennek valószínűsége ugyan számszerűen nagyon kicsi, de a fermentorban az osztódások száma is óriási, így valós az esély plazmidmentes utódok létrejöttére. Ezek pedig megszabadulva az idegen fehérje termelés terhetől sokkal gyorsabban szaporodnak és néhány generáció alatt túlnövik a plazmidos sejteket. Ez a versenyelőny az indukció előtt nem jelentkezik, a plazmidos és plazmidmentes sejtek közel azonos sebességgel szaporodnak.



276. ábra Plazmidos és plazmidmentes sejtek növekedése

Az indukció pontosságát és a termelés sebességét megnövelhetjük úgy, hogy kétlépcsős indukciót alkalmazunk. Ehhez olyan *coli* törzset használunk, amelynek kromoszómájába már beépítették a T7 bakteriofág RNS polimeráz enzimének génjét. A teljes kialakításhoz hozzá tartozik, hogy ez a polimeráz is IPTG-vel indukálható, valamint a célgén elé is a T7 fág saját promóterét kapcsolják, amit csak a fág polimeráz ismer fel. Így a rekombináns fehérjeszintézis teljesen elválik a sejt saját fehérjeszintézisétől, nem léphetnek fel zavaró keresztatások. Ráadásul ez az enzim jóval gyorsabban működik, mint a *coli* saját kiíró rendszere.



277. ábra A kettős indukció mechanizmusa

15.2.1.2. Tápoldatok

Az ipari fermentációs tápoldatok összeállításánál elsődleges szempont a költség. Törekednek az olyan mezőgazdasági, élelmiszeripari melléktermékek, hulladékok felhasználására, mint a melasz, kukoricalékvár, szójadara stb. Ezek komplex anyagok, pontos összetételük nem ismert és ráadásul tételről tételre változik. A gyógyszeripari célú fehérje hatóanyagok gyártásánál ezek nem alkalmazhatók. A tisztaság és reprodukálhatóság érdekében pontosan ismert összetételű komponensekből összemért, „chemically defined” (CD) tápoldatokat használnak. Ez azzal jár, hogy azokat a nyomelemeket, amelyeket a komplex anyagok szennyezésként tartalmaztak, egyenként precízen be kell mérni. A tápoldat optimalása igényes mérnöki feladat, a sok komponens hatásának egyidejű vizsgálatára kísérlettervezési módszereket (design of experiments = DOE) alkalmaznak. Ráadásul a technológia különböző fázisaiban más és más összetételű tápoldatra van szükség. Célszerű külön vizsgálni a szaporító, a termelő és a rátáplált tápoldat optimális összetételét.

Az *E. coli* esetében kézenfekvő szénforrás a glükóz. Számos technológiában alkalmazzák is, de megvan az a hátránya, hogy a *coli* hajlamos a részben anaerob, savtermelő anyagcserére és ilyenkor ecetsavat termel. Ennek kiküszöbölésére glicerint szénforrást szoktak alkalmazni. Nitrogénforrásként szervesen sók is megfelelnek, ezekből is képes fehérjét termelni a sejt. A törzs tiamint igényel, ez biztosítja, hogy a laboratóriumból vagy üzemből kikerülve életképtelen legyen. Egy ilyen genetikai elem beépítése megakadályozza, hogy egy GM törzs a természetben elterjedjen és megváltoztassa a biológiai egyensúlyt.

Oltóanyag (inokulum) tápoldat	Termelő tápoldat	Rátáplált (feed) tápoldat
Glicerin 99,5%	Glicerin 99,5%	Glicerin 99,5%
KH_2PO_4	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
K_2HPO_4	K_2HPO_4	EDTA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Kanamycin szulfát
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Boric acid
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Kanamycin szulfát	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
Kanamycin szulfát	Tiamin HCl	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Tiamin HCl	Boric acid	$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
Boric acid	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	
	PPG2000	

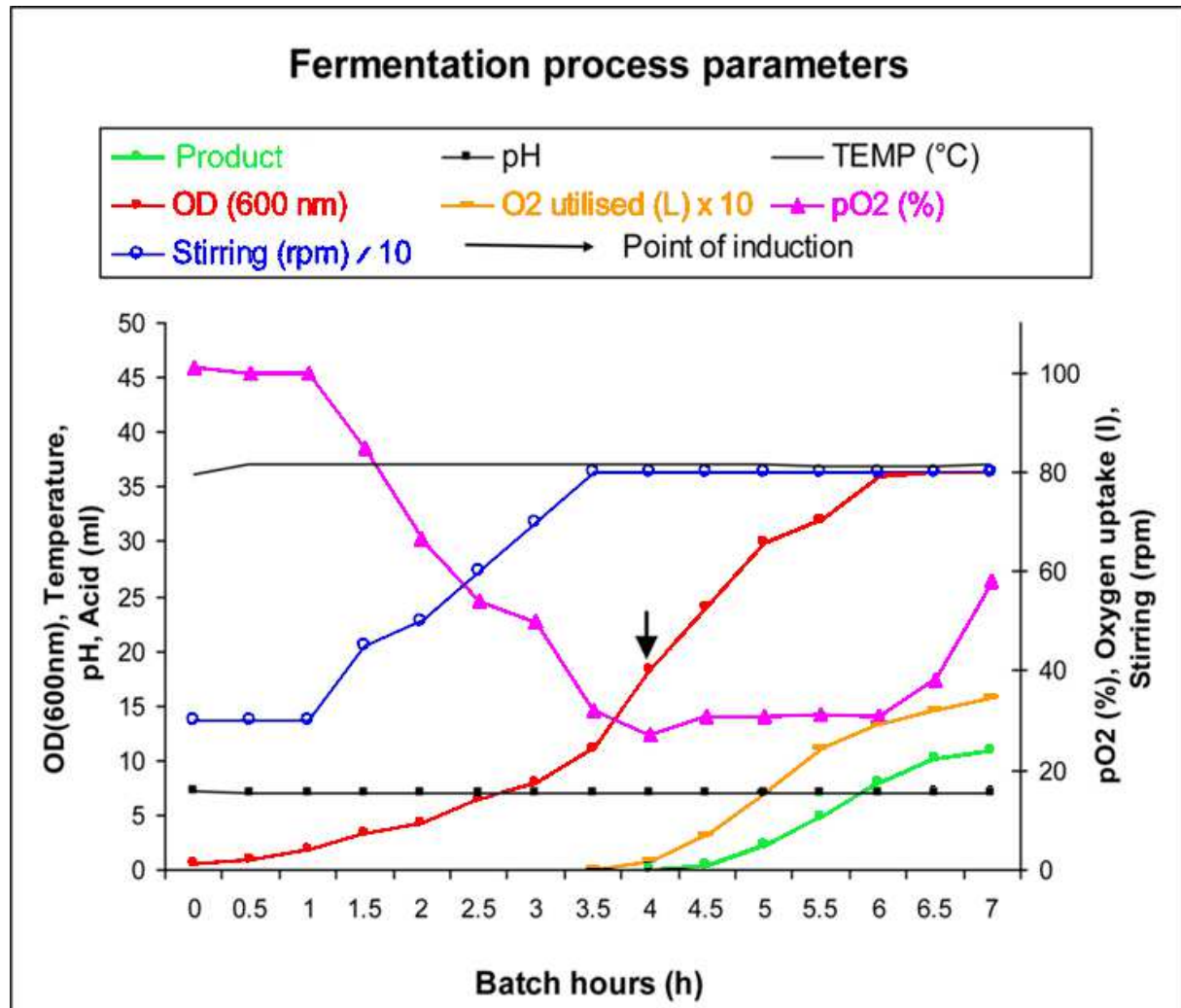
278. ábra *Glycerines coli* tápoldatok jellemző komponensei

15.2.1.3. Fermentáció

A *coli* fakultatív anaerob, de a rekombináns fehérje termelést egyértelműen aerob körülmények között végzik. Az intenzív szaporodáshoz igen nagy oxigénigény kapcsolódik, erőteljes keverésre és levegőztetésre van szükség. A keverési megoldások kialakításánál arra kell törekedni, hogy a fermentálé minden részében egyformán jó legyen az oxigén ellátás.

A bélbaktériumok optimális szaporodási hőmérséklete 37 °C, fermentációs körülmények között is ekörül alakulnak az optimumok. Speciális esetekben, mint például a későbbi esettanulmányban szereplő GCSF előállításánál a feldolgozási problémák miatt az indukció után csökkenő hőfokprofil kellett kialakítani.

A pH optimum a baktériumoknál, így az *E. coli*-nál is közel semleges, 6,5-7,5 között van. Az anyagcsere savakat termel, emiatt lúg adagolással tartják a kívánt értéket.



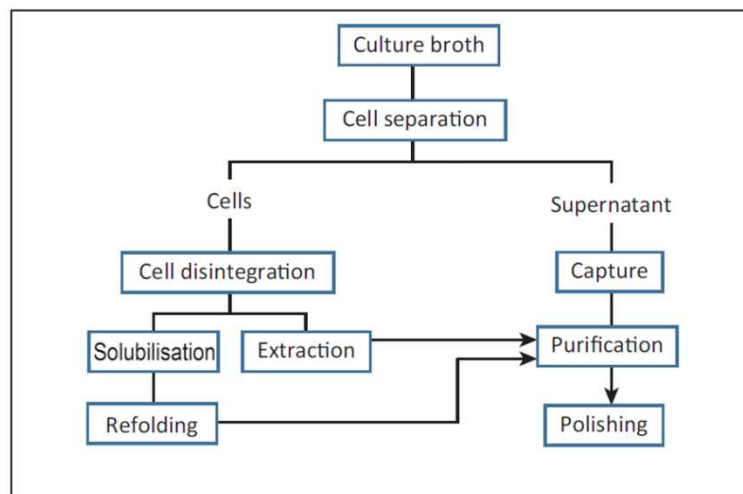
279. ábra Egy tipikus rekombináns coli fermentáció lefutása. Az oldott oxigén szintet az indukció után már csak tiszta oxigén hozzávezetésével tudták tartani.

Az indukció beépítése a technológiába kétszakaszos fermentációt (sejtszaporítás + termékképzés) tételez fel, ezzel kizárja a félfolytonos és folytonos fermentációs technika alkalmazását. Ennek megfelelően szakaszos (batch), illetve rátáplálásos (fed batch) fermentációval termelnek. A rátáplált (feed) tápoldat összetétele más, mint a szaporító tápoldaté. A rátáplálással a fermentációs idő meghosszabbítható, több sejt és termék keletkezik.

15.2.1.4. Feldolgozás

A baktériumokkal termelt rekombináns fehérjék izolálására is érvényes a fermentlevek feldolgozására kialakított általános séma, azzal a kiegészítéssel, hogy a prokarióták az idegen fehérjéket gyakran zárványtestek (inclusion body) formájában halmozzák fel a sejt belsejében. A kis méretű sejtek nehezen szűrhetők (a membránszűrés költsége nagy), célszerűbb nagy fordulatszámú centrifugával leválasztani. Ha a termék a felülúszóban van, akkor egyszerűbb a folyamat, a homogén oldatot a koncentráls, tisztítás, végtisztítás lépésorán viszik végig. Ha viszont a termelt fehérje a sejten belül van, akkor a sejteltávolítás műveletét is be kell iktatni

(French press, nagynyomású homogenizátor). Abban az esetben, amikor a célfehérje zárványtestet alkot, a szemcsék elválasztása, feloldása és a molekulák hajtogatása (foldingja) további plusz műveleteket, ezzel költséget jelent.

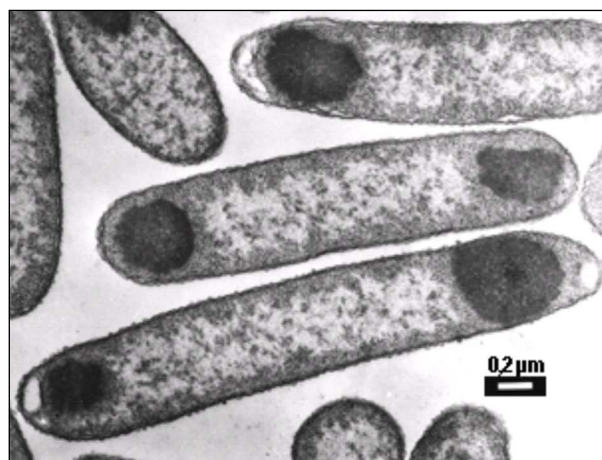


280. ábra A fermentlevek általános feldolgozási sémája

Zárványtestek (inclusion body) feldolgozása

A rekombináns fehérjék előállításánál gyakran fellépő probléma, hogy a kifejezett fehérje nem oldatban jelenik meg, hanem a sejten belül szilárd szemcséket, zárványokat képez, az angol nyelvű szakirodalomban ezeket "inclusion body"-nak (IB) nevezik. Ez a jelenség a prokarióta szervezetekben gyakran előfordul, a fehérjék izolálásánál komoly problémákat vet fel, ezért érdemes vele külön foglalkozni.

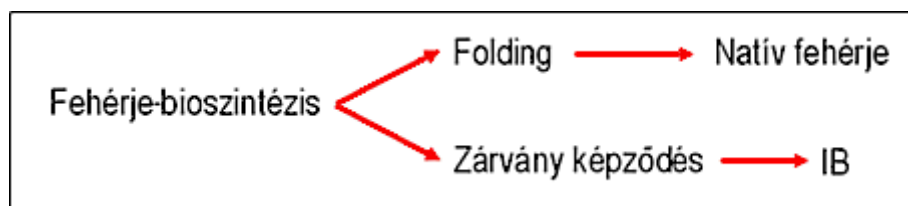
Fehérjezárványok kizárólag a prokarióta organizmusokban fordulnak elő, így a leggyakrabban manipulált *E. coli*-ban is számos esetben képződik. A zárványtest kifejezést az angol „inclusion body” szókapcsolat fordításaként használjuk. Jelentése a sejteken belül, zárványok formájában keletkező, szilárd halmazállapotú fehérjeszemcse. Kompakt, legömbölyített alakú testek. Fénytörésük eltér a citoplazmáétól, ezért fáziskontraszt-mikroszkóppal észlelhetők. Sűrűségük viszonylag nagy, ezért sejtfeltárás után centrifugálással gyorsan ülepedhetnek. Anyagukban általában homogének, 90-95 százalékban egyféle fehérjéből állnak. Technológiai szempontból csak a prokariótákban előforduló zárványtestek érdekesek, emberi sejtekben csak nagyon ritka genetikai rendellenességek következtében fordulnak elő.



281. ábra: Zárványtestek *E. coli*-ban

A zárványtestek kialakulása

A kifejezett fehérjék között nem lehet bizonyossággal (csak ~60%) előre jelezni, hogy mely fehérjékből lesz zárványtest, és melyekből nem. A vizsgálatok szerint képződésük nem hozható összefüggésbe sem genetikai paraméterekkel (host, vektor, génkörnyezet), sem a fehérje tulajdonságaival (méret, oldhatóság, szerkezet). Annyit lehet csak megfogalmazni, hogy a sok diszulfidhidat tartalmazó fehérjék általában hajlamosabbak a zárványképzésre. A fehérjezárványok képződése kinetikai okokra vezethető vissza. A riboszómák felületén végbemenő fehérjeszintézis létrehozza a megfelelő aminosav-sorrendű polipeptidláncot (elsődleges szerkezet), de az aktív (natív) állapot eléréséhez ennek fel kell vennie a megfelelő másodlagos és harmadlagos szerkezetet, beleértve az intramolekuláris diszulfidhidak kialakulását is. Ezt a folyamatot nevezik „folding”-nak (legelfogadhatóbb fordítása talán a „hajtogatás”). A folyamat többé-kevésbé spontán módon is végbemegy, hiszen a rendezett, natív fehérje energiaállapota alacsonyabb, mint a frissen keletkezett, kigombolyított fehérjeláncé. Az átalakulást számos esetben katalizálják a chaperonok (dajkafehérjék). A fehérjeképződés és a folding sebessége normális körülmények között egyensúlyban van, a létrejött fehérjemennyiség túlnyomórészt átalakul natív formává. Ha viszont valamilyen oknál fogva több fehérje képződik, mint amennyit a folding folyamata át tud alakítani, akkor a felszaporodó „hajtogatatlan” (unfolded) fehérje zárványtestté alakul (256. ábra). Ezt a mechanizmust igazolja az a megfigyelés is, hogy ha a prokarióta organizmus saját fehérjéjének termelését fokozzuk (pl. géntöbbszörözéssel), akkor a mikroorganizmus saját fehérjéjéből is kialakulhat zárványtest.



282. ábra A folding és a zárványképződés alternatív utak

A fehérjezárványok jellemzően a citoplazmában alakulnak ki. Az *E. coli* citoplazmájában ugyanis a közeg redukzív, ami nem kedvez a diszulfidhidak kialakulásának, azaz a foldingnak. A *coli* citoplazma-fehérjéinek jelentős részében nincs is diszulfidhid. A sejten belül oxidatív környezetet a periplazmikus térben találunk, itt megy végbe a keresztkötést tartalmazó fehérjék foldingja.

A fehérjezárványok kialakulása bonyolultabbá teszi az izolálási technológiát, de ugyanakkor vannak előnyei is. A szemcsék csaknem tiszta célfehérjéből állnak, homogenitásuk több mint 90 százalék, ezzel az előtisztítás feleslegessé válik. Ebben a tömör állapotban nem hatnak rájuk a proteázok, nem kell a termék elbontásától tartani. A zárványban lévő fehérjék inaktívak, így a sejten belül nem tudják kifejteni esetleges káros hatásukat.

A feldolgozási technológia

A zárványtestekbe tömörült fehérje kinyerése és aktiválása általában a következő sorrendi séma szerint folyik:

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 1. sejtfeltárás | → sejtörmelék, közte a zárványtestek |
| 2. centrifugálás, tisztítás | → „IB paszta” |
| 3. oldatba vitel | → oldott, unfolded fehérje |
| 4. folding | → oldott, aktív fehérje |

A következőkben eszerint tekintjük át a technológia lépéseit.

Sejtfeltárás

A sejtfeltárás műveletei a zárványtesteknél nem specifikusak, az általánosan használt műveletek alkalmazhatók. A baktériumok sejtfala változó szilárdságú, a Gram-pozitív törzseké ellenállóbb, a Gram-negatívaké valamivel gyengébb. Ipari méretekben lizozimos kezelést, és/vagy nagynyomású homogenizátort alkalmaznak. A feltárás a zárványtesteket nem károsítja, nem aprítja.

A sejtfeltárás hatására kiszabadul a *coli* DNS is, és ez viszkózussá, nyálkássá teszi az amúgy is nehezen kezelhető anyagot. Ezt nagyon nehéz lenne akár szűrni, akár centrifugálni, ezért a következő lépés előtt DNÁzzal kell kezelni.

Centrifugálás, tisztítás

A zárványtestek jó esetben tömör, nagyobb sűrűségű részecskék, centrifugálásnál jól ülepednek. A sejttörmelékek és a fehérjeszemcsék kis mérettartományba esnek, ülepitésükhöz nagyobb g-értékekre van szükség (10 000–25 000 g).

Példa: a már említett GCSF fehérjét *E. coli*-val termeltetik. Ha a folyamatot 37 °C-on vezetik, akkor olyan tömör fehérjeszemcséket kapnak, amelyeket nem lehet oldatba vinni. Ha viszont 30 fokon, akkor olyan laza, pelyhes csapadékot kapnak, amit nem lehet hatékonyan lecentrifugálni. Ezért az indukció után egy csökkenő hőfokprofil optimáltak, amellyel a kapott anyag mindkét lépésben kezelhető.

A zárványok anyaga eléggé tiszta, csak a felületükön hordoznak szennyezéseket. Ezeket a felülúszó elvétele után pufferrel célszerű lemosni, majd újra centrifugálni. Az mosópuffer (pH~8) sókat (pl. 0,2 M NaCl-ot), és felületaktív anyagot (p. Triton X100-at) is tartalmaz. A fémionok megkötésére EDTA-t, redukzív közeg fenntartására ditio-treitolt (DTT), a mikrobiális romlás kivédésére NaN_3 -ot adagolnak.

Oldás, szolubilizálás

A zárványtestek kiválását éppen az okozza, hogy a nyers fehérjék a citoplazma sós vizes közegében rosszul oldódnak. Ha fel akarjuk ezeket oldani, ebben az esetben a közeg polaritásának változtatásával, csökkentésével (oldószer) vagy növelésével (sók) nem megyünk semmire. A fehérjék oldását ún. kaotróp oldószerekkel segíthetjük elő. A kaotróp anyagok (tipikusan a karbamid, illetve a guanidin-hidroklorid), hidrogénkötések kiépítésére hajlamosak. A vízben szinte korlátlanul oldódnak, nagy koncentrációban (40-50 %) a szintén hidrogénhidak kialakítására képes vízmolekulákkal együtt sajátos tulajdonságú oldószert alkotnak. Ebben egyrészt a kaotróp molekulák közbeépülésével megszűnik a hidrogénkötésekkel összekapcsolódó vízmolekulák térhálós, klaszteres szövete (kao-tróp = káoszt elősegítő, entrópiát növelő). Másrészt a fehérjemolekuláknak lehetőségük van hidrátburok helyett részben vagy teljesen „kaotróp burkot” megkötni felületükön, és ezzel oldatba vihetők olyan anyagok is, amelyek vizes közegben oldhatatlanok.

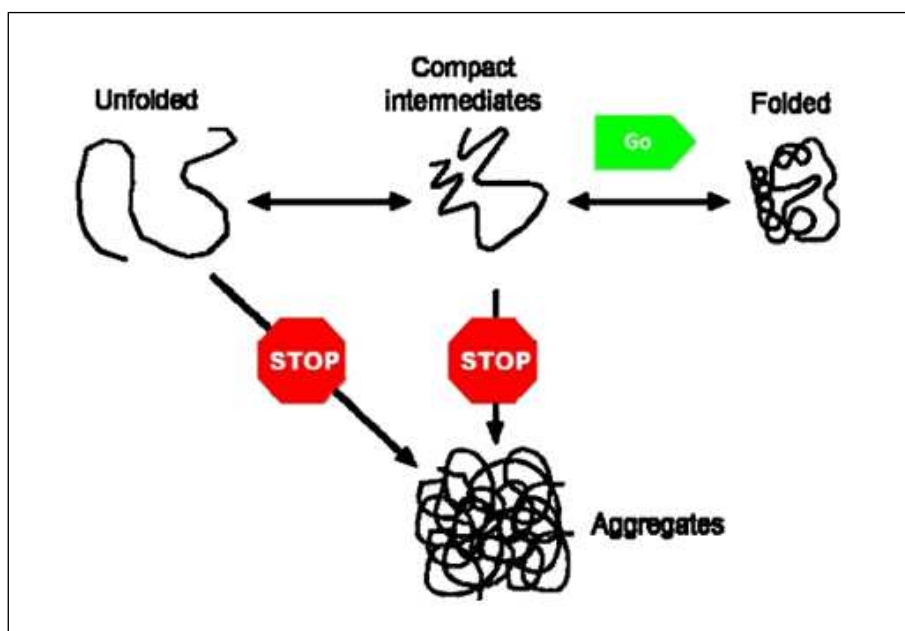
A szolubilizáló elegy fő komponense 8 M karbamid vagy 6 M guanidin-hidroklorid. A közeget pH~8 körül pufferolják. Ez az oldat is tartalmaz EDTA-t, és itt is redukáló potenciált alakítanak ki SH-vegyületekkel (ditiotreitolt, ditioeritrol, redukált glutation, merkaptó-etanol, cisztein, cisztamin), amely megakadályozza a diszulfidhidak idő előtti kialakulását. A fehérjeszuszpenzió koncentrációját ~5 g/l-re állítják be. Az oldási folyamat szobahőmérsékleten néhány óra (1–4 óra) alatt végbemegy. Felmerülhet a kérdés, hogy miképpen lehetne elválasztani az oldódás során kiszabaduló szennyező fehérjéket. Ez a lépés azonban nem szükséges, mert a következő lépésben többszázszorosán meghígítják az oldatot, aminek következtében a szennyezők koncentrációja elhanyagolható szintre csökken.

Folding

Ebben a témakörben folding („hajtogatás”) alatt a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetének megfelelő kialakulását értjük. A térbeli szerkezetet az intramolekuláris elsődleges és másodlagos kémiai kötések rögzítik. Az intermolekuláris (két vagy több fehérjemolekulát összekötő) kapcsolatok hibás szerkezetet, inaktív fehérjéket eredményeznek. A háromdimenziós szerkezetet kovalens kötések (diszulfidhidak) és gyengébb kölcsönhatások (hidrogénhidak, ionpár-kölcsönhatások és van der Waals-erők) stabilizálják.

A sejtekben a folding természetes folyamata az eukariótákban az endoplazmás retikulumban megy végbe. A belső kötések kialakulását dajkafehérjék (chaperonok) katalizálják, amelyek átmenetileg összekapcsolódnak a formálódó fehérjével, majd a megfelelő alak kialakulása után leválnak róla. Ezzel párhuzamosan a fehérje N-glikozilálásának első lépései is lejátszódnak. A fehérjemolekulák ezek után szállító (transzport) vezikulákban lépnek ki a lumenből, és továbbítódnak a Golgi-komplexebe, ahol glikozilálásuk folytatódik, érésük befejeződik.

Ugyanezt a folding reakciósort a technológia során *in vitro*, azaz egy készülékben, endoplazmás retikulum és dajkafehérjék nélkül kell megvalósítani. Ez sokkal nehezebb feladat. A natív szerkezet kialakulása soklépéses folyamat, amely többféle melléreakcióban is „félrecsúszhat”, inaktív termékeket eredményezve. A „téves” reakciók lehetnek intra- és intermolekulárisak.



283. ábra A folding folyamata és melléreakciói

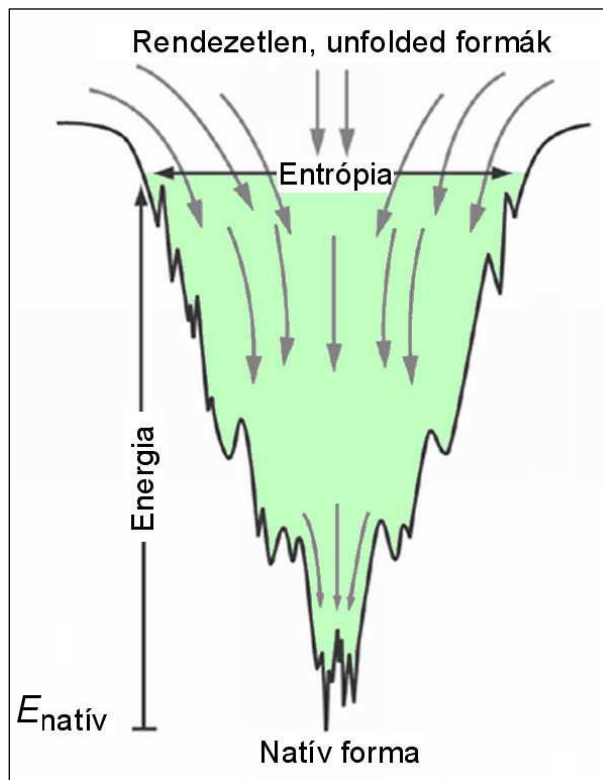
A monomolekuláris reakciók többé-kevésbé reverzibilisek, az aggregátumképzés viszont nem. Emiatt elsődleges cél a molekulák távoltartása, találkozásuk megakadályozása. A legegyszerűbb megoldás az erős hígítás, a híg oldatokban a fehérjék találkozási valószínűsége kicsi. A szolubilizálásnál beállított ~5 g/l koncentrációjú oldatot 100–1000-szeresen felhígítják. A kisebb koncentráció hatása a reakciósebességre kvantitatívan is kifejezhető. A sebességeket felírva a foldingra (F) és az aggregációra (A) a következő összefüggéseket kapjuk:

$$v_F = \frac{dc}{dt} = -k_F c \qquad v_A = \frac{dc}{dt} = -k_A c^2$$

A negatív előjel arra utal, hogy a kiindulási nyers fehérjekoncentráció a reakció során csökken. Az aggregáció (minimum) bimolekuláris (másodrendű) folyamat, emiatt szerepel a koncentráció a második hatványon. Ha tehát a hígítással a koncentrációt százszorosán csökkentjük, a folding sebessége századrésztére csökken, az aggregációé viszont tízezerszeresen. A folding

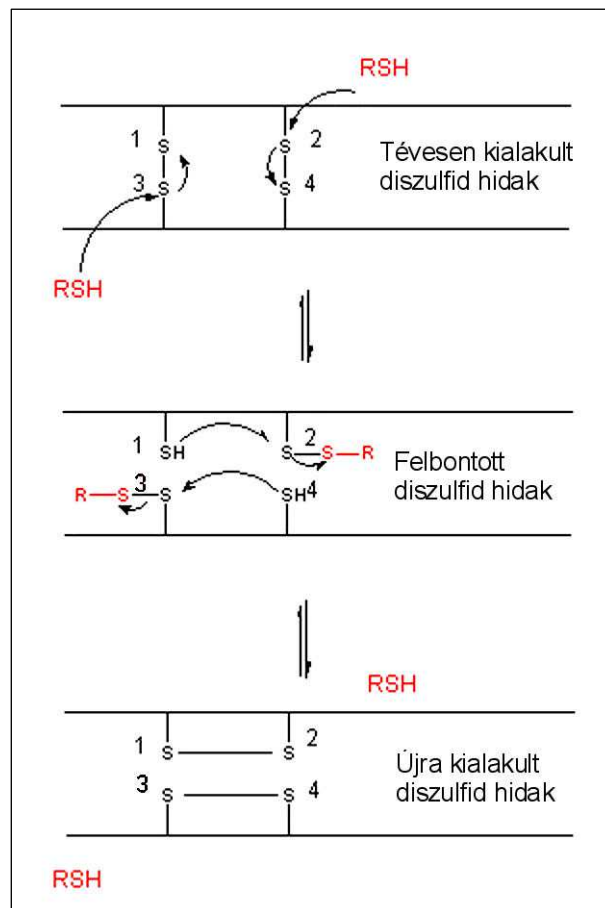
lelassul ugyan, de a bimolekuláris reakciók gyakorlatilag megszűnnek. A folding kialakulására emiatt hosszabb, 24–48 órás reakcióidőt adnak. A fehérjeoldatot lassan, keverés közben, nagy mennyiségű folding pufferbe engedik. A beadagolást sokszor több ponton, illetve több részletben hajtják végre. A bevitel késleltetése nem csak a tökéletes elkeveredést szolgálja, hiszen az néhány másodperc alatt bekövetkezik. Ha a betáplálás során több időt hagyunk, akkor a már bevitt fehérje egy része felveszi a natív formát, ezzel csökkenti az intermolekuláris reakcióra képes molekulák koncentrációját. Ez a hígítási módszer egyúttal több százszorosan csökkenti a kaotróp koncentrációt is. Ehhez viszont nagy térfogatokkal kell dolgozni, nagy tartályban nagy mennyiségű drága, steril folding pufferre van szükség. Ezt a költséget elkerülendő egy másik technikát, a dialízist is kifejlesztették. Dializáló membránon keresztül lassan, fokozatosan cserélik le a kaotróp oldatot a folding pufferre, így kerülnek el az újbóli kicsapódást.

Egy adott fehérjelánc a hajtogatás során nagyon sokféle konformációt fölvehet, ezek közül csak egy „az igazi”, a natív, aktív fehérje. A sokféle szerkezet energiaszintje is különböző. Sok vizsgálattal alátámasztott feltételezés, hogy a natív állapot az energiaminimumnak megfelelő szerkezet. A feltételezés azon alapul, hogy ha a természetben, a sejtekben működő aktív, natív fehérjéknek lenne egy még alacsonyabb energianívójú alakja, akkor a fehérjék spontán módon „átcsúsznának” ebbe a másik – kevésbé aktív – formába, amelyben kevésbé hatékonyan működnének. A rosszabb hatékonyságú működést viszont a természetes szelekció, az evolúciós verseny kiszelektálja, kihalásra ítéli. Az *in vitro* folding során tehát a fehérjét az energiaminimum felé kell mozgatni, ami látszólag könnyű, önként végbemenő folyamat. A nehézséget az jelenti, hogy a nagyon sok hajtogatási forma energiaszintjei bonyolult energiafelületeket alkotnak (258. ábra), aminek számos lokális minimuma lehet, ahol a molekula „megrekedhet”. Ennek kivédésére a tudomány által sok helyen alkalmazott módszert alkalmazzuk: ismételt kis energia-„lökésekkel” perturbáljuk a rendszert, átsegítjük a lokális energiagátakon. Ezzel elérjük, hogy a molekulák túlnyomó többsége az energiaminimumra vagy legalább annak közvetlen közelébe kerüljön. Ilyen perturbációs energiaközlés történhet a hőmozgással, illetve



284. ábra A fehérjehajtogatási formák energia- és entrópiaviszonyai

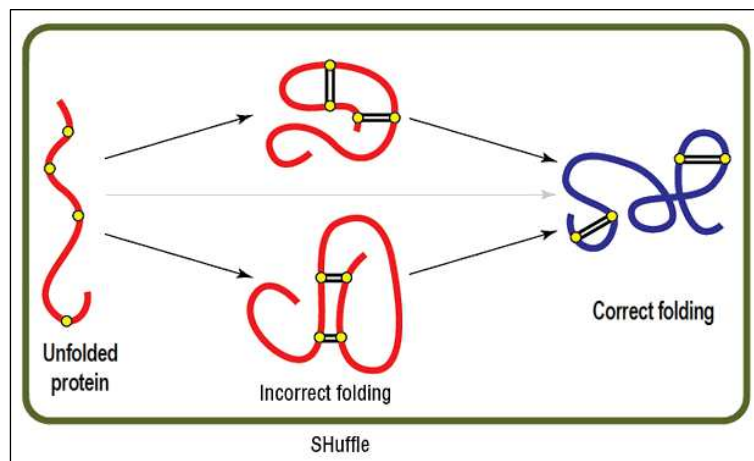
dinamikus kémiai rendszerekkel. A folding reakciót nem szokták melegíteni, általában 4–20 °C között végzik. A folding kialakításánál kritikus folyamat a diszulfidhidak (kovalens kötések, nagyobb energiát képviselnek) megfelelő kialakítása. Ha egy fehérjemolekulában csak két hozzáférhető cisztein van, akkor nincs esély hibás kénhíd létrejöttére. Ha viszont több is van (n), akkor a lehetséges hidak száma $n*(n-1)/2$ – ekkor már nagy az esély a „téves” kapcsolódásra. Extrém példa a rekombináns fehérjeként gyártott szöveti plazminogén aktivátor (tPA), amelyben 17 diszulfidhíd fordul elő. Itt nagy a téves kötés esélye. A kénhidak létrehozásához az eddigiektől eltérően oxidáló közegre van szükség, ezt ditio-vegyületekkel érjük el. De mivel gyakran előfordul, hogy az adott SH-csoport elsőre nem a megfelelő partnerrel alkot kötést, biztosítani kell a felbontás és újrakötés lehetőségét is. Ehhez redukáló, hidrogén donor SH-vegyületek jelenlétére is szükség van. Erre a célra „redox-puffert” alkalmaznak, amiben az adott kénvegyület oxidált és redukált alakja egymás mellett van jelen – a fő reakcióiránynak megfelelően oxidáló túlsúlyal. Ilyen vegyületpárok például a glutation (oxidált > redukált forma), a cisztein < cisztin és a β -merkaptó-etanol < diszulfidja. A dinamikus kötés-felbomlás-újrakötés folyamat végeredményeképpen a kialakul az energiaminimum vagy ahhoz közeli állapot (259, 260. ábra).



285. ábra A diszulfidhidak újrakapcsolódása

A folding puffer alapja általában 0,1-0,2 M Tris, a pH változatlanul 7,5-8,5 közötti érték. A kénvegyületek koncentrációja 1-10 mM. Az oldat az eddigiekhez hasonlóan detergenset, pl. Triton-X-et, és 2-10 mM EDTA-t tartalmaz. Konzerválószerként a sejteket elpusztító azid helyett ~0,1 mM PMSF-ot (fenil-metil-szulfonil-fluorid, proteáz inhibitor) használnak. Emellett chaperon-hatású anyagokkal is kiegészítik az összetételt, így arginint adnak 0,4-1 M

koncentrációban. Kisebb koncentrációban kaotróp anyagokat is alkalmaznak, pontosabban benne hagyják az előző lépésből.



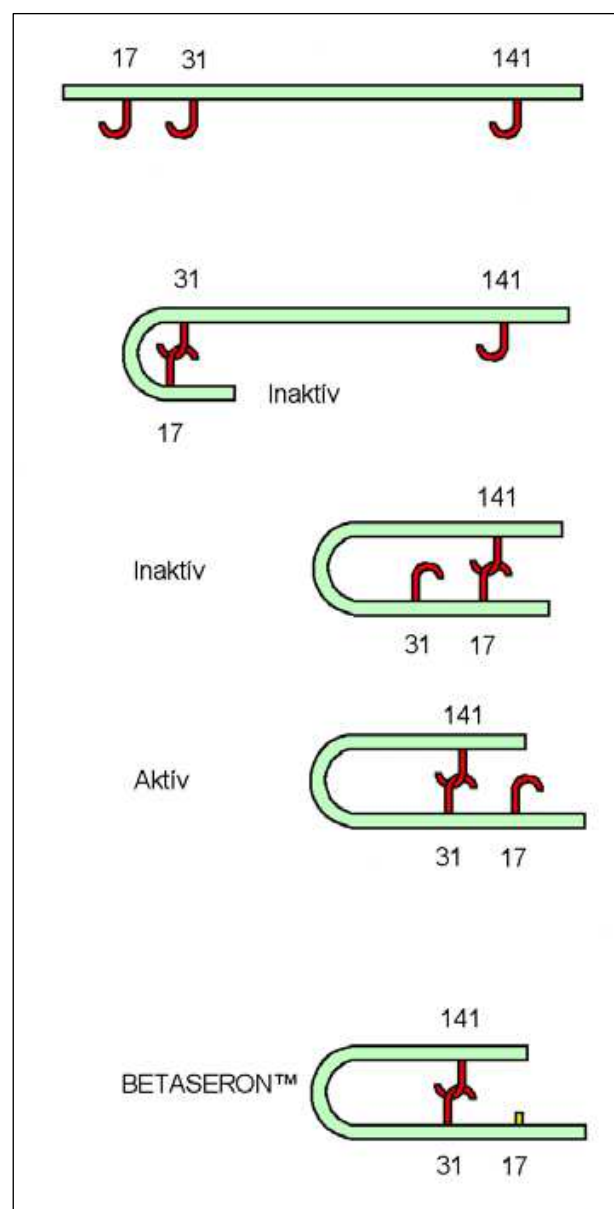
286. ábra A diszulfid hidak „újrakeverése”

15.2.1.5. A folding befolyásolása fehérjemérnökséggel

A foldingot, különösen a diszulfidhidak kialakulását egy vagy néhány kritikus aminosav kicserélésével meg lehet változtatni. A ciszteinek beépítésével vagy cseréjével a kötési lehetőségek megváltoznak.

Jó példa erre a BETASERON™ fehérje kialakítása. A béta-interferon (immunfehérje) eredetileg három ciszteint tartalmaz (17, 31 és 141 aminosav), ezek közül kettő (31 és 141) diszulfidhidat képez. Amikor rekombináns fehérjeként állították elő, problémát okozott, hogy az SH-csoportok statisztikusan kapcsolódtak össze, és a három lehetséges szerkezetből csak egy volt aktív. A hibás szerkezetű termékek kialakulásának megakadályozására a gén módosításával a 17 pozícióban álló ciszteint kicserélték szerinre. A szerin kémiaiailag hasonló tulajdonságú aminosav, oldalláncán SH-csoport helyett hasonló polaritású OH-csoportot tartalmaz, így a fehérje tulajdonságait legfeljebb minimális mértékben változtatja meg. Keresztkötések létesítésére a szerin viszont alkalmatlan, így csakis a megmaradt két cisztein között jöhet létre a kötés, így nem keletkeznek melléktermékek (261. ábra).

287. ábra A 17-cisztein kicserélése szerinre megakadályozza a téves kapcsolódást



15.2.2. Rekombináns fehérjék gyártása génmanipulált állati sejtekkel

Mielőtt az állati sejtekre épülő technológiákra térnénk, röviden tekintsük át a tenyészetek típusait és tulajdonságaikat.

Primer kultúrának nevezzük az eredeti szervből vagy szövetből frissen izolált sejteket. A szövetdarabot mechanikai és enzimes kezeléssel sejtjeire bontják, ezeket elkülönítik és tápoldatba viszik.

Szekunder kultúra az előző tenyészet egyszeri átoltásával jön létre.

Sejttörzs: A primer kultúrából néhány passzálás után kialakult véges élettartamú, korlátolt növekedésű (40-60 generáció) sejt-kultúra (pl. fibroblaszt tenyészet).

Sejtvonal: Genetikailag homogén, korlátlan ideig fenntartható kultúra. Ehhez az eredetileg szeneszcens sejteket immortalizálni kell. Ez előfordulhat spontán mutációkkal, de ez nagyon ritka, sok éves tenyésztési munka során néha sikerül (pl. patkány kardio-myocytá H9C2). A mesterséges immortalizációnak többféle útja is van:

- Transzfektálás virális onkogénekkkel; SV40 (Simian vírus)
- Hibridómák létrehozása (szeneszcens és tumoros sejtek fúziója).

Az emlős sejteken alapuló gyártások igáslova a CHO (Chinese Hamster Ovary) sejtvonal. A fajjal kb 100 éve dolgoznak a kutatók, de eredetileg *Pneumococcusok* vizsgálatára használták. Hatvan évvel ezelőtt kezdték a sejtvonalat tenyészteni. Eredetileg kitapadó sejtvonal volt, de később tucatnyi kutatóhelyen megannyi változatot állítottak elő, és létrejött a szuszpenziós növekedésre képes típus is. Jelenleg a technológiák ~70%-a CHO sejteket használ. A legelső termékénél (1987, Genentec, tPA = szöveti plazminogén aktivátor, ld később az esettanulmányt) még szakaszos tenyésztést alkalmaztak, kis térfogatokban, a tápoldathoz állati vérszérumot kellett adni, 6-7 nap alatt ~100 mg/lit koncentrációt értek el. A 2000-es évektől megjelentek a fed-batch v. perfúziós tenyészetek, megnövelték a térfogatokat (1000→25000 liter), egyszerűbb, CD (chemicaly defined) tápoldatokat használnak és ezekkel 1-6 g/literes hozamokat lehet elérni.

A CHO sejtek alternatívái:

NS0 sejtvonal: egér myeloma sejtek. A CHO-hoz hasonló a fehérje, de kevésbé humán a glikoziláció. A tápoldatba többlet komponensek szükségesek.

EB66 sejtvonal: kacsza embrió őssejtből spontán immortalizációval jött létre. Jó a fehérje glikozilációja, de magas licenszdíjat kérnek érte.

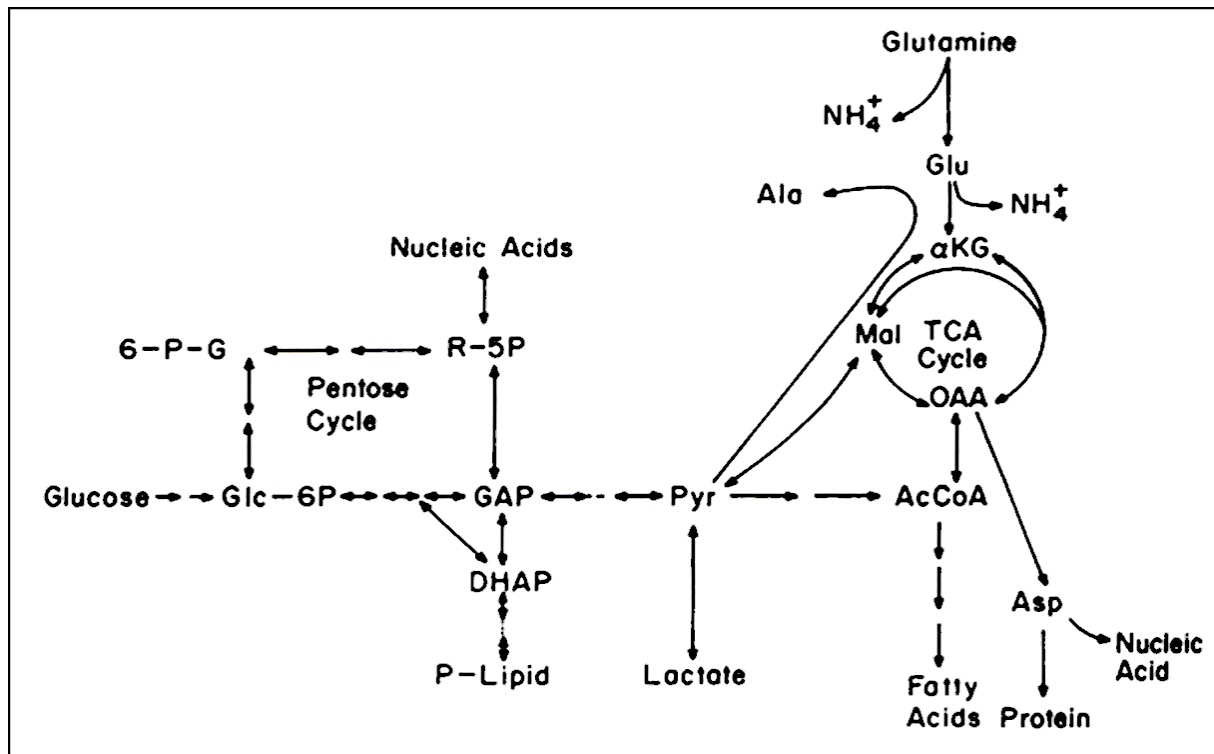
PER.C6: humán retina eredetű. Akár 30 g/liternyi glikozilált fehérjét termel, de magas licenszdíjat kérnek érte, és a tápoldatot is csak a licenszadótól lehet megvenni.

15.2.2.1. *Fermentáció (upstream)*

Az állati sejtek szaporítása egészen más feladat, mint a mikrobáké. A mikroorganizmusok változó környezetben élnek, alkalmazkodnak a változásokhoz, és ezeket a paramétereket kell optimálnunk ahhoz, hogy maximális termelést érjünk el. Az állati sejtek viszont állandó környezetben élnek, nem tudnak alkalmazkodni. Ez számukra az optimum, és ehhez képest csak minimális, óvatos változtatásokkal élhetünk a technológia során.

Ezt az állandó környezetet kell kialakítani és fenntartani a technológiában. Mi veszi körül a sejteket természetes állapotukban? A vér, illetve a majdnem teljesen azonos összetételű sejt-közi folyadék. Ez nagyon sok komponensből áll, ha kémiaiilag meghatározott (CD) tápoldatot készítünk, akkor kb. ötven nagyon tiszta komponenst kell pontosan bemérni. Míg a mikrobáknál elegendő volt valamilyen cukor, szójadara, és néhány műtrágya, az állati sejteknél sokféle, tiszta és drága anyagra van szükség.

Táploldatoknál mindig az az első kérdés, hogy mi a szénforrás? Az állati sejteknél ez egyértelmű, mindegyik a vércukrot, azaz a glükózt hasznosítja. Érdekes, hogy emellett a glutamin szénláncát is képesek feldolgozni a glutaminolízis során. Azaz a bioszintézis megfordul, a szénlánc végül alfa-ketoglutarátsavként lép be a citrátkörbe. Emiatt a glutamint a többi aminosavhoz



288. ábra A glikolízis és a glutaminolízis kapcsolata

képest kb. ötszörös feleslegben adják. A folyamat során ammónia szabadul fel, ami hosszú távon felhalmozódva gátolja, mérgezi a tenyészetet.

A további komponensek az ásványi ionok mellett az aminosavak (legalább 15 féle a húsból), vitaminok és a vérfehérjék.

Az ásványi ionoknál nem elegendő a beállított ozmózis nyomású (3-400 ozmól) fiziológias sóoldat, vagy Ringer oldat, hanem emellett az egyes ionok koncentrációját is reprodukálni kell, a membránpotenciálok és a pufferhatások (hidrogén-karbonát és foszfát) biztosítására. A vitaminok közül a vízben oldódók egy részét igénylik a sejtek.

A gyakorlatban legtöbbször az Eagle által optimalt táploldat változatait (MEM = Modified Eagle Medium) használják. A . **ábrán** egy finomvegyszer cég katalógusából átvett összetétel látható. Sokféle nagy tisztaságú és emiatt drága komponensből áll össze.

A táploldatba egyetlen olyan komponens kerül, ami az élő szervezetben nem fordul elő, a fenolvörös indikátor. A színe fiziológias pH-n, 7,4-nél vörös, de ha valamilyen folyamat lesavanyítja az oldatot, akkor élénk sárgára változik. Ez erős tejsav termelést, esetleg bakteriális fertőzést jelez, az ilyen kultúráknál be kell avatkozni.

A táploldatot csak nagyobb üzemekben érdemes helyben összeállítani és sterilizálni (szűréssel), egyébként beszerezhető egyszer használatos steril tenyésztőedényekbe kiszerve.

289. ábra Készen kapható táploldat, egyszer használatos T-flaskában



Dulbecco's Modified Eagle's Medium					
Component	D5546 [1×] g/L	D5648 g/L		D5546 [1×] g/L	D5648 g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS		
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Niacinamide	0.004	0.004
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—	0.004
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004	—
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER		
L-Leucine	0.105	0.105	D-Glucose	1.0	4.5
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	0.0159	0.0159
L-Phenylalanine	0.066	0.066	Pyruvic Acid • Na	0.11	—
L-Serine	0.042	0.042	ADD		
L-Threonine	0.095	0.095	Glucose	—	—
L-Tryptophan	0.016	0.016	L-Glutamine	0.584	—
			Sodium Bicarbonate	—	3.7

290. ábra Módosított Eagle médium (MEM) összetétele

Az állati sejt nem csak a kis molekulájú anyagokból igényli a vérhez hasonló koncentrációt, hanem igényli a vérfehérjék jelenlétét is. Ezt nagyon nehéz szintetikus anyagokkal pótolni. Kénytelenek vagyunk valódi vérszérumot (sejtmentesített vért) is használni. Újszülött állatok (borjú, néha csikó) vérért használják, pl. a borjú vágásánál steril körülmények között lecsapolják a vért, és az ebből elválasztott szérumot adják tápfolyadékba.

Kérdés: miért kell ehhez újszülött állat, amikor egy kifejlett marhában sokkal több a vér? Mert tisztább a vérszéruma. A felnőtt vérébe bele van írva az egész kórtörténete. Benne van az átélte összes fertőző betegség immunfehérjéje, az összes kapott védőoltás által létrehozott immunfehérjék, valamint a lappangó vírusok és vírusfehérjék. Az újszülött állat vérében ezek még nem jelentek meg.

A sejtvonalak nagy része igényli a vérszérum jelenlétét is (5-15%), enélkül elpusztulnak. A szérum komponens nagyon drága és nehezen reprodukálható, hiszen nincs két egyforma állat, még testvérek esetében sincs tökéletes azonosság. Emellett fertőzések forrása is lehet, tartalmazhat a mikrobák mellett vírusokat prionokat és változatos ellenanyagokat. A kutatók sok erőfeszítést tettek a szérummentes technológiák kifejlesztésére. Néhány sejtvonalat sikerült is hosszú manipulációval átalakítani úgy, hogy szérummentes tápoldaton is növekedjenek (egyes CHO, BHK sejtvonalak). Megjegyzendő, hogy bár az összes ismert sejtvonalból csak kb 5% képes szérum nélkül szaporodni, mégis az engedélyezett technológiák 95%-a ezeket használja.

A szérum komplex rendszer, legfőbb komponense az albumin (az összes fehérje kb. kétharmada). Mellette még legalább ezerféle alkotót lehet megkülönböztetni, sok szabályozó, serkentő és gátló faktor nélkülözhetetlen az egyes sejtek működéséhez is.

A tápoldat készítéséhez nagy tisztaságú vizet kell használni. Minősége megegyezik a WFI (water for injection = injekciós minőségű víz) követelményeivel. Az ionmentesség alapkövetelmény, a vezetőképességet általában 1-2 μ S alá csökkentik. Emellett szerves anyagokat sem tartalmazhat. A sterilitás mellett a pirogénmentességet is biztosítani kell.

A vízelőkészítési technológia során felhasználnak desztillációs, ionmentesítő, reverz ozmózis modult, továbbá aktív szerves anyag mentesítő patront és ultraszűrőt is a pirogén

Typical components (constituents) of serum

Protein Components: Serum proteins Albumin Globulins (e.g. Immunglobulins, IgG) α 1-Antitrypsin (Protease Inhibitor) α 2-Macroglobulin (Protease Inhibitor)	Fatty Acids and Lipids Free and Protein-bound Fatty Acids Triglycerides Phospholipids Cholesterol Ethanolamine Phosphatidylethanolamine
Transport proteins Transferrin Transcortin α 1-Lipoprotein β 1-Lipoprotein	Vitamins and Trace Elements Retinol/Retinoic Acid (Vitamin A) Vitamin B-Group: Thiamine Riboflavin Pyridoxine/Pyridoxalphosphate Cobalamin Folic Acid Niacinamide/Nicotinic Acid Panthothenic Acid Biotin Ascorbic Acid (Vitamin C) α -Tocopherol (Vitamin E)
Attachment and Spreading Factors Fibronectin Laminin Serum Spreading Factor	Selenium, Iron, Zinc, and Cu, Co, Cr, I, F, Mn, Mo, V, Ni, Sn
Enzymes Lactate Dehydrogenase Alkaline Phosphatase γ -Glutamyl Transferase Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Aspartate Aminotransferase (AST/GOT)	Carbohydrates Glucose Galactose Fructose Mannose Ribose Glycolytic Metabolites
Hormones Insulin Glucagon Corticosteroids Vasopressin Thyroid Hormones Parathyroid Hormone Growth Hormone Pituitary Glandotropic Factors Prostaglandins	Nonprotein Nitrogens Urea Purines/Pyrimidines Polyamines Creatinine Amino Acids
Growth Factors and Cytokines Epidermal Growth Factor (EGF) Fibroblast Growth Factor (FGF) Nerve Growth Factor (NGF) Endothelial Cell Growth Factor (ECGF) Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Insulin-like Growth Factors (IGFs) Interleukins Interferons Transforming Growth Factors (TGFs)	

mentesítésre. A fémionok beoldódása ellen a csöveknél, tartályoknál és szerelvényeknél a rozsdamentes acél helyett megfelelő műanyagokat használnak. A fertőzések megakadályozására a tisztított vizet 80 C-on tartják és csak felhasználás helyén hűtik le.

Tenyésztési körülmények

Mivel az állati sejteknek nincs sejtfaluk, ezért nagyon érzékenyek az ozmotikus és mechanikai hatásokra. Majdnem olyan óvatossággal kell kezelni a sejteket, mint a protoplasztokat. Nem szabad nagy nyíróerejű keverést alkalmazni, mert az szétszakíthatja a sejteket. Olyannyira érzékenyek, hogy a buborékok elpattanásánál fellépő hatások is kárt okozhatnak a sejtmembránban. Emiatt a fermentoroknál használt levegőztetési rendszerek (átbuborékolatás, turbulens keverés) nem alkalmazhatók.

Szerencsére az *oxigén igényük* elég kicsi, körülbelül százszor kisebb, mint egy hasonló mikroba tenyészeté. Emiatt nem kell átbuborékolatni a folyadékot a betáplált levegőt, hanem elegendő a folyadékfelszín felett átáramoltatni a steril levegőt.

A kis oxigénigény lassú anyagcserét jelez, lassabban szaporodnak, és lassabban használják fel a cukrot is. Némelyik sejt vonal igényli a széndioxid jelenlétét is a légtérben (2-5%). Ennek magyarázata az, hogy a szervezetben azok a sejtek, amelyek távol vannak a gyors és intenzív gázcserétől, alacsony oxigéntartalom és magas széndioxid tartalom jelenlétében működnek, azaz természetes környezetükben is magas az széndioxid szint.

Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C, rovarsejteknél 25-30 °C. Az emberek és a madarak állandó testhőmérsékletűek, de az evolúció során külön úton jutottak el az állandó testhőmérséklethez, ez okozza az eltérést. A rovarok változó testhőmérsékletűek.

Tenyésztő edények, készülékek

Alapállapotban a sejtvonalak felületi növekedésűek (anchorage dependant cells). Ennek megfelelően alakították ki a laboratóriumi és ipari méretű készülékeket. Ez a megoldás az egyéb fermentációknál megszokott szuszpenziós, szubmerz tenyésztéshez képest előnytelen, mert adott térfogatban csak nagyon kevés sejtet lehet nevelni. Hosszú manipuláció eredményeképpen néhány sejtvonalat sikerült „leszoktatni” a kitapadásról, ezeket a mikrobiális fermentációhoz hasonló edényzetben (rázott lombik, fermentor) lehet szaporítani. Itt is megfigyelhető, hogy bár a szuszpenziós sejtvonalak száma kicsi, de termelő eljárások túlnyomó része ezeket alkalmazza.

Felületi tenyésztés

Elsőként tekintsük át a felületi tenyésztés módszereit. Az edényeken belül megfelelő tapadási felületet kell kialakítani a sejtek számára. Ezen egyetlen sejt vastagságú réteg (monolayer) alakul ki.

A legegyszerűbb tenyésztő edény a *T-flaska* (T-flask, tissue flask), ennek alsó sima felületén tapadnak meg sejtek. Annyi tápfolyadékot töltenek bele, hogy lapjára állítva néhány milliméter vastag rétegben lepje el a sejtréteget. A monolayer annyira vékony, hogy majdnem átlátszó, szabad szemmel alig látszik. Ha egy kicsit megmozgatjuk az edényt, akkor lehet némi opalizálást látni a felületen.



291. ábra Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi tenyésztéshez)

Az edény nyaka nem szimmetrikusan, középen helyezkedik el, hanem fölfelé eltolva. A magasabban lévő nyak miatt a folyadék nem éri el a nyakat és a dugót. Az edények különböző méretben, sterilizve, akár tápoldattal töltve kaphatók. Anyaguk műanyag, általában egyszeri használat után eldobható. Üveg edényeket nem szoktak használni, mert az üveg anyagából kálium, nátrium és más fémionok oldódnak ki, és a sejtek erre is érzékenyek.



292. ábra Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi tenyésztéshez)

A kitapadó sejtekhez is használnak különböző méretű műanyag Petri csészéket. A jobb oldali képen látható elrendezés sok (6, 12, 24, 48, 96) kis Petri csésze együttesének fogható fel, ezeket tálcának (multiwell plates) nevezik. Sorozatvizsgálatokra különösen alkalmasak.

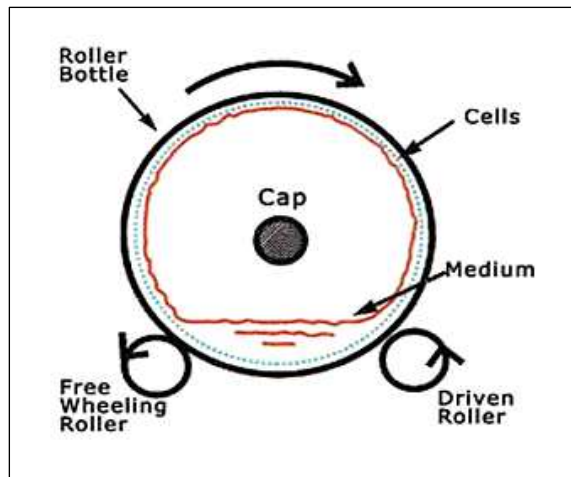
Nagyobb léptékű szaporításnál minél nagyobb benőhető felületre van szükség a készülékekben. Erre többféle szellemes megoldást is kitaláltak.



293. ábra Multitray

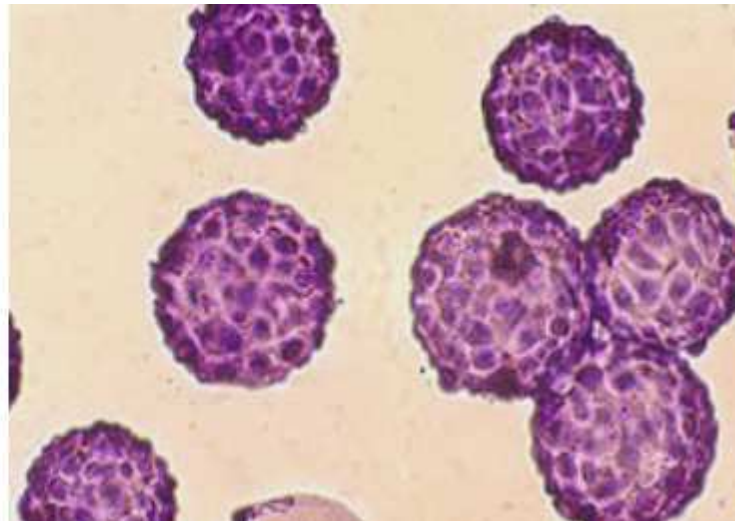
A 267. ábrán látható megoldások nagyobb felületűek. A Multitray sok lapos cella egymásra helyezésével jött létre. A sarkokban lévő csatornák és túlfolyók rendszere úgy van kialakítva, hogy szétszedés nélkül is minden tálca feltölthető vékony rétegben tápoldattal, ugyanakkor mindegyik fölött kialakul egy légréteg is.

A *forgó palackok* (roller bottles) pontosan henger alakú edények, amelyek vízszintes helyzetben görgőkön fekszenek. A görgőket motor hajtja, ami lassan (kb 1-2 perc alatt) megforgatja az edényt. Kevés tápoldat van benne (a térfogat 10-20 %-a), ami a forgatás miatt folyamatosan nedvesíti a teljes belső felületet. A sejtek így benövik a teljes hengerpalástot. A folyadékból kiemelkedő monolayer a körülfordulás ideje alatt nem szárad ki, nem károsodik, sőt a levegővel érintkezve nagyon jó a sejtek oxigénellátása.



294. ábra Forgó palack (roller bottle)

Mikrokarrieres tenyésztés: a felület növelésének másik lehetősége a fajlagos felület növelése. Ha hordozónak nem sík felületű edényeket, hanem apró szemcséket választunk, akkor ugyanakkora edénytérfogatban sokszoros nagyságú növekedési felületet biztosíthatunk a sejteknek. A mikrokarrierként (= kicsi + hordozó) inert anyagokból készült apró szemcséket alkalmaznak. Ezek néhány száz μm átmérőjű, azaz a sejtek méreténél egy nagyságrenddel nagyobb gömböcskék. A sejtek megtapadnak a gyöngy felületén, elszaporodnak, egy rétegben beborítják (monolayer).



295. ábra Inokulálási/tapadási fázis

kialakult monolayer

A 295. ábra bal oldalán a kezdeti állapot látható, amíg csak néhány sejt tapadt meg, míg a jobb oldalon már a teljes borítottság, a kialakult monolayer figyelhető meg, mikroszkópi festéssel.

A mikrokarrieres alkalmazása nagy áttörés volt sejtenyésztés technológiájában (van Wezel 1967). A kialakított technológiai paraméterek:

- szemcseátmérő: 100-300 μm , azaz a sejtek méreténél egy nagyságrenddel nagyobb. Így van felület a növekedéshez, több tucatnyi sejt fér el egy szemcsén.
- sűrűség: 1020-1050 kg/m^3 (enyhe keveréssel ez még lebegésben tartható, de a keverés leállításával leülepszik, a felülúszó elvehető).
- Mennyisége: a tápoldatba 8-15%-nyi hordozót visznek be.

- Fajlagos felülete: 0,5-1,5 m²/liter, ami 10-30 forgó palacknak felel meg, = nagy produktivitás.

Előnyei:

- nagy felületet be lehet bevinni egy adott reaktortérfogatba
- viszonylag homogén környezet a sejtek számára
- nincs szükség új reaktortípusokra (a mikroba-fermentorok kis átalakítással használhatóak)

A karrier gyöngyöket nem szokták újra felhasználni, mivel túlságosan bonyolult lenne a regenerálásuk.

A tenyésztés indítása flaskákról vagy forgó palackról történik. A monolayer tripszinnel oldják le a felületről. Ez a proteáz elbontja a ragasztó fehérjéket és felúsznak a sejtek. A kezelés idejét nagyon precízen kell beállítani, mert hosszabb idő alatt az enzim károsítja a sejteket is. Vagy stopperrel kimérik az optimált kb 5 perces időtartamot, vagy felületi mikroszkóp alá teszik a flaskát és amikor a sejtek nyúlványos alakjukból lekerekednek, akkor adnak hozzá friss szérumos tápoldatot, amelyben az inhibitor fehérjék leállítják a további bontást. Oldásnál átlagosan 5-6 sejt/szemcsényi mennyiséget visznek be, így biztosan minden karrierre jut legalább egy sejt.

A növekedés a sejtvonaltól, a mikrokarrier jellemzőitől, a sejt növekedési fázisától, a médium összetételétől és a sejt/mikrokarrier számaránytól függ.

A gömbökön megtapadt sejtek károsodhatnak a szemcsék összesúrlódásától, a nyírás ledörzsölheti a sejteket a felületről. Emiatt lekerekített, nagy átmérőjű keverőket alkalmaznak, nagyon kis fordulatszámmal (10-30 rpm).

Szuszpenziós tenyésztés

A mikrokarrier alkalmazásával egyformán kezelhetjük a kitapadó és a szuszpenziós tenyészeteket. Alkalmazhatunk fermentorszerű készülékeket, de lassú fordulatú, kis nyíróerejű keveréssel, minimális levegőztetéssel.

A leggyakoribb keverési megoldások:

„Spinner flask”

Ezeket a keverős edényeket 0,5 l-estől a 10 l-es ürtartalomig használják. A nagy, középső kupak alsó oldalára csuklósan csatlakozik a keverő. Mágneses meghajtású, alul a kereszttrúdban egy mágnes található. Az edényt rá kell helyezni egy keverő berendezésre, amelyben egy mágnes forog lassan körbe. A forgó mágnes viszi magával a keverő elemet, ami lassan kavarja a karriereket. A fehér háromszögletű teflon lap a keverőn a leülepedő szemcsék felkavarását, „ekézését” végzi.

Az oldalsó csonkok arra szolgálnak, hogy a menet közbeni beavatkozásokat (beadagolás, mintavétel pipettával) ezeken át el lehessen végezni.

296. ábra Spinner flask



A tenyésztéseket steril körülmények között hajtják végre, az edény minden része sterilizálható.

A jobb oldali képen nehezebben kivethető, de a keverő ferde rúdjának végén egy golyó alakú keverőelem van. Ennek a belsejében található a mágnes. Az edény alatt a meghajtó egység egy mágneset keringet, ez viszi körbe-körbe a gömb alakú keverőt.

Adalék: Laborszengben ezt a típust bim-bam keverőnek is nevezik, mert a felépítése hasonlít a harang/harangnyelv kialakításhoz.

297. ábra Spinner flask „bim-bam” keverővel



Minibioreaktorok

A sorozatvizsgálatok elvégzéséhez szükségessé vált kis térfogatú, de keveréssel, mérő és szabályozó eszközökkel felszerelt készülékek kialakítása is.

Ennek legkisebb képviselője mindössze 12 milliliteres, alakja nem is a megszokott hengeres, hanem téglatest (laborszengben: Tictacos doboz). Hat önálló reaktor alkot egy blokkot, de ez többszörözhető akár 96 elemig. Az érintésmentes pH és a DO mérést úgy oldották meg, hogy az átlátszó reaktor belső felületére felvittek egy-egy fluoreszkáló festékfoltot, aminek fénykibocsátása arányos a két koncentrációval. Lézerfényrel megvilágítva és a fluoreszcens fényt

298. ábra 12 ml-es minibioreaktor érték.

A következő lépték 200 ml-es. Ezek a hengeres üveg készülékek már jobban hasonlítanak egy fermentorra, a fejen lényegesen több szerelvény kap helyet. Automatikus adagolások és mintavétel is lehetséges.

Egy nagyságrenddel feljebb, 2 literes térfogatban is építenek sorozatvizsgálatra alkalmas laboratóriumi sejt-fermentorokat. Ezek kiszolgáló egységei már külön házban működnek, de a számítógépes irányító rendszer közös.



mérve akár folyamatosan is mérhető ez a két



299. ábra 200 ml-es minibioreaktorok



300. ábra 2 literes sejtfementorok

Termelő bioreaktorok

A nagyobb, ipari berendezések kialakítása és szerelvényei nagyon hasonlóak a fehér biotechnológiában használatos készülékekhez. A különbség a nagyobb tisztaságban, nagyobb sterilitás igényében, homogén oldatok (CD tápoldatok, nincsenek szemcsés komponensek) használatában, és az igényesebb, sokféle precíz szabályozást igénylő technológiában mutatkozik.



301. ábra 1 m³-es termelő bioreaktor (a Richter debreceni üzemében)



302. ábra 15 m³-es termelő bioreaktor, nagy része a padozat szintje alatt

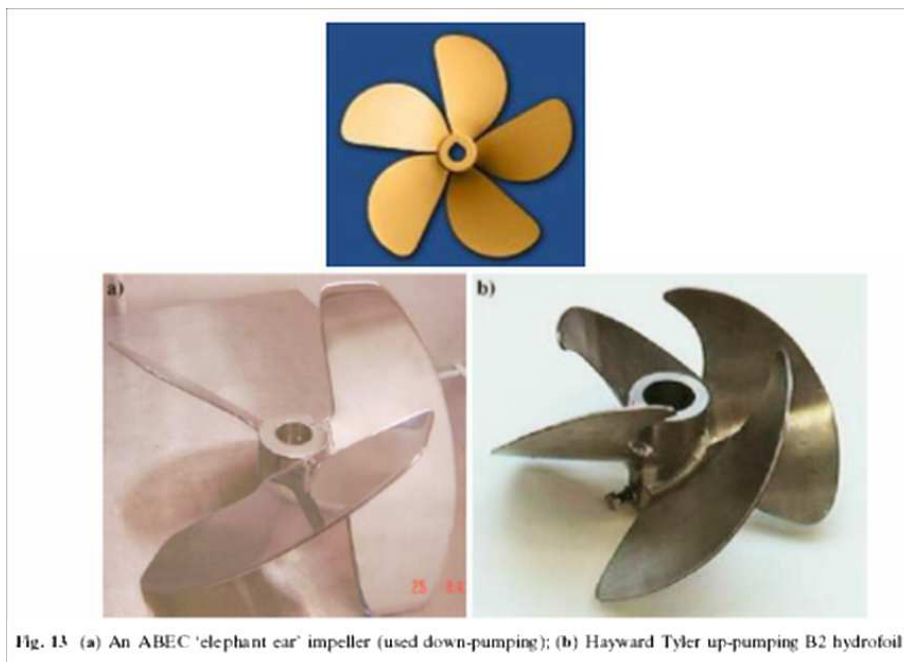


Fig. 13 (a) An ABEC 'elephant ear' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil

303. ábra Keverők: lekerekített formák, hajócsavar alak, 25-150 rpm

A **keverésnek** is más a szerepe. Az energiabevitel nagyon kicsi, kevés oxigén kell a sejteknek, a keverés nem is a levegőztetéshez szükséges, hanem a cél a homogenizálás és a sejtek/mikrokarrierek lebegésben tartása. Lassú járású, nagy átmérőjű, lekerekített formájú, keverőket használnak.

Adalék: érdekes technológiai analógiát láthatunk az ilyen keverők és a tengeralattjárók hajtócsavarjainak kialakításában. A sejteknél az örvénymentes, minimális nyírású keverés a sejtek épsége érdekében fontos. A haditengerészetnél viszont a rejtőzködés, a hajócsavar zajának csökkentése a cél, mivel akusztikus eszközökkel a hajókat akár száz kilométer távolságból is észlelni lehet. A két alkatrészt azonos méretezési elvekkel, hasonló programokkal tervezik, a forma hasonlósága szemmel látható.

Levegőztetés: inkább felületi vagy indirekt levegőztetés, mert a buborékok itt is károsíthatják a sejteket. A buborékok hatása csökkenthető megfelelő detergenssek (pl. Pluronic) alkalmazásával.

Felületi levegőztetés: a folyadék feletti levegőtér fogatot öblítik át. A folyadék felületén keresztül beoldódik annyi oxigén a folyadékba, amennyi a sejteknek kell.

Indirekt levegőztetés:

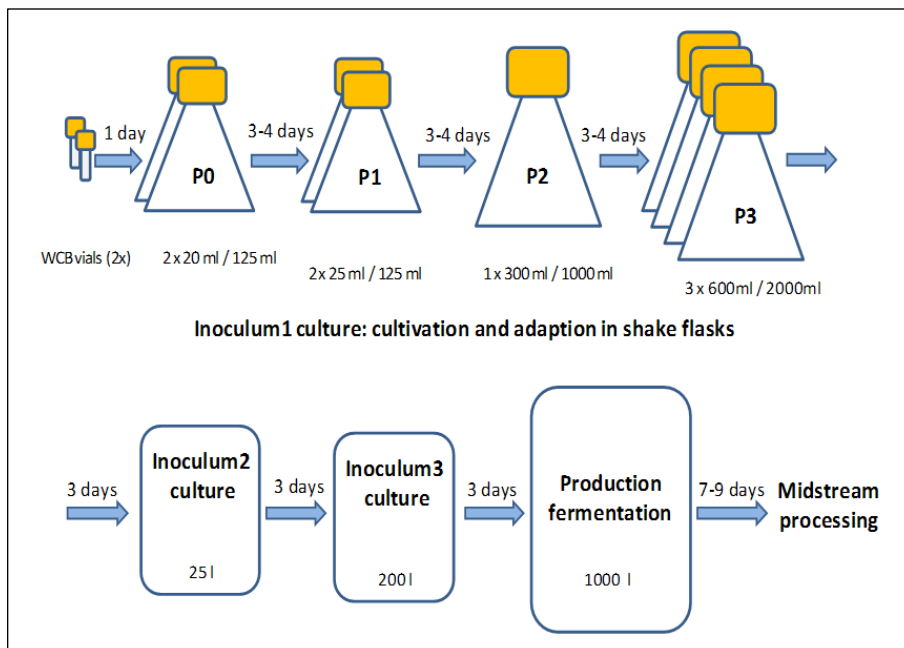
Membrándiffúzióval: a fermentlébe egy vékonyfalú szilikon cső spirált merítenek. A levegőt a csövön áramoltatják át. Így a folyadék nem érintkezik a levegővel, csak a szilikon cső falán keresztül. A szilikon cső fala tulajdonképpen egy membrán, melyen az oxigén jól áthatol és átdiffundál a folyadékba (fordított pervalporáció).

Emlékeztető: Az oxigén egy apoláris molekula, a szilikon anyag szintén erősen apoláris jellegű, azaz hasonló polaritású anyagok. Ezért az oxigén hajlamos beleoldódni a szilikon anyagába és átdiffundálni rajta.

Perfúzióval: a fermentlevet két térre osztják egy olyan fém szitával, vagy mikroszűrő membránnal, ami a folyadékot átengedi, de a sejteket nem. A sejtmentes térbe buborékolatják be a levegőt, ez telíti a folyadékot oxigénnel. Az áramlás révén a folyadék folyamatosan kicserélődik a sejtes térrel, és magával szállítja az oxigént, a sejtek viszont nem jutnak be a levegőztetett térbe.

Szaporítás, fermentációs technikák:

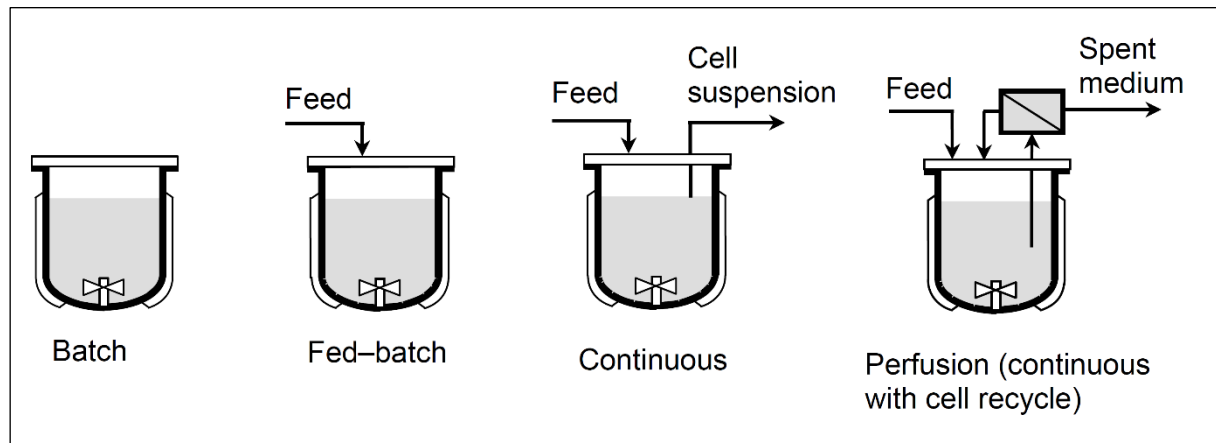
Az emlős sejteknél az oltótenyésztet készítése ugyanúgy lépcsőzetes szaporítással történik, mint a mikroorganizmusoknál. A különbség annyi, hogy a térfogatnövelési lépcsők kisebbek, a tízszeres ugrások helyett inkább csak ötszörös az oltási arány, kevesebb osztódás megy



304. ábra Lépcsőzetes szaporítás

végbe egy lépésben. Ezeknél a lépéseknél még nem a termékképzés a fontos, hanem a sejtek szaporítása, igyekeznek az exponenciális fázisban lévő tenyészetet tovább oltani.

A termelő fermentációnál a tápanyagbevétel szerint az emlős sejteknél is többféle technikát alkalmazhatunk, ugyanúgy, mint a mikrobák szaporításánál.



305. ábra A különböző fermentációs technikák sémája

Szakaszos tenyésztés: (batch): a folyamat legelején az összes tápanyagot bemérik tápoldatba, beviszik az oltótenyészetet, elindul a szaporodás, a termékképzés, majd a végén elveszik a levet, továbbadják feldolgozásra. Menet közben további tápanyagot nem adnak hozzá. Gyenge produktivitás, a sejtkoncentráció $1-2 \times 10^6$ sejt/ml. Időtartama maximum egy hét.

Rátáplálásos-szakaszos (fed-batch): a szakaszoshoz hasonlóan indul, de menetközben többször is pótoljuk az elfogyasztott tápanyagokat. Általában glükózt és aminosavakat tartalmazó tápoldatot (feed) adnak hozzá. A beadott oldat összetétele különbözik az indulásitól. Koncentrációja is lényegesen nagyobb, mivel az adagolás során jelentősen hígul. A többszöri rátáplálással akár 3 hétig is fenntartható a folyamat, és ennek megfelelően a sejtszám és a produktivitás is nagyobb. Határt szab a termelésnek, hogy a fermentor térfogata véges, és a toxikus anyagcseretermékek (tejsav, ammónia) felhalmozódnak a lében.

Félfolytonos tenyésztés: a félfolytonos technika alapja a program szerinti lefejtés és tápanyag betáplálás. Ezzel egyrészt pótolható az elfogyasztott szubsztrát és a fermentálé térfogata is állandó marad. A perfúziós jelzőt akkor kapcsoljuk hozzá, ha az elvételnél a sejteket valamilyen módon visszatartjuk a készülékben.

Mikrokarrieres esetében ez egyszerű, elegendő a keverést kikapcsolni és a hordozó szemcsék könnyen leülepednek. A fölülúszó leszívható, a benne lévő termékkel együtt. A hordozón lévő sejtekre újra friss tápoldatot töltenek. A sejtszám egy idő után már nem növekszik, hiszen a monolayer már kialakult, de a sejtek fehérje termelése minden adagolásnál újra indul.

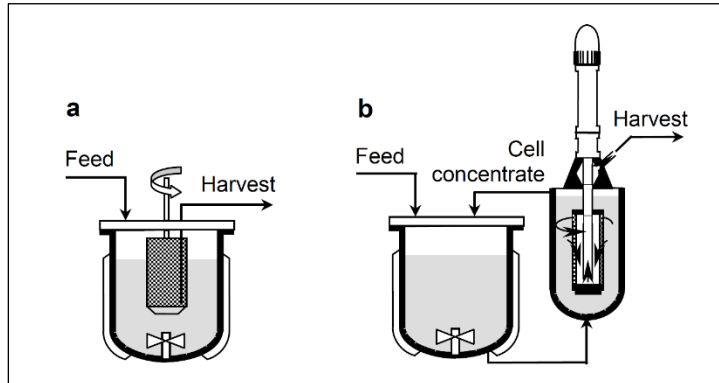
Folytonos tenyésztés (+ perfúziós):

A mikrobiális fermentációkhoz hasonlóan itt is a betáplálás és az elvétel folyamatos, térfogatárama állandó és egyenlő.

Sejtvisszatartás, recirkuláció

A sejtek visszatartása a szuszpenziós tenyésztésnél nehezebb a feladat, hiszen a jóval kisebb, nehezebben ülepedő sejteket kell elválasztani. Erre a célra különböző technikákat alkalmaznak.

Gyakran használnak a különféle szűrőket és szitákat. A sziták érdekes alkalmazása a dinamikus szűrést megvalósító forgó szitahenger. A szita felületén a folyadék gyorsan áramlik, a fémllemezen az áramlás irányára merőlegesen pontosan beállított szélességű rések (nem kerek lyukak) vannak. A kialakuló örvények miatt a szita nem a rés szélességének megfelelő méretű részecskéket tartja vissza, hanem a feleakkorákat is. A szitahenger forog a folyadékban, így jön létre a felületi áramlás. Az intenzív áramlás miatt a sziták nem tömődnek el. A szita lehet a



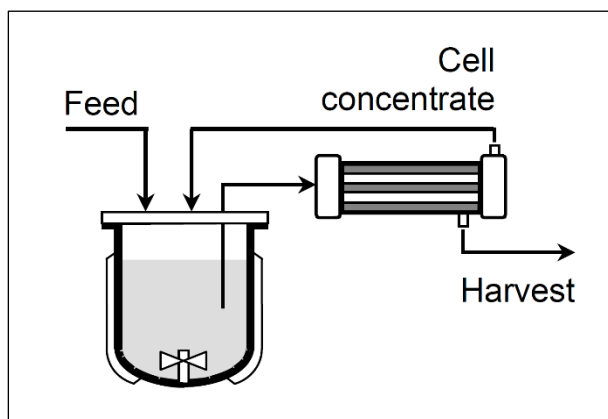
306. ábra Külső és belső sejtle választók

fermentorban, de lehet egy külső cirkulálókörben is.

Adalék: az elv ugyanaz, mint az ívszitáknál, csak ott a folyadék mozog, egy fúvókán keresztül „lövik” rá az álló felületre.

A belső elhelyezés teszi lehetővé a már említett perfúziós levegőztetést. A henger belsejébe vezetett levegő buborékjai nem találkoznak a kívül lévő sejtekkel.

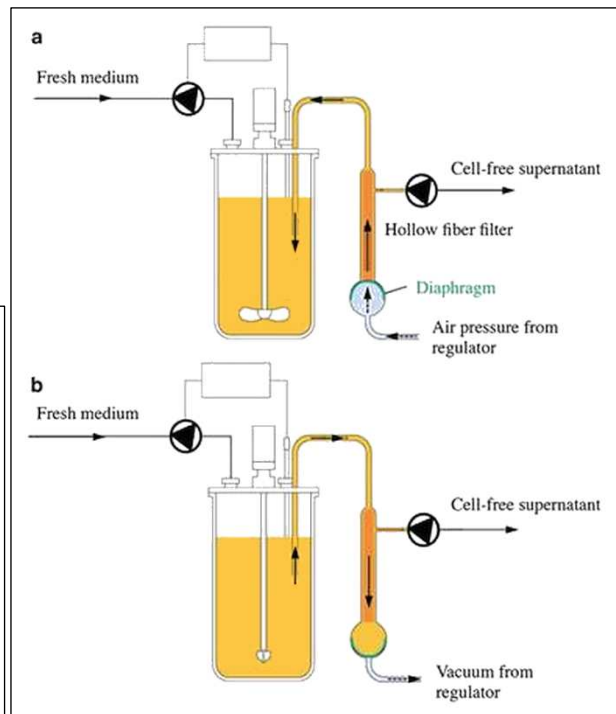
Szintén méret szerinti elválasztást lehet megvalósítani mikroszűrő membránokkal. A szokásos membránmodulok közül jellemzően hollow fiber (üregesszál) kialakítást alkalmaznak. A legnagyobb problémát itt a membrán eltömődése okozza. Nehéz a vékony csatornákon belül olyan intenzív áramlást létrehozni, ami a tangenciális szűrés elveinek megfelelően tisztán tartaná a felületet. Ráadásul egy ilyen technológia hetekig tart, és a szűrésnek mindvégig egyformán működni kell.



308. ábra Sejtvi sszatartás membránmodullal



307. ábra Kiszerezelt forgó acélszita

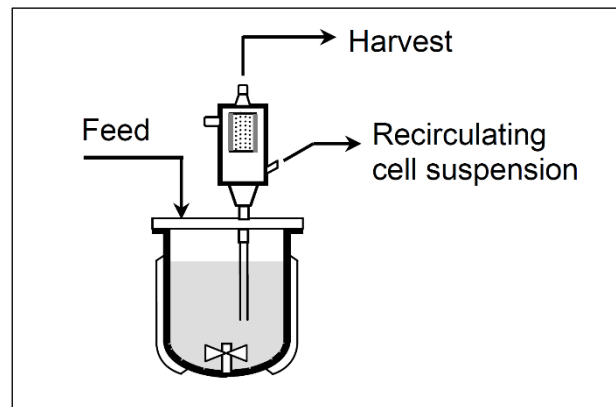


309. ábra ATF = alternating tangential filtration

Ezért aztán a készüléket kiegészítették egy pulzáló áramlást biztosító egységgel. A membránmodulhoz kapcsolva egy diafragmával, mint dugattyúval váltakozó irányban mozgatják a szálakban lévő folyadékot. Vákuum ráadásával szívóhatás keletkezik, a membrán pórusaiban visszafelé indul el a folyadék, ezzel kiköködnek a beszorult sejtek. A túlnyomás pedig segít átnyomni a szűrletet a pórusokon és a tömönyebb sejtsuszpenziót visszanyomja a reaktorba.

A sűrűségkülönbségen alapuló elválasztási műveletek is alkalmasak a sejtek és a fermenté elkülönítésére. Ennek a klasszikus módszere a gravitációs ülepítés. Ez az emlős sejteknél önmagában túlságosan lassú és rossz hatékonyságú, ezért inkább a módosított, továbbfejlesztett változatait használják.

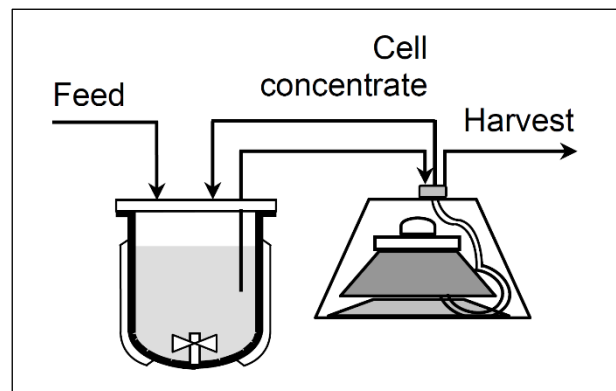
Az ülepedést elő lehet segíteni ultrahangos kezeléssel. Ez nem azonos az ultrahangos sejtfeltárással, hanem lényegesen kisebb energiabevittel állóhullámokat hoznak létre a folyadékban. Az állóhullámok csomópontjai között a sejtek laza csomókban összegyűlnek. Az ultrahang kikapcsolásával leülepednek és visszasüllyednek a fermentorba. Ezután a keverés megszünteti a csomókat, a lé újra homogénné válik.



310. ábra Ultrahangos sejtvisszatartás

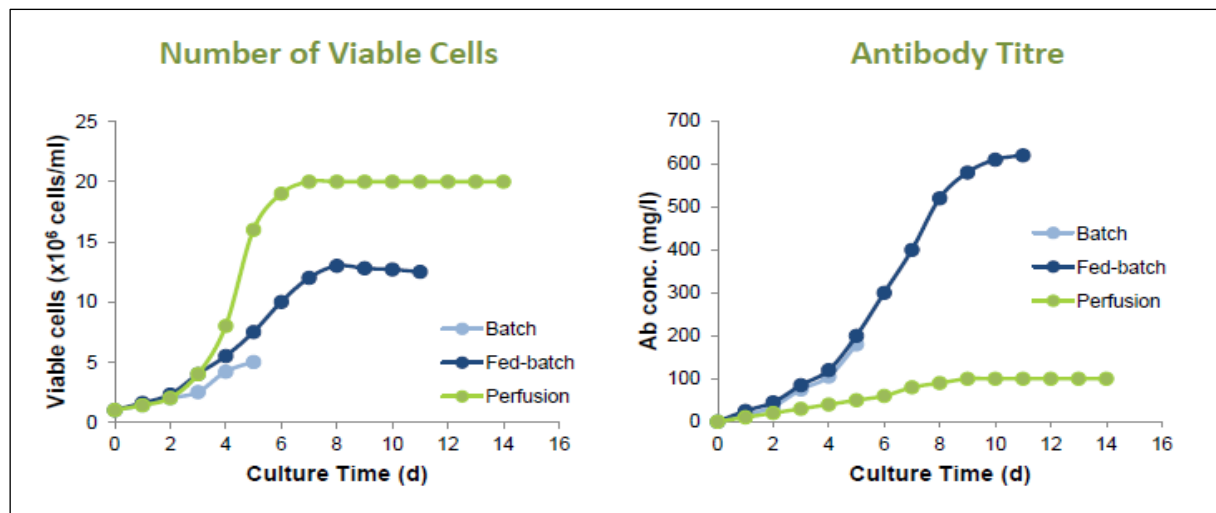
Ipari léptékben legjobban alkalmazható a *centrifugálás*. A készülékben a sejtek károsodás nélkül elviselnek 200-500 g gyorsulást, viszont ügyelni kell a nyíróerőkre.

A hagyományos lemezes kialakítású (Westfalia) centrifuga is megfelel a célnak, ha kellőképpen lelassítják. A másik megoldás a harang centrifuga (Centritech), amelynél a sejtet a forgórészbe helyezett egyszer használatos zsákon vezetik keresztül. A betáp, a recirkuláció és az elvétel (kötegelt) flexibilis csöveken történik. A kétrészes forgórész szellemes kialakításával érik el, hogy a cső nem tekeredik meg, az áramlás folyamatos. (Ezt a típust használják a vérsejtek elválasztására is.)

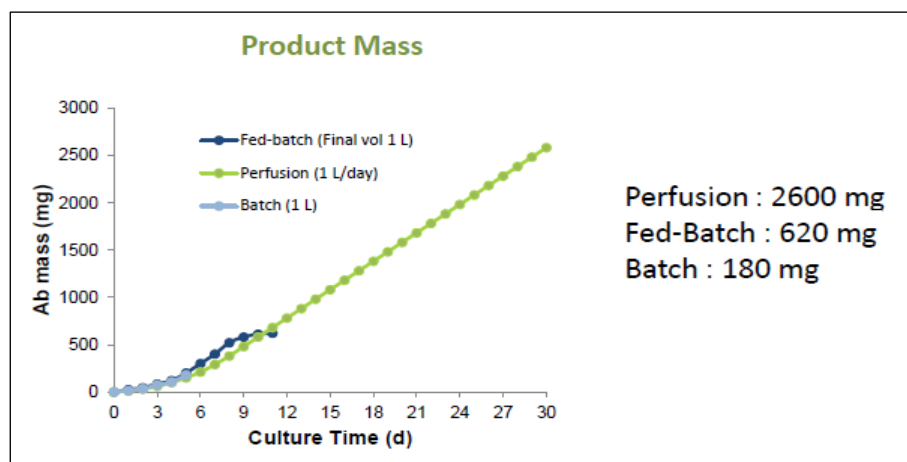


311. ábra Centritech harangcentrifuga

A recirkuláció következtében az elérhető sejtszám egy nagyságrenddel is nagyobb lehet, 10^7 - 10^8 sejt/ml közé is emelkedhet. Ha nagyobb a sejtsűrűség, akkor nagyobb a megtermelt anyag (fehérje) mennyisége is. A lefejtéssel és rátáplálással akár 6 hétig is fenntartható egy termelési folyamat. Mindvégig fenntartható a jó szubsztrát ellátás és a káros metabolitok (pl. tejsav, ammónia) is eltávoznak. Sejtszám szempontjából a perfúziós tenyésztés a leghatékonyabb, a termék koncentráció viszont a rátáplálásnál a legnagyobb,



313. ábra Sejtszám és termékconcentráció összehasonlítása



312. ábra Az akkumulált termékmennyiség összehasonlítása

Az akkumulált összes termék mennyisége viszont a perfúziósnál maximális, még akkor is, ha figyelembe vesszük, hogy a rövidebb folyamatokat a vizsgált harminc nap alatt többször is újra indíthatjuk. A perfúziós technika produktivitása, az idő és térfogategységre vonatkoztatott termékképzése kiemelkedik, összevetve a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak kb. 1%-a.

A reaktor és módszer kiválasztása sokszor annak alapján történik, hogy mennyi a termékre van szükség. Ha kevés betegnek egy terápiához az adott hatóanyagból csak néhány μg -ra van szüksége, akkor azt elég kis mennyiségben (forgó palackban) gyártani. Monoklonális ellenanyagból viszont a kezeléshez 20-30 g is szükséges lehet, így ezt nagyobb térfogatú fermentorban célszerű előállítani.

Adalék: ez a döntés egyúttal csapda is lehet. Ugyanis, ha egy gyógyszer hatóanyag gyártását egy bizonyos technikával engedélyezte a hatóság, akkor attól még ésszerű indokokkal sem lehet eltérni. Így járt az Amgen is, amely forgó palackban engedélyeztette a rekombináns eritropoietin gyártását. Amikor kiderült, hogy a piaci igény sokkal nagyobb a vártnál, nem vihette át a gyártást fermentorba, kénytelen volt ráállni több ezer forgó palack használatára, ami extrém költségekkel járt.



314. ábra 5000 forgó palackot mozgató berendezés

Egyszer használatos bioreaktorok

A tenyésztés befejeztével reaktorokat kiürítik, és a következő tétel indítása előtt gondosan, több lépcsős tisztítási program végrehajtásával kitisztítják. Ez vegyszeres és vizes mosások és öblítések sorozatát jelenti. A fermentor tisztaságát validálják, majd üresen sterilizelik, végül beveztik a szűrővel sterilizett tápoldatot. Ez az idő és vegyszerigényes lépéssor elhagyható, ha egyszer használatos bioreaktorokat használnak. Ezek több (általában hét)rétegű műanyag zsákok, ami összehasonlíthatlanul olcsóbb, mint egy azonos térfogatú, elektropolírozott rozsdamentes acélból készült reaktor. Ezért terjednek egyre nagyobb léptékben is az eldobható bioreaktorok. A megfelelő csatlakozókkal ellátott zsákokat steril állapotban szállítják. Gyorsan és könnyen csatlakoztathatók a kiszolgáló rendszerekhez. A megoldás kritikus pontja a keverő és a (még) nem egyszer használatos szenzorok (pl. pH, DO elektródok) illesztése. A keverő elhagyásával az egyik probléma megszűnik, erre fejlesztették ki a hullám-bioreaktorokat. A zsák egy teknőszerű tartóban fekszik, amit a gépezet ütemesen 10-20 fokos szögben megbilient. Az oda-vissza mozgás okozta hullámozás



315. ábra Hullám bioreaktor

elegendő ahhoz, hogy a szükséges oxigén mennyiség beoldódjon.

A tényleges keverést is megoldották. A reaktor hengeres alakját egy külső támasztó lemezköpeny biztosítja. A zsák része a tengely számára kialakított benyúló cső, aminek a végén található a műanyag keverő elem, belsejében egy állandó mágnessel. A csőbe vezetik bele a forgó tengelyt, aminek a végén szintén egy mágnes van. A mágneses kapcsolat viszi át a forgó mozgást a keverőre.



316. ábra Keverős egyszerhasználatos bioreaktor

Az egyszer használatos eszközök összekapcsolásánál kulcskérdés a csatlakozók gyors, egyszerű és a sterilitást garantáltan megőrző összekapcsolása. Erre több szabványos megoldást alakítottak ki, amelyeknél a csatlakozókat fólia fedi, steril lezárva a belső teret. A végdarabok fóliáit összeillesztve két vég összekattintásával létrejön a zárt kapcsolat. Ezután a két fóliát ki kell húzni a csomok közül, és a két steril tér összekapcsolódik. *(Ez a megoldás hasonlít a printer tonerek üzembe helyezéséhez, ahol szintén ki kell húzni a záró fóliát ahhoz, hogy a festék kiszabaduljon.)*

Az egyszerűbb megoldásoknál a kötés nem oldható, végérvényesen egyesíti a tartályzsákokat. De léteznek felbontható csatlakozások is, amelyek lehetővé teszik a kötés bontását és újra csatlakoztatását is.



317. ábra Steril terek összekapcsolására szolgáló csatlakozó

Összefoglalva:

Az egyszer használatos bioreaktorok előnyei:

- Elmarad a CIP/SIP (helyben tisztítás és sterilizálás)
- Lerövidül az átállási idő a sarzsok között
- Kisebber beruházási költség
- Flexibilisebb gyártás

Hátrányai:

- Problémás az érzékelők beillesztése
- Léptéknövelési korlát
- Erős függés gyártóktól, kiszolgáltatottság



318. ábra 200 literes keverős egyszer használatos bioreaktor beállítása

Az egyszer használatos eszközök alkalmazása a későbbi lépésekben is terjed, tároló/szállító tartályként, illetve a feldolgozás során is egyre több helyen megjelenik.

Flexel® 3D Bag Modular Palletank® System



Specifications

Material:	Stainless Steel 304L
Surface Finish:	Bad Blasted
Volumes:	100 200 L, 500 L, 1,000 L

Dimensions

100 200 L	792 × 592 × 720 mm (31.2" × 23.3" × 28.3")
500 L	1192 × 792 × 856 mm (46.9" × 31.2" × 33.7")
1,000 L	1192 × 992 × 1235.5 mm (46.9" × 39.1" × 48.6")

Stack ability

100 L 200 L	3×
500 L	2×
1,000 L	not to be stacked

Description

The Modular Palletank® Systems are stainless steel containers designed for the safe and

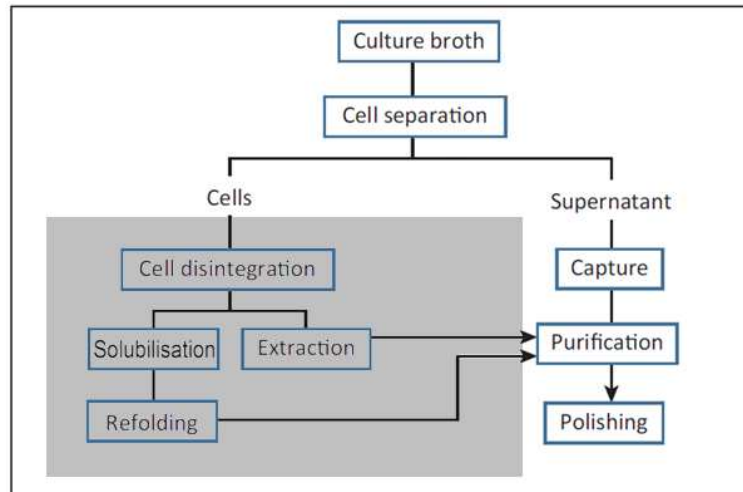
Flexibility

Each Palletank® includes an integrated pallet base that allows easy carriage by pallet-jack

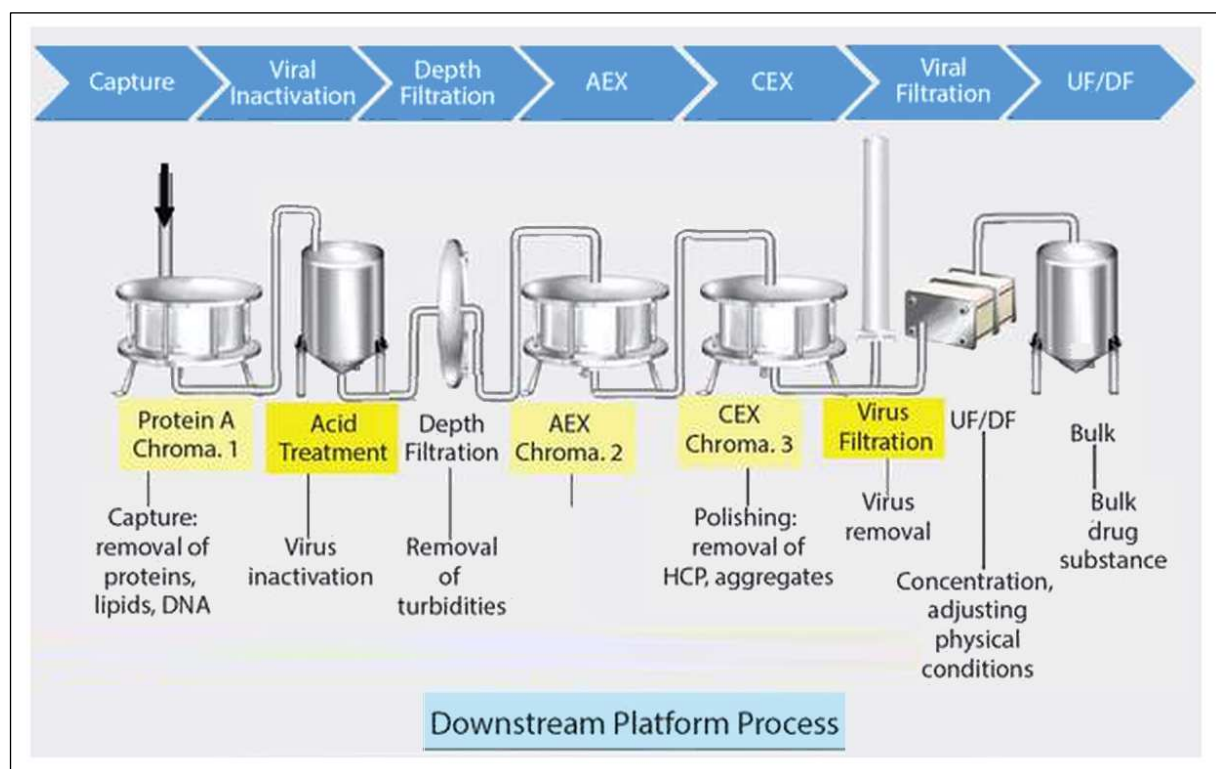
319. ábra Tároló tartály helyett egyszer használatos fóliaszákok, 1000 literes térfogatig

15.2.2.2. *Feldolgozás*

Az állati sejtekkel termelt rekombináns fehérjék feldolgozásának sémája annyiban különbözik a mikrobiális termékekétől, hogy a sejteltávolítást és az ezt követő műveleteket el lehet hagyni. A kapott fehérjék gyakorlatilag mind extracellulárisak.



320. ábra Egyszerűsített feldolgozási séma



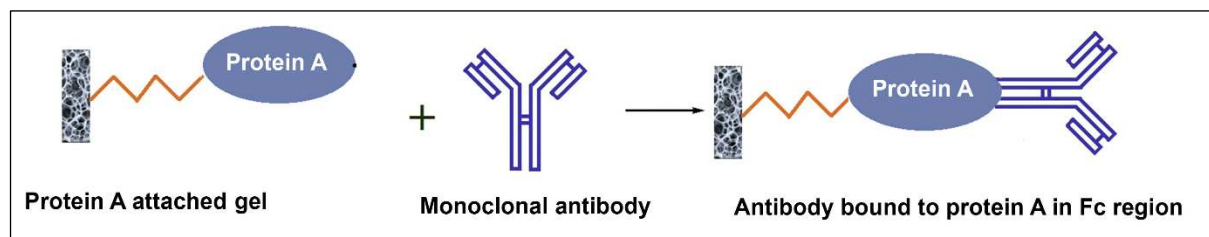
321. ábra Tipikus fehérje izoláló műveletsor

A műveleti sorrend tehát így alakul:

Sejtek elválasztása: szilárd-folyadék elválasztás, centrifugálással vagy mikroszűréssel könnyen megoldható. Erre a műveletre nincs is mindig szükség. A szakaszos és rátáplálásos tenyésztésnél igen, ott sejtes fermentlevet kapunk. De a perfúziós technikánál gyakorlatilag sejtmentes levét veszünk el. A mikrokarrieres kultúránál pedig a keverés leállításával szemcsék

a sejtekkel együtt kiülepednek, tiszta felüliszót vehetünk el. A művelet kiválasztásánál gazdasági szempontok is szerepet játszanak. A megfelelő centrifuga igen drága berendezés, megnöveli a beruházás összegét. A szűrés általában mélységi szűrés, aminél a szűrőanyagot csak egyszer lehet használni, így ez viszont a működési költségeket növeli.

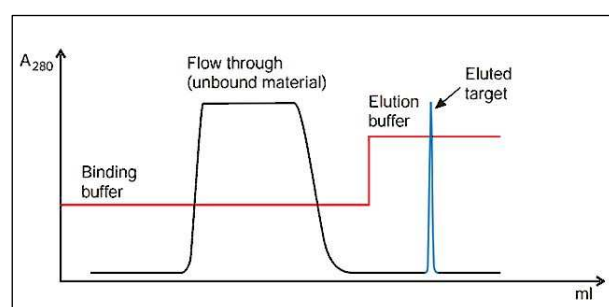
Koncentráló lépés (capturing, a termék „megragadása”): a terméket a nagy mennyiségű szennyezésektől, így elsősorban a víztől választjuk el. Jellemző művelete az adszorpció (= affinkromatográfia), esetleg membránszűrés vagy csapadékképzés. Az affinkromatográfiát kromatográfiának nevezik ugyan, de valójában oszlopban végrehajtott adszorpció. A ligandum minden fehérjénél más, de egy technikát érdemes kiemelni, mert minden antitest izolálásánál alkalmazzák. Ez a Protein-A kromatográfia. Elvi alapja az, hogy a *Staphylococcus aureus* felületén ta-



323. ábra A Protein-A kromatográfia sémája

lálható fehérje erősen és szelektíven kötődik az IgG fehérjék (antitestek) konstans régiójához.

Ezt a fehérjét ligandumként oszloptöltetre kötve bármely antitest megköthető. A szennyező komponensek kimosása után eltérő pH-jú/ionerősségű eluenssel a termék nagy tisztaságban és nagyobb koncentrációban leválasztható. A Protein A-t ma már nem a potenciálisan patogén *St. aureus* fermentációjával állítják elő, hanem rekombináns fehérjeként, de még így is nagyon drága.



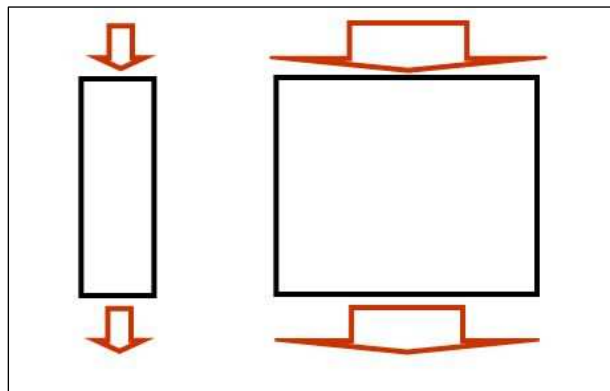
322. ábra Az affinkromatográfia kromatogramja

A fehérje ligandum használatával új problémák jelentek meg. A töltet kevésbé időtálló, mint pl. az ioncserélő gyanták. A Protein A molekulák leválhatnak és szennyezhetik a terméket. A rögzített fehérje fokozatosan denaturálódik, elveszti kötőképességét. Emiatt az adott elválasztásnál mindig meg kell vizsgálni, hogy mennyi a töltet élettartama, hány ciklus után kicserélni. A vizsgálatok azt mutatják, hogy 250 ciklus után a minőségi paraméterek (host cell protein, savas formák, aggregátumok) nem romlottak, a kötőképesség kis mértékben (7%-kal) csökkent.

Protein A Resin Lifetime Study				
Reuse Cycle Number	Yield (%)	HCP (ng/mg)	Acidic Variants	Aggregate %
6	97	8,100	9	2.2
20	97	7,900	10	2.4
70	97	6,500	11	2.0
130	94	9,500	11	1.9
170	94	8,800	8	2.5
204	91	8,300	9	2.1
250	90	7,900	9	2.2

Tisztítás: a termék és a szennyezések elválasztása, a jellemző műveletek az adszorpció és a kromatográfia, néha a csapadékképzés. Az orvosi célú rekombináns fehérjék gyártásánál legalább két ioncserés tisztítási lépést iktatnak be, kation és anioncserélő oszlopokat. Mindkettőnél a szennyező anyagok megkötése a cél (flow trough technika). A kationcserélőn enyhén savas pH-n (pl. 5→6) engedik át az oldatot, amiből az aggregátumok és a host cell protein kötődik meg elsősorban. Az anioncserét alig magasabb pH-n végzik (6→7) és a host cell protein mellett a nukleinsavakat és az endotoxinokat kötik meg.

Ezen a ponton érdemes végig gondolni az oszlopok léptéknövelését. Ha egy laboratóriumi oszlopon sikerült optimálni egy elválasztást, akkor nagyobb méretekben hogyan célszerű változtatni az oszlop méreteit? Adott tulajdonságú és szemcseméretű töltet esetén az oszlop hossza (HTU száma) és a lineáris áramlási sebesség határozza meg az elválasztás hatékonyságát. Az oszlop hosszát nem célszerű növelni, hiszen az eredeti hossz is megfelelő elválasztást biztosított. Az áramlási sebességet sem célszerű változtatni, mivel azt már laborszinten az optimális értékre, a van Deemter függvény minimumára állítottuk be. Nagyobb mennyiség feldolgozásához nagyobb térfogatáramot kell átvinni az oszlopon, ehhez a lineáris sebesség megtartása mellett a keresztmetszetet kell arányosan megnövelni. Így jutunk el a sajátos geometriájú töltetekhez, amelyeket nehéz oszlopnak nevezni, mert átmérőjük többszöröse a magasságuknak. A technikai nehézség a töltet tetején a folyadékáram egyenletes elosztása, hogy a teljes keresztmetszetben homogén áramlási kép alakuljon ki. Mindemellett az elosztató rendszer térfogatát is kicsire kell méretezni, hogy a visszakeveredés minimális legyen. Analóg módon alul, a folyadék kilépésénél, az összegyűjtő rendszerrel is ugyanígy kell eljárni.



325. ábra A kolonnák léptéknövelésénél a keresztmetszetet növeljük, a magasság állandó marad



324. ábra Ipari kolonna, (a saját felvétel)

Végtisztítás (polishing): meghatározása szerint a terméket a kereskedelmi forgalomba hozás előírásainak megfelelő formájúra és tisztaságúra tisztítják.

Az utolsó lépések közé tartozik a puffercsere és a kívánt koncentráció beállítása. Ezt rendszerint membránművelettel, ultraszűréssel, diaszűréssel oldják meg. A gyógyszeripari technológiákban az engedélyező hatóság egy utolsó sterilszűrést is előír, függetlenül attól, hogy az előző műveletsor nagy biztonsággal eltávolított már minden kórokozót.

Vírusmentesítés

A feldolgozási műveletsorba több helyre is be lehet illeszteni vírusmentesítő lépéseket. Valójában minden elválasztási művelet valamilyen mértékben csökkenti a vírusrészecskék számát, de szerepelnek célzott vírusszám csökkentő műveletek is. A fertőző ágensek számának alacsonyan tartása minden termékénél fontos szempont, de kiemelten kell kezelni a gyógyszeripari

termékeknél, ezen belül is azoknál, amelyek gyártása során potenciális vírushordozókkal, humán vagy emlős sejtekkel, szövetekkel, vérplazmával dolgoznak (állati szövettenyésztés, vérkészítmények).

Célszerű megkülönböztetni a vírusok eltávolítására szolgáló módszereket és az inaktíválási technikákat. Ez utóbbiaknál az alapprobléma a szelektivitás, hogy a vírusok anyagait károsító beavatkozások ne inaktíválják a hatóanyagot is. A nukleinsavak sokkal stabilabbak, mint a fehérjék, mégis a virulenciát hordozó nukleinsavakat kell inaktíválni úgy, hogy a jelen lévő fehérje termék ne veszítsen a hatásosságából. A műveletek az alkalmazott hatások szempontjából csoportosíthatók:



326. ábra Vírusmentesítési módszerek

Inaktíválás hőkezeléssel

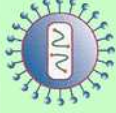








A hővel végrehajtott sterilizálás nagyon sok iparágban (fermentációs ipar, élelmiszeripar) nagy méretekben is általánosan elterjedt művelet. A vírusok célzott előlésénél viszont erősen behatárolja a gyenge szelektivitás. A fehérjék kímélése érdekében csak pasztörözést (maximum 100 °C-os hőkezelést) alkalmaznak, de sokszor hosszabb ideig. A mikrobiológiai gyakorlathoz hasonlóan megkülönböztetjük a száraz és nedves hőkezelést (gőztérben, illetve forró levegőben). Néhány konkrét példa:

Albumin	nedves hő, 10 óra, 60 °C
F-VIII	száraz hő, 72 óra, 80 °C
F-VIII	száraz hő, 30 perc, 100 °C

Ezzel a paraméterekkel a különböző vírusok száma 5-7 nagyságrenddel csökkent. A hőkezelés a lipid burok nélküli és lipid burokkal rendelkező vírusok széles csoportjára egyaránt hatékony, ugyanakkor a tok nélküli RNS vírusok ellenállóbbak.

A vírusok eltávolítása

A vírusok szuszpenziót alkotnak, lebegő szilárd részecskék a fehérjeoldatban. Megfelelő pórusméretű szűrőkkel kiszűrhetők a folyadékából. A méretarányokat szemlélteti az alábbi ábra:

HIV	EBV	HCV	HBV	BVDV	Polio	HAV	Parvo	Filter
								
80-110 nm	> 80 nm	> 45 nm	> 42 nm	> 40 nm	28-30 nm	22-30 nm	18-22 nm	20 nm

327. ábra A különböző vírusok mérete

A kis méret gondot okoz, hiszen a szokásos mikrobiológiai sterilszűrők pórusmérete 0,22–0,45 mikron, itt ennél egy nagyságrenddel kisebbre van szükség. Ezek a szűrők már átmenetet jelentenek a mikroszűrők és az ultraszűrők között. A szűrést gyakran megnehezíti a fehérjeoldat nagy viszkozitása.

Vírusok elválasztására alkalmasak még a kromatográfias műveletek is, így a gélkromatográfia (kizárásos kromatográfia), amely ez előzőekhez hasonlóan méret szerint választ el. A vírusokat megfelelő tölteten végrehajtott adszorpcióval, esetleg kicsapással (PEG) is eltávolíthatjuk.

Kémiai módszerek

Savas kezelés A monoklonális antitestek gyártásánál bevett módszer, hogy a Protein-A kromatográfia után a pH értéket ecetsavval leviszik 3,5-re és itt tartják 30-50 percen keresztül. Ezután visszalúgosítják 5,0-ra. Ha a kezeléstől fehérje csapadék válik ki, akkor azt ki kell szűrni az ioncsere előtt.

Szolvens-detergens eljárás Valójában nem játszódik le kémiai reakció, a vegyi anyagok leoldják, „leszappanozzák” a vírusok burkát. Szolvensként jellemzően TNBP-ot (tri-n-butilfoszfát, 0,3-1,0%), detergensként Triton X-100-at vagy Tween-t (szintén 1%) alkalmaznak. Adagolás után az elegyet 30° C-on kevertetik 1-4 órán keresztül. (Egyes vírusokra 2-10 perc is elegendő.) A kezelés után a hozzáadott szerves anyagokat el is kell távolítani az elegyből. Ezt extrakcióval oldják meg. Halogénezett, vagy kőolajszármazék oldószerek nem jöhetnek számításba, ezért tisztított, steril növényi olajat (szójaolaj, ricinusolaj) használnak egy vagy két extrakciós lépésben. Végül a maradék apoláris molekulákat hidrofób töltetű oszlopon (C18) kötik meg. Sajnos ez a nagy hatékonyság nem érvényesül a burok nélküli vírusoknál.

β -Propiolakton és etilén-imin Feszített gyűrűs szerkezetű erős alkilezőszerek, mind a fehérjékkel, mind a nukleinsavakkal reakcióba lépnek. Ennek dacára széles körben alkalmazzák, mert a fehérjék aktivitáscsökkenése sokkal kisebb mértékű, mint a vírusok inaktiválódása. Mindkettő közvetlenül veszélyes, rákkeltő hatású. De a propiolakton vizes közegben fél-egy nap alatt elhidrolizál és ártalmatlan hidroxipropionsav lesz belőle, az etilén-imin feleslegét pedig tiosulfát oldattal gyorsan ártalmatlanítani lehet.

Fotokémiai módszerek Az ultraibolya fény önmagában is mutagén hatású, a DNS-en a funkcióra káros kémiai változásokat idéz elő. Ez a hatás fokozható, ha olyan gerjeszthető molekulákat viszünk be a rendszerbe, amelyek az elnyelt energia átvitelével károsítják a DNS-t. Ilyen célokra metilénkékét, Psoralent vagy Hypericint alkalmaznak. Ezeknél figyelembe kell venni, hogy a kezelés után szennyező szermaradványok és bomlástermékek maradhatnak a közegben.

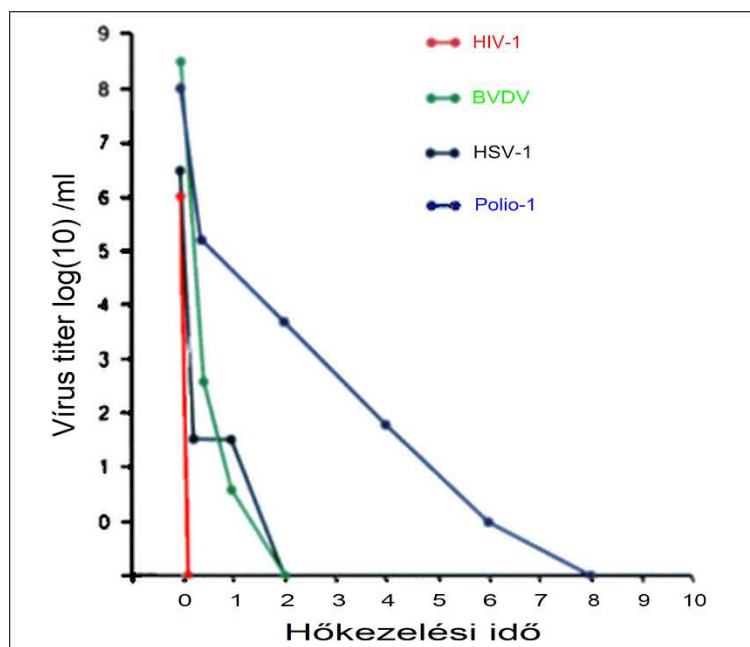
A vírusmentesítés hatékonysága

Hangsúlyozni kell, hogy a célzott vírusszám csökkentő műveletek mellett a komponensek elválasztásra alkalmazott műveleteknek is van számottevő hatása. Az alkoholos kicsapás, a pH-változtatás és a kromatográfiás lépések mind inaktíválják, vagy eltávolítják a vírusok egy részét.

A vírusmentesítés hatékonyságát log-ban fejezik ki, ez az $N_{kiindulási}/N_{végső}$ érték tízes alapú logaritmus. Egy log az élő víruskoncentráció egy tizedére való csökkenését fejezi ki (ld. a konzervek sterilizálásánál használatos tizedelési idő fogalmát). 5-6 log-nyi csökkenés tehát 5-6 nagyságrendnyi vírusszám redukciót jelent. Az egymást követő technológiai lépések log értékei összeadódnak. A gyógyszeripar szigorú szabályai szerint a teljes műveletsor eredő log értékének 15-20 között kell lennie.

A köztes és végső minták vírusszámát legérzékenyebben PCR-rel lehet meghatározni, de nehézséget okozhat az életképes és az inaktívált vírus DNS megkülönböztetése.

A gyártási technológia egyes lépéseinek vírusszám csökkentő hatását validációs vizsgálatokkal bizonyítják. Ez azt jelenti, hogy egy mintát szándékosan megfertőznek ismert fajtájú és számú vírussal, majd az adott művelet végrehajtása után visszamérik a megmaradt aktív vírusokat.



328. ábra Beriplex P/N (Faktor-IX) pasztörizációs vírusinaktiválásának kinetikája

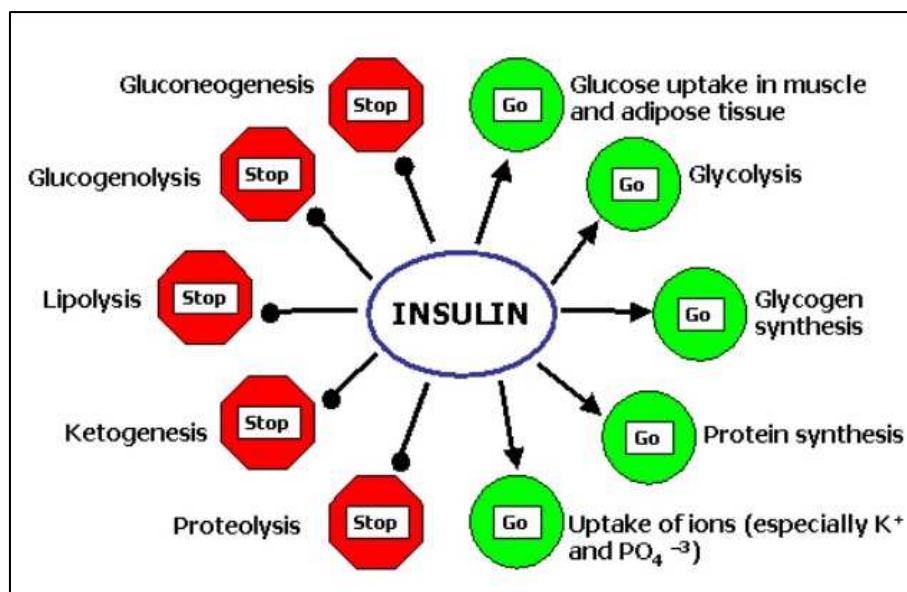
16. REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – esettanulmányok

A részfolyamatok, műveletek áttekintése után áttérünk az egyes konkrét termékek gyártási technológiájának tárgyalására. Sok száz rekombináns fehérjét állítanak elő, a legkülönbözőbb célokra. A spektrum széles, a nagy mennyiségben termelt, olcsóbb ipari, élelmiszeripari enzimektől (pl. a rennin három változatban is piacon van, (8.5.6.3 fejezet) a legdrágább monoklonális antitestekig terjed. A legnagyobb szellemi és anyagi töke a piros biotechnológiában koncentrálódik, így esettanulmánynak orvosi felhasználású fehérjéket választottam. Igyekszem többféle funkciójú termékeket bemutatni, hormonokat, hemosztatikumokat, antitesteket és alegység vakcinát is.

16.1. Inzulin

Az inzulin azért kiváló esettanulmány az orvosi célú fehérjék gyártására, mert többféle életképes technológiát is kidolgoztak az előállítására, különböző gazdaszervezetekkel. Első lépésként vizsgáljuk meg a termék tulajdonságait.

Az inzulin polipeptid hormon, amely a szénhidrátok, fehérjék és zsírok anyagcseréjének szabályozásában vesz részt. A szervezet sejtjei csak inzulin jelenlétében képesek felvenni a vérből a glükózt. Az inzulin serkenti a májban a glikogén raktározását és a sejtek glükóz felvételét, így módon csökkenti a vércukorszintet.



329. ábra Az inzulin hatása a különböző anyagcserefolyamatokra

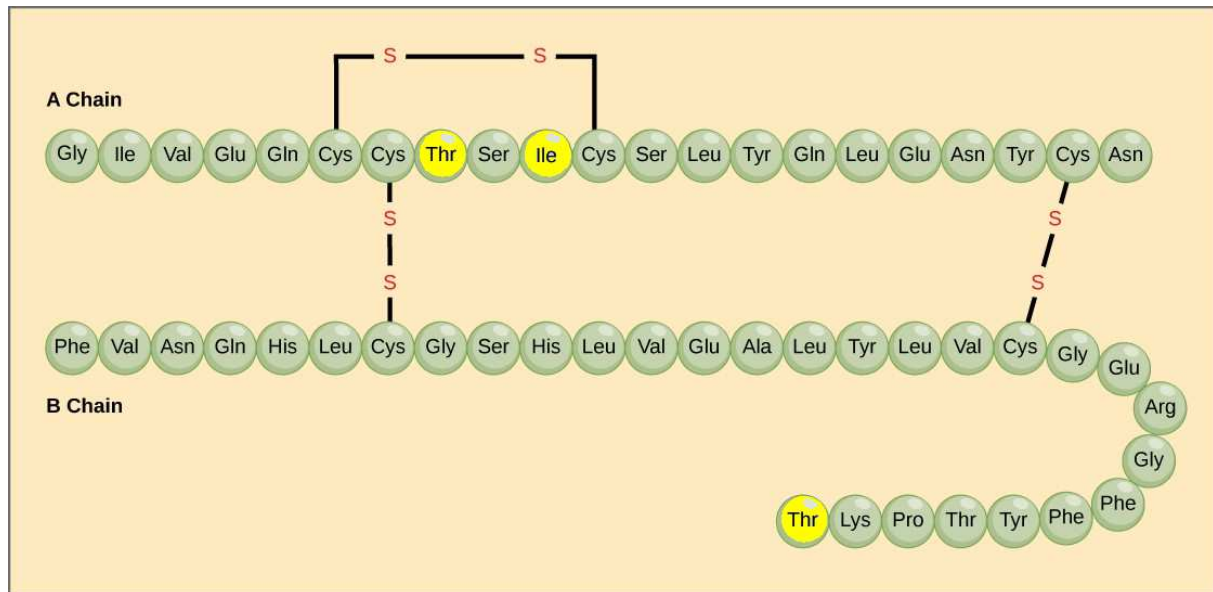
Az inzulint hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben található béta-sejtek termelik.

Az inzulint gyógyszerként adják a cukorbetegség(ek) kezelésére. A diabetes lényege, hogy a sejtek nem tudják megfelelően felvenni a vérből az glükózt, emiatt a vércukorszint megemelkedik. Az I-típusú vagy fiatalkori diabetesnél a hasnyálmirigy nem termel elegendő inzulint, mert pl. autoimmun folyamatok elpusztítják az béta sejteket. A II-típusú vagy időskori cukorbetegség esetén van inzulin termelés, de a sejtek inzulin érzékenysége lecsökken, emiatt nem hat eléggé.

A kívülről bevitt inzulin pótolja a hiányzó vagy elégtelen inzulintermelést. Az inzulint nem lehet szájon át bevinni a szervezetbe, mert egyrészt az emésztőenzimek lebontják, mint a többi fehérjét, másrészt a fehérjemolekulák méretüknél fogva gyakorlatilag nem szívódnak fel. Emiatt injekcióban adják, illetve fejlesztések folynak az nyálkahártyákon keresztüli bevitelre.

16.1.1. Az inzulin szerkezete

Két aminosavláncból áll (21 + 30 aminosav), amelyeket két diszulfid híd köt össze és egy stabilizál. Móltömege (humán): 5808. Izoelektromos pontja: 5,4.



330. ábra Az inzulin szerkezete

Az inzulin minden emlősben egyformán működik, de a szerkezete az evolúció során a mutációk miatt fokozatosan megváltozott.

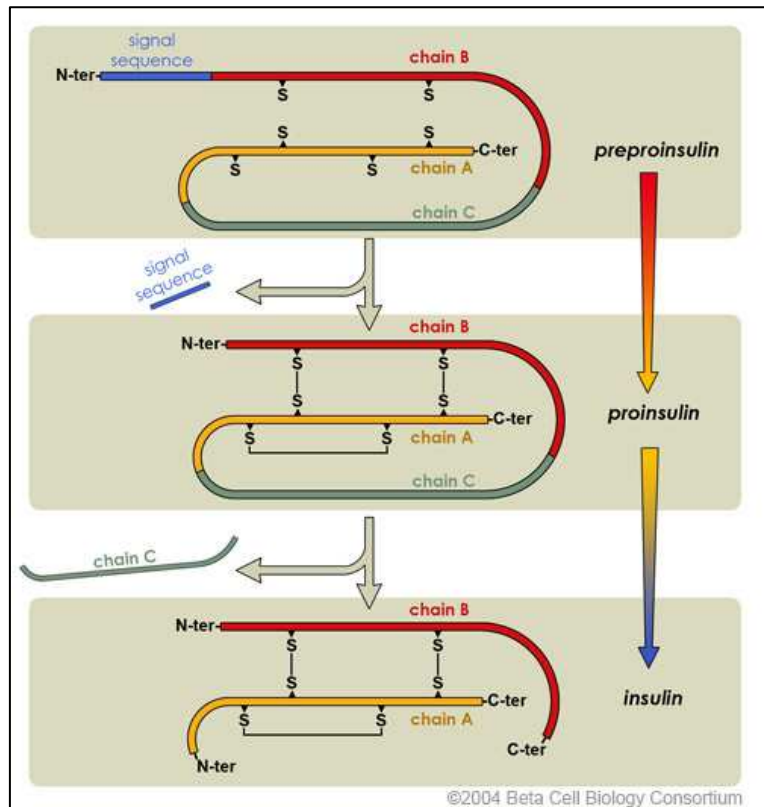
	Aminosav		
	8.	10.	30.
Marha	Ala	Val	Ala
Sertés	Thr	ILeu	Ala
Ember	Thr	ILeu	Thr
	A lánc		B lánc

331. ábra A humán, marha és sertés inzulin csak néhány aminosavban különbözik egymástól

16.1.2. Az inzulin érése

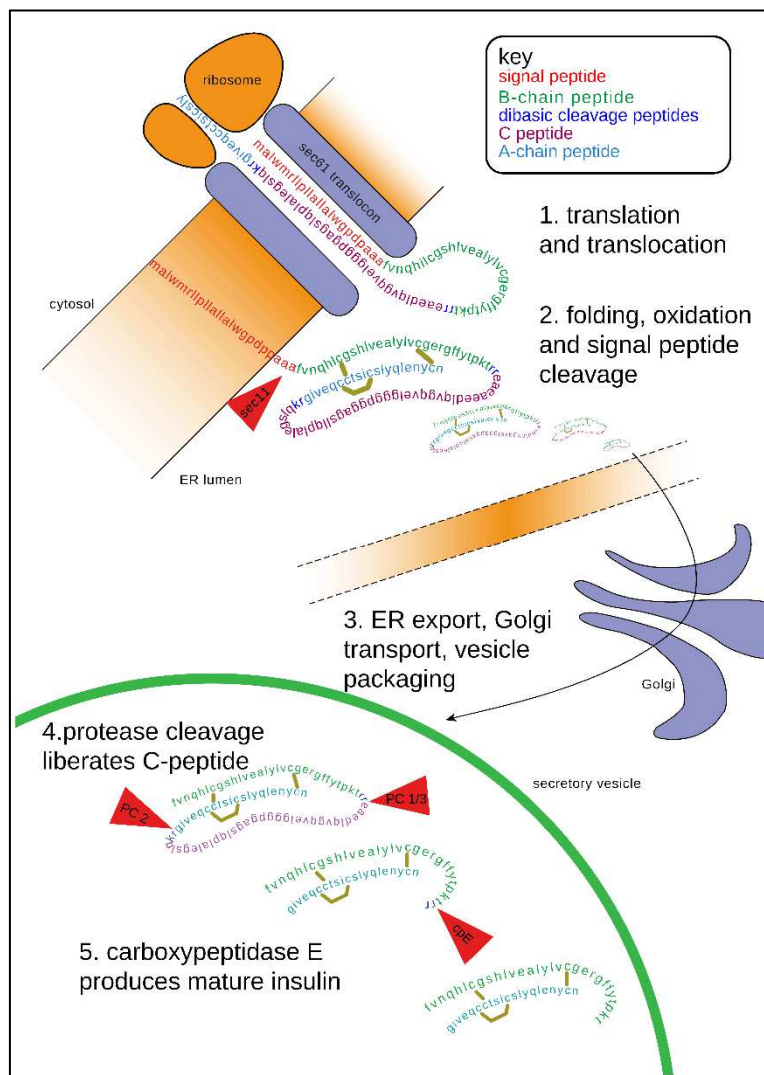
Az inzulin egy gén terméke, ez azonban két intront tartalmaz. Az intronok kivágása után egy fehérjeláncként keletkezik a pre-proinzulin (110 AS), ebből két szakasz (pre: 23 AS, C: 34 AS) eltávolításával alakul ki az aktív szerkezet.

332. ábra A preproinzulin lánc felbontása



Az endoplazmás retikulumban megy végbe a szignálpeptid levágása, a diszulfid hidak és a folding kialakítása. A proinzulin transzport vezikulákban megy át a Golgi komplexbe, és ott történik a C lánc kivágása (PC-I és PC-II enzimekkel), valamint a két Arg levágása (karboxipeptidáz E enzim = CPE).

333. ábra Az inzulin érése



16.1.3. Az inzulin előállítása

A lehetséges utak:

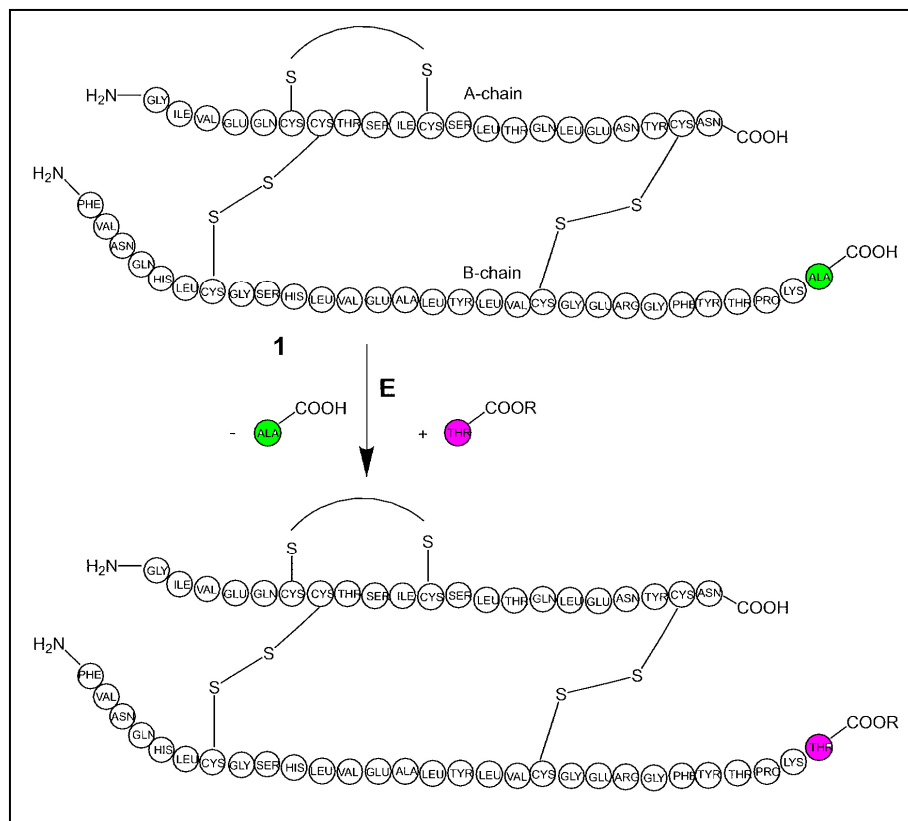
1. Kémiai szintézis aminosavakból (megoldott, de nem gazdaságos)
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulinná (a rekombináns inzulin megjelenése előtt ez volt az egyedüli humán inzulin készítmény)
3. Fermentáció génmanipulált mikroorganizmusokkal
 - Az A és B lánc termelése külön-külön *E. coli*-val, majd összekapcsolás
 - pro-inzulin fermentációja *E. coli*-val, majd átalakítása
 - Preproinzulin fermentációja *E. coli*-val, hasítások
 - Pro-inzulin fermentáció *S. cerevisiae*-vel, átalakítás

16.1.3.1. Kivonás hasnyálmirigyből – átalakítás

Az 1920-as évek eleje óta a diabéteszes betegeket olyan inzulinnal kezelték, amelyet szarvasmarha- vagy sertés hasnyálmirigyből vontak ki. Ez a tradicionális eljárás, a vágóhidakon összegyűjtött hasnyálmirigyből extrahálták az állati inzulint. De ennek a gyártási eljárásnak megvannak a korlátai:

- nincs elegendő alapanyag (hasnyálmirigy)
- az egy aminosavnyi különbség hosszú távú használat esetén immun-problémákat okozhat

Ezért inkább átalakítják a sertés inzulint, a láncvégi alanint treoninra cserélik. Elsőre az lenne logikus, hogy exopeptidázt használjanak, de mégis egy endopeptidázt, a tripszint választották. Ennek az az oka, hogy a karboxipeptidázok nem elég szelektívek, viszont a tripszin a bázikus aminosavakra (Arg, Lys) szelektív, ezek karboxi oldalán lévő peptidkötést bontja. Az inzulin molekulában két ilyen aminosav van, a B22Arg és a B30Lys. A tripszin ez utóbbi mellett hasítva lecsípi a láncvégi alanint. Mellékreakcióként az Arg melletti hasítás is felléphet, a



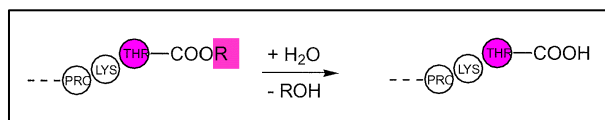
334. ábra A láncvégi alanin lecserélése treoninra

B23-30 oktapeptid szabadul fel. Ennek visszaszorítására speciális reakciókörülményeket kell beállítani, alacsony hőfokot (6-12 fok), és apolárisabb oldószerkeletet (etanol, DMSO, DMF + <50% vizes acetát puffer).

A tripszin szintén a sertés hasnyálmirigyéből nyerhető ki, de nem a Langerhans sejtekből, hanem a hasnyálat, az emésztő enzimeket termelő szövetből.

A bontási reakcióval párhuzamosan az ellentétes folyamat is végbemegy. A tripszin nagy szabad aminosav koncentráció mellett peptidkötés létrehozására is képes. A hidrolízis és az acilezés dinamikus egyensúlyban vannak. Ha nagy fölöslegben szabad aminosavat, treonint adunk a rendszerbe, akkor a folyamat a szintézis irányába tolódik el. Mivel a rendelkezésre álló szabad aminosavak között a treonin nagyságrenddel nagyobb koncentrációban van jelen, mint az alanin, ez nagyobb valószínűséggel kapcsolódik a lánc végére. Az egyensúlyi elegyben a B30Thr akár 92%-ban is megjelenhet az összes inzulinszármazékhoz viszonyítva.

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében nem treonint, hanem Thr-észtert (pl.: terc-butilésztert) adnak a reakcióelegybe. A termék elválasztása után a treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:



335. ábra Az észter védőcsoport eltávolítása

16.1.3.2. Az inzulin fermentációs előállítása

Prokariótákkal is megoldható, mert:

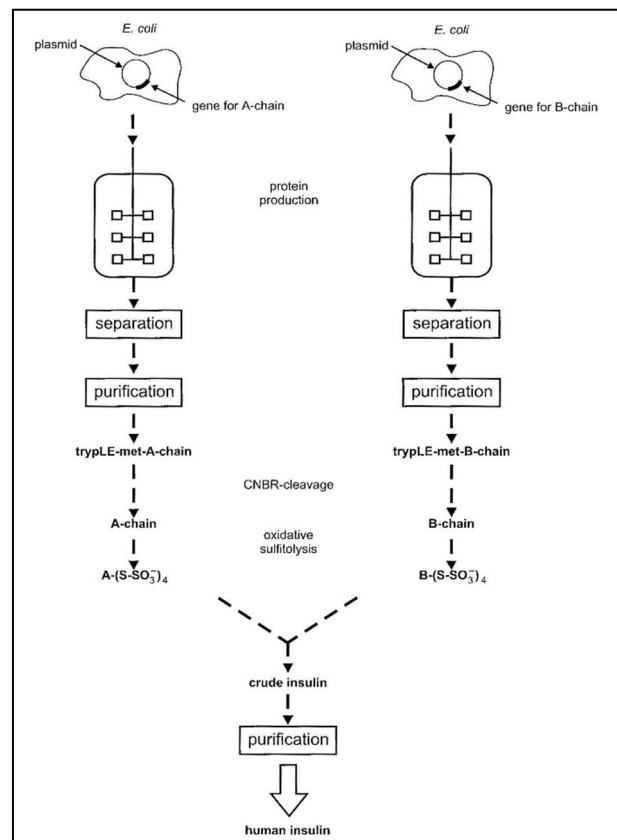
- Viszonylag rövid láncok, nincs glikozilezés, metilezés, de:
- Két lánc, három diszulfid híd – nehezebb jól összepárosítani

Megoldották a két lánc külön-külön bevitelét és fermentációját, majd összekapcsolását is – és az egészet egyben is.

Adalék: Kettős fermentáció *E. coli*-val

Ennek a technikának már csak történeti érdekessége van. Az egyik első rekombináns technológiában az inzulin A és B láncát két külön pBR322 plazmid vektorba építették be. Az inzulint kódoló szakasz elé egy Trp-operonból származó szakaszt (121 aminosav) illesztettek, amelyeket egy metioninnal választottak el. Ennek az a szerepe, hogy brómción hatására (70%-os HCOOH-ban) a Met elbomlik, és a fehérjelánc ezen a helyen elszakad. A kiválasztott *E. coli* törzset (nem-patogén coli törzs, csak laboratóriumban életképes, a természetben elpusztul) külön fertőzték meg a két plazmiddal, két külön manipulált törzset hoztak létre. A két törzssel külön fermentációval állították elő a két inzulin láncot. A leader szekvenciák lehasítása után a két láncot izolálták. Az –SH csoportokat oxidatív szulfitolízissel ($\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$, $\text{pH} > 9$) –S–SO₃ csoporttá alakították, azaz felbontották az esetleg létrejött (hibás kötésű) diszulfid hidakat. A két szabad lánc elegyítése után a diszulfid hidakat redukív közegben (–SH vegyületekkel: merkaptó-etanol, ditio-treitol) hozták létre.

336. ábra Inzulin rekombináns előállítása két külön fehérjeláncként



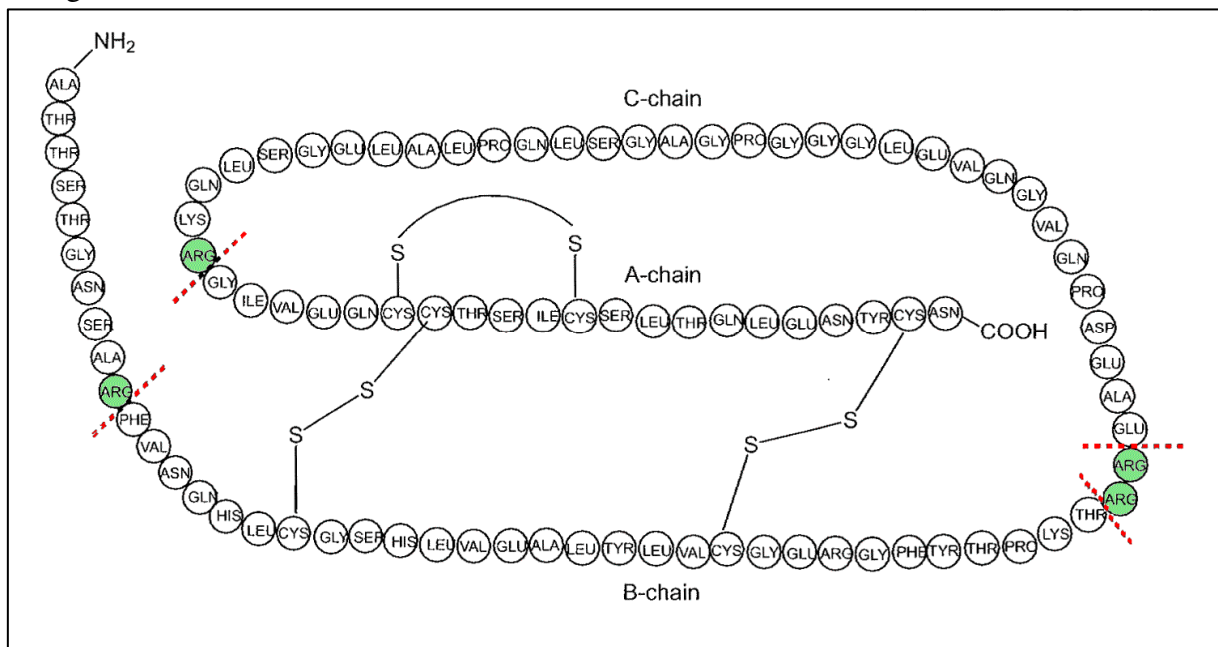
Előállítás egy fehérjeláncként (preproinzulin) *E. coli*-val

Ezzel voltaképpen a természetes inzulin képződését és érését másoljuk le a technológiában.

Az egész lánc előállítása génmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes kódoló génszakasz (preproinzulin) befér egy *E. coli* plazmidba. Bonyolultabb feladat viszont a DNS szakasz kialakítása. Mivel az inzulin gén két intront is tartalmaz, nem használhatjuk direktben az izolált DNS-t hiszen ebből sokkal hosszabb, használhatatlan fehérje képződne. Célszerűen mRNS-t, még hozzá érett, a kivágáson átesett mRNS-t kell keresni, és erről megszerkeszteni a kívánt génszakaszt. Ehhez az RNS-ről reverz transzkriptázzal DNS-t kell másolni, a hibrid nukleinsavakat szétválasztani, kétszálú DNS-t szintetizálni, majd ragadós végekkel ellátni, ez kerülhet azután a vektorba. A bevitt plazmid a „szokásos” elemeket tartalmazza, szelektációs markerei ampicillin és tetraciklin rezisztencia, promotere triptofánnal szabályozható erős Trp promóter. A *coli* az egész (pre)-proinzulin láncot elkészíti, de a szerkezet kialakítását további lépésekben kell megvalósítani. A technológia műveleti sorrendje:

1. Szakaszos fermentáció (15 m³)
2. Sejtfeltárás (lízis), centrifugálás, szűrés
3. Folding: a terciér szerkezet kialakítása megfelelő pufferben.
4. Hasítás három helyen Arg mellett
5. A B lánc végéről két Arg „lecsípése”
6. Tisztítás

Az elsődleges szerkezetet, az aminosav sorrendet felépíti a *coli* sejt, de a következő lépéseket, amelyeket a természetes hormon szintézisben a hasnyálmirigy sejtek enzimeit hajtják végre, további technológiai lépésekben kell megvalósítani. A diszulfid hidak és a harmadlagos szerkezet kialakítása az izolálás után, a folding pufferben megy végbe. Ezután kerül sor a „felesleges” molekularészek eltávolítására.



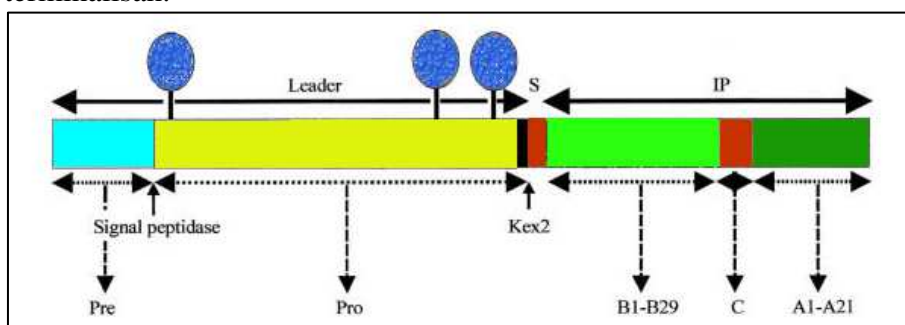
337. ábra A preproinzulin enzimes hasításai

Célszerűen a természetes reakcióutat kellene követni, azt, ahogyan a hasnyálmirigy sejtekben alakul ki az aktív inzulin. Mivel ezek a humán enzimek nem állnak rendelkezésünkre, helyettük más eredetű, de hasonló aktivitású enzimeket kell keresni. A lánc szétvágása három

helyen a bázikus jellegű arginin mellett szükséges, erre a már említett tripszin alkalmazható. A hasítási termék már csak két argininben tér el a végterméktől (B30ArgArg inzulin). Ezek eltávolítását a sertés hasnyálmirigyéből kivonható karboxipeptidáz-B-vel valósítják meg, amely a CP-E-hez hasonlóan a C-terminális bázikus aminosavak eltávolítására specializálódott. Az enzimes átalakítás után a tisztítás első lépése a gélkromatográfia, amellyel a levágott fehérjeláncokat lehet elválasztani a célterméktől.

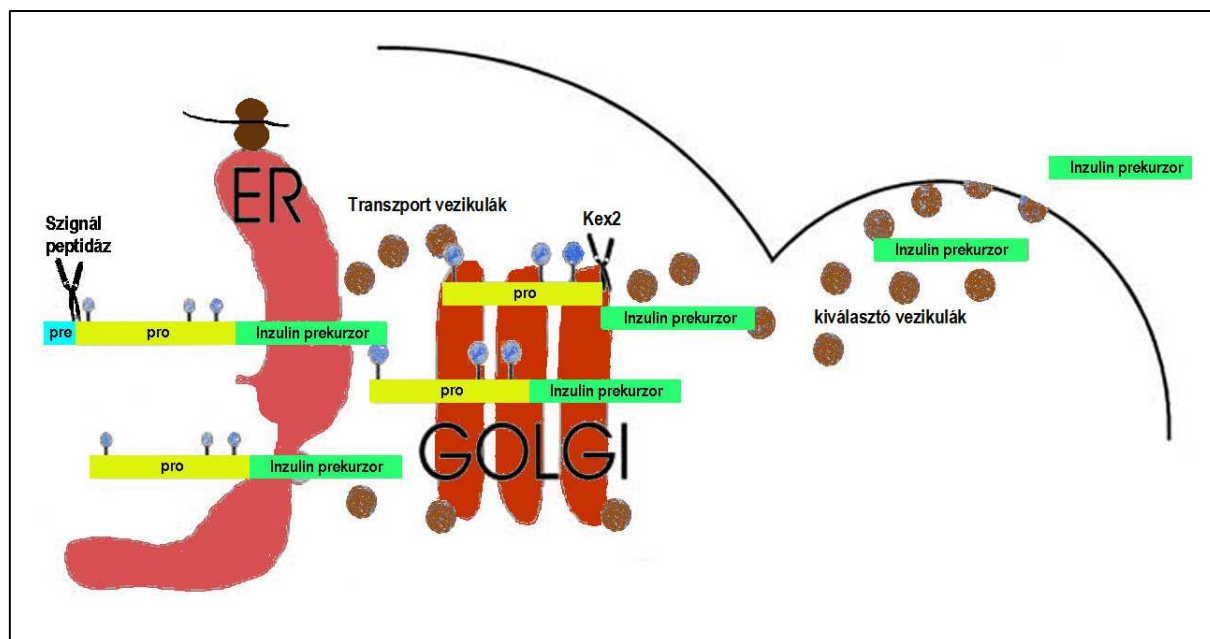
Előállítás élesztővel (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*)

A prokarióta *coli* mellett eukariótákkal, élesztőkkel is termeltetik a rekombináns inzulint. Előnyös például, hogy a termelés extracelluláris, nincs szükség sejteltérésre. A fermentációt félfolytonosan is lehet vezetni, ami gazdaságosabb. Emellett az élesztő enzimeit még a sejtben elvégezznek néhány átalakítást, így a technológia kevesebb lépésből áll. Az élesztőben termeltetett rekombináns fehérje az előzőektől eltérő konstrukció. Ahhoz, hogy a fehérje végig tudjon haladni az endoplazmás retikulum – Golgi – extracelluláris tér útvonalon, egy leader szakaszt kell elé kapcsolni. Ez a leggyakrabban az élesztőben működő α -faktor leader, néha Yap3, de kifejlesztettek szintetikus leader szekvenciákat is. Ez egy szignál peptiddel kezdődik, ez vezeti be a riboszómán képződő fehérje láncot a transzlokonon keresztül az endoplazmás retikulum belső terébe. Ezt a szakaszt még ott helyben levágja a szignál peptidáz. A „Pro-” szakasz 43-47 aminosav hosszúságú, az α -faktor leader estében három szénhidrát „legyező” kapcsolódik hozzá. A leader és az inzulin B lánc közé néhány aminosavból álló összekötő S-peptidet (=spacer) illesztnek. Ez minden esetben két bázikus aminosavval (Lys/Arg) kezdődik, mert az élesztőben található Kex2 proteáz ennél a pontnál hasít. Így ez az enzim még a sejtben eltávolítja a „Pro-” láncot. A további aminosavakra sztérikus okokból van szükség, ezek nélkül a Kex2 enzim „nem fér hozzá” a vágási helyhez. Így viszont felesleges aminosavak maradnak a B lánc N-terminálisán.



338. ábra Az élesztőben termeltetett inzulin prekursor fehérje

Ettől úgy lehet megszabadulni, hogy az utolsó helyre lizint építenek be és a későbbi tripszines kezelés leválasztja a feleslegessé vált szakaszt. A termelt fehérjét inzulin prekursornak (IP) nevezik, mert nem azonos a humán proinzulinnal. A C láncot jelentősen megrövidítették (3-6 aminosav), sőt el is hagyták. A B30 treonint is kihagyták, ezt csak folyamat végén, enzimesen kapcsolják rá.

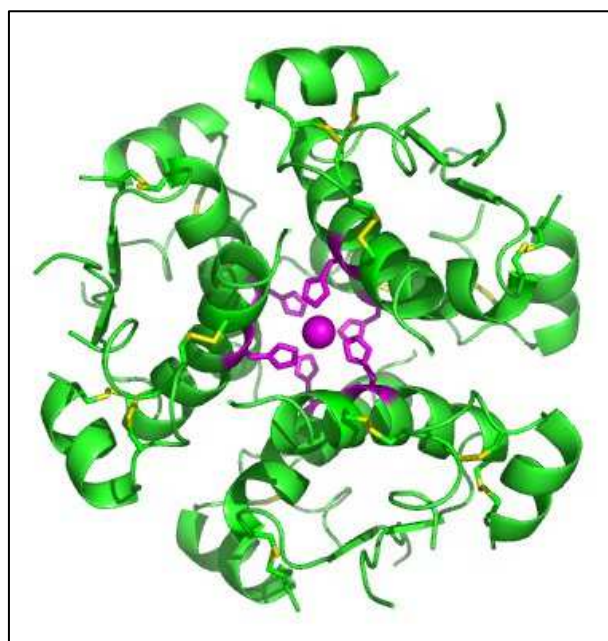


339. ábra Az inzulin útja az élesztősejten belül

16.1.3.3. Az inzulin feldolgozása

Első lépésként a különböző méretű molekulák, hasítási termékek és egyéb, kis peptidek elválasztására gélkromatográfiát alkalmaznak. Ezt követheti egy ioncsere kromatográfiai lépés, és az így megtisztított oldatból választják le az inzulint. A különböző inzulin formák eltérő sebességgel szívódnak fel az emberi szervezetben. Így ezek megválasztásával, illetve kombinálásával beállíthatjuk az inzulin készítmény hatástartamát. A tiszta inzulin önmagában hajlamos amorf csapadékként kiválni. Szépen kristályosítható viszont cink komplex formájában. A komplexképzés a B-10 His aminosav gyűrűjében lévő nitrogénatomon keresztül történik. Ez többértékű fémionokkal komplex kötést képes kialakítani. (Ugyanezt használja ki a fém-kelát kromatográfia, amelynél az állófázisra rögzített fémionok – Ni, Cu, stb. – létesítenek kötést a fehérjék hisztidinjeivel vagy a hozzákapcsolt His-tag-gel.) Az inzulin esetében is további 15 féle fémionnal alkotott komplexet írtak le, de a gyógyszeres szempontok alapján a cink ionnal alkotott hexamer az optimális.

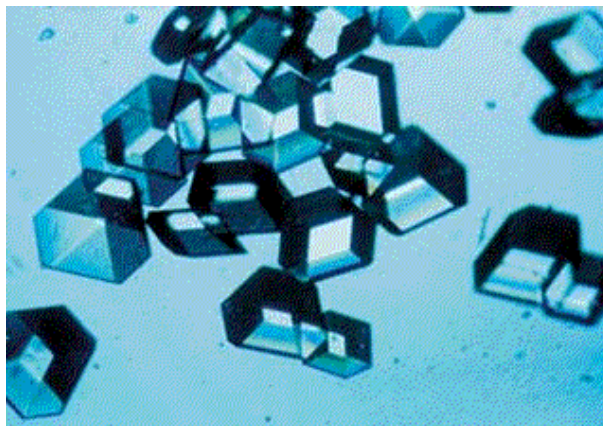
A kristályosításnál a híg savas oldatban (ecetsav, esetleg sósav) lévő 7%-os inzulin oldat pH-ját ammónium-acetát hozzáadásával 5,4-6,1 közé állítják. A sztöchiometrikus Zn ionmennyiség csak 2 ezreléke lenne az inzulin tömegének, de ezt negyvenszeresen túladagolják. Ez 1,1% cink-klorid hozzáadását jelenti. Az oldhatóság csökkentésére még 10% acetont is kevernek az elegyhez, és a hőmérsékletet 25 °C-ról +5 °C-ra csökkentik. A kristályosodás elsőrendű kinetika szerint megy végbe, az anyag nagy része az első négy órában kiválik, de az egyensúlyi állapotot csak ~24 óra után éri el.



340. ábra Az inzulin molekulák hisztidinjei kapcsolódnak a Zn ionhoz

Ilyen körülmények között a komplex romboéderes formában kristályosodik.

A gyorsabban felszívódó amorf és a lassabban felszívódó kristályos inzulin mellett használatos még a protamin-inzulin is (NPH = neutral protamin Hagedorn). A protamin, mint bázikus fehérje a savas karakterű inzulinnal együttesen kicsapva egy rosszul oldódó formulát ad, ami lassan szívódik fel, így elnyújtott hatást alakít ki.



341. ábra Cink-inzulin kristályok

16.1.4. Inzulin analitika

Egy rekombináns fehérje minősítésénél mindig az az alapkérdés, hogy tulajdonságaiban mennyire egyezik meg az eredeti fehérjével. Ez legtökéletesebben a biológiai hatás összehasonlításán keresztül lenne lemérhető.

Ami az inzulinnál azt jelentené, hogy mérni kellene a beadás hatására bekövetkező vércukorszint csökkenést az emberi szervezetben. Alanyként embereket nem, de nyulakat használhatunk, de ez természetesen drága, lassú, kis kapacitású és állatvédelmi szempontból is kifogásolható.

A fehérjék harmadlagos szerkezetére is kiterjedő azonosítására alkalmasak az immunanalitikai módszerek, reakciók specifikus ellenanyagokkal. Ezek viszont sokszor nem adnak pontos kvantitatív eredményt.

A minősítés első lépése rendszerint egy HPLC vizsgálat, ami gyors, kvantitatív és az esetleges szennyezésekre is információt ad. Az egész, 51 aminosavból álló inzulin molekula vizsgálatánál a kis eltérések nehezen vehetők észre. Ennél részletesebb eredményt kaphatunk, ha az inzulin molekulát egy specifikus endoproteázzal (V8 proteáz) feldaraboljuk. Ez négy jól definiált helyen hasítja el az inzulint, és a kapott öt peptid kromatogramjából már a kis eltérések kiolvashatók (fingerprint technika).

Vizsgálhatjuk az inzulin preparátumot aminosav analízátorral is. Teljes hidrolízis után az aminosavak kromatográfiás szétválasztásával az aminosav összetételt kapjuk meg, de ez csak a fehérje elsődleges szerkezetére ad információt.

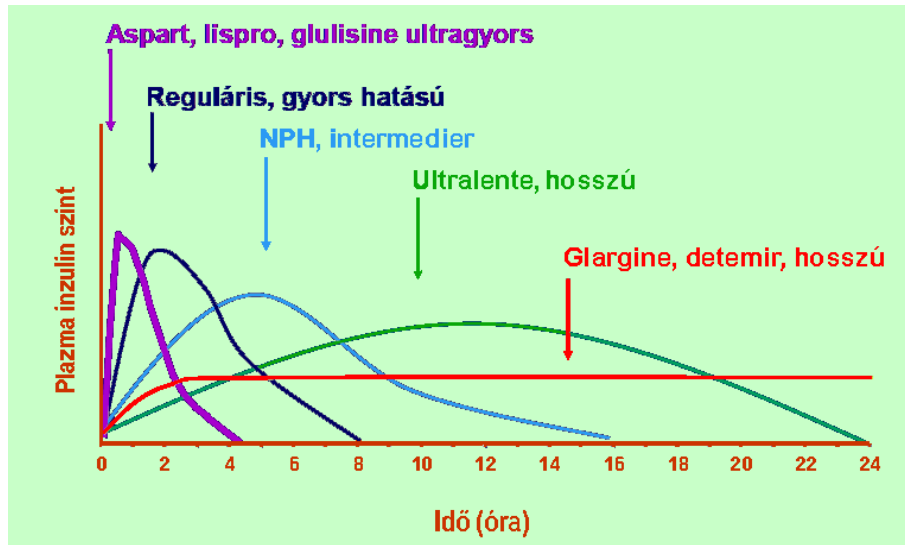
16.1.5. Módosított inzulin molekulák

Az inzulin molekulák szerkezete elég konzervatív, de bizonyos kémiai módosítások lehetségesek kellemetlen mellékhatások nélkül. Ezek a változtatások nem a hormonhatás erősítésére irányultak, hanem a farmakokinetikát, a hatás időbeli lefutását alakították át.

16.1.5.1. Gyors hatású inzulinok:

Lispro inzulin: a B28 Pro és 29 Lys sorrendjét megcserélték. A változtatás alapja az IGF-1 (insulin like growth factor) molekula szerkezete volt, amelyben ugyanez az aminosavak sorrendje. Nem alkot hexamert, gyorsabban felszívódik, ~15 perc alatt hat a szokásos 45-60 perc helyett. Az Eli Lilly (USA) gyártja, Humalog néven.

Aspart inzulin: a B28 helyen lévő Pro-t kicserélték Asp-ra. Egyrészt nem alkot hexamert, másrészt a bevitt savas csoport miatt eltolódik az izoelektromos pont \rightarrow jobban oldódik, gyorsabban szívódik fel. *S. cerevisiae*-vel termeli a NovoNordisk (DK), Novo-Log néven.

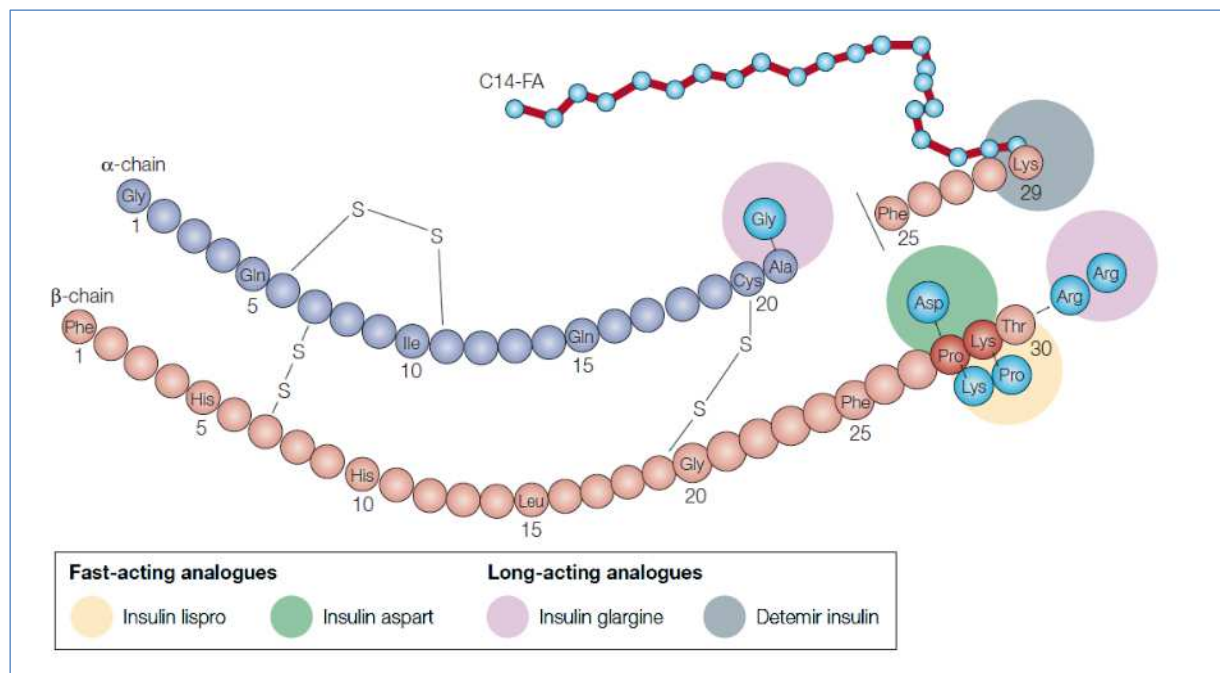


342. ábra Módosított inzulinok hatásgörbéi

16.1.5.2. Elnyújtott hatású inzulinok:

Glargin inzulin: (Gly + Arg) mindkét lánc C terminálisát átalakították: az A21 Asp helyére glicint kapcsoltak, a B lánc végére pedig két arginint. Ez megváltoztatja az izoelektromos pontot (5,4 \rightarrow 6,7). Az injekcióban (pH=4,0) oldatban van, beadva a szövetekben (pH=7,4) mikroprecipitátumok keletkeznek. Ezek lassan oldódnak fel, emiatt elnyújtott a hatás (>24 óra). A Sanofi-Aventis gyártja, Lantus néven.

Detemir inzulin: a B30 Thr-t elhagyták, és a B29 Lys amino csoportját C14 zsírsavval (mirisztilsav) acilezték. A gyártásnál rövidebb láncot termelnek (Insulin B1-29-Ala-Ala-Lys-Insulin A1-21), ezt enzimesen bontják, majd acilezik. A Novo-Nordisk állítja elő, Levemir néven.



343. ábra Módosított inzulinok szerkezete

És végül egy kis vidámság. Egy olyan kép, amin az átlagember nem talál semmi poénosat.



344. ábra. De az, aki idáig eljutott az olvasással, az biztosan érti.

16.2. Eritropoietin (EPO) gyártása

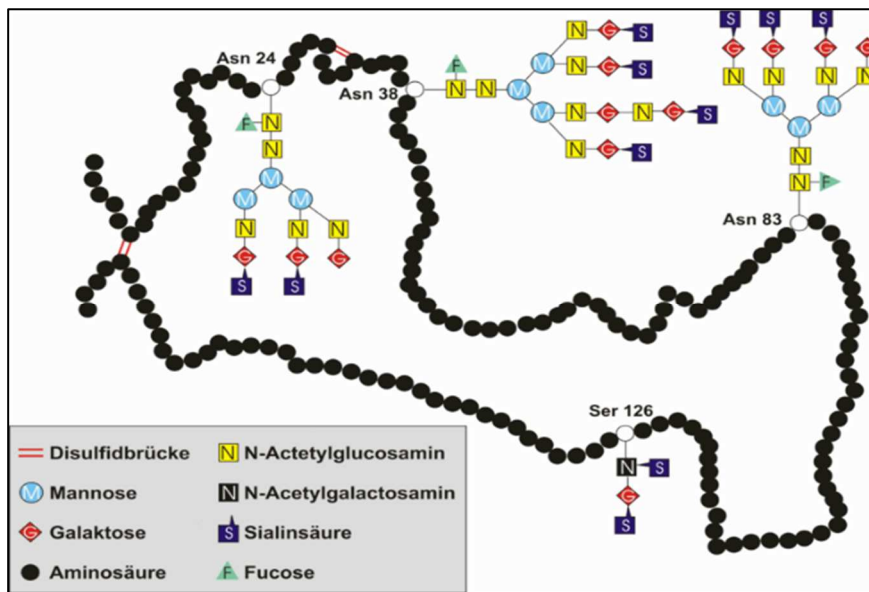
Az eritropoietin egy hormonfehérje, a citokinek közé tartozik. Funkciója szerint stimulálja a vörösvértestek (eritrociták) képződését a csontvelőben. A szervezet egésze számára a megfelelő oxigén-szállító kapacitást biztosítja. Képződését a vér hosszabb ideig tartó alacsony oxigénkoncentrációja (hipoxia) indukálja. A hormont a vesetubulusok mellett található intersticiális sejtek termelik. Az EPO 85-90%-a a vesében képződik, 10-15% pedig a májban. A vese képes a hematokrit szintet (a vörösvérsejtek arányát a vérben) a normál, ~45%-os értékre beállítani úgy, hogy a vörösvérsejtek mennyiségét az EPO termelésén és a víz, illetve só ürítésén keresztül (a plazmatérfogat beállításával) szabályozza. A vérbe kerülő EPO eljut a csontvelő sejtjeihez és a sejtfelszíni receptorokhoz kötődik, így stimulálja a vörösvérsejtek termelését. Az EPO receptorhoz való kötődése elősegíti az eritrociták proliferációját és differenciálódását.

Külső EPO bevitelre többféle kórkép esetén is szükség lehet:

1. Nem termelődik elegendő hormon - ez a vesekéreg károsodása esetén fordulhat elő.
2. Anaemia (vérszegénység) tartós dialízis (művese) kezelés esetén.
3. A csontvelő túl kevés vörös vértestet képez (pl. anaemia tumor, illetve kemoterápia következtében), ekkor az ép állományt lehet gyorsabb működésre készíteni.
4. A vörös vértestek elvesztése vagy pusztulása (vérvesztés, HIV, malária)

Az EPO-t engedélyezték krónikus veseelégtelenségben szenvedő anémiások és kemoterápiás kezelés alatt álló rákos betegek számára, valamint műtéti vérvesztés esetén. Az EPO adása a HIV kezelésére használt Zidovudine mellett adagolva is jótékony hatású.

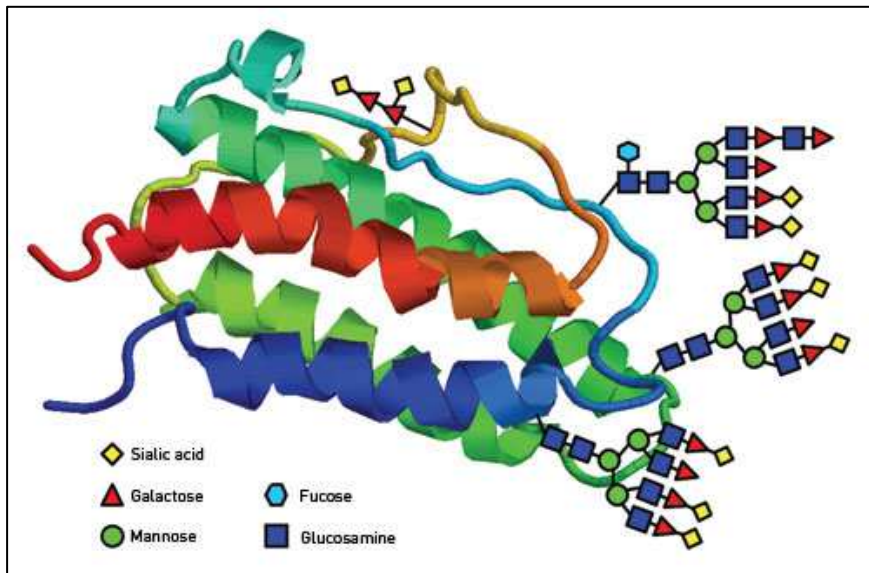
A gyógyászati felhasználáson túl az EPO-t használják doppingszerként is, mivel a keringési rendszer oxigénszállítási kapacitása kulcskérdés az állóképességi sportágakban (kerékpározás, hosszútávfutás, sífutás, de néha labdarúgók is használják). Ugyanez a mechanizmus működik a sportolók magashegyi edzőtáborozásánál is. A ritka levegőben az alacsony oxigén tenzióhoz úgy alkalmazkodik a szervezet, hogy növeli az EPO termelést, ezáltal néhány hét alatt megnöveli a vörösvérsejtszámot, amitől megnő az oxigén-szállítási kapacitás.



345. ábra Az EPO glikozilációs mintázata

16.2.1. Az EPO szerkezete

Az EPO szerkezetét tekintve egy glikoproteid, mely 165 aminosav-, és 55 cukoregységből áll. A szénhidrát rész, mely a molekula tömegének közel 40%-át teszi ki, három N-glikozilációs (Asn 24, 38, 83) és egy O-glikozilációs (Ser 126), egységből áll. Egyetlen fehérjeláncból áll és két diszulfid híd rögzíti a szerkezetét. Az egyik majdnem a lánc végeit kapcsolja össze, egy óriási hurkot képezve („nyaklánc és csat”), a másik egy kicsi, öt aminosavból álló gyűrűt formál. Molekulatömege kb. 30 kDa, a különböző izoformák miatt nem adható meg pontosan, ebből a fehérjelánc tömege 18396 Da. A harmadlagos szerkezet 4 antiparalel lefutású α -hélixből áll, az N-glikozilációs oligoszacharid „legyezők” a molekula egyik pólusán helyezkednek el.



346. ábra Az EPO 3D szerkezete

A szénhidrát láncok végén legtöbbször sziálsav (hét szénatomos cukorsav) található, de a lánc belsejében is előfordulhat. A savas csoportok száma megváltoztatja a molekula töltését, izoelektromos pontját (savas, pH=4,4 körüli). A sziálsavazottság mértéke arányos a hormon

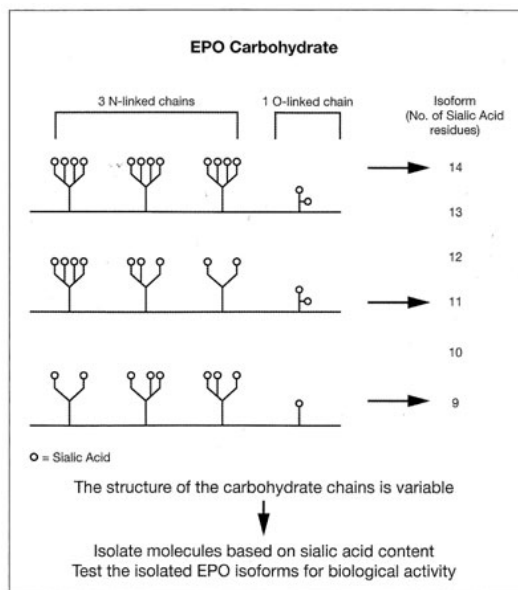


Figure 1: Schematic of EPO Carbohydrate Structure and EPO Isoform Designation. EPO = erythropoietin.

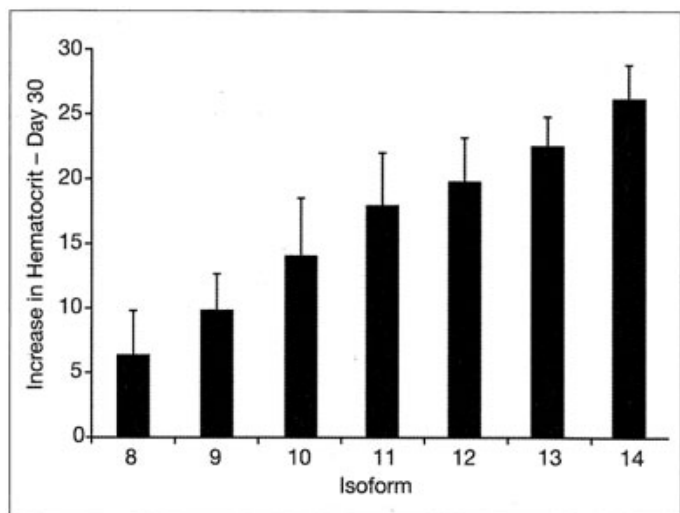


Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/

348. ábra Különböző mértékben sziálizált EPO molekulák

347. ábra Az EPO izoformák hatásának összehasonlítása

receptorkötő képességével és a szérumbeli felezési idejével (ez utóbbi fontosabb az EPO hatásának szempontjából). A láncvégi szialinsavak hiányában a szabadon maradó galaktóz végek erősen kötődnek a májsejtek galaktóz receptoraihoz. A molekula szénhidrát részei variábilisak, a glikoziláló enzimek statisztikus működése miatt egyidejűleg különböző mértékben szializált („félkész”) izoformák vannak jelen. A cukorrészek befolyásolják a molekula hő- és pH-érzékenységét is.

16.2.2. Az EPO előállítása

Kis mennyiségű hormont ki lehet vonni vérből, illetve vizeletből, de ezekben nagyon kicsi a koncentrációban fordul elő és az alapanyag is korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre. A hormont először vérszegénységben szenvedő betegek vizeletéből (2500 liter) tisztították, 1977-ben. Kereskedelmi mennyiségben rekombináns fehérjeként állítják elő.

Az EPO génje 4 intront tartalmaz, ezek a mRNS érése során kivágódnak. A fehérjelánc eredetileg 193 aminosavból áll. Érése során az N-terminálisról a 27 AS-ból álló pre szakasz, a C-terminálisról egy Asp hasad le. A cDNS-ét a szignálfehérjével együtt 1985-ben sikerült klónozni.

Gazdasejtként erre a célra nem használhatunk prokariótákat, mert:

- ezekben nem működik az intronok kivágása (ez még megoldható az érett mRNS reverz transzkripciójával)
- nem képesek a glikozilálásra
- a harmadlagos szerkezet kialakítása (folding) bizonytalan
- nagy az esély, hogy a fehérje intracelluláris marad
- zárványtest (inclusion body) kialakulása is lehetséges

Összetettebb fehérjék termeléséhez ezért eukarióta gazdasejteket választanak.

Megismételve a fejezet elején felsorolt szempontokat, termelhetünk:

- élesztőkkel
 - könnyen, gyorsan szaporíthatók, nagy hozam, olcsó táptalaj, de:
 - az eltérő (hiper)glikozilációs mintázat miatt a termék nem mindig aktív vagy immunreakciót vált ki.
- állati sejtenyészetben
 - lassú szaporodás, drága tápoldat, kényes fermentáció, kisebb koncentráció, de:
 - biológiailag aktív termék.

Az EPO esetében az állati sejtenyészetek alkalmasak a termelésre. A különböző vállalatok CHO (Chinese Hamster Ovary = kínai hörcsög petefészek), és BHK (Baby Hamster Kidney = veseszövet) sejtvonalak manipulálásával is megoldották a gyártást.

16.2.2.1. Az EPO génbevitel vektora

Ahhoz, hogy az EPO génszakaszt klónozni lehessen, olyan vektort kellett választani, ami az emlős sejtvonalban is működni, szaporodni tud. Replikációs origóként SV40-et (majomvírus része) építettek be. A plazmid markere a DHFR (dihidrofolat reduktáz) enzim génje. Ennek megfelelően a CHO gazdasejtben ez az enzim hiányzik. Többlépcsős metotrexátos szelekcióval jó és stabil (több mint 50 osztódás) termelőképes sejtvonalakat izoláltak.

16.2.2.2. EPO fermentáció (upstream)

Az első eljárások felületi növekedésű CHO sejtekkel működtek. Munkaigényessége ellenére ipari mennyiségben is forgó palackokban állították elő (5000 palack! 289. ábra). A sejtvonal szaporításához Eagle alap közeget, +10 % szérumot és 10% Bacto tryptose foszfát oldatot használtak. Négy nap után a tápoldatot lecserélték a termelő közegre, ami csak 1,5% szérumot tartalmazott. Ezt félfolytonos üzemben 3 naponként lefejtették és friss tápoldattal pótolták. Így

egyrészt olcsóbb a közeg, másrészt a feldolgozás során kevesebb idegen fehérjét kell elválasztani.

A fejlesztések során elérték, hogy a sejtvonal fehérjementes tápoldaton is növekedjen. A sejteket makropórusos mikrokarrieren – felületén és pórusaiban –szaporították, fluidizációs reaktorban. Ez folytonos technológia, glükózt és Na-butirátot tartalmazó tápoldaton. A szabad ammónia koncentrációját 2mM alatt tartották. Egy termelési ciklust 40 napig tartottak fenn.

Kialakítottak perfúziós üreges szál (hollow fiber) reaktort is, a membrán tartotta vissza a sejteket, a másik térben zajlott az anyagforgalom, a termék elvétele, a tápanyagok és az oxigén bevitele.

16.2.2.3. *Az eritropoietin izolálása (downstream processing)*

A fehérje mindegyik technológiában extracellulárisan képződik, és a felületi növekedésű sejtek miatt külön sejtelválasztási lépést nem kell beiktatni. A lé feldolgozására sokféle technológiát írtak le, mindegyik kromatográfiás/adszorpciós lépések variálásán alapul. Egy jellegzetes lépéssort tekintünk át a következőkben:

1. 100 l lefejtett fermentlé koncentrációja 2 l-re hollow-fiber ultraszűrővel. (Az 50-es koncentrációs faktort valószínűleg csak több lépésben lehetett elérni.)
2. MAb-affinkromatográfia: a töltetre az EPO-ra szelektív monoklonális antitesteket rögzítettek, ezen csak az eritropoietin molekulák kötődtek meg, a többi oldott komponens kimosható az oszlopból. Az adszorbeálódott molekulákat nátrium-acetát oldattal eluálják. (Az affinkromatográfia név téves, ez voltaképpen oszlopban végrehajtott adszorpció.) Ennek során a termék 2800-szoros tisztítását érték el, miközben az aktivitás 84 %-a megmarad. A művelet nagyon hatékony, de a MAb oszloptöltet nagyon drága, és az élettartama is rövid (a fehérje ligandumok elbomolhatnak, leválhatnak).
3. Gélkromatográfia Sephadex G-100 oszlopon, molekulaméret szerinti elválasztás. Az eredeti aktivitás 66 %-a megmarad.
4. Adszorpció hidroxipatit tölteten, az elúció után az aktivitás 52 %-a megmarad.
5. Puffercsere és stabilizálás humán szérum albuminnal.
6. A termék tisztaságát SDS-PAGE-sel, HPLC-vel, és MAb-ELISA-val ellenőrzik.

16.2.3. *Eritropoietin készítmények*

Mindegyik rekombináns EPO elsődleges szerkezete (aminosav sorrendje) azonos, de a cukorrészek összetételében (glikozilációs mintázat) különbözik a natív molekulától.

EPO α : CHO sejtvonallal termeli az Amgen. A szabadalmi oltalom 2013-ban lejárt, a gyártás leállítására készülnek.

EPO β : CHO sejtvonallal termeli a Roche.

Mindkettő oligoszacharid izoformák keveréke. Klinikailag egyenértékűek. E kettőn túl még sok bioszimiláris, utángyártott termék van.

EPO ω : BHK sejtvonallal termeli az Elamex. A fehérjelánc itt is azonos, de az egyik N-glikán foszforilezett oligomannánt tartalmaz, és a molekulák egy részében hiányzik az O-glikán.

EPO δ : humán fibroszarkóma sejtvonallal termelik, a genetikai manipuláció különbözik az előzőektől. Nem az EPO gént vitték be a sejtbe, hanem a humán genomban jelen lévő, de kikapcsolt gént aktiválták egy erős vírus promóter (CMV) beépítésével.

A különböző variánsok között kis különbségek vannak: mindegyik izoformák keveréke, ezek izoelektromos fókuszálással vagy kapilláris zónaelektroforézissel szétválaszthatók és azonosíthatók. Mindegyik engedélyezett, használatban lévő termék, bár a biológiai hatásuk, illetve ennek időbeli változása kis mértékben különbözik.

Második generációs EPO készítmények

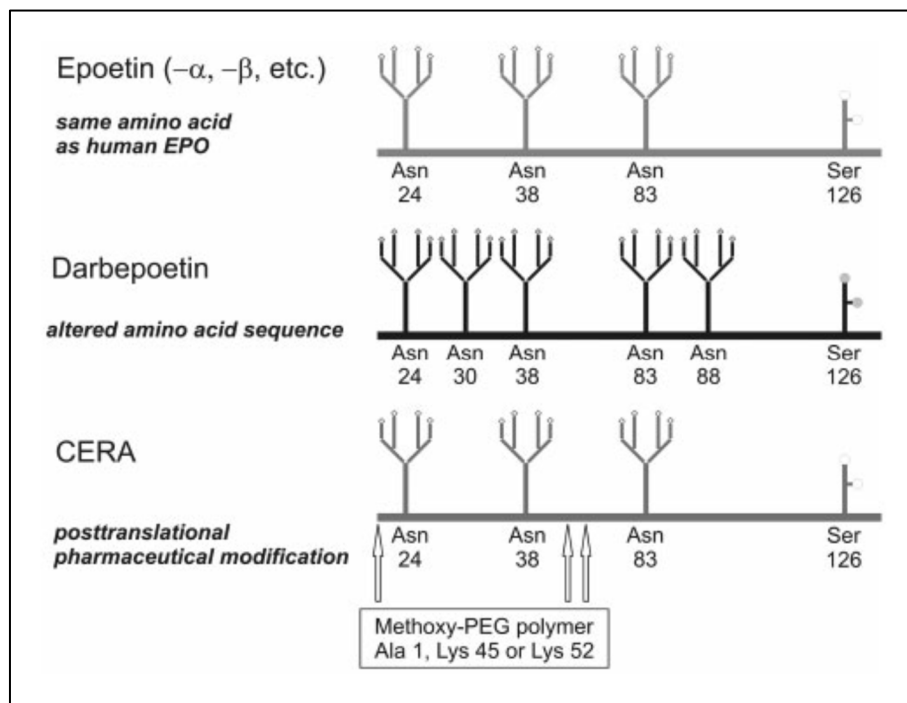
A módosítások célja a biológiai aktivitás növelése, a felezési idő növelése, a felhasználás könnyítése. Ennek érdekében a kiindulási molekulának mind a fehérjerészét (protein engineering), mind a szénhidrát részeit (carbohydrate engineering) módosították.

Darbepoietin alfa/Aranesp (Amgen): módosított EPO, amelyben öt aminosavat cseréltek ki: Asn-57, Thr-59, Val-114, Asn-115 és Thr-117, ezzel újabb két N-glikozilációs helyet alakítottak ki. Három helyett öt N-cukorláncot tartalmaz, ennél fogva sztiálsav-tartalma is nagyobb. A molekula felezési ideje is a háromszorosára nőtt.

Más fejlesztésben a 24 Asp-at Glu-ra cserélték le, a molekula hatékonysága 29%-kal növekedett.

Harmadik generációs EPO készítmények

CERA (Continuous erythropoietin receptor activator): az EPO-ra PEG láncokat kötöttek, ettől a molekulatömeg 60 kDa-ra növekedett. A felezési idő a húszszorosára nőtt (Roche gyártmány).



349. ábra Továbbfejlesztett EPO készítmények

17. VÉRFEELDOLGOZÁS, PLAZMAFEHÉRJÉK

17.1. A vér

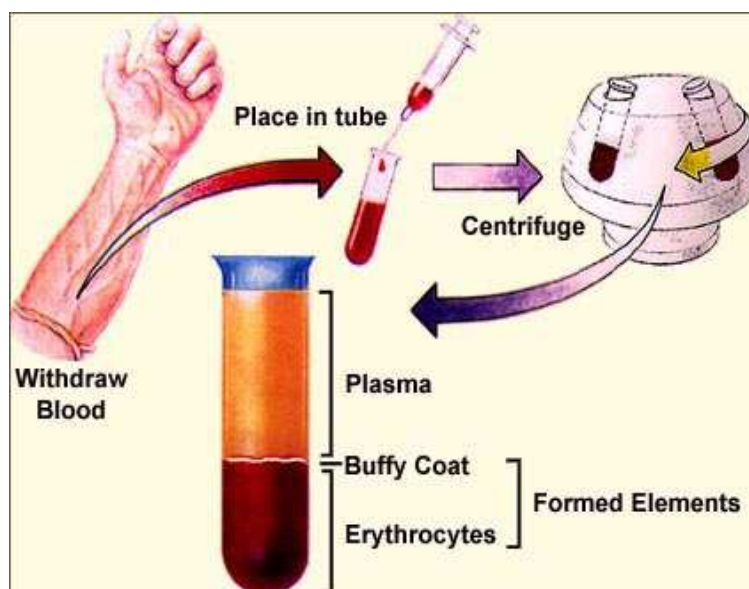
A vérrendszerben keringő testfolyadék, amely oxigénnel és tápanyaggal látja el a sejteket, elszállítja a bomlástermékeket és közreműködik a szervezet védekezésében. Olyan sajátos lazarusos kötőszövetnek tekinthető, ahol a sejtek között nincs kapcsolat, a sejtközi folyadékban lebegnek. Egy felnőtt embernek átlagosan 5-6 liter vére van. A vér térfogatának 42-48%-át (ez a hematokrit érték) teszik ki a sejt elemek (vörösvérsejtek, fehérvérsejtek, vérlemezkék), a többi a vérszérum. Androgén többletnek nevezzük azt a jelenséget, hogy a férfiak vérében 10-20%-kal több vörösvérsejt van, mint nőkében. Ez a szteroid típusú férfi hormonok hatása.

Az emberi vér egy szuszpenzió, melynek alkotórészei a folyékony plazma és a benne lebegő alakos elemek:

- a (sejtmag nélküli) vörösvérsejtek, vagy vörösvértestek (erythrocyták), amelyek a gáztranszportban és a sav-bázis egyensúly beállításában vesznek részt,
- a maggal rendelkező, keringő fehérvérsejtek (leukocyták, többféle típusuk van), amelyek a szervezet védekező, immunológiai rendszereinek részét képezik.
- a sejtmag nélküli vérlemezkék (trombociták), amelyek funkciója a vérzések elleni védekezés, az érpálya sérüléseinek lezárása.

A levett vért többféle formában vizsgálják/használgják:

- eredeti állapotában (teljes vér),
- centrifugálás után (alakos elemek + szérum)
- alvadás után (alvadék + plazma)

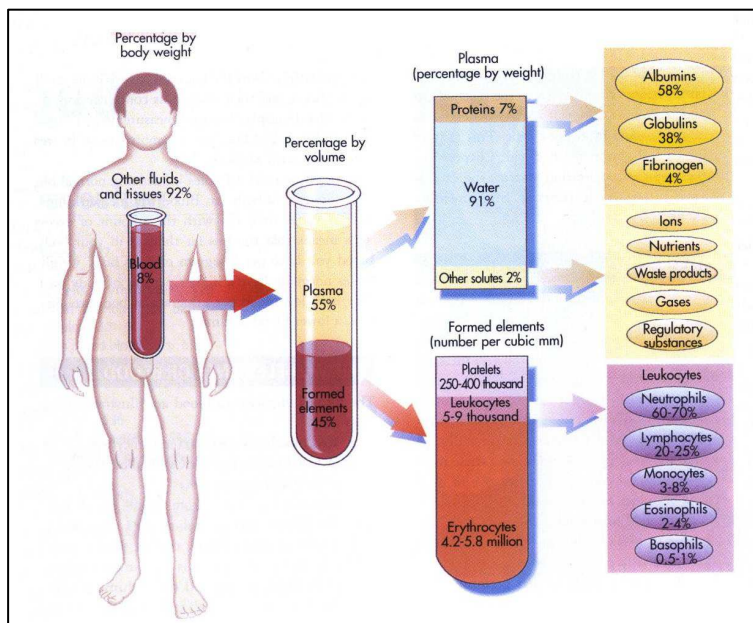


350. ábra A vér lecentrifugált alakos elemei

A szérum és a plazma közötti különbség: a plazmában már nincsenek benne az alvadás során elhasználdott faktorok, így a legnagyobb mennyiségű fibrinogén sem.

A vér centrifugálása során az „alakos elemek”, a vérsejtek leülepednek. A vörös vértestek fölött egy vékony fehér réteg rakodik le, ezt nevezik „buffy coat”-nak. Ebben található a vérlemezkék és a fehér vérsejtek. Az egészséges embernél a vörös vérsejtek koncentrációja 4-

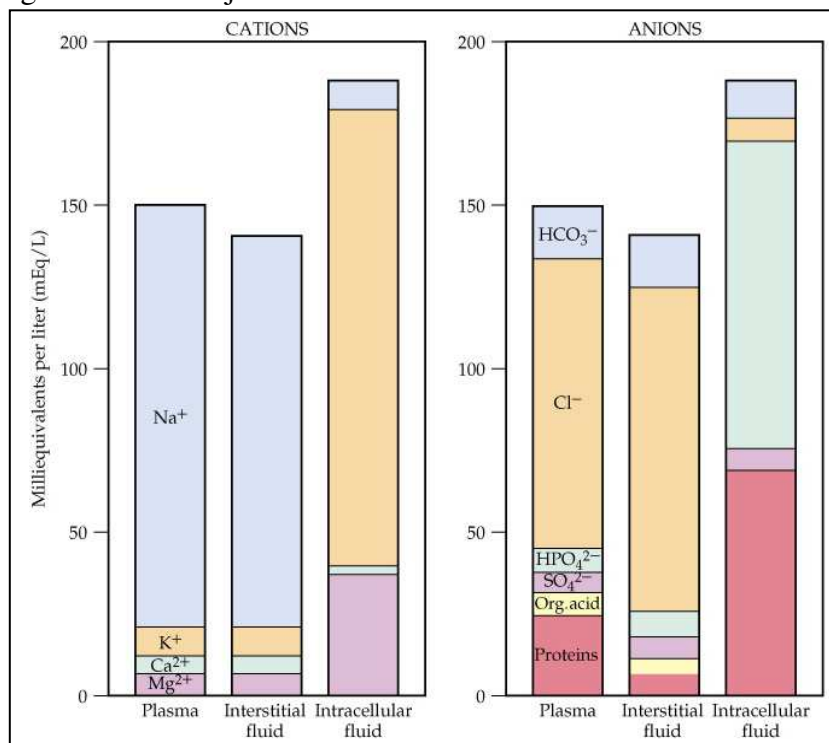
5 millió/mm³, a vérlemezkéké 200-400 ezer, a különféle fehérvérsejteké összesen 8-10 ezer. A felülúszó a halvány sárga színű szérum.



351. ábra A vér alkotó elemei

A szérum összetétele

A vér oldott ásványi anyag tartalma kb. 2%. Ezek alkotják a vér puffer rendszereit (hidrokarbonát és foszfát pufferek) és biztosítják a megfelelő ozmózisnyomást (nátrium-klorid). A hajszálerek fala ultraszűrő membránnak tekinthető, így a kis ionok retenció nélkül átlépnek a sejt közötti folyadékba (intersticium). Emiatt a két folyadéktér ionösszetétele gyakorlatilag megegyezik. Más a helyzet a sejtek belsejében, ott az aktív transzportok folyamatos energiaráfordítással jelentősen eltérő összetételt tartanak fenn.



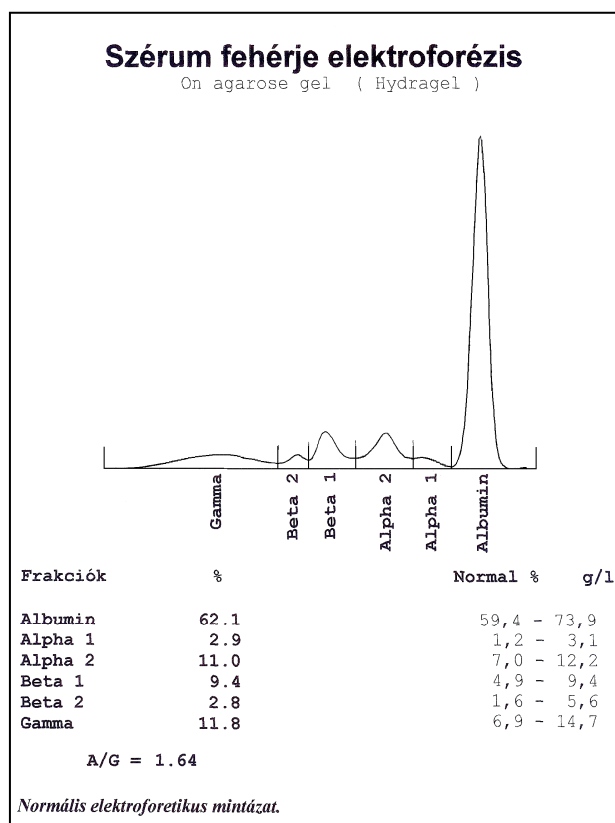
352. ábra A testfolyadékok ionösszetétele

A vérben 6-7% oldott fehérje van, ezek funkciójuk szerint sokfélék, vannak szállító-, szabályozó- és immunfehérjék, valamint véralvadási faktorok is. Az albumin teszi ki a fehérjék nagyobb részét, ez a vér fizikai-kémiai tulajdonságait stabilizálja (ld. az állati sejtek tápoldatánál is). Fő frakciók:

40 - 50 g/l	Albumin
10 - 25 g/l	Immunoglobulinok
2 - 4 g/l	Fibrinogén
9 - 10 g/l	6 nagy mólsúlyú fehérje (Transferrin, Haptoglobin, C ₃ , α_2 -Makroglobulin, α_1 -Proteináz-Inhibitor, Apolipoprotein I)
8,5 g/l	kb. 110 különböző minor plazmafehérje (többek között alvadási faktorok és enzim inhibitorok)

A klasszikus oldhatósági kategóriák szerint: a legtöbb az albumin (az összes fehérje kb. kétharmada) és globulinok (α -1, α -2, β -1, β -2, γ frakció). Gélelektroforézissel szétválasztva, denzitométerrel kiértékelve ezek mennyiségileg is meghatározhatók.

Adalék: ezt az ábrát nem egy tankönyvből vettem át, hanem egy egészségvédelmi specializációs BSc hallgató vette fel nyári szakmai gyakorlatára során, az ő beszámolójából másoltam ide. A „normális elektroforetikus mintázat” azt jelenti, hogy a vizsgált páciensnél a frakciók százalékos aránya az egészséges tartományba esik.



353. ábra Szérum fehérjék elválasztása elektroforézissel

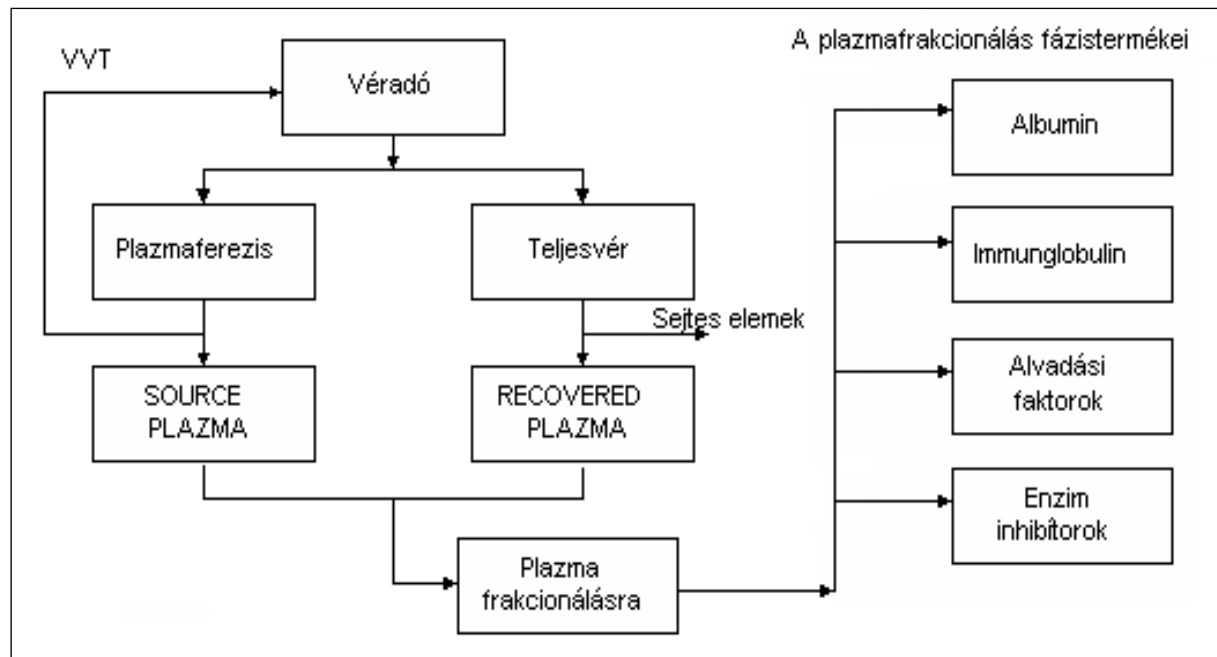
17.2. A vér és komponenseinek pótlása

A vér egészében is, elemeiben is nélkülözhetetlen a szervezet életben maradásához. Ha tehát ebből/ezekből hiány keletkezik, azt pótolni kell.

Ha a teljes vér hiányzik (sérülés, műtét), akkor vérátömlesztésre van szükség. (A fiziológiai sóoldat, vagy dextrans oldat csak részleges, átmeneti megoldás.) Transzfúzióra akkor van szükség, amikor a beteg klinikai állapota azt egyértelműen indokolja. Az indikáció felállításakor mindig mérlegelni kell a kockázatát, illetve az előnyét, mert ugyan egyre biztonságosabb vérkészítmények kerülnek előállításra, a transzfúzióknak mégis van rizikója. Napjainkban a transzfúzió nem csak a teljes vér átömlesztését jelenti, hanem célzott hemoterápiát, vagyis csak a hiányzó, vagy funkcióképtelen véralkotórész pótlását is.

Ha a vérnek csak egyes komponensei hiányoznak (veleszületett vagy szerzett betegség, külső ártalom miatt), akkor a cél annak az összetevőnek a pótlása. Ez származhat donorvérből vagy lehet mesterségesen előállított készítmény (rekombináns fehérje).

A donorok kétféle módon adhatnak vért. Az egyik esetben teljes vérvétel történik. A levett vér megalvadását meg kell akadályozni. Ezt valamilyen kémiai anyag (citrát, oxalát, EDTA, heparin) azonnali hozzáadásával érhetjük el. A levett vér túlnyomó részét teljes vérként vérátömlesztésre használják fel. Egy kisebb részt viszont frakciókra bontva a hiányzó komponenseket célzottan pótló készítményeket gyártanak. A vér elemeit centrifugálással szétválasztják. Az így előállított felülúszó a „recovered” plazma.



354. ábra A véradás és a plazmafrakcionálás kapcsolata

A másik út a plazmaferézis. Ennek során a kivezetett vért egy mikroszűrő membránmodulon vezetik keresztül. A szűrő az alakos elemeket visszatartja, az oldott anyagokat, a sókat és a fehérjéket viszont átengedi. Ezt a szűrletet „source” plazmának nevezik. A donorok érrendszerébe visszavezetik a sejtes elemeket, így kisebb a szervezetük megterhelése és gyakrabban ismétélhető a plazma adása.

A levett vér tartalmazhat olyan fertőző ágenseket, melyek a termékkel a recipiens szervezetébe jutva fertőzést és betegséget okozhatnak. A veszély csökkentése érdekében mind a donorkat, mind a levett vért, illetve plazmát szigorú vizsgálatnak és szelekciónak vetik alá. A véradás előtt a donork általános orvosi és laboratóriumi vizsgálaton vesznek részt, így a vér csak egészséges donoroktól származhat. Magyarországon minden egység levett vért ellenőriznek. Valamennyi adagnál követelmény:

- HBs-antigén teszt (a hepatitis-B vírus jelenlétét mutatja ki): **negatív**
- Anti-HIV1-2 (HIV vírusok ellen termelt antitest): **negatív**
- Anti-HCV (hepatitis-C vírus ellen termelt antitest): **negatív**
- Lues (szifilisz, vérbaj: TPHA = *Treponema pallidum* haemagglutination assay): **negatív**

17.3. Az alakos elemek pótlása

Vörösvérsejt koncentrátumot akkor adnak a páciensnek, ha a vér oxigén szállító kapacitása a normális felére csökkent (a hematokrit 45% helyett <23%, vagy az oxigén parciális nyomása az artériás vérben nem éri el az 50%-ot).

17.3.1. Vörösvérsejt-koncentrátumok

A vörösvérsejt-készítményeknél szempont az is, hogy adható-e a készítménnyel fehér vérsejt, vagy azokat kell szűrni. Ha a szűrt, mosott vérsejteket fiziológiás sóoldatban szuszpendálják, azt 24 órán belül fel kell használni. CPDA oldatban (citrát, foszfát, dextróz, adenin) +4 °C-on tárolva viszont jóval hosszabb ideig eltarthatók.

17.3.2. Trombocita-készítmények

Trombocita-koncentrátum adása akkor indokolt, ha a trombocitopéniás beteg (= alacsony a vérlemezke száma) vérzik, vagy csontvelő-elégtelenség áll fenn. Nem vérző, kis trombocita-számmal rendelkező beteg esetén nem feltétlenül indokolt trombocita transzfúzió adása.

A trombocita frakciót a buffy coat réteg kiszívásával állítják elő. A vérlemezkék saját plazmájukban +22 °C-on tárolva öt napig használhatók fel, de fiziológiás sóoldatban szuszpendálva 6 órán belül fel kell használni.

Ha beteg nem kaphat idegen fehér vérsejteket, akkor a mentesítésre ugyanolyan szűrőket használnak, mint a vörös vértetek mentesítésénél.

17.4. Plazmakészítmények

Az emberi vérplazma száznál is több különböző fehérjét tartalmaz, melyek közül számos gyógyszerként is forgalomba kerül. Ezek közül néhánynak életmentő szerepe van és szinte csak egyedülként alkalmas az adott betegség gyógyítására. Ezek az izolált, specifikus fehérjét tartalmazó gyógyszerek a plazmaderivátumok.

17.4.1. Technológiák kialakulása, fejlődése

A fehérjék fiziko-kémiai tulajdonságainak megismerése reális lehetőséget teremtett fehérje koncentrátumok vérpótló szerként való felhasználásra. Az állati, elsődlegesen ló és marha plazmából előállított albumin készítmények allergiás reakciót váltottak ki, így a kutatók a humán plazma felé fordultak. A plazmafrakcionálási eljárások kialakulását az USA háborús erőfeszítései segítették, így a Harvard egyetemen telepített laboratórium albumin termékét már felhasználták az 1941. decemberi Pearl Harbor-i támadás sérültjeinek a gyógyítására. 1942 januárjában, az USA-ban döntés született, hogy a nagy gyógyszergyárak plazmafrakcionáló kapacitást építsenek ki, elsődlegesen a hadsereg igényeinek kielégítésére. 1946-ban az addig már szabadalmaztatott eljárásokat (Cohn hideg alkoholos eljárása) teljes részletességgel nyilvánosságra hozták, ami segítette az eljárások telepítését és módosítását, fejlesztését.

A plazmafrakcionálási technológia a 60-as évek elejétől indult igazi fejlődésnek. A hetvenes években elkezdtek telepíteni a korszerűbb elválasztás technikai műveleteket (ultra-szűrés, kromatográfia) amelyek lehetővé tették az alvadási faktorok előállítását és az intravénásan alkalmazható immunglobulin készítmények is piacra kerültek. A nyolcvanas években a monoklonális technika elterjedésével affinkromatográfiával tisztított faktor készítményeket fejlesztettek ki, és ezzel párhuzamosan folyt a rekombináns preparátumok tesztelése is.

Adalék: Magyarországon az 50-es évek második felében indult meg a plazmafrakcionálás a Humán Intézetben, illetve az Országos Hematológiai és Vértranszfúziós Intézetben. Először a gammaglobulint preparálták, majd 1962-től az albumin infúzió is törzskönyvezett készítményként jelent meg. A Humán Intézet gödöllői telephelyén 1966-ban kezdték meg az ipari méretű plazmafrakcionálást. Albumin infúziókat és immunglobulin injekciót gyártottak hazai önkéntes donorok vérplazmájából. 1986-ban jelentős beruházással kapacitás bővítés történt, korszerűbb lett a gyártás. 1994-re a hazai vértranszfúziós állomásokon bekövetkezett minőségi fejlődés lehetővé tette a friss fagyasztott plazma előállítását, amely előfeltétele volt a véralvadási faktorkoncentrátumok gyártásának. Így 1994-95-ben a gyártóüzem átépítése után megkezdődött a nagy tisztaságú, vírusinaktivált Faktor-VIII és Faktor-IX koncentrátumok előállítása a magyarországi hemofiliás betegek ellátására. (A Humán Intézet azóta többször tulajdonost és nevet cserélt, volt a TEVA izraeli gyógyszergyár üzeme, Humán Bioplazma Rt, jelenleg a Kedrion Group-hoz tartozik.)

17.4.2. A humán plazma, mint alapanyag

A plazmaderivátumok alapanyaga egyedi plazmák keveréke. Az egyedi plazmák számtalan paraméterben különböznek egymástól. A plazma tartalmazhat vírusokat, ezért a plazma és a belőle előállított termékek gyártására olyan átfogó biztonsági rendszert (The Integrated Safety System) alakítottak ki, amely lefedi a gyártás teljes folyamatát a plazma előállításától a végtermék felszabadításáig.

Az emberi vérplazmából előállított készítményekkel történő vírusátvitel kockázatának csökkentésére a hazai és nemzetközi előírások az alábbi feltételek együttes teljesülését írják elő:

- a véradók fentiek szerinti orvosi vizsgálatát és a vírus-antigének/ellenanyagok meghatározását,
- az alapanyag plazma feldolgozás előtti újbóli vírusvizsgálatát, a HCV esetében PCR technikával,
- validált vírusinaktiváló, víruseltávolító lépések alkalmazását a gyártás során.

A vírusmentesítés drága művelet, közel kétszeresére növeli a költségeket, ráadásul az alkalmazott módszerek csökkentik egyes labilis komponensek aktivitását is. Ezért a plazmának csak azt a részét kezelik, amelyiket változatlanul adják a pácienseknek. A további feldolgozásra kerülő plazmánál a frakcionálási, tisztítási technológiákban vírusmentesítő, inaktiváló műveletek is vannak, ezért nem szükséges már az alapanyagot mentesíteni.

A vérből előállítható plazmakészítmények az alábbiak:

17.4.2.1. Friss Fagyasztott Plazma (FFP)

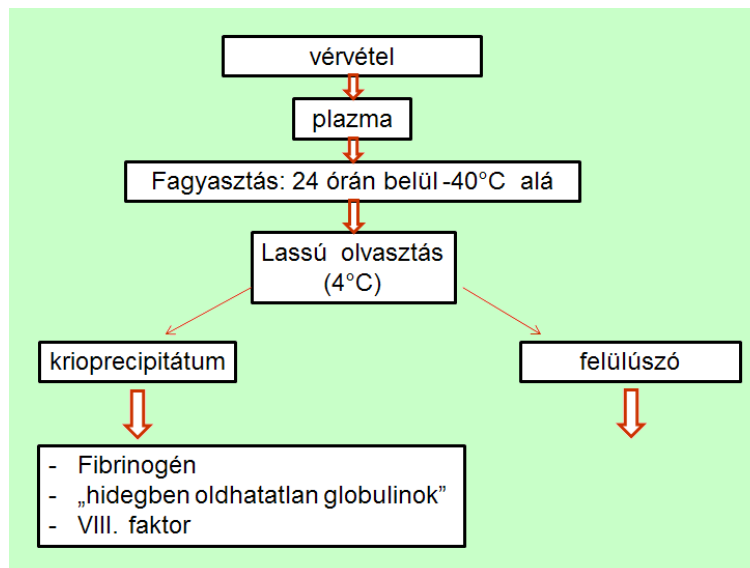
A friss fagyasztott plazma előállítása teljes vérből centrifugálással (180-290 ml/donáció) vagy nagyobb mennyiségben plazmaferézis szűrletből (közel 800 ml/donáció) történik. A plazmát a vérvételt követő 24 órán belül gyorsfagyasztóban -40 °C alatti hőmérsékletre fagyasztják le. A WHO ajánlása még szigorúbb, alapkövetelménynek a 8 órán belüli lefagyasztást és a -20 °C alatti tárolást tekinti. Ezzel az eljárással a plazma valamennyi alkotórésze egy évig megőrizhető. Mind a labilis, mind a stabil véralvadási faktorok aktivitása megmarad. A stabilitás mérőszáma a FVIII aktivitása, maximum 30% csökkenés megengedett. A fagyasztás sebessége nagymértékben befolyásolja az instabil alvadási faktorok inaktiválódását. A minél gyorsabb fagyasztás a kívánatos, ugyanis lassú fagyasztáskor a fehérje molekulák hosszú ideig találkoznak nagy sókoncentrációjú oldattal. A fagyasztás kezdetén a víz fagy ki, a sók a folyadék fázisban feldúsulnak és a nagy ionerősség következtében a fehérje molekulák elveszíthetik aktivitásukat, ami a kitermelést rontja. Fagyasztó szekrényben, -25 °C -nál alacsonyabb hőmérsékleten tárolják. Nem célszerű a kórházi osztályos hűtőkben tartani, mivel azok fagyasztó terében a hőmérséklet általában csak -18 °C körüli. Ezen a hőmérsékleten a jég még folyamatosan átkristályosodik, ami denaturálja az érzékeny fehérjéket.

A friss fagyasztott plazma különféle gyógyszergyári plazmakészítmények az alapanyaga: alvadási faktorkoncentrátumok, albumin- és immunglobulin készítmények vonhatók ki belőle.

Ezenkívül tartalmazza a véralvadási rendszer inhibitorait (fibrinolitikus enzimek, antitrombin-III, protein C, protein S stb.), kininogént, fibronektint, proteáz inhibitorokat, C1-észteráz inhibitorot, illetve a komplement rendszer komponenseit. Emellett a vér alvadását megakadályozó gátló anyagok (CPD vagy ACPD) is jelen vannak.

17.4.2.2. *Krioprecipitátum*

A FFP-t hőfokprogram szerint lassan felolvasztják +4 °C-os hőmérsékletig. Ilyen körülmények között a fehérjék egy része csapadék formájában oldhatatlan marad, ez a frakció a krioprecipitátum. Ez a csapadék a fibrinogént, FVIII-t, von Willebrand faktort (vWF), FXIII-at és a fibronektint tartalmazza. A további fehérjék a felülúszóba kerülnek.



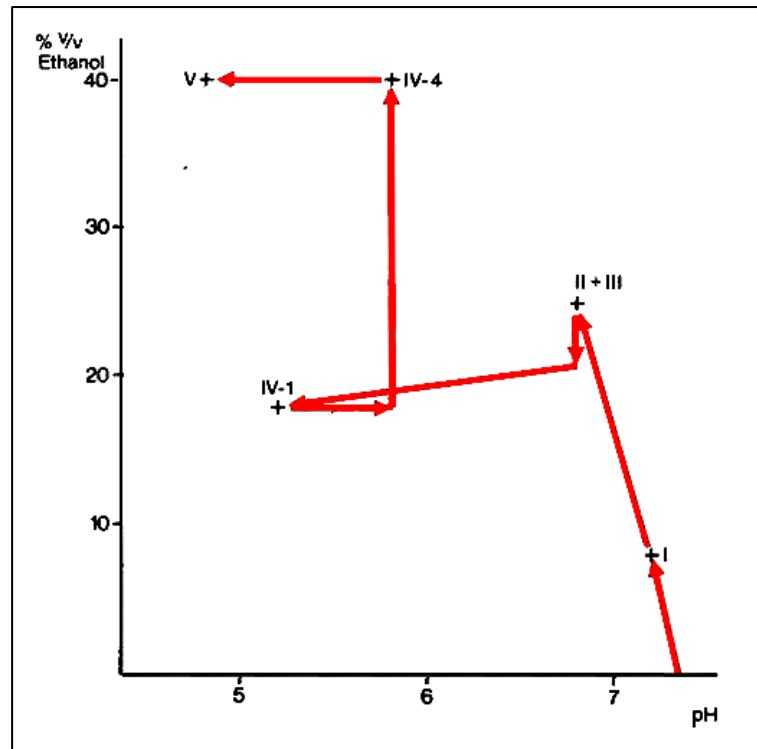
355. ábra Krioprecipitátum

A csapadék alapesetben további feldolgozásra kerül, terápiára csak rendkívüli körülmények között használják, mert ez sem vírusinaktivált készítmény.

17.4.2.3. *A Cohn-féle csapadékos frakcionálás*

Edwin Cohn (1892-1953) amerikai biokémikus nevéhez fűződik a vérplazma frakcionálása hideg etanolos eljárással, melynek során a pH és az alkoholtartalom változtatásával lépésről lépésre csapják ki az egyes frakciókat. A csapadékképzéshez le kell csökkenteni a fehérjék oldhatóságát. Az oldhatóság az izoelektromos ponton minimális. Ezen a pH-n a molekulák eredő töltése nulla, így a közöttük ható taszító erők megszűnnek, könnyen összetapadnak. Másrészt az oldhatóság csökkenthető az oldószer polaritásának megváltoztatásával. A Cohn-féle eljárásban etanolt adnak a vizes közeghez, így csökken az oldószer polaritása, ebben a poláris jellegű fehérjék oldhatósága rosszabb, ezért kicsapódnak.

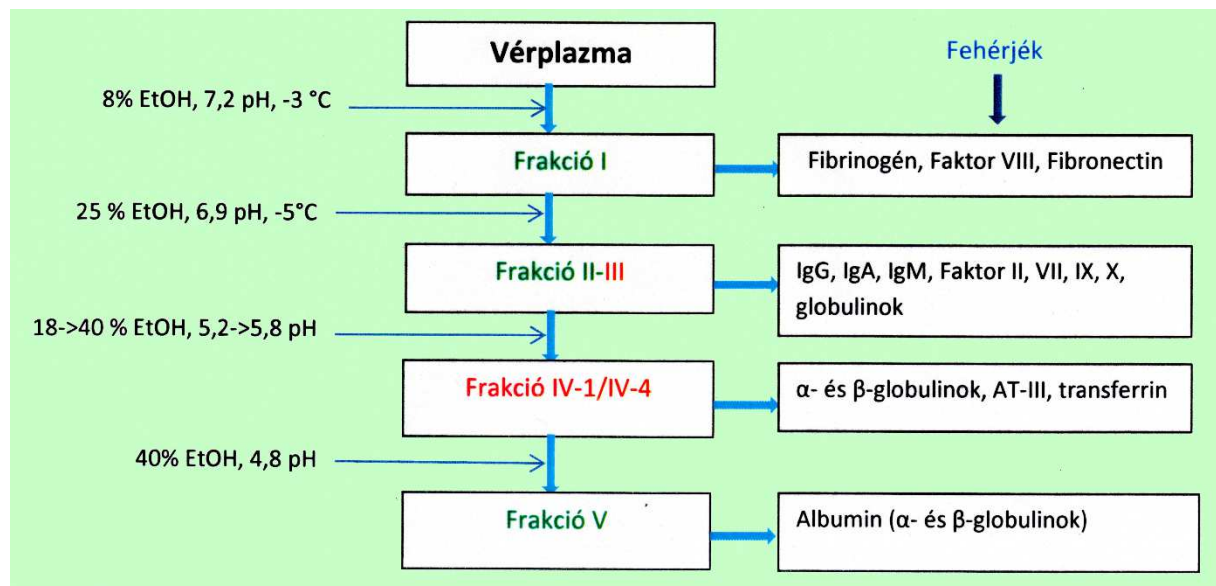
A Cohn-féle eljárás 5 fő frakciót eredményez (I, II, III, IV, V). A kezdeti szakaszban a Frakció-I-et csapják ki, ez tartalmazza a F-VIII véralvadási faktort, ami a veleszületett A típusú vérzékenység kezeléséhez szükséges.



356. ábra A pH és etanol koncentráció változtatása a Cohn frakcionálás során

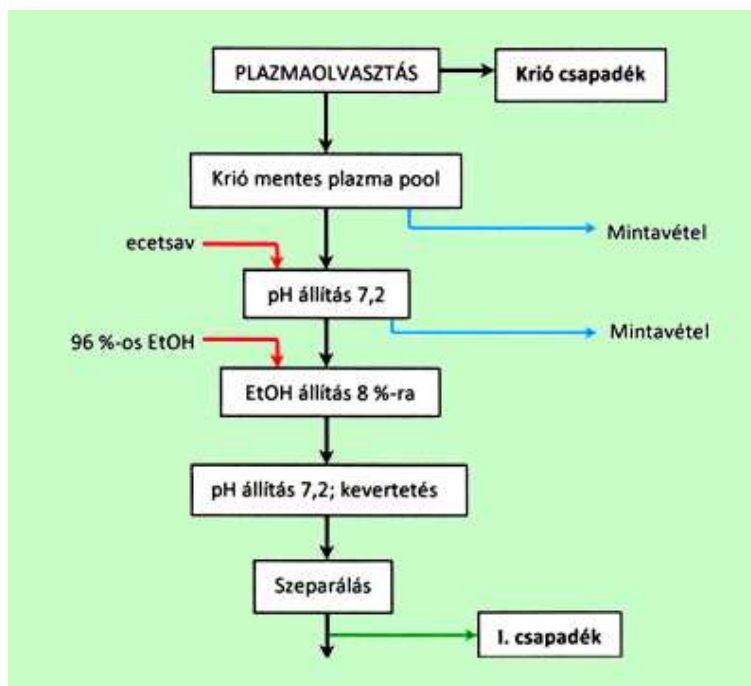
A frakcionálás indulhat a teljes plazmából, vagy a krioprecipitátum felülúszójából. Ez utóbbi esetben a F-VIII a kriocsapadékba kerül, így az első Cohn csapadék ezt már nem tartalmazza.

A Frakció-I elválasztása után a Frakció II és III egyszerre válik ki. Ezt a csapadékot visszaoldva két lépésben kapják a II és III csapadék frakciókat. A II+III csapadék felülúszójából három lépésben választják le előbb a IV/I csapadékot (melléktermék) majd a IV/4 frakciót, végül az V frakció az összes fehérje kb. kétharmadát kitevő albumin.



357. ábra A Cohn frakcionálás lépései és termékei

A teljes műveletsorból csak az első lépés bloksémáját mutatjuk be (357. ábra).



358. ábra A Cohn frakcionálás első lépése

Hetven évvel ezelőtt, amikor ezeket a csapadékos eljárásokat kidolgozták, a membrános és kromatográfias fehérje elválasztási műveletek még gyerekcipőben jártak. Azóta ezek fejlődésével gyakorlatilag tiszta terápiás fehérje frakciókat lehet előállítani, de ezzel együtt a feldolgozás ma is csapadékképzéssel indul.

A frakcionálás eredményeképpen a következő termékcsoportokat állítják elő:

17.4.2.4. Albumin

A humán szérum albumin az összes vérfehérje kétharmadát teszi ki. Enzimaktivitása nincs, elsődleges szerepe a vér fizikai-kémiai tulajdonságainak beállítása. Fenntartja a hajszálerekben a kolloid ozmotikus (onkotikus) nyomást, növeli a viszkozitást, és van némi pufferkapacitása is. Emellett a felületén van egy apoláros „zseb”, amelyben kis, hidrofób molekulákat (szteroid hormonok, vitaminok) szállít a szervezetben. Az albumin vízkötő kapacitása nagy, 1 g albumin 18 ml vizet köt meg. Albumin pótlásra akkor van szükség, ha a páciens sok vért vesztett, vagy kiterjedt égést szenvedett.

A plazmából 95 %-os tisztaságú albumint állítanak elő. 5 %-os, izoonkotikus és 20 %-os, hiperonkotikus albumin oldatot hoznak forgalomba. Az elvesztett vértérfogat pótlására alkalmas. A volumennövelő hatás kb. 48 óráig tart. A kolloid ozmózis nyomás 80 %-át visszaállítja. A készítmény vírusfertőzés szempontjából biztonságos, mivel kettős, kombinált (fizikai és kémiai) vírusinaktiváláson esik át.

Akut vérvesztés kezelésére az 5 %-os humán albumin adható. Kiterjedt égésbetegségben az első négy napban a plazma albumin tartalmának kb. 2-szerese vész el a sebeken keresztül. Ilyen esetekben mielőbb 20 %-os albumin adása szükséges, bevitele infúzió formájában történik.

17.4.2.5. Immunglobulinok

Az immunglobulin készítmények főkomponensként antitesteket (immunglobulinokat) tartalmaznak. Passzív immunizálással erősítik fel a szervezet védekezését a fertőzések ellen. A készítményben lévő antitestek specifikitása alapján lehetnek polivalens és monovalens immunglobulin készítmények.

a.) A polivalens immunglobulin készítmények az adott népességben előforduló gyakori kórokozók (vírus-, baktérium antigének) ellen tartalmaznak sokféle ellenanyagot. Beadásuk intramuszkulárisan (= izomba), illetve a tisztított készítményeké intravénásan történhet. Hatása nem specifikus, nem önmagában, hanem más kiegészítő kezelésekkel együtt hatásos. A magyar polivalens (sokféle baktérium és vírus ellen hatékony), vírusmentesített készítmény, a Humaglobin 5 %-os immunglobulin oldat. A fehérjetartalom legalább 95 %-a immunglobulin, melynek legalább 99 %-a IgG. Ezen belül valamennyi IgG alosztályt tartalmazza.

b.) A monovalens (specifikusan egyféle fertőző ágenssel szemben hatékony) immunglobulin készítmények előállítására felépülő betegektől, vagy immunizált donoroktól plazmaferézissel nyert plazmából történik. Például a tetanusz ellenanyagot tartalmazó monovalens immunglobulin készítmény (TETIG) akkor alkalmazható, ha a sérült beteg nem részesült aktív tetanusz immunizációban. Másik hasonló elven ható készítmény a hepatitis B vírus elleni antitestet tartalmazó immunglobulin (Hepatect, gyártó: Biotest) hepatitis B vírussal történő kontaminációt követő 72 órán belül alkalmazható.

17.4.2.6. Véralvadási faktorkoncentrátumok

Ezek tárgyalásához előbb célszerű áttekinteni az emberi szervezet véralvadási, védelmi mechanizmusát.

A szervezet érpályái sérülékenyek. Mechanikai traumák következtében a megnyílt erek keresztül vérvesztés következik be. Az élőlény ezeket a traumákat csak abban az esetben élheti túl, ha az érsérülést követő vérzést csillapítani képes. Az erek sérülését követően a vérzés megszüntetése három fázisban megy végbe:

1. Helyi érreakciók: a sérült erek összehúzódással reagálnak az érfal simaizmok közvetlen reakciójaként. Ez a folyamat csak rövid ideig tart.

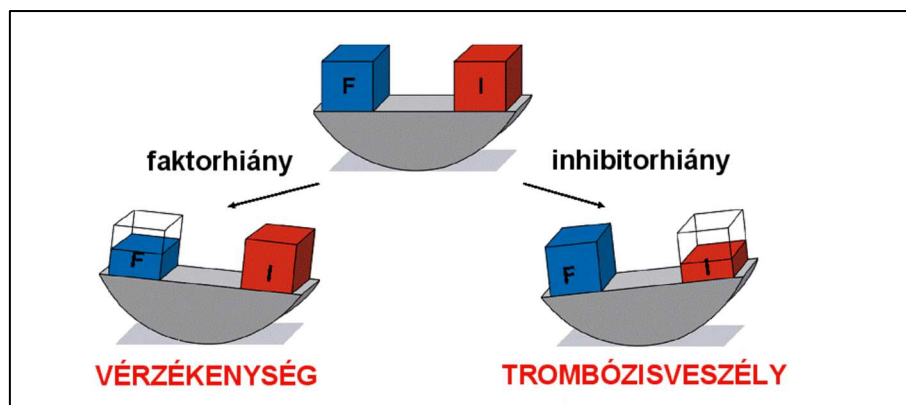
2. Trombociták működése: a trombociták aktiválódnak, majd aggregálódnak. Ennek hatására alakul ki az érsérülés helyéhez tapadó trombocitadugó, amely elzárja a sérült eret.

3. Véralvadás vagy koaguláció: Ebben a kaszkádfolyamatban a vérplazmában oldott állapotban lévő fibrinogénből egy oldhatatlan, stabil fibrinháló lesz, amely a trombocitákkal együtt dugót képez.

A három fázis időben átfedi egymást. Az alvadás befejeződése, a biztonságos zárás után indul meg lassan az eredeti állapot helyreállítása, az alvadék feloldódása, aminek végeredménye – kedvező esetben – az ér helyreállítása.

A vérzéscsillapítás kétélű fegyver, nemcsak hiánya, de túlműködése is veszélyezteti az életet. Ha az eredetileg nagyon pontosan kiegyensúlyozott rendszer egyik tagja hiányzik, akkor – a hiányzó tag működésének megfelelően – vagy kóros vérzékenység, vagy ennek az ellentéte, kóros vérrögképződés, és ennek következtében érelzáródás, trombózis lép fel.

A véralvadásban szereplő fehérjék nagy részét a máj – vagy a máj is – szintetizálja. Az elsőként felfedezett faktorok, a fibrinogén/fibrin és a protrombin/trombin elnevezése általánosan elfogadottá vált. A későbbiekben felismert faktorok elnevezését az Egészségügyi Világszervezet egységesítette. A faktorokat római számokkal, az aktivált faktort „a” toldalékkal jelölik.



359. ábra Egyensúly a véralvadási faktorok és inhibitorok között

A fibrinháló megjelenése többlépcsős reakciósorozat végeredménye. Az egyes lépésekben egy-egy a vérben keringő inaktív proenzim (alvadási faktor) aktív enzimmé alakul át. Az aktív enzimek – a VIIIa és a XIIIa faktor kivételével – szerin-proteázok. Valamennyi proteáznak nagyon szűk a szubsztrát specifitása, csak meghatározott fehérjék (egy vagy több alvadási faktor) meghatározott peptid kötéseit hasítják: az aktivált alvadási enzim egy további proenzim peptid kötésének hasításával alakítja ki a következő aktív enzimet. Minthogy az egymást követő proenzimek koncentrációja a vérben egyre magasabb, az eredetileg lassan induló folyamat egyre jobban felgyorsul. A gyorsuló folyamatot „alvadási kaszkád” (a kaszkád jelentése eredetileg lépcsőzetes vízesés) néven említik.

Az alvadási folyamat sajátosságai közé tartozik, hogy néhány proenzim nagyon lassan ugyan, de spontán is aktiválódik. Aktív alvadási faktorok ezért rendszeresen találhatók a vérplazmában, de nagyon kicsi mennyiségűk, valamint az azokat semlegesítő mechanizmusok következtében sérülés nélkül nem indítanak meg alvadást. A keringésben jelen lévő aktív proteázok viszont sérülés esetén helyben segítik elő a további enzimaktiválást.

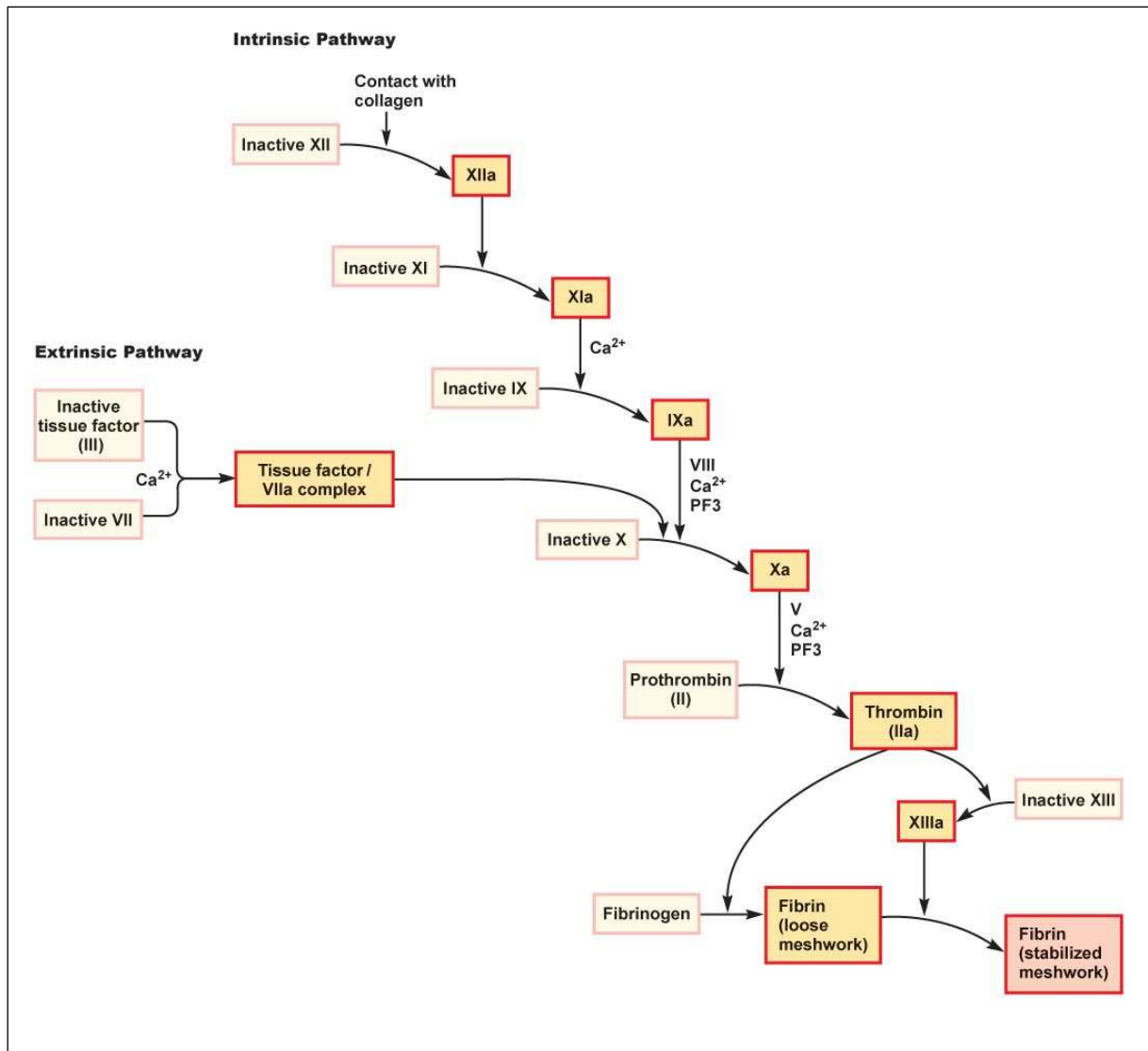
A sérülés helyén az alvadási folyamatot a vér és a sérült szövet találkozása indítja meg. A vérben keringő faktorok olyan anyagokkal érintkeznek, amelyeket az ép érfal különben elzárva tart. A véralvadási folyamat két különböző módon indulhat meg.

Az *extrinsic*, avagy külső indítású úton a vérben lévő VII faktor közvetlenül érintkezik a szöveti sejtek felületén található egyik membránproteinnel, a szöveti faktorról (III faktor, vagy angolosan TF= tissue factor). A két molekula Ca^{2+} ion segítségével összekapcsolódik, és az így kialakult komplex már aktív. A komplex további VII faktor molekulákat aktivál VIIa-vá, és ettől kezdve jelentős sebességgel alakul ki a szöveti faktor-VIIa-komplex. A folyamat autokatalitikus, önmagát gyorsítja, katalizátora maga a reakcióban keletkezett termék. A szöveti faktor-VIIa-komplex proteolitikus hasítással átalakítja a reakciósorban következő X faktort Xa faktorrá.

A másik, *intrinsic*, avagy belső indítású a folyamatban csak a vér saját anyagai szerepelnek, külső tényezők - mint az *extrinsic* úton a szöveti faktor - nem. Az érfal sérülésénél a vér alvadását a kötőszöveti kollagénnel való érintkezés indítja meg.

Adalék: Ugyanilyen hatása van minden negatív töltésű felületnek. Az üveg kémcsőbe levett vér az üveg negatív felületével érintkezve alvad meg. Ha a felületet bevonják akár monomolekuláris vastagságú szilikonolaj réteggel, az megakadályozza az alvadást. Ennek oka, hogy a szilikonok felülete hidrofób, a vér alkotói csak nehezen, vagy egyáltalán nem tudnak megtapadni rajta.

A reakciósorozatban ugyanúgy Xa faktor keletkezik, mint az *extrinsic* úton, de több lépésben és más faktorok közreműködésével.



361. ábra A véralvadási kaszkád

Ez az alternatív út több tényező együttműködését igényli, mint az előbb leírt.

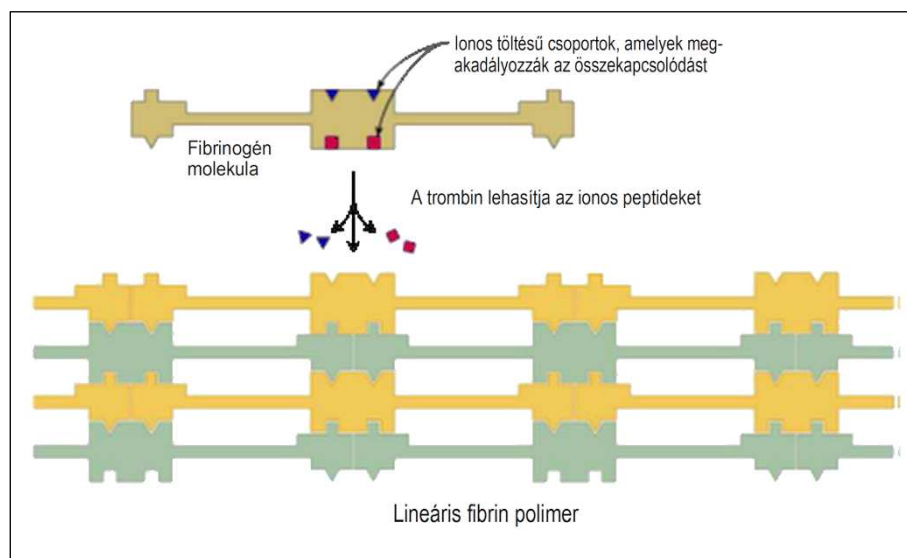
Mind a IXa, mind a X. faktor Ca²⁺ jelenlétében az aktivált tromboцитák foszfolipid (PL) membránfelületéhez kötődik. A VIIIa faktor biztosítja az enzim és szubsztrátja megfelelő térbeli elrendeződését. A kialakuló aktivátor- (tenáz-)komplex tehát a IXa, a VIIIa, faktorokból, a



360. ábra A tenáz komplex

trombocita foszfolipidból és Ca^{2+} ionokból áll, amelynek aktív proteáz enzime a IXa faktor, szubsztrátja pedig a X faktor.

A kialakult Xa faktor alakítja át protrombint trombinná (II→IIa). Az átalakulás résztvevői szintén aktivátor komplexet képeznek, ez azonban különbözik az előzőekben említett tenáz komplextől. Ebben az összeállításban az aktív enzim a Xa, a szubsztrát a protrombin; a regulátorfehérje, ami az enzim-szubsztrát megfelelő elrendezését biztosítja, az Va faktor. Az aktivátor komplex Ca^{2+} jelenlétében ez esetben is a trombocita-membrán foszfolipid felületén alakul ki. A létrehozott trombin a fibrinogénből kisebb, ionos peptideket hasít le, ezáltal jönnek létre a reakcióképes fibrin monomerek. Ezek lineáris kötegekbe rendeződve rögzülnek egymáshoz. A második lépés a fibrin szálak térhálósítása keresztkötések kialakításával. Az aktív trombin proteolízissel aktiválja az inaktív XIII (Laki-Lóránd) faktort, és a XIIIa az egyes fibrin szálak között stabil kovalens kötést hoz létre, fibrinhálóvá térhálósítja a lineáris polimereket.



362. ábra Fibrinogén – fibrin átalakulás

A trombinnak ezen kívül szerepe van a regulátorfehérjék aktiválásában: Mind a VIII., mind az V. csak előzetes aktiválást követően vesz részt a megfelelő aktivátor-komplex kialakításában; mindkettő aktiválásában a trombin szerepel. Az átalakítást kezdetben a vérplazmában nyomnyi mennyiségben jelen lévő trombin végzi, és a továbbiakban az alvadási folyamatban keletkező trombin és a Xa faktor folytatja.

A többlépcsős, konsekutív folyamat biológiai erősítőként működik. Egy parányi kis változástól a folyamat végére komoly anyagmennyiségek átalakulása következik be. Ezt jól szemlélteti a folyamat elején, közepén és végén működő fehérjék normális koncentrációja a vérben:

XII faktor	–	10 ppb
↓		
IX faktor	–	3-5000 ppb
↓		
Fibrinogén	–	4.000.000 ppb

Ez annak köszönhető, hogy a faktorok (nagyreszt) enzimek, és egy enzim molekula sok szubsztrát molekulát képes rövid idő alatt átalakítani.

E rendkívül összetett, hosszú evolúciós folyamatban kialakult rendszerben egyetlen elem hibája vagy hiánya is életveszélyes állapotot idézhet elő (vérzékenység ↔ trombózisveszély). A faktorhiány felismerése révén megnyílik a lehetőség, hogy a rendszer normális működését a

hiányzó molekula bevitelével helyreállítsuk és elháríthatjuk a veszélyeket. A kérdéses fehérjék előállítására két út adódik:

- Izolálás donorok vérplazmájából
- Előállítás rekombináns fehérjeként fermentációs úton

Ebben a fejezetben az első gyártási módszerrel foglalkozunk.

A plazmából (FFP) vírusinaktivált véralvadási faktorkészítményeket állítanak elő. Ezek intravénásan alkalmazható, speciális vézescsillapító, tisztított, liofilizált szerek, melyeknek faktoraktivitása az FFP-vel szemben magas és pontosan ismert. Vírusbiztonságuk egyrészt a donorok szűrésén, másrészt a végtermék vírus inaktiválásán (kettős: fizikai + kémiai módszerek a burkos és nem burkos vírusok ellen) és PCR módszerű végtermék ellenőrzésén alapul. Hemofília esetén a készítmények adagolása a faktorhiány mértékétől, a vézés helyétől és kiterjedésétől függ.

A faktorok közül legnagyobb piaci súlya a F-VIII-nak és F-IX-nek van. Ezek képződésének veleszületett hiánya (hemofília A és B) állandó, élethosszig tartó rendszeres adagolást tesz szükségessé. Vértékeny betegek kezelésére alkalmazható véralvadási faktorkoncentrátumok:

F-VIII koncentrátumok:

Humafaktor 8	(Humán Bioplazma, Gödöllő)
Haemoctin SDH	(Biotest)
Hemofil M	(Baxter)
Immunate	(Baxter)
Haemate P	(Behring)

F-IX koncentrátumok:

Humafaktor 9	(Humán Bioplazma, Gödöllő)
Immunine	(Baxter)

Többkomponensű készítmények:

Prothromplex Total/STIM : FII, FVII, FIX, FX	(Immuno)
Prothromplex TIM: FII, FIX, FX	(Immuno)
Beriplex	(Behring)
FEIBA VH	(Baxter)

Egyéb faktorkoncentrátumok:

FI: Haemocomplettan	(Behring)
FXI: Hemoleven	(LFB) (hazánkban nem áll rendelkezésre)
FXIII: Fibrogammin	(Behring)

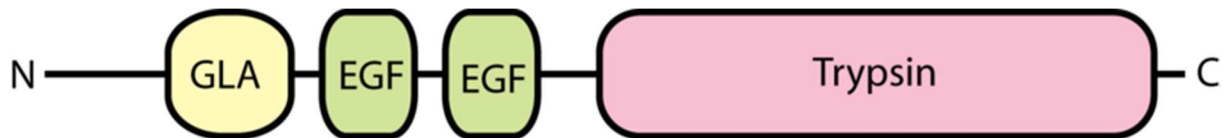
17.5. Esettanulmány: a Faktor-IX előállítása vérplazmából

A véralvadási kaszkád egyik tagja a *Faktor-IX* fehérje, amelyre a véralvadás folyamatához minden embernek szüksége van. Örökletes hiánya a B típusú hemofília betegség, ami a IX-es faktor teljes, vagy részleges hiányát jelenti. Kezelésére rendszeresen nagy tisztaságú IX-es véralvadási faktort kell adagolni a páciensnek – ennek gyártását tárgyaljuk esettanulmányként.

A IX-es véralvadási faktor sok vérfehérjéhez hasonlóan a májban szintetizálódik, egylán-cú glikoprotein, molekulásúlya 56 000 D. Normál koncentrációja a plazmában 3-5 µg/ml.

A IX-es faktor 415 aminosavból áll, az aminosavak sorrendje ismert. A fehérje kb. 20% szénhidrátot tartalmaz. A fehérje több jól elkülöníthető szakaszból, doménből áll. Biokémiai aktivitására nézve ez egy tripszin típusú szerin proteáz, funkcionális része a C terminálison

található tripszin domén. Az N-terminálison elhelyezkedő Gla-domén egyéb aminosavak mellett 12 γ -karboxi-glutaminsav (Gla) egységet tartalmaz. A Gla gyökök intramolekuláris kalcium-hidakat képeznek, amelyek nélkülözhetetlenek a fehérje konformáció kialakulásához és a membránfelszínekhez való kötődéshez. A két EGF (Epidermal Growth Factor) doménen egy másik szokatlan aminosav, hidroxí-aszparaginsav található. A véralvadásban szerepet játszó II-es, VII-es és IX-es véralvadási faktor, valamint a gátló C és S protein homológ szerkezetűek. Felépítésükben közös a 45 aminosavból álló N-terminális Gla-domén.

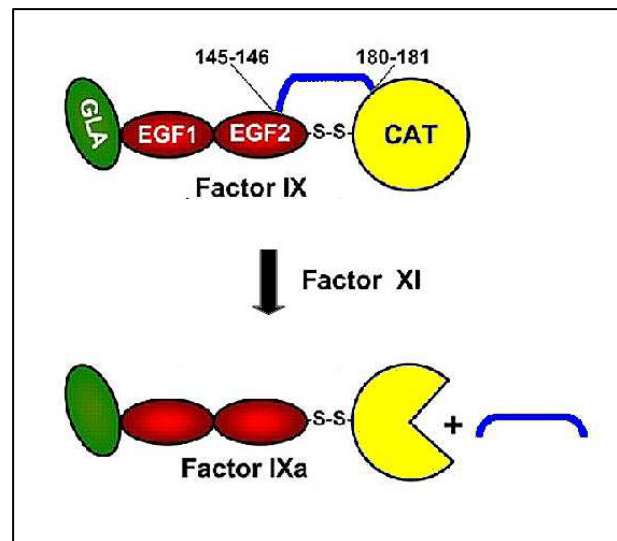


363. ábra A F-IX domén szerkezete

A plazmafehérjék ezen csoportjának teljes szintéziséhez K-vitaminra van szükség, ezért nevezik ezeket K-vitamin függő fehérjéknek. A Gla doménben a glutaminsav gyököket a korai transláció során egy K-vitamin függő speciális enzim gamma-karboxilezi. K-vitamin-hiányban ennek elmaradása miatt alvadási zavar következik be. A K-vitamin zsírban oldódó vitamin, felszívásához epesavas sók jelenlétére van szükség: ha az epetermelés zavart, vagy az epesavas sóknak a bélbe ürülése akadályozott, felszívódási K-vitamin-hiány jön létre.

A Faktor-IX számos N- és O-glikozilált helyet tartalmaz. Különösen az EGF domének szerin oldalláncain (53 és 61 pozíció) jön létre sokféle izoforma. A kihasadó aktivációs peptid szakasz is gazdagon glikozilált (Thr-159, -169, -172, -179).

Ez a fehérje is előanyag (proenzim, zimogén) formában képződik, csak akkor aktívódik, ha beindul a véralvadás. Aktiválása szelektív proteolízissel történik, a XI faktor kihasít belőle egy kis peptidet. A fehérje kettéválk egy könnyű és egy nehéz láncra, amelyeket egy diszulfid kötés tart össze. Ez az aktivált forma pH 7 és 9 között viszonylag stabil, de redukáló közegben, például ditiotreitolt hatására a diszulfid-kötés felbomlik, amitől az enzim elveszti az aktivitását. A IX-es faktor alapállapotban az egyik legstabilabb véralvadási faktor. Féléletideje a vérkeringésben 18-24 óra. In vitro a normál plazma közegében vagy koncentrált terápiás szer formájában szobahőmérsékleten órákig megtartja aktivitását



364. ábra Az F-IX aktiválása

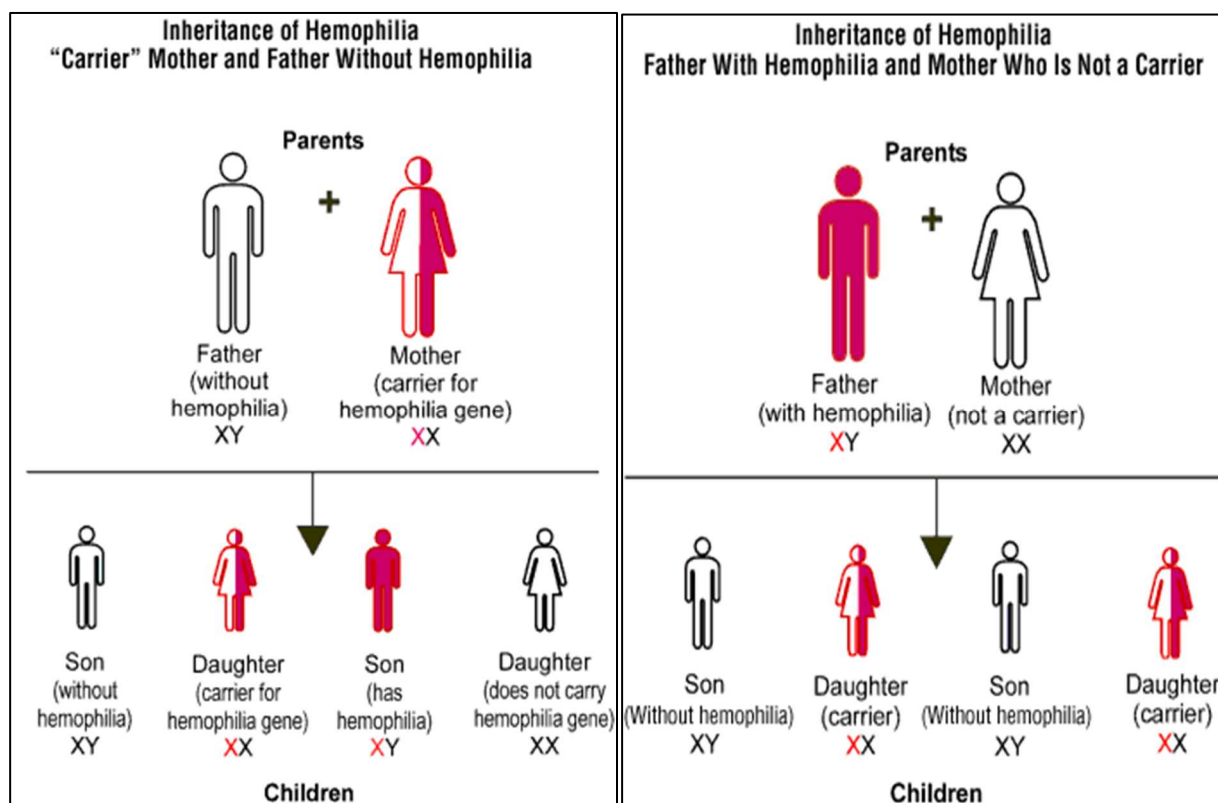
17.5.1. A hemofília-B betegség

A IX-es faktort nevezik Christmas faktornak, valamint antihemofíliás faktor-B-nek is. Utóbbi elnevezések a faktor részleges vagy teljes hiánya esetén kialakuló betegsége utalnak. A IX-es faktor a normál plazmában viszonylag állandó mennyiségben van jelen. A normál populáció nagy részében a IX-es faktor szintje az átlagos szint 80-120%-a. Hiánya vérzékenységi hajlamot okoz, a betegség neve *hemofília B*, vagy Christmas betegség. A B betű különbözteti meg a *hemofília A*-tól, amit a VIII-as faktor hiánya okoz.

A klinikai tünetek visszatükrözik a faktor koncentrációját. Súlyos hemofília esetén a plazma véralvadási IX faktor tartalma a normálisnak kevesebb, mint 1%-a, közepesen súlyos esetben 1-4%-a, míg enyhe hemofília esetén 5-25%-a.

Adalék: A hemofília B nemhez kötötten öröklődő betegség. A IX-es faktor szintéziséért felelős gén, mely hemofília B esetén hibás, az X (női) kromoszómán helyezkedik el. A B típusú hemofília recesszív jellegű, tehát a betegség nem expresszálódik, ha a normális allél is jelen van. Emiatt a hemofília B csak férfiakat betegít meg, egy hemofiliás férfinak egy hibás X és egy egészséges Y kromoszómája van. Ha egy hemofiliás férfinak és egy két normál X kromoszómával rendelkező nőnek utódai születnek, minden lányuk hemofília hordozó lesz (ők egy hibás X kromoszómát örökölnek az apától és egy egészséges X kromoszómát az anyától), míg a fiaik egy Y kromoszómát örökölnek az apától és egy egészséges X kromoszómát az anyától így a betegséget nem is örököltik tovább. Tehát egy hemofiliás férfi gyerekei közül a fiúk 100 %-os biztonsággal egészségesek, míg a lányok 100%-os biztonsággal hemofília hordozók. A hordozó nőknél általában nincsenek vérzékenységi tünetek, de lehetnek hemofiliás fiúgyermekük. Ha egy hemofília hordozó nőnek - akinek tehát egy beteg és egy egészséges X kromoszómája van – és egy egészséges férfinak gyermekei születnek, a fiaik 50-50%-ban egészségesek vagy hemofiliások, a lányuk pedig ugyanilyen arányban hordozók, vagy nem hordozók.

Ritkán, sporadikus esetekben, amikor egy új mutáció fellépése okozza a betegséget, a hemofiliának nincs családi előtörténete.



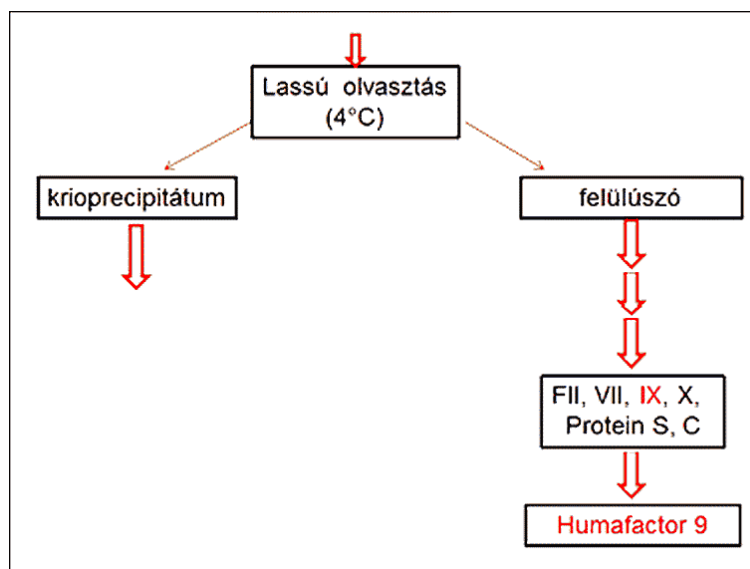
365. ábra A genetikai eredetű vérzékenység öröklődése

A betegség kezelése intravénás plazma, vagy IX-es faktorban gazdag plazmafehérje koncentrátum transzfúziójával történik. Alternatíva a faktor előállítása rekombináns fehérjeként is. Ma már a biotechnológiai úton előállított rekombináns faktor IX preparátum számottevő mennyiségben van jelen a piacon.

17.5.2. Izolálás vérplazmából

A Humafactor-9-et egészséges donorok HBsAg-, anti-HCV, anti-HIV-1- és anti-HIV-2-negatív plazmájából nyerik. A gyártásra csak akkor kerülhet sor, ha a poolból vett minta is negatív eredményt ad a vírusvizsgálatoknál.

A gyártás egy félig zárt rendszerben zajló, hosszú folyamat, amelynek első lépése a felszabadított (= a vizsgálatok alapján felhasználhatónak minősített) fagyasztott plazma olvasztása. Az 1500 kg fagyasztott vérplazmát lassan melegítik fel +4°C-ra. A plazmafehérje frakció egy része csapadékban marad, ez az ún. „krioprecipitátum”. A csapadékot centrifugálással választják el. A kilences faktor a kriocsapadék felülúszójában található, sok más fehérjével együtt. A feladat tiszta IX-es faktor izolálása, azaz a jelen lévő egyéb fehérjék elválasztása. Ezek biológiailag aktív, és akár gyógy szerként is használható értékes anyagok, amelyeket nem lenne helyes szennyezésnek nevezni, viszont ebben a készítményben feleslegesek, sőt károsak (ellentétes hatásúak) is lehetnek.



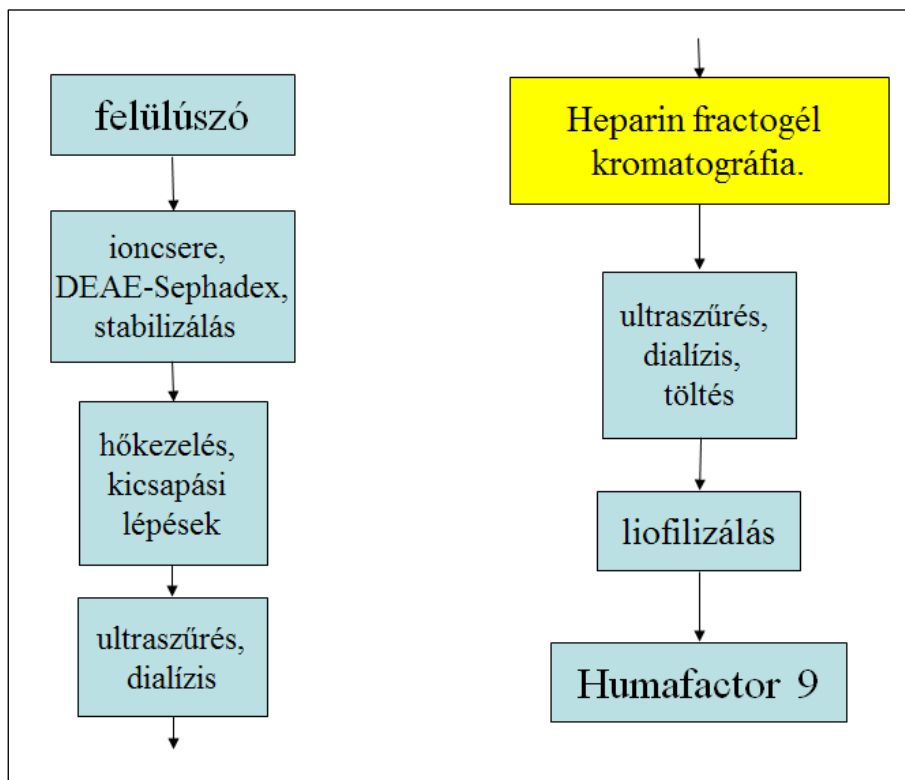
366. ábra Az első lépés a krio csapadék leválasztása

Az első lépés egy gélkromatográfia, ami a molekulákat méretkülönbségük alapján választja el. Ennek egy frakcióját viszik tovább ioncsere kromatográfiára. A DEAE-Sephadex A50 oszlopról a II-es, VII-es, IX-es, X-es faktorok együtt eluálódnak, és ez a frakció még protein C-t, protein S-t is tartalmaz. Ezek együttesét nevezik Protrombin Komplex Koncentrátumnak (PCC). A következőkben a II, VII, X faktorokat és ezek aktivált formáit távolítják el. A megfelelően ellenőrzött tisztításnak azért van nagy jelentősége, mivel a maradék faktorok és azok aktivált formáinak jelenléte nem eléggé körültekintő alkalmazás esetén tromboembóliás szövődmények kialakulásához vezethet. E faktorok szintje a B hemofiliások vérében normális, és ha a IX-es faktor készítménnyel együtt ezekből további mennyiséget juttatunk be, akkor az a normális fölé emeli az alvadási faktorok koncentrációját, ami fokozza alvadási hajlamot és vérrögképződéshez vezethet.

Stabilizáló anyagok hozzáadása után kerül sor a vírusmentesítésre. A célzott vírusszámcsökkentő eljárás (10 órás hőkezelés 60 °C-on) a lipid burok nélküli és lipid burokkal rendelkező vírusok széles csoportjára egyaránt hatékony. A gyártási technológia egyes lépéseinek vírusszám csökkentő hatását validációs vizsgálatokkal bizonyították.

Ezt követően több fehérje kicsapási lépés következik, amelyek célja a szennyező komponensek eltávolítása a IX-es faktor mellől. A csapadékot lecentrifugálják, majd a felülúszót ultraszűrő berendezésen diaszűrjük és koncentrálnak. Az oldat már csak két fő komponenst, IX-es és X-es

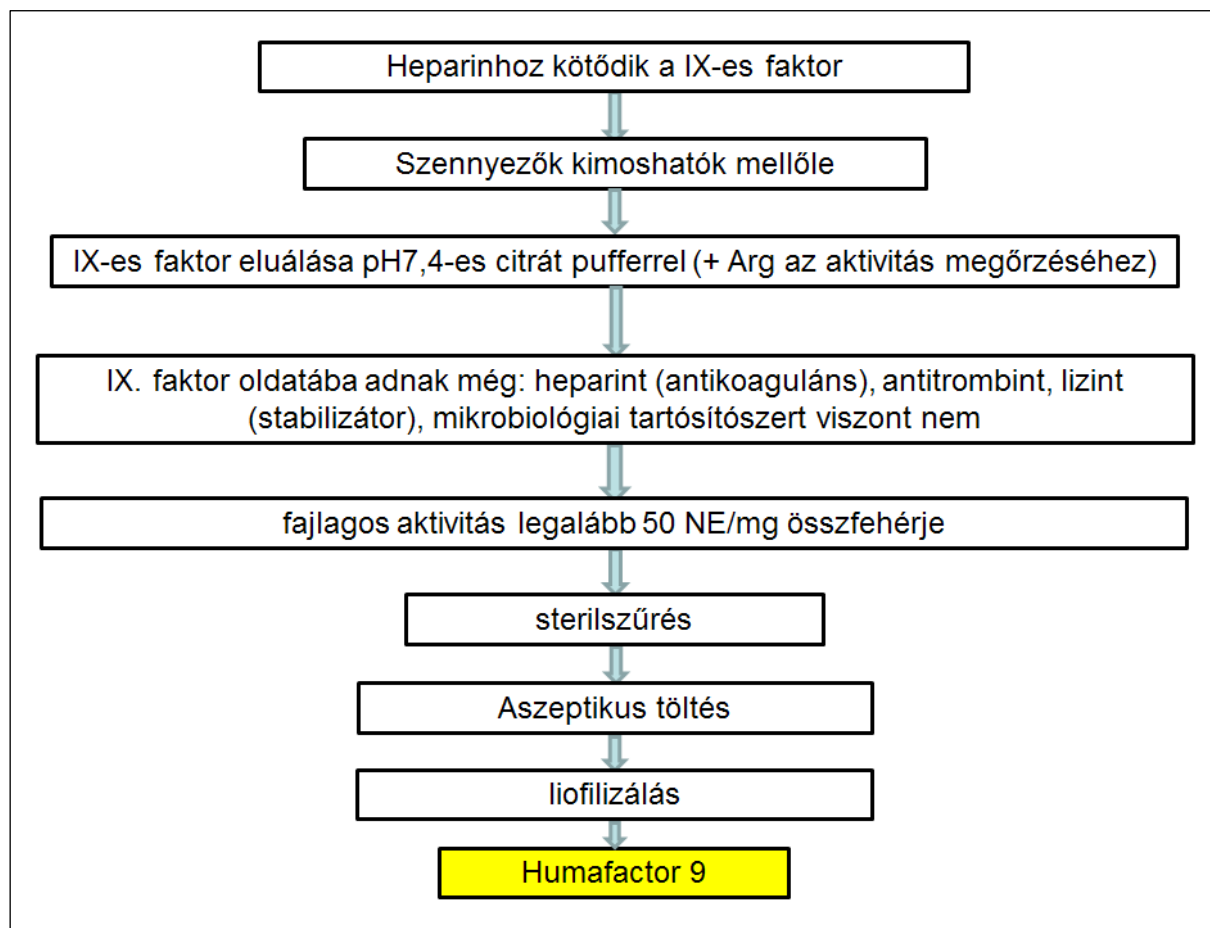
faktort tartalmaz. Ezek elválasztása affinkromatográfiával történik. A Na-heparin Fractogel tölteten a IX-es faktor szelektíven és nagy affinitással megkötődik, a X-es faktor viszont nem, így a mosó pufferrel távozik az oszlopról.



367. ábra A Humafactor-9 gyártásának blokksémája

Affinkromatográfia során az aktív célmolekula szelektíven kötődik a tölteten rögzített ligandumhoz. A IX-es faktor gyártási folyamatában használt gél ligandként heparint tartalmaz. A kötés során a gélen lévő heparin magához köti a IX-es faktort, a célterméket. A heparin egy lineáris és sok szulfátcsoportot tartalmazó glükóz-aminoglikán poliszacharid, melynek antikoaguláns (vérárvadásgátló) tulajdonságai vannak. Alapláncában D-glükózamin és D-glükuronsav kapcsolódik egymáshoz 1-4 glikozidos kötésekkel. Sok hidroxil- és amino csoportja szulfonált. Kis mennyiségben egyéb cukrokat (galaktóz, xilóz) és aminosavakat (pl. szerint) is tartalmaz. A kötött heparint széles körben alkalmazzák a biológiai anyagok affinkromatográfias tisztításához. A folyamatban háromféle puffert használnak, egy kötő, egy mosó és egy eluáló puffert. Az elúciónál a puffer ionerősségét, vagyis sókoncentrációját növelik. Ebben a lépésben citrát puffert (pH=7,4) használnak, amit ki lehet egészíteni argininnel a IX-es faktor aktivitásának megőrzése érdekében. Stabilizátorként heparint, antitrombint, illetve egyéb segédanyagokat, pl. a másik bázikus aminosavat, lizint is lehet használni.

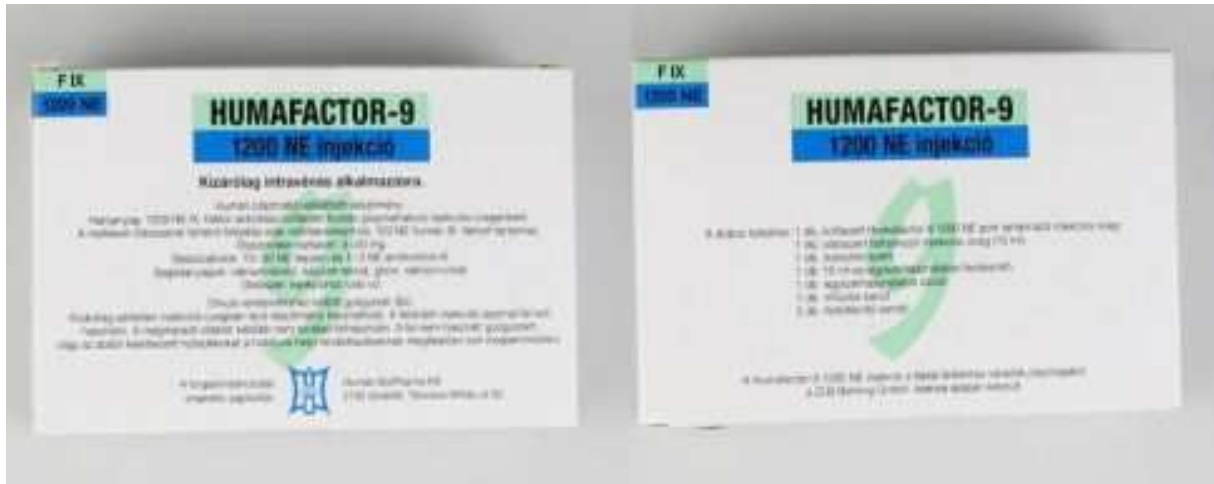
Az elúciót követően a IX-es faktor hatóanyagot tartalmazó oldatban ultraszűrő berendezésben diaszűréssel lecserélik a puffert, majd bekoncentrálják. A hatóanyag tartalom alapján beállítják a kívánt végső koncentrációt. Mikrobiológiai tartósítószer nem alkalmazható. A fajlagos aktivitás – a stabilizáló fehérje esetleges hozzáadása előtt – legalább 50 NE IX. faktor az összes fehérje 1 mg-jára számítva.



368. ábra Technológiai lépések az affinkromatográfia után

Az oldatot baktériumszűrőn bocsátják át, majd aszeptikusan letöltik a végső kiszerelésbe (ampullázzák), majd azonnal lefagyasztják. Ezután fagyasztva szárítják (liofilizálják) és az ampullákat vákuumban vagy inert gáz alatt zárják le. A hatóanyagot nagy tisztaságban tartalmazó termék Humafactor-9 néven kerül forgalomba. A Humafactor-9 faktorkoncentrátum intravénásan alkalmazható vérzéscsillapító szer hemofília-B kezelésére

A készítmény hatóanyaga:	plazma eredetű humán IX. véralvadási faktor					
Humafactor-9 liofilizátum	300 NE		600 NE		1200 NE	
Összfehérje tartalom	1,25 – 5,00	mg	2,5 – 10,0	mg	5,0 – 20,0	mg
IX-es faktor aktivitás	300	NE	600	NE	1200	NE
Nátrium-heparin	Max 62,5	NE	Max 125	NE	Max 250	NE
Humán Antitrombin III koncentrátum	0,25 – 0,75	NE	0,5 – 1,5	NE	1 - 3	NE
Oldószer:						
Injekcióhoz való víz	2,5	ml	5,0	ml	10,0	ml



369. ábra A kiszerelt Humafactor-9 készítmény

A terméket a következő analitikai vizsgálatokkal minősítik:

- a IX. faktor tartalmi meghatározása,
- az aktivált véralvadási faktorok meghatározása,
- a II., VII. és X. faktorok aktivitásának meghatározása; ezek aktivitása bizonyítottan nem lehet több, mint a IX. faktor aktivitásának 5%-a.

18. VAKCINAGYÁRTÁS

A vakcinák vagy más néven az oltóanyagok arra szolgálnak, hogy az immunrendszert támogatva megvédje a szervezetet a kórokozókkal szemben. Az oltóanyagok segítségével a molekuláris immunrendszer hatékonyabban működik, a szervezet könnyebben leküzdí a fertőzéseket. Az immunizálásnak alapvetően két módja van, az aktív és a passzív immunizálás. Az **aktív immunizálás** során antigéneket visznek be a szervezetbe, ezáltal kiváltva az antitest termelést. Ezt a módszert általában megelőzésre (profilaxisra) használják. **Passzív immunizálás** során más élőlény által megtermelt kész antitesteket juttatnak be a szervezetbe, ezek helyettesíthetik a fertőzött személy saját antitesteit. Ez tehát nem megelőzés, hanem fennálló fertőzés kezelése (terápia).

18.1. A passzív immunizálás oltóanyagai

Az antitesteket régebben csak vérből lehetett kivonni. Ehhez az antigénnel (lehet virulens vagy attenuált kórokozó, vagy csak egy fehérje) kontrollált körülmények között állatokat fertőznek meg. Beindul az ellenanyag termelés, a vérben egy-két hét múlva megjelennek az antitestek. A vérplazmát levéve izolálható belőle az immunoglobulin frakció. Kapacitása korlátozott, idegen fehérjeként emberben immunválaszt válthatnak ki és állatvédelmi okok miatt is kiszorult a gyakorlatból.

Másik forrás a véradásból származó donorvér, aminél megvizsgálják az adott ellenanyag jelenlétét, és a kiválasztott tételekből izolálják az antitest frakciót (anti-RhD+, tetanusz, HBV, Varicella, Covid = plazmaterápia). Ez a folyamat a Vérvételek fejezetéhez tartozik.

Antitesteket előállíthatunk rekombináns fehérjeként is. De ezek alkalmazása nem szorítkozik a passzív immunizálásra, ezért egy külön fejezetben, a Monoklonális antitestek között tárgyaljuk.



FIG. 4
The production of an antiserum
bleeding
gular vein
immunized horse from the

370. ábra Vérvétel immunizált lótól

18.2. Az oltóanyagok története

Szűkebb értelemben az **aktív immunizálás** céljára készített oltóanyagokat nevezik vakcinának. A feladat ebben az esetben az, hogy olyan készítménnyel oltsuk be az embereket, ami kiváltja az immunválaszt, de ugyanakkor nem okoz fertőzést. A vakcinák evolúciója során megfigyelhető az a tendencia, hogy a vad típusú teljes kórokozótól indulva egyre kifinomultabban módosított élő egységek egyre kisebb részegységeit használták fel.

Az első vakcinákban egész élő vírust vittek át emberről emberre vagy állatról emberre, mint például Edward Jenner tehénhimlő oltása (1796), ami azon a felfedezésen alapult, hogy a tehének himlőjével fertőzött tehenészek nem kapják meg az emberi himlőt. Az oltással az anyhe lefolyású tehénhimlővel immunizálta az embereket a sokkal súlyosabb fekete himlő ellen. A vakcina elnevezés is innen származik (latinul vacca = tehén, vaccinus = tehénnel kapcsolatos).

Ezután a következő termelési módszer az élő attenuált (legyengített) vírusok in vivo vagy in ovo szaporítása volt. Attenuált baktériumokat tartalmazó vakcinákat hozott létre Louis Pasteur a 1880-as években a csirke kolera és a lépfene (anthrax) ellen. Húsz évvel később Calmette és Guérin szintén legyengített *Mycobacterium* törzsszel készítettek tuberkulózis (TBC) elleni vakcinát (*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG).

Az 1918-ban engedélyezett szamárköhögés (pertussis) elleni vakcina volt az első teljes sejtes inaktivált bakteriális vakcina. Ezt követően diftéria és tetanusz toxoidokkal kombinálták, így jött létre az első kombinált diftéria, pertussisz és tetanusz vakcina (DiPerTe). A pertussis komponenst később felváltotta az acelluláris alegység vakcina, így ez a vakcina már csak bakteriális fehérjékből áll.

Idővel kifinomultabb módszereket vezettek be, mint például a toxinfhérjék formaldehid inaktiválásával toxoidot képeztek (pl. tetanusz, diftéria).

In vitro elsőként a polio vírust szaporították, előbb nem idegi emberi sejtekben (Enders, 1949), majd elsődleges majom vesesejtekben (Salk, 1955). Ez jelentette a modern ipari sejtenyésztes kezdetét.

A vírusok szaporítása még attenuált esetben is speciális biztonságot igényelt, ezért a tudósok az egyedi kórokozó antigéneken alapuló vakcinákat kezdtek létrehozni. Ezek az alegység vakcinák potenciálisan biztonságosabbak, de gyakran kevésbé immunogének.

A poliszacharid vakcinák jellemzően bakteriális kapszid felszínéről származó immunogén poliszacharidokat tartalmaznak (tífusz, pneumococcus, meningococcus).

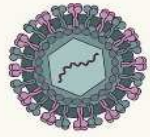

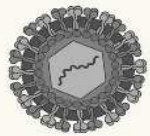



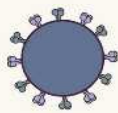


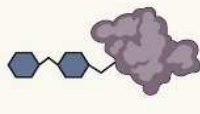

Önmagukban gyakran nem váltanak ki megfelelő hatást, ezért gyakran konjugálják fehérjével.

év	Esemény
1796	vakcinázás tehénhimlő oltással feketehimlő ellen (Jenner)
1879	Élő attenuált bakteriális vakcina (csirke kolera ellen)
1884	Agyszövetben tenyésztett élő attenuált vírus vakcina (veszettség ellen)
1897	Lószérumból készült vakcina (bubópestis ellen)
1918	Teljes sejtes inaktivált bakteriális vakcina (szamárköhögés/pertussis ellen)
1923	Inaktivált bakteriális toxin (=toxoid) vakcina (torokgyík/diftéria ellen)
1931	Az első jóváhagyott fagyasztva szárított vakcina (himlő ellen)
1949	Kombinált vakcina (diftéria, tetanusz, teljes sejtes pertussis = DiPerTe)
1949	Enders féle, nem neurális emberi sejtekkel in vitro termelt vírusvakcina (gyermekbénulás/poliomielitis ellen)
1954	Collier javította a himlő vakcina fagyasztva szárítását (szállíthatóvá vált)
1955	Inaktivált vírus vakcina előállítás in vitro elsődleges majom vesesejteken (gyermekbénulás ellen)
1962	Emberi diploid sejtvonalt (WI-38) létrehozása (Hayflick)
1977	Az utolsó himlő eset laboratóriumon kívül
1986	Élesztőben előállított rekombináns vírusszerű részecske (VLP) vakcina (hepatitis B)
1987	Konjugált poliszacharid-fehérje vakcina (Haemophilus influenzae b)
1998	Nagy tisztaságú vakcinák előállítása (hepatitis A)
2005	plazmid DNS vakcina (nyugat-nílusi láz)
2020	RNS vakcina (Covid-19)

36. táblázat A vakcinagyártás története

18.3. A vakcinák típusai

A vakcinagyártás klasszikus paradigmája a kórokozó izolálása, néha inaktiválása, és a kórokozó vagy kórokozó összetevő bevitele az emberi szervezetbe. Ezt az elvet még ma is eredményesen használják az egész világon.

A Licensed for use				
Vaccine type	PAMP	Examples (route if not IM/ID)	Adjuvant	Booster
Live attenuated 	Endogenous 	Measles Mumps Rubella Rotavirus (oral) Yellow Fever Chicken pox Polio Sabin (oral) Live zoster BCG Influenza (nasal: FluMist)	None None None None None None None None None None	Yes Yes Yes Yes No Yes Yes No No Annual
Killed 	Intrinsic 	Whole cell pertussis Polio Salk	None None	Yes Yes
Split 	Intrinsic 	Seasonal influenza Flud for > 65 yr.	None MF59	Annual Annual
Virus like particles 	Incorporated [#]	HPV Guardasil 9 HPV Cervarix	Alum AS04	Yes Yes
Toxoid 	None	Diphtheria Tetanus	Alum Alum	Yes Yes
Recombinant subunit 	None	Hep A Havrix Hep A Vaqta Hep B Engerix-B Hep B Recombivax HepA/Hep B Twinrix Hep B Heplisav-B Acellular pertussis Zoster Shingrix Influenza Flublock	Alum Alum Alum Alum Alum CpG Alum AS01B None	Yes Yes Yes Yes Yes Yes Yes Yes Annual
Conjugate 	None	MenB Bexsero MenB Trumenba Pneumococcal Pneumovax 23 HiB	Alum Alum Alum Alum Alum	Yes Yes Yes Yes Yes
Polysaccharide 	None	Pneumococcal polysaccharide PPSV23	None	Yes

371. ábra A vakcinák alaptípusai

Az immunogén hatást hordozó egység nagyon sokféle lehet, a teljes kórokozótól az egyetlen epitópot tartalmazó makromolekuláig (371. ábra).

A vakcinák fejlesztésénél egyszerre van jelen egyfajta konzervativizmus és az új megoldások keresése. Például toxoidon alapuló modern diftéria vagy tetanusz bakteriális vakcinák ma is az 1930-as években kifejlesztett eljárás javított változatával készülnek. A kanyaró, mumpsz és rubeola (MMR) vakcinát több mint 30 évvel ezelőtt alakították ki. A további folyamatfejlesztés a gyártási problémák elhárítására, új kombinációk kialakítására (pl. ProQuad = Varicella + MMR) vagy a formulázás javítására irányult. Ezeket fejlesztéseket általában nem védik szabadalmak, de a gyártás bonyolultsága és a kritikus pontok titkossága megnehezíti a versenytársak piacra lépését. Más vakcinák esetében új megközelítéseket alkalmaztak a biztonságosabb és olcsóbb gyártás érdekében. Például a polio vakcináknál a Salk féle inaktivált vad típusú vírust tartalmazó oltóanyag mellett megjelent a szájon át adható és olcsóbb, attenuált Sabin oltóanyag is. Jelenleg mind a kettő része a gyermekek oltási protokolljának. A vakcina-típusok fejlődésével a gyártási folyamatok is fejlődtek.

18.3.1. *A teljes kórokozót tartalmazó vakcinák*

A hagyományos vakcinák a kórokozó egészét tartalmazzák, de ezek nem okoznak betegséget, mivel legyengített vagy inaktivált formákat hoznak létre. Sok általánosan használt vakcina ezekbe a klasszikus kategóriákba tartozik. Az ilyen teljes kórokozó vakcinák erős immunválaszt válthatnak ki, mivel a kórokozó összes epitópját tartalmazza. Ez az elv azonban nem minden kórokozó esetében működik és biztonsági kockázatok is felmerülnek.

18.3.1.1. *Inaktivált vakcinák*

Az inaktivált kórokozók immunitást indukáló hatását már a 19. században leírták. Ennek alapján fejlesztették ki az inaktivált vakcinákat, amelyeknél a kórokozót vegyi anyagokkal, hővel vagy sugárzással elpusztítják, de kapott anyag immunogén tulajdonsága megmarad.

Ezesetben probléma lehet, hogy akadhat kis számú olyan mikroba, ami nem pusztult el, így fertőzést okoz. Az inaktiválás történhet például hővel, de ezt ritkán alkalmazzák, mivel ekkor az antigén tulajdonságért felelős fehérjék is denaturálódhatnak. Ehelyett inkább kémiai reagenseket használnak. Olyan szerek jöhetnek számításba, amelyek szelektíven károsítják a DNS-t, ugyanakkor az epitóp fehérjék nem károsodnak. Jellemzően formaldehidet, vagy alkilező szereket, mint az etilénimint és származékait választják.

18.3.1.2. *Élő, attenuált vakcinák*

A tenyésztési technikák fejlődése lehetővé tette az élő, attenuált ("legyengített") vakcinák kifejlesztését, amelyek a kórokozó élő, szaporodóképes, de laboratóriumban legyengített, azaz betegséget nem okozó változatát tartalmazzák. Ilyen típusú vakcinákat viszonylag egyszerűen létre lehet hozni bizonyos vírusokból, de jóval nehezebb előállítani az összetettebb kórokozók, például baktériumok és paraziták esetében.

Ilyen vakcinának tekinthető a Jenner által empirikusan használt tehénhimlő vírus (*Vaccinia bovis*) is, de ez nem mesterséges fejlesztés eredménye, hanem az evolúcióban spontán jött létre. A mintegy százéves BCG oltás (BCG = *Bacillus Calmette-Guérin*) az emberben és tehénben egyaránt tuberkulózist okozó *Mycobacterium bovis* törzs tizennégy éves laboratóriumi tenyésztéssel létrejött attenuált változata. E vakcina hatékonysága és az immunizáció tartóssága változó, de a keresztimmunitás révén más *Mycobacterium* fajok ellen is véd.

Az attenuált vírusvakcinák között jó példa a kanyaró, mumpsz és rubeola elleni kombinált oltás (MMR). Ezek a vakcinák már egy vagy két adag után erős immunválaszt váltanak ki, és élethosszig tartó immunitást adnak.

Az attenuált törzsek veszélye, hogy reverziók történhetnek, ami betegség kialakulásához vezethet. Ezért a vakcinákat gyakran ellenőrizni kell. Az eljárás előnye viszont, hogy erősen ragályos betegség esetén a legyengített kórokozó spontán szóródhat a populációban, s immunizálhatja az oltásban nem részesülteket is. (Ugyanakkor a spontán szóródás közben is lehet reverzió!).

A teljes kórokozót tartalmazó oltóanyagok közé tartoznak a modern géntechnológiai eljárásokkal létrehozott *kiméravírusok* is. Ezek két vagy több vírus génjeit tartalmazzák, például egy ártalmatlan vírus tokfehérjét a patogén víruséra cserélik ki.

18.3.1.3. Toxoid vakcinák

Más bakteriális betegségeknél, mint például a diftéria és a tetanusz, nem is maga a baktérium okoz kárt, hanem általa szekretált, betegséget okozó fehérjék (toxinek). A védekező emberi szervezet ezek ellen is termel semlegesítő antitesteket. A vakcina célja ilyen antitestek generálása az epitóppal rendelkező, de nem mérgező fehérjékkel. Ezek a *toxoid vakcinák* a baktérium által termelt toxinok kémiai módosításával, inaktiválásával hozhatók létre.

18.3.1.4. Alegység vakcinák

A teljes kórokozó helyett annak csak egy jellegzetes, erőteljes immunreakciót kiváltó felületi fehérjéjét, egy epitópját állítják elő és adják be a megvédendő személynek. Ezt a molekulát rekombináns fehérjeként egy ártalmatlan gazdaszervezet felhasználásával termeltetik. A gyártás és a termék biztonságosabb és egyszerűbb, mert a kórokozó egyáltalán nincs jelen. Az így kapott egy-epitópos antigének viszont nem mindig váltanak ki hosszú távú immunitást.

Ha a vakcina csak a legfontosabb antigén(ek)e)t tartalmazza, akkor sokkal kevesebb lesz a mellékhatás is. Ezt jól szemlélteti az új generációs pertussis (szamárköhögés) vakcinák kifejlesztése. Az 1940-es években bevezetett első pertussis vakcinák inaktivált *Bordetella pertussis* baktériumokból álltak. Bár hatékonyak voltak, az egész sejtes pertussis vakcina gyakran okozott kisebb mellékhatásokat, lázat, illetve az oltás helyének megduzzadását. Emiatt sokan nem oltatták be magukat. Az 1970-es évekre a csökkenő oltási arány a fertőzések gyakoriságának növekedését eredményezte. Ekkor fejlesztették ki az acelluláris (sejtet nem tartalmazó) pertussis vakcinát, amely a *B. pertussis* sejteknek csak egyes izolált és tisztított összetevőit tartalmazta. Ezek az oltóanyagok hasonlóan hatékonyak, mint a teljes sejtes vakcinák, de sokkal ritkábban okoznak mellékhatásokat.

A géntechnológia korszaka az 1970-es években kezdődött. Egy évtizeddel később a rekombináns DNS-technológiát már az első *rekombináns fehérje vakcina*, a hepatitis B vakcina kifejlesztésére használták. A vakcina antigén a hepatitis B vírus egyik fehérjéje, amit a vírus génszakasz élesztő sejtekbe ültetésével termeltetnek.

18.3.1.5. Vírusszerű részecskék (virus-like particle, VLP)

A vírusok burokfehérjéinek "önösszeszerelése" a kristályképződéshez hasonlóan spontán végbemenő, energiacsökkenéssel járó folyamat. A vírus rekombináns fehérjeként megtermelt tokanyagai a gazdasejtben vagy akár in vitro is képesek összeállni, egy „üres”, nukleinsav nélküli tokot formálni. Ezek a *vírusszerű részecskék (virus-like particle, VLP)* a természetes vírus által kiváltotthoz hasonló immunválaszt váltanak ki, de a nem tudnak szaporodni, mert nem tartalmaznak információt hordozó nukleinsavat. Enélkül pedig nem működik a vírusreplikáció.

Az 1990-es évek elején felfedezték, hogy a humán papilloma vírus (HPV) külső héjából származó fehérjék olyan részecskéket képezhetnek, amelyek nagyon hasonlítanak a kész vírusra. A tokfehérjét rekombináns úton előállítva a spontán létrejött VLPk vakcinaként használható fehérje antigének.

18.3.1.6. *Poliszacharid vakcinák, konjugált vakcinák*

Az immunreakciót kiváltó epitópok nem mindig fehérje mintázatok, részben vagy teljesen poliszacharidokból állhatnak. Jellemzően egyes fertőző baktériumok külső felszínén, a sejtfalhoz kötve találhatók. Kézenfekvő, hogy ezeket a molekulákat is fel lehet használni a védőoltásokban. Az első engedélyezett ilyen oltóanyag a *Haemophilus influenzae* B típusa (Hib) elleni poliszacharid vakcina volt. Használhatósága azonban korlátozott volt, mivel nem váltott ki elég erős immunválaszt a kisgyermeknél – éppen abban a korcsoportban, ahol a leggyakoribb a Hib-fertőzés. Ez vezetett az úgynevezett *konjugált vakcinák* kifejlesztéséhez, amelyben a Hib-poliszacharidhoz egy fehérje antigént csatoltak, ez kisgyermeknél erősebb immunválaszt és jobb védelmet biztosított. Ma a Hib-en kívül konjugált vakcinákat alkalmaznak a pneumococcus és meningococcus fertőzések elleni védelemre is.

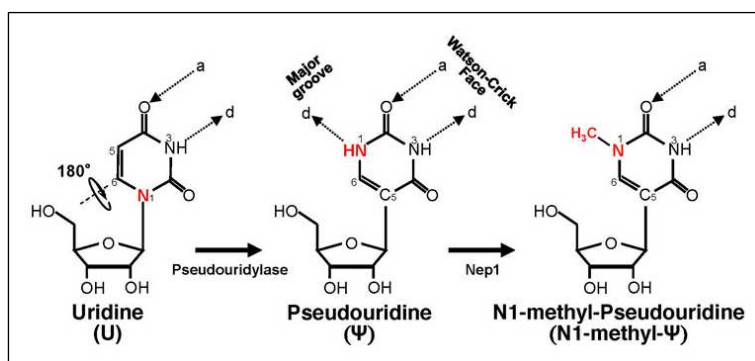
18.3.1.7. *Nukleinsav vakcinák*

A vakcinázás egy másik megközelítése, hogy nem magát az antigént vagy antigéneket visszük be a megvédendő szervezetbe, hanem az azt kódoló genetikai anyagot. A szervezet saját sejtjei ennek alapján maguk állítják elő az antigént. Az immunválasz ugyanolyan erős és tartós, mint az előzőeknél, viszont a vakcina stabilitása kiváló (a nukleinsavak stabilabb vegyületek, mint a fehérjék) és a nagyüzemi gyártás is egyszerűbb.

A *DNS vakcinák* a természetben megtalálható plazmidok genetikai átalakításával jönnek létre. Ezeket a prokarióták genetikai manipulációjánál vektorként használjuk, szinte tetszőleges fehérje génjének bevitelére és kifejezésére, expressziójára alkalmasak. Vakcinaként az immunválaszt kiváltó epitóp fehérje génjét építjük be a plazmidba, és ezt bejuttatva átíródik a testi sejtekben. A plazmidok szabás-varrása és gyártása jól ismert, bejáratott technika, emiatt viszonylag gyorsan lehet vakcinát fejleszteni a kialakulóban lévő vagy újra felbukkanó fertőző betegségek ellen. Ilyen elven működő vakcinákat fejlesztettek ki először 2003-ban, majd a H5N1 madárinfluenza ellen 2005-ben, a H1N1 pandémiás influenza ellen 2009-ben és a Zika-vírus ellen 2016-ban. A vakcinába bevonandó vírus gének kiválasztásától az embereken végzett klinikai vizsgálatok megkezdéséig eltelt idő ezalatt 20 hónapról mintegy három hónapra rövidült.

A DNS mellett a *messenger RNS* (mRNS) is alkalmazható vakcinaként. Előnye a DNS-hez képest, hogy a fehérje legyártásában a két lépés (transzkripció, transláció) közül csak a másodikat kell végrehajtani. A molekula gyorsan (1-2 nap alatt) elbomlik, nem marad a sejtben, így nem zavarja meg annak működését.

A nukleinsavak bevitelének megvan az a hátránya, hogy aktiválják a veleszületett (innate) immunrendszert, nem-specifikus, gyulladásszerű folyamatok indulnak meg. Ez a mellékhatás nagyrészt elmarad, ha az uridin helyett módosított bázisokat építenek be az RNS láncba. Két



372. ábra Az uridin analógok szerkezete

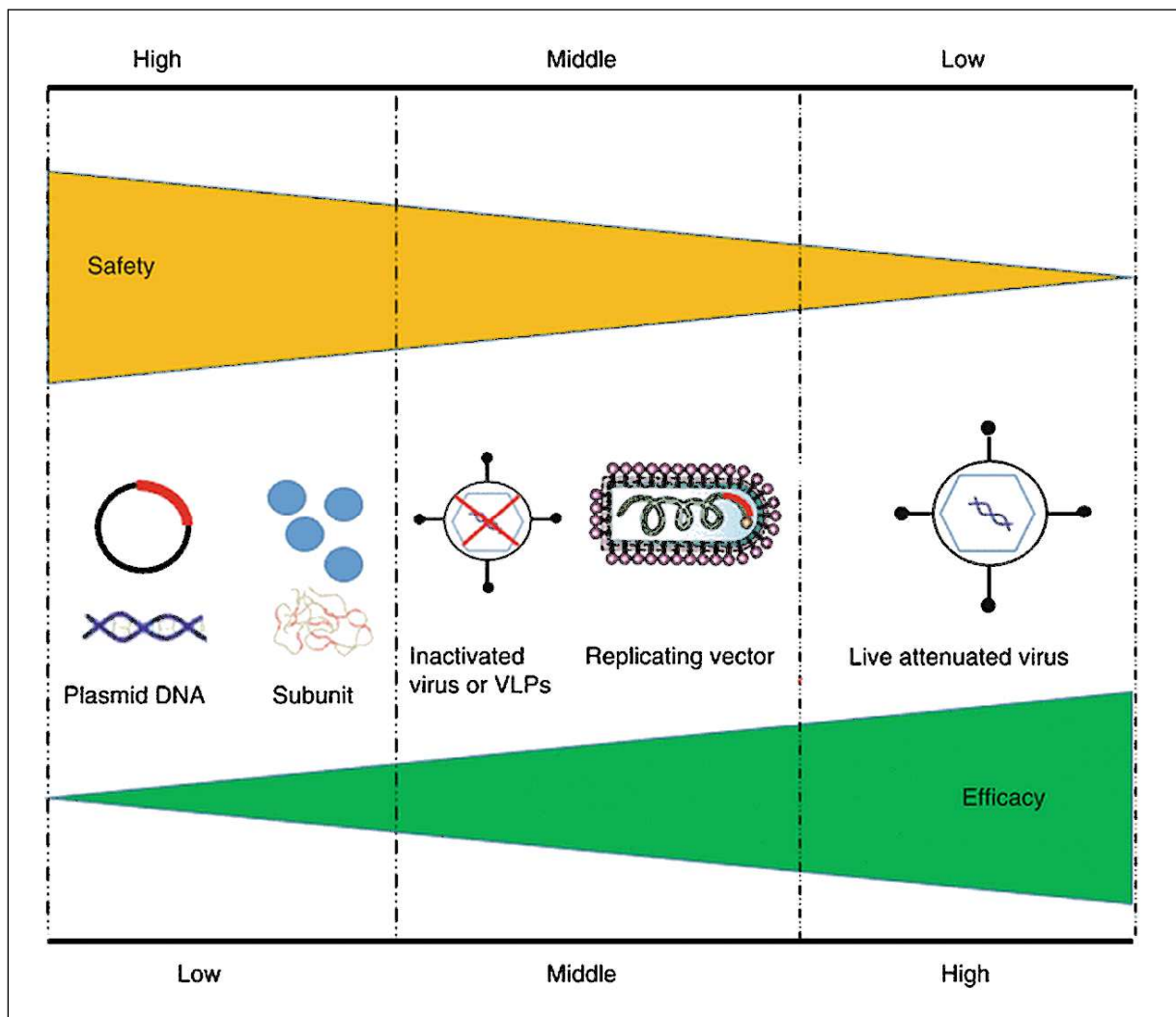
szerkezetanalóg jöhet számításba, a pszeudo-uridin és az N1-metil-pszeudo-uridin. Ezek alkalmazásával a fehérjeszintézisben betöltött szerep csak kis mértékben változik, viszont a veleszületett immunrendszer szenzorai nem érzékelik az RNS molekulát. Karikó Katalin legnagyobb felismerése abban áll, hogy az analógok alkalmazásával lehetővé tette a mRNS humán alkalmazását.

Ezenkívül a mRNS-ek potenciálisan sem integrálódhatnak a gazdaszervezet genomjába, és az antigén expresszió folyamata során természetes úton lebomlanak. Ezek a jellemzők azt mutatják, hogy az mRNS-vakcinák sokkal biztonságosabbak lehetnek, mint más vakcinák

Más, a génmanipulációban használatos vektorokat is alkalmazhatunk a vakcinák kialakításánál. Egyes vakcinák ártalmatlan vírust vagy baktériumot használnak vektorként vagy hordozóként, hogy a genetikai anyagot bevigyék a sejtekbe. Ezek a **rekombináns vektor vakcinák** előbb az állategészségügyben jelentek meg, később alkalmazták humán célokra is.

További érdekes lehetőség: az emberre ártalmatlan *Vaccinia* vírus genomjába is beültethető a Hepatitis B vírus tokfehérje génje, így ezzel a rekombináns vírussal a Hepatitis B ellen lehet oltani az embereket.

Ebből akár 24 molekula is képes összekapcsolódni és a komplex mérete eléri a 8-12 nm-t. Ebbe lehet beépíteni az antigén fehérjét. Ilyen típusú vakcinákat az influenza, a MERS vírus és az Epstein-Barr vírus ellen fejlesztenek.



373. ábra Különböző vakcinák hatékonyságának és biztonságának összehasonlítása

A vakcina hatékonysága és biztonságossága sokszor fordított kapcsolatban van egymással. Amíg az egész kórokozó van jelen inaktivált vagy legyengített formában, addig megvan az esély a reverzióra, a betegség létrejöttére. Ha a kórokozónak csak egy alkotóját használjuk oltóanyagként, akkor ez a veszély nem áll fenn, de az egyetlen építőp miatt a hatékonyság gyakran gyengébb (373.ábra).

18.4. Technológiák

Legelső, ősrégi módszer: “testről testre”, Jenner módszerével. a tehénhimlő és a fekete himlő közötti keresztimmunitást kihasználva a tehén testén képződött hólyag váladékát, benne a vírusokat az emberi bőrön ejtett karcolásba dörzsölve vitték be az antigént. Ehhez nem kellett gyártási technológia, a vakcina, mint termék csak addig a néhány percig létezett, amíg a váladékot átvitték egyik testről a másikra.

A feladat végrehajtása szempontjából érdemes kettéosztani a vakcina gyártási technológiáját a baktériumok elleni és a vírusok elleni oltóanyagokra.

18.4.1. Baktériumok elleni vakcinák előállítási technológiája

A baktériumokat hagyományos fermentációs technológiával elszaporítják azzal a különbséggel, hogy igen szigorú biztonsági előírásokat kell betartani a gyártás során. Az attenuált törzsekkel kevesebb a gond, hiszen azok már nem okoznak megbetegedést. Azoknál a patogén törzseknél viszont, amelyekből később inaktiválással készül a vakcina, a teljes zártságot térben és időben mindaddig fenn kell tartani, amíg élő kórokozó előfordulhat. A containment fenntartása a fermentáció során általában nem ütközik nagy nehézségekbe, a fő gondot inkább a feldolgozási technológia okozza. A feldolgozás során minden csővezeték, szerelvényt, berendezést, szabályozó elemet úgy kell kialakítani, hogy onnan semmiféle élő mikroba nem kerülhet ki a rendszerből. Időben a containment-et egy készülékre vagy szakaszra akkor lehet feloldani, ha a belső teret igazolhatóan megtisztították és fertőtlenítették. A helyben tisztításra (CIP = cleaning in place) általában nátrium-hidroxidos vagy formaldehides mosást vagy hosszabb áztatást írnak elő. Az eljárás program szerint végrehajtott mosási és öblítési ciklusok sorozata. A készüléket szétszerelni, pl. szűrőbetétet cserélni csak ilyen tisztítás után lehet. A mosóvizet sokszor nem engedik egyenesen a szennyvíz rendszerbe, hanem egy gyűjtő tartályban felfogják és csak ártalmatlanítás után engedik tovább.

A baktérium sejttömeg inaktiválását rendszerint vegyszeres kezeléssel (formaldehid, etilénimin) hajtják végre.

Minden gyógyszerkészítménynél fontos minőségi követelmény az endotoxin-mentesség. A baktérium alapú termékeknél ez hatványozottan igaz, mivel ezek termelik az endotoxinokat. Ezek kis méretű lipoproteinek amelyek a magasabb rendű szervezetekre károsak. Növeli a veszélyt az, hogy stabil anyagok, a hősterilizálás vagy vegyszeres kezelés során nem bomlanak el, sőt a sejtek pusztulása során kiszabadulva hatásuk még fokozódhat is. Az endotoxinok egy csoportja a pirogének, avagy lázkeltő toxinok. Ezek eliminálására, illetve mérésére külön módszereket írhatnak elő.

Méretük szerint nehéz elkülöníteni őket a számunkra hasznos fehérjéktől, ezért általában adszorpciós megkötést alkalmaznak.

18.4.2. Toxinok, toxoidok

A toxintermelő baktériumok által okozott betegségek egy részénél nem is a baktérium okozza a súlyos tüneteket, hanem a toxin. A szervezet a toxinok ellen termelt ellenanyagokkal veszi fel a küzdelmet, ugyanolyan mechanizmussal, mint a sejtes építőpokok esetén. Az ilyen megbetegedések esetén a vakcinálás célja nem a kórokozók, hanem a toxin elleni antitestek

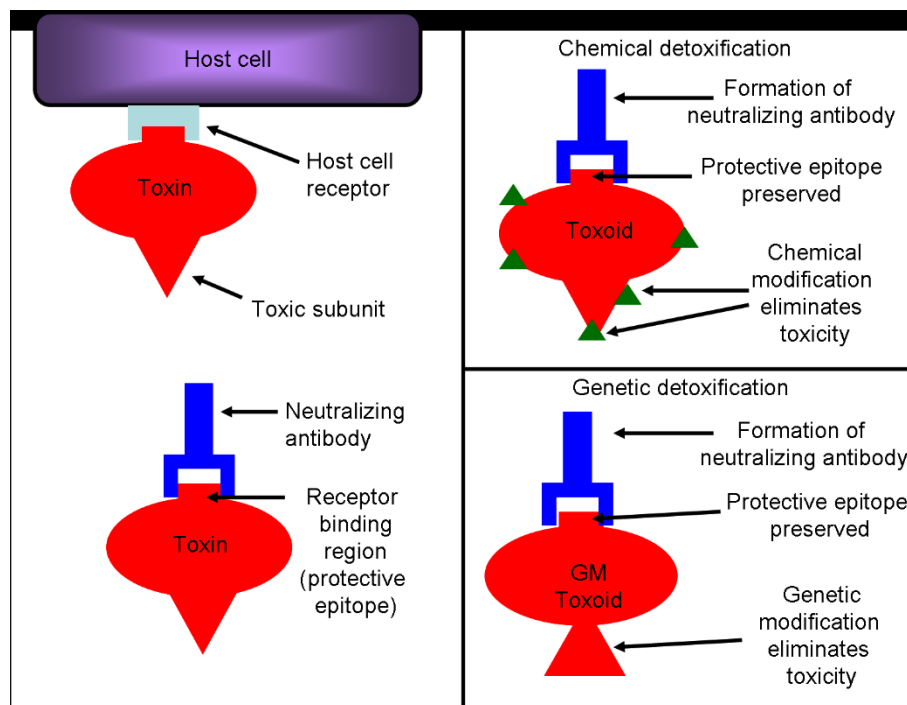
termelésének kiváltása. A legismertebb toxintermelő mikroorganizmusok és a kiváltott betegség:

- Clostridium tetani* – „merevgörcs”, „nyakszirtmerevedés”
Clostridium botulinum – izombénulás, „botulizmus”
Corynebacterium diphtheriae – „torokgyík”



374. ábra Tetanuszos izomgörcsben elhunyt beteg

A védetség kialakításához nem alkalmazhatunk valódi toxint, ehelyett ennek is a „legyengített”, módosított formájával váltják ki az immunválaszt. A módosított, inaktivált toxint **toxoidnak** nevezik. A mikroba által termelt toxin inaktiválása megoldható kémiai reakcióval (tipikusan formaldehiddel) vagy hőkezeléssel.



375. ábra Toxin és toxoid

Másik megoldás a törzs genetikai módosítása, a toxin génjét úgy változtatják meg, hogy az ne váltson ki tüneteket, de az epitóp ne változzon.

Érdekességek: a C. botulinum mérgezés legtöbbször a rosszul hőkezelt élelmiszereknél fordult elő. A Clostridiumok anaerobok, tehát a légmentesen lezárt konzervekben is tudnak szaporodni és toxint termelni. Ráadásul a konzerv kibontása után hiába főzik meg újra az ételt, a hőálló toxin mérgező marad. Manapság a toxint botox néven a szépségipar használja a mimikai izmok bénítására.

A torokgyík, mint betegség onnan kapta a nevét, hogy a torokban okoz gyulladást, duzzanatot, és a nyálkahártya nagyobb felületen egyben leválik. Ezt a beteg felköhögi és az összepöndörödött hártya alakja gyíkhoz hasonlítható

18.4.3. Vírusok elleni vakcinák előállítási technológiája

Akár élő attenuált, akár inaktivált vírusokból készítünk vakcinát, mindenképpen szükséges a vírusok szaporítása. A vírusok viszont táptalajon vagy fermentációval nem szaporíthatók, mivel abszolút paraziták, szükségük van egy gazdaszervezet funkcióira és anyagaira. Szaporításukhoz tehát élő és specifikus sejtek kellenek. A specifitás itt azt jelenti, hogy a vírusok csak bizonyos fajok bizonyos szöveteit fertőzik meg. Az emberre veszélyes vírusok általában szaporíthatók majmokban, némelyik rágcsálókban, sertésben is. A COVID-19 vírus például megbetegíti a menyétféléket (nyérc, vadászgörey) is. A vírusok szaporítása gerinces állatokban laboratóriumi szinten bevett gyakorlat, de ipari léptékű technológiaként nem alkalmazható részben biológiai, technikai, részben állatvédelmi okok miatt. A specializálatlan sejtek viszont széleskörűen használható a vírus szaporításra. Ilyen sejteket az embriókban találhatunk. Ipari szempontból a leginkább elérhető embrió a csirkeembrió, vagyis az előkeltetett tojás. A tojás további előnye, hogy kis egység lévén befertőződése esetén kisebb lesz a kár, továbbá nincs benne immunválasz. Gyógyszeripari célra csak csíramentes tojás használható fel, így ezt egy speciális tojóállomány segítségével állítják elő. Ezek a tyúkok születésüktől kezdve steril körülmények között élnek, védőoltást sem kapnak, hogy az immunrendszerük minél intaktabb legyen. Az ilyen tyúkokat SPF (specific pathogen free) állománynak nevezik és az általuk előállított tojás az **SPF tojás**.

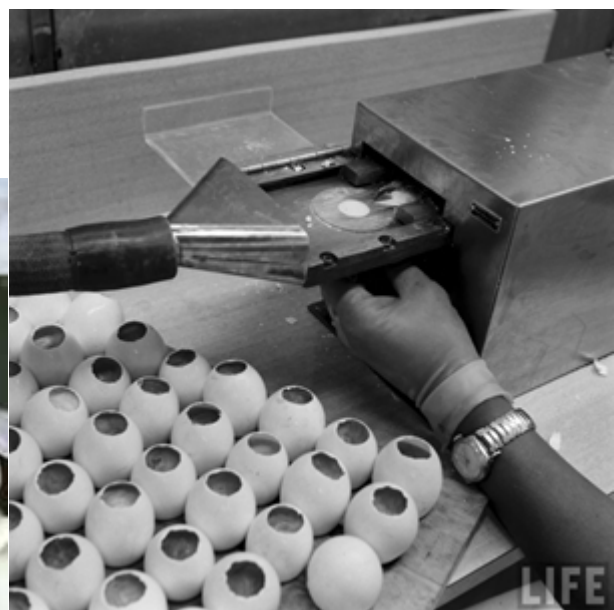
Érdekeség: Magyarország jelentős exportőr az SPF tojások piacán. Ez jó üzlet, a tojások ára akár hússzorosra is lehet a normál, étkezési tojásnak.

18.4.3.1. Vakcina gyártás tojásban

Az SPF tojást keltetőgépben előkeltetik 8-11 napig, majd steril körülmények között fogászati fúróhoz hasonló eszközökkel kilyukasztják és meghatározott helyre, például az amnion hártýára fecskendezik a vírust. A nyílást aszeptikusan lezárják, és a tojást 2-3 napra visszateszik a keltetőgépbe. Ezután a tojást megnyitják és az kiszívják a vírustartalmú folyadékot. Ez a módszer sajnos eléggé körülményes és sok kézi munkát igényel.



376. ábra SPF tojásokbeoltása vírussal

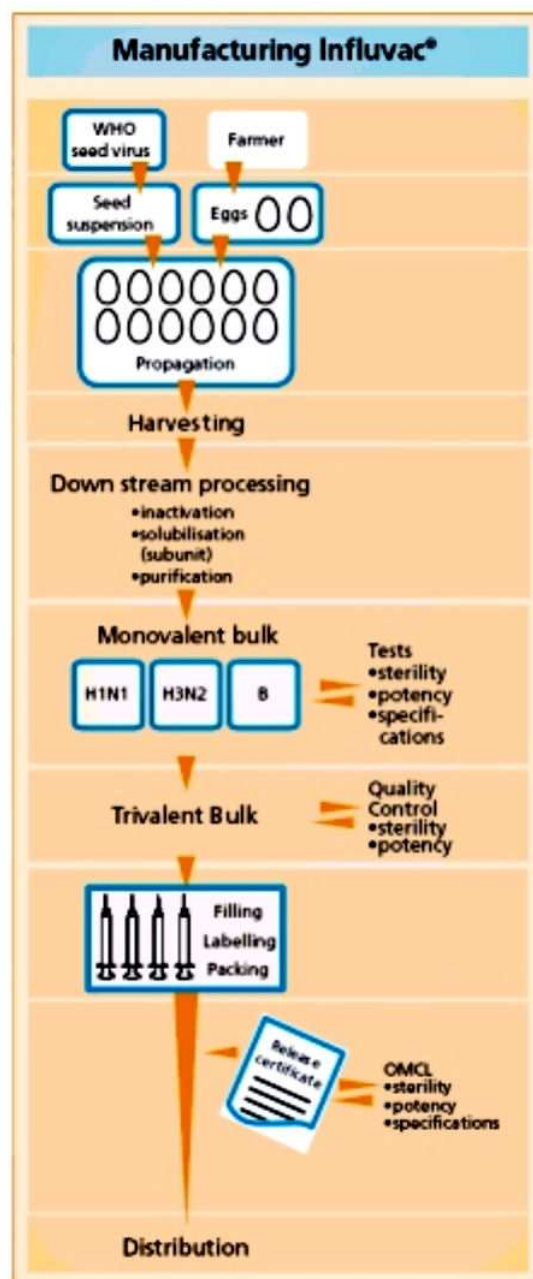


377. ábra SPF tojások megnyitása vírus aratáshoz

Esettanulmány: hagyományos influenza vakcina gyártása csirkeembrióban

A legnagyobb tömegben tojásokban készített vakcina az évi rendszeres influenza elleni védőoltás. Az influenza vírus nagyon változékony, legalább negyven altörzse van jelen az emberi populációban. A WHO évente szakértői előrejelzést készít arról, hogy a következő évben melyik három altörzs járványos elterjedése várható. A törzsbankból vírus inokulum tenyészetet adnak ki minden országnak, amelyik igényli. Ezeket az oltóanyaggyárakban tojásokban párhuzamosan szaporítják. Az élő, fertőző vírusokat maximális biztonsági körülmények között formaldehiddel inaktíválják. Az elpusztult vírusok köpenyét detergens kezeléssel aegységeire bontják (split vírus). Tisztítás után a háromféle vírus antigént egyesítik, így trivalens vakcinát kapnak.

A hideg évszak beköszöntével megkezdik a lakosság oltását, ezzel csökkentik a megbetegedések gyakoriságát és súlyosságát.

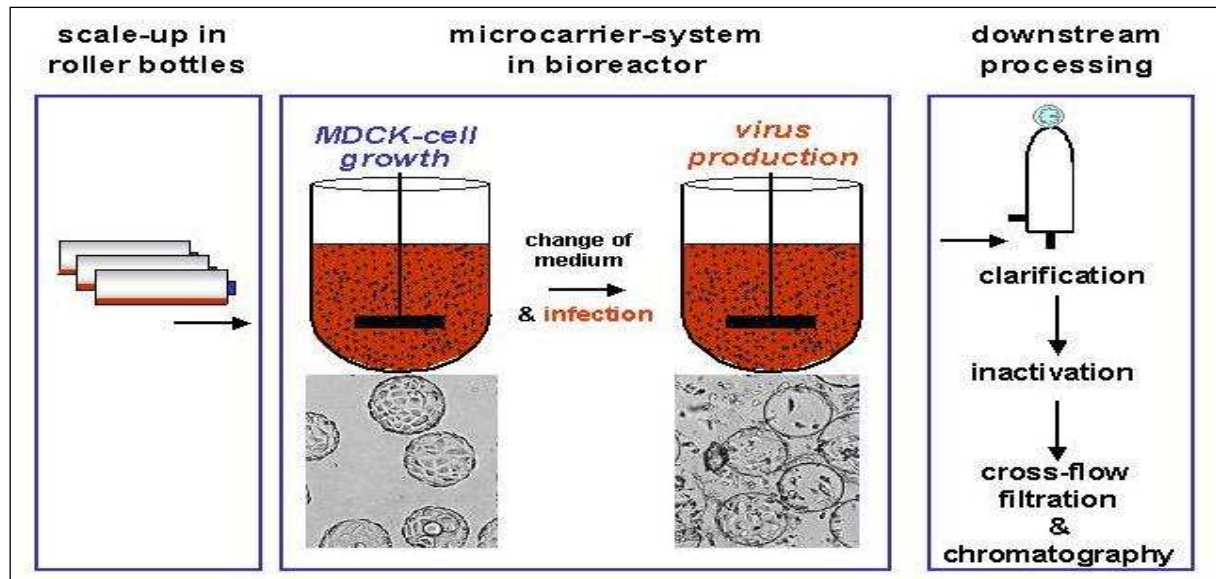


378. ábra Trivalens influenza vakcina termelése tojásban

18.4.3.2. Vakcinagyártás sejtenyészetekben

Nagyobb léptékben és rugalmasabban alkalmazható a **sejtenyészetekben** történő vírus tenyésztés. Az egész gazdaszervezet helyett csak szöveti vagy dedifferenciált sejtvonalon szaporítjuk a vírust. Az állati sejtek tenyésztéséről részletesebb leírás a rekombináns fehérjék gyártásánál olvasható.

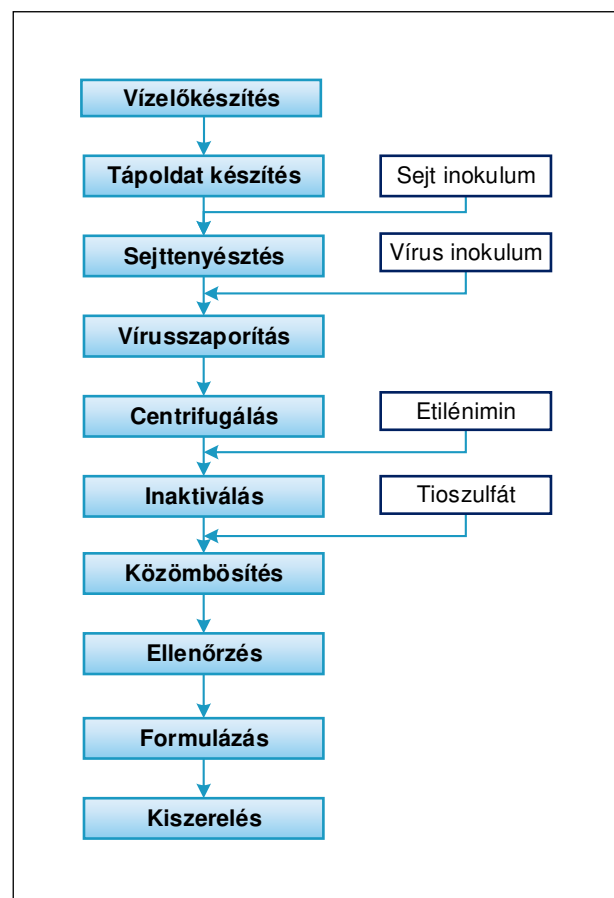
A technológia ebben az esetben is két szakaszra osztható. Előbb a sejteket kell elszaporítani, utána következhet a vírussal történő fertőzés. A sejt szaporítás módja szintén a rekombináns fehérjék gyártásánál található, itt csak annyit jegyzünk meg, hogy más készülékek szükségesek a kitapadó (anchorage-dependent) sejtek és a szuszpenzióban növekedő sejtek esetén. A tenyésztés célja ebben az esetben a nagy sejtkoncentráció, nem egy termelt fehérje. Megfelelő sejtszám elérésénél következik a vírusok ráoltása. A vírusokat is egyfajta working „cell” bankban tárolják, innen veszik elő az oltóanyagot. Ennél a lépésnél fontos paraméter a vírusok száma. Ha kis számú vírussal oltanak (pl. a vírus szám két nagyságrenddel kisebb, mint a sejtek



379. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártása

száma), akkor két generációt, két víruszaporodási ciklust kell kivárni. Ha viszont a két szám egy nagyságrendben van (pl. ~ 2 vírus/sejt), akkor egy ciklusban elérhető a maximális vírus titer. A fertőzés után 10-36 órán keresztül tart a vírusok szaporodása. A tenyésztési paraméterek, pl. a tápoldat optimális összetétele, pH-ja, hőmérséklete eltérő lehet a sejtszaporodási szakaszhoz képest.

A kapott vírus szuszpenzió feldolgozása a szaporítás közegétől függetlenül hasonlóan történik. A vírusok hatására a sejtek a sejtek lizálnak, a sejtörmelék nagy g-vel, *csőcentrifugával* választják el. Az attenuált vírusok mehetnek a tisztítás és formulázás irányába, az patogén vírusok viszont *inaktiválásra* kerülnek. Az inaktiválásnál az a nehézség, hogy a vírusok nukleinsav állományát kell használhatatlanná tenni úgy, hogy közben az epitópokat alkotó, lényegesen érzékenyebb fehérje molekulák ne változzanak meg. Leginkább szelektív kémiai reagenseket, alkilező szereket használnak (etilénimin, bis-etilénimin). Ezek nagyon reaktív vegyületek, ezért rendszerint az alkalmazás előtt, a helyszínen állítják elő. Mivel a DNS-sel reagálnak, erősen rákkeltőek, emiatt minden lépést elszívó fülkében, különleges védőeszközökkel végeznek. Az inaktiváló oldat bevitel után a reakció vírustól függően 2-24 órán keresztül folyik. Ekkor feleslegben nátrium-tioszulfát oldatot adnak az oldathoz, ez elbontja a maradék etilénimint. A tételből min vesznek és *ellenőrzik*, hogy nem maradt-e benne még élő vírus. Ez a vizsgálat sokszor egy hétig is eltart, addig a folyadékot szigorúan lezárva a hidegszobában $+4$ °C-on tárolják.



380. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártásának blokk-sémája

A negatív eredmény után lehet a tételt felszabadítani és további feldolgozásra átadni. Az élő, patogén vírusoknál a containmentet eddig a pontig fenn kell tartani. Tehát a vírus beadásától a felszabadításig minden berendezést, szerelvényt és csővezetékét végig hermetikusan zártan kell kezelni, tilos megbontani mindaddig, amíg az adott részt nem fertőtlenítik, szanitizálják.

Az eddigi lépések eredménye mind az attenuált, mind az inaktivált vírusok esetében egy ártalmatlan vírus szuszpenzió. Ennek koncentrációját szükség esetén mikroszűrővel lehet növelni, de általában a készítményt inkább hígítani kell a megfelelő hatás beállítása érdekében. A *formulázás* során puffercserével, stabilizátorok hozzáadásával jön létre a vakcina, amit felhasználási tételekbe szerelnek ki. A teljes technológia blokkvázlata a 380. ábrán látható.

18.4.3.3. *Alegység vakcina gyártás*

A teljes kórokozó helyett annak csak egy jellegzetes, erőteljes immunreakciót kiváltó fe-lületi fehérjéjét, egy epitópját állítják elő és adják be a megvédendő személynek. Ezt a moleku-lát rekombináns fehérjeként egy ártalmatlan gazdaszervezet felhasználásával termeltetik. A gyártás és a termék biztonságosabb és egyszerűbb, mert a kórokozó egyáltalán nincs jelen. A K+F folyamat lépései ugyanazok, mint bármely más rekombináns fehérje esetében:

1. az antigén fehérjét kódoló gén izolálása, esetleg szintetizálása
2. bevitel egy jól kezelhető gazdaszervezetbe, expresszálas.
3. A fehérje előállítása fermentációval.
4. Feldolgozás, tisztítás
5. Adjuválás

18.4.3.4. *Adjuválás*

A fehérjéket tartalmazó (toxoid, alegység, konjugált, VLP) vakcinák gyártási technoló-giájának utolsó művelete mindig az *adjuválás*. (Az elnevezés a latin adiuvo, adiuvat = segít, támogat, előmozdít szóból származik, mivel a művelet felerősíti az antigén tulajdonságot). Az

PRODUCT	ACTIVE COMPONENT	HUMAN VETERINARY EXP. IMM.		
MINERAL ADJUVANTS				
Alhydrogel 1.3%	aluminium hydroxi de	+	+	+
Alhydrogel 2.0%	aluminium hydroxi de	+	+	+
Alhydrogel "85"	aluminium hydroxi de	+	+	+
<hr/>				
Adju-Phos 2%	aluminium phosphate	+	+	+
<hr/>				
Calcium phosphate adjuvant	calcium phosphate	+	+	+
SAPONIN ADJUVANTS				
Quil-A saponin adjuvant	triterpenoid glycoside	-	+	+
OIL EMULSION ADJUVANTS				
Freund's incomplete adjuvant	Mineral oil + emulsifier	-	+	+
<hr/>				
Freund's complete adjuvant	Mineral oil + emulsifier + M tuberculosis	-	-	+

37. táblázat Különböző adjuváns anyagok (katalógus részlet)

adjuvánsok olyan anyagok, amelyek nem specifikus immunválaszt váltanak ki, mintegy előkészítik a terepet a specifikus hatású antigének elleni immunreakció előtt. Az adjuvánsok önmagukban gyulladásszerű állapotot hoznak létre a kezelés helyén, ezzel felkészítik az immunrendszert. Ettől erősebb/tartósabb immunválasz alakul ki (2-3-szoros növekedés!), azaz kevesebb vakcinát kell alkalmazni és tovább eltartható a készítmény. A teljes (attenuált vagy inaktivált) vakcinák esetében nem szükséges az adjuválás, mert a szilárd részecskék önmaguk is adjuváns hatásúak.

A használt anyagok között vannak szilárd (kolloid méretű alumínium-hidroxid és -foszfát szemcsék) és folyékony (ásványi és növényi olajok) halmazállapotúak is. A folyadékoknál a vakcinát steril olajjal és emulgeáló anyagokkal keverik, majd nagy nyomással keresztül nyomják egy homogenizátor szelepen és ezáltal finom, stabil emulziót hoznak létre.

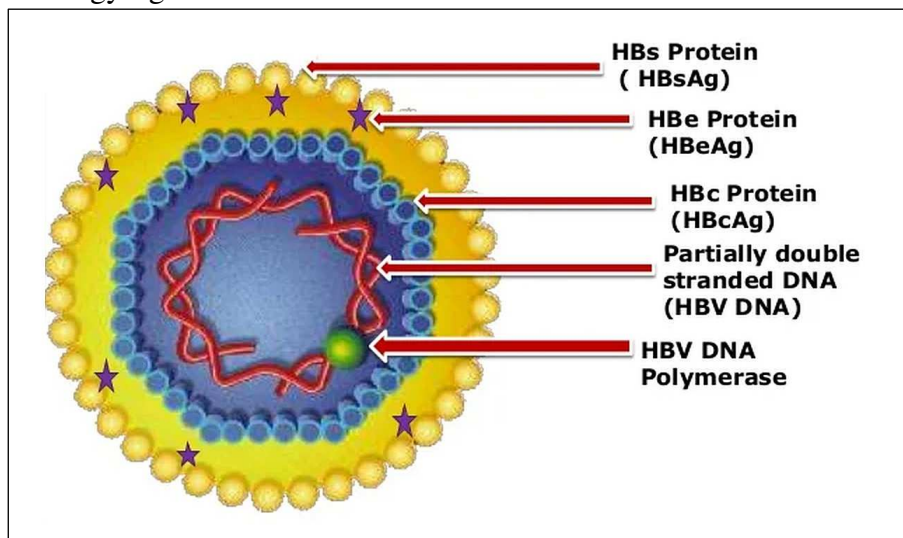
Érdekesség: ugyanezt a berendezést használják a tartós tej zsírcseppeinek aprítására (homogenizált tej) és sejteltetésre is.

18.4.3.5. Esettanulmány: a hepatitis B vírus (HBV) vakcina gyártása

A fertőző májgyulladást többféle vírus okozhatja. A sok közös tünet ellenére a különböző vírustörzsek jól elkülöníthetők. Megjelölésükre az ABC betűit használják, A-tól E-ig. A hepatitisz-A viszonylag enyhe lefolyású betegség, nagy eséllyel spontán gyógyul. Járványt a rossz higiéniai körülmények között élő populáció körében okoz, mivel a széklettel terjed. A hepatitisz B súlyosabb betegség, a vírus hatására a májsejtek pusztulnak, májgyulladás, májelégtelenség, sárgaság alakul ki. A spontán gyógyulás a gyermekkori fertőzéseknél ritka, a felnőtteknél viszont ez a jellemző. Krónikus formában az évek alatt májsugor, és az esetek néhány százalékában carcinoma jöhet létre. A beteg mindvégig fertőző, a vírus vérrel, testnedvekkel, szexuális úton és közös tűhasználattal terjed. Lappangási ideje 1,5-3 hónap, a beteg ezalatt is vírusgazda, megfertőzhet másokat. A fertőzés terjedésének megakadályozása érdekében a vérátömlesztéshez levett vért már húsz éve hepatitisz B és C vírusra is tesztelik.

A WHO adatai szerint világszinten az emberiség mintegy 5%-a fertőzött, ez kb. 350 millió embert jelent. Ez természetesen egy átlagérték, a fejlettebb egészségüggyel rendelkező országokban ez az arány lényegesen alacsonyabb, hazánkban 1% alatti.

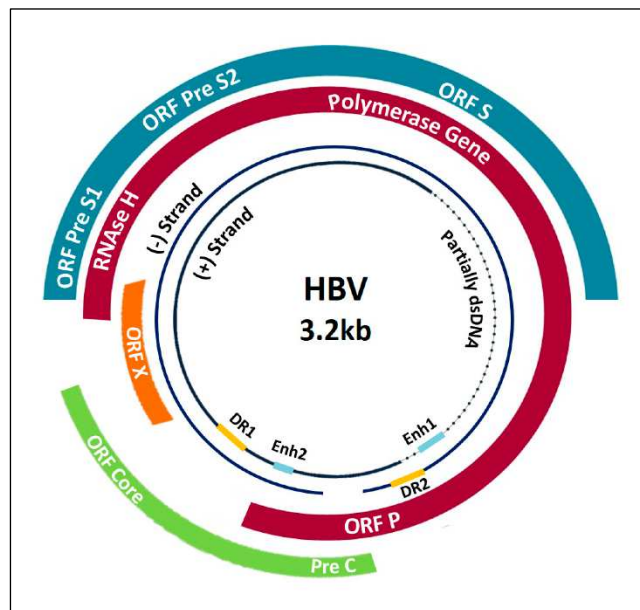
A vírus a májsejtekben szaporodik, az új vírusok a májsejtek szétesésével a vérbe kerülnek. Ez a betegek véréből kimutatható, sőt izolálható. A vírus tokfehérjéi nagy mennyiségben képződnek, a monomer, félkész vagy üres tokok is megjelennek a vérben. Ezekből készült a legelső vakcina, de ez egyrészt korlátozott mennyiségben volt elérhető, másrészt fennállt a vírusátvitel veszélye (nem csak a HBV, de más vérrel terjedő vírusok, pl. a HIV is!), ezért áttértek a rekombináns alegység vakcinára.



381. ábra A hepatitis B vírus felépítése

A vírus 42 nm átmérőjű, kívülről közel gömb alakú. Két összefüggő fehérjeburok borítja. A külső réteget a hepatitisz-B surface (felületi) antigén (HBsAg) alkotja, a belső ikozaéderez elrendezésű „core” antigénekből (HBcAg) áll. A harmadik, „endo” antigén nem alkot összefüggő réteget. A szerkezet legbelsejében található a DNS és a vírus saját DNS-polimeráz enzime.

A HBV DNS szerkezete rendhagyó, nem végig kettős szálú. A (+) szál hiányos. A (-) szál ~3200 nukleotid hosszúságú, a + szál ennek csak 55-75%-a. A kódoló szakaszok átfednek, „néma” szakasz alig van, hét „open reading frame” különíthető el. A vírus replikációja speciális. A DNS-ről először egy RNS kópia (pregenom) készül, erről reverz transzkriptázzal íródik át az új DNS (-) szála. Erre épül rá a (+) szál. Ha a szükséges nukleotidok elfogynak, ez a szál csonka marad. De az összeépülés így is megtörténik, a hiányos vírus is fertőző és szaporodóképes.



382. ábra A HBV genom felépítése

Mindegyik antigén fehérje képes immunreakció kiváltására. A vakcinához célszerűen a surface (felületi) antigént választották, mivel vírusfertőzésnél ezt észleli elsőként a szervezet.

A HBsAg fehérje valójában három doménből áll, amelyek 55, 108 és 226 aminosavból állnak. Ez utóbbit nevezik kicsi (S, small) láncnak. 55 aminosavval hosszabb a közepes (M, medium) forma, és újabb 108 tagú lánc kapcsolódásával alakul ki a nagy (L, large) fehérje.

Ezek hajlamosak a szétesésre, külön is kimutathatók a szervezetben. A molekulában két N-glikozilációs hely található. A kódoló génszakaszok a DNS-ben egymás mellett helyezkednek el (PreS1, PreS2, S), a vakcinához elégséges az S génszakasz termelése.

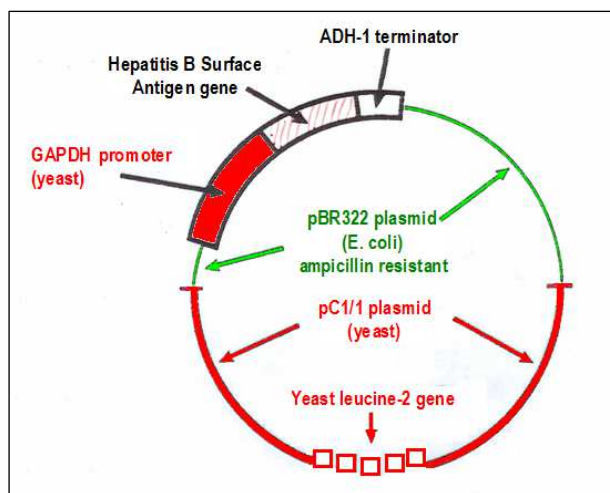
A felületi antigén génjét először *E. coli*-ba vitték be egy plazmiddal. A fehérje sikeresen expresszáldott, de glikoziláció hiányában nem volt hatékony. A cukormintázatot eukariótákkal kellett kialakítani. Két technológia is eljutott az engedélyezésig. Élesztővel aktív fehérjét kaptak, de az a sejten belül maradt, kinyeréséhez sejtfeltárást kellett végezni. Emlős sejtek tenyésztésével extracelluláris, hatékony fehérjét kaptak, de ez az út költségesebb.

Az élesztő törzs manipulálásához használt ingázó (shuttle) vektor kialakítása azért érdekes, mert hatással van a fermentációs technológiára is. Az ilyen vektorok egyes elemeit meg kell duplázni, hogy prokariótákban (tipikusan *E. coli*-ban) és a kiválasztott eukarióta szervezetben egyaránt működőképesek legyenek. A 383. ábrán bemutatott vektor két plazmidből áll, a coliban működő pBR 322-t és az pékélesztő PC1 plazmidjét kapcsolták össze. Ebben már benne van a kétféle replikációs origó, és az ampicillin rezisztencia. Az élesztőnél markerként a leucin bioszintézis második enzimének génjét építették be. A sikeres szelekcióhoz a használt

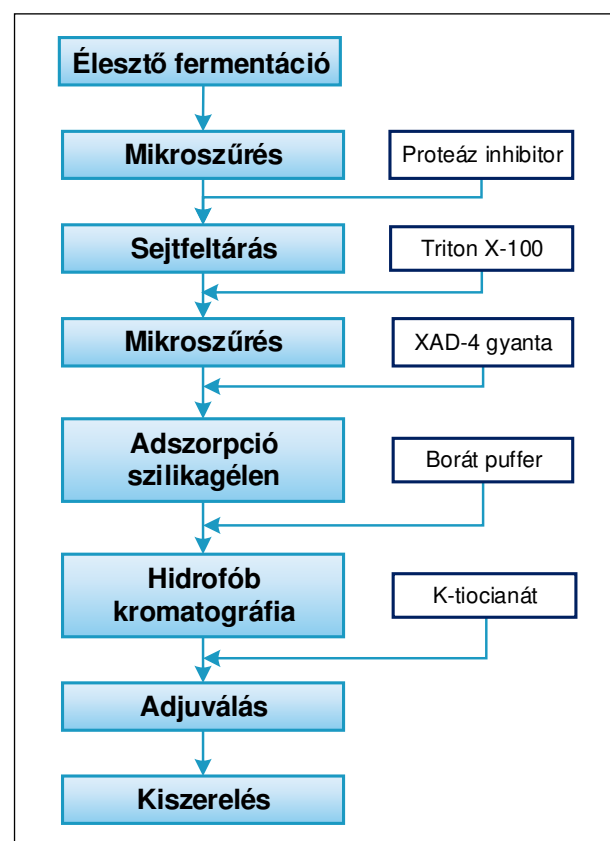
élesztőtörzsben ezt a gént kiütötték. Így leucin-mentes tápoldaton csak a sikeresen transzfektált sejtek nőnek ki. A célgén a *coli* szakaszon található, a kazetta elejére konstitutív promótert kapcsoltak, a végén terminátorral zárták le. Csak az S fehérje génszakaszát építették be, ez is megfelelő immunogénitást biztosított.

A gyártásban kétfázisú szakaszos fermentációs technológiát alkalmaznak. Az első, sejtzaporítási szakaszban leucinmentes tápoldaton nevelik az élesztőt. Ennek az a célja, hogy a nagy plazmid tartalmú sejtek kerüljenek túlsúlyba. A második, víruszaporítási szakaszban már komplex tápoldatot adnak, hogy semmi ne limitálja a szintézist.

A feldolgozás első lépése a sejtömeg elválasztása. Az élesztősejteket centrifugálással és mikroszűréssel egyaránt el lehet távolítani. A sejtekben lévő még aktív fehérjebontó enzimek hatásának kivédésére proteáz inhibitorokat adnak. Az S-fehérje a sejtekben található, ezért sejtfeltárást kell alkalmazni. Mechanikai feltáró berendezéssel, például nagynyomású homogenizátorral detergens jelenlétében roncsolják a sejteket. A sejtörmeléket újabb mikroszűréssel választják el, az antigén fehérje a szűrletbe kerül. A bevitt detergenst apoláris felületű adszorbens gyanúval távolítják el. A következő lépésben a fehérjét kötik meg szilikagélen (pl. Aerosil), majd meleg borát pufferrel eluálják. A továbbiakban hidrofób kölcsönhatás kromatográfiával (HIC, butil-agaróz tölteten) tisztítják. A diszulfid hidak megfelelő kialakítására oxidatív közeget hoznak létre kálium-tiocianáttal. A vakcinafehérjét alumínium vegyülettel adjuválják.



383. ábra Az élesztőbe bevitt ingázó vektor (kettős plazmid) szerkezete



384. ábra HBV vakcina feldolgozási lépéssora

A végterméket sokféle ellenőrző vizsgálat után hozzák forgalomba:

- Fehérje tisztaság: max 1-5% HCP (host cell protein = élesztő fehérje)
- Azonosítás: MAb (epitóp analitika)
- DNS tartalom: max 10 pikogram/l (!)
- Hatékonyság: állatkísérletekben (egér, tengerimalac)
- Pirogének: LAL teszt
- Mikrobiális tisztaság
- Stabilitás: 2-3 év +4 fokon

18.4.3.6. Konjugált vakcinák gyártása

A konjugált vakcinák két egységét külön állítják elő, majd kémiai reakcióval kapcsolják össze.

A kapszuláris poliszacharidot (pl. a *Haemophilus influenzae* esetében poliribozil-ribitol-foszfátot) a patogén törzs fermentációjával állítják elő. A sejteket kationos detergenssel kezelik és centrifugálással választják el. A feltárt pasztát pufferrel újra szuszpendálják és a poliszacharidokat az ionerősség növelésével leválasztják a sejtörmelékről. A továbbiakban ultraszűréssel, alkoholos kicsapással tisztítják, vákuumban szárítják, és $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolják további feldolgozásig.

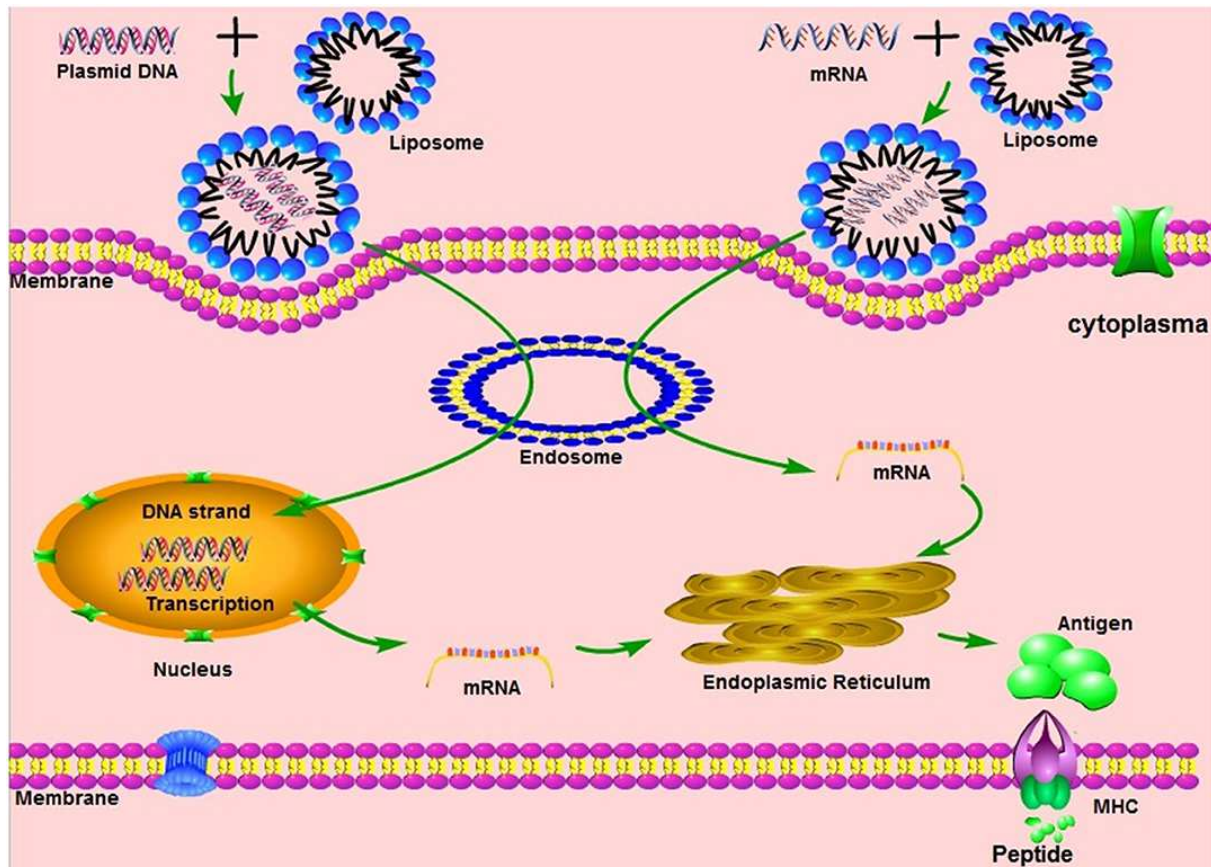
A fehérjerészt külön fermentációval termelik. A klasszikus módszer a tetanusz toxoid alkalmazása volt, amit a jól bevált gyártási technológiával állítottak elő. Gyorsabb és egyszerűbb módszer a toxoidhoz nagyon hasonló rekombináns fehérje (P16) termelése *E. coli* törzsszel. A P16 célfehérje a sejtek periplazmás terében lokalizálódik. A sejteket csöcentrifugával betöményítik, nagynyomású homogenizátorral feltárlják. A sejtfeltárlás során keletkező sejtörmelék eltávolítása is csöcentrifugával történik, de a nagy viszkozitás csökkentésére előbb DNázt kell adagolni. A kinyert fehérjét három kromatográfiás lépésben tisztítják.

A szénhidrát és a fehérje egységeket kémiai reakcióval, pl. karbodiimiddel kapcsolják össze. A maradék egységeket elválasztják a nagy molekulájú terméktől.

18.4.3.7. Nukleinsav vakcinák

A nukleinsav vakcinák bevitelére utánozza az élő mikroorganizmusokkal való fertőzés, illetve immunreakció folyamatát.

Ezek gyártása gyorsabb és biztonságosabb, mivel nem kell patogén szervezeteket nagy léptékben szaporítani. A gyorsabb gyártás pedig lehetővé teszi, hogy járványos betegség



385. ábra A DNS és mRNS vakcinák működésének összehasonlítása

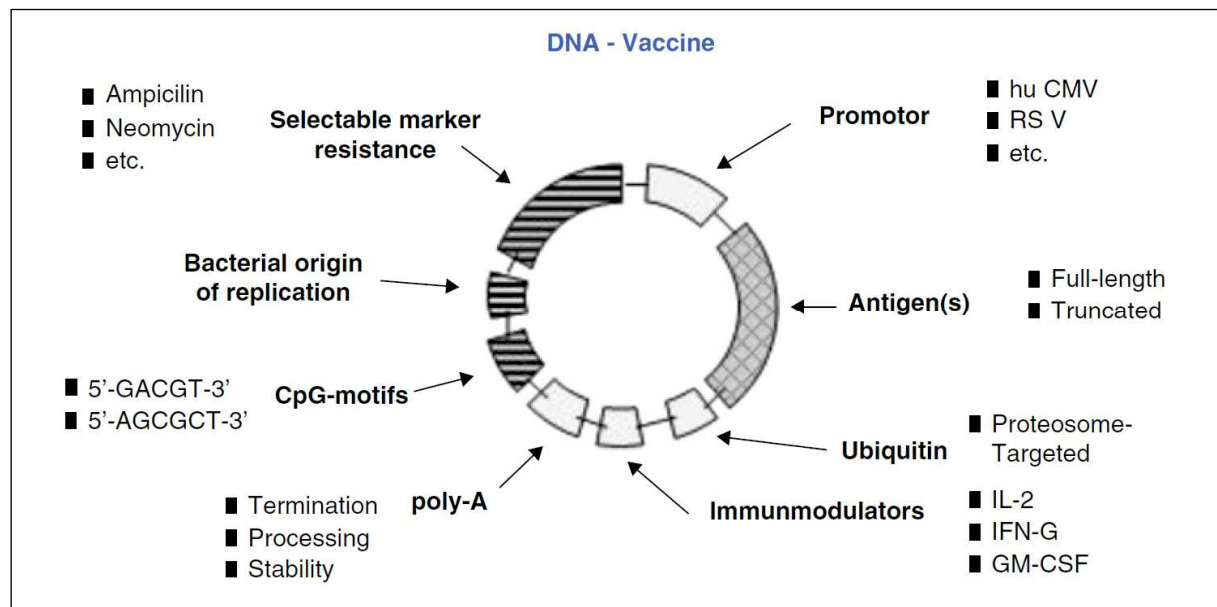
megjelenése esetén rövidebb időn belül lehessen nagy tömegeket átoltani. A DNS- és az RNS-vakcinák sejten belüli útvonala különbözik. Az elején és a végén vannak közös lépések, a sejtbe való belépés és a riboszomális fehérjeszintézis, valamint a termelt antigén bemutatása a sejt felszínén azonos. De közben a DNS molekulának be kell lépnie sejtmag membránján, át kell íródnia a mRNS-re, ennek vissza kell térnie a citoplazmába, és csak ezután megy végbe a transzláció. Eközben a DNS ki van téve a sejt nukleáz enzimeinek, amelyek az idegen örökítő anyag lebontásával védik a sejt normális működését. Ugyanakkor felmerül annak kockázata is, hogy az idegen DNS beépül a gazda genomba, megzavarva annak működését. Az RNS molekuláknál ezek a gondok nem jelentkeznek, emiatt sok fejlesztés indult meg a profilaxis (vakcinák) és terápia (tumorelles szerek) területén.

Gondot jelentett ugyanakkor az, hogy inkább típus aktiválja a veleszületett (innate) immunrendszert, ami problémákat okozhat.

DNS vakcinák

A DNS-vakcinák lényegében DNS-alapú vektorok, amelyek gazdasejt helyett közvetlenül az emberi szervezetbe viszik be és expresszálják a patogén fehérje antigén szekvenciáját. A vektorba az antigén mellett más immunmodulátorok génjét is be lehet építeni. Ezeket a plazmidokat baktériumokban (pl. *E. coli*-ban) termesztik, kinyerik és tisztítják. A kör alakú kettős szálú DNS plazmidok alkalmasak a vakcinázásra. Mivel a fehérjéket a megvédendő szervezet maga állítja elő, a poszttranszlációs módosítások, így a glikozilálás is megfelelő lesz. Az alegg vakcinákhoz hasonlóan a DNS-vakcinákat is adjuválják. A „csupasz” DNS nem működik.

A DNS-vakcinák hatásukban utánozzák az élő, attenuált vakcinákat, de a reverzió kockázata nélkül. A DNS-vakcinák a teljes, humorális és sejtes immunválaszt képesek stimulálni. A plazmid DNS stabil, hűtés nélkül is tárolható. A vakcinázáshoz használt plazmid DNS-konstrukciók jellemző részei (386. ábra):



386. ábra A DNS vakcina (plazmid) jellemző részei

- Erős promotor/enhancer szekvencia a beépített idegen gén kiírásához
- Megfelelő klónozási hely idegen gének behelyezéséhez
- A replikációs origó (a baktérium törzshöz)
- PoliA/terminátor szakasz
- antibiotikumrezisztencia marker a szelekcióhoz
- Immunmodulátorok (pl. CPG-k, interleukinok, ubiquitin stb.)

A DNS-vakcináknak több biológiai barrieren is át kell lépni a sejtmag felé vezető úton. Ahogy a plazmid DNS-t a célszövetbe, például a vázizomba beadják, a szöveti nukleázok megtámadják és elbontják a bevitt DNS nagy részét. A maradéknak is csak kb. 1%-a tud átlépni a sejtmembránon fagocitózissal vagy pinocitózissal. A sejten belül is ki van téve az exo- és endonukleázok hatásának, így csak 0,1% (becsült érték) kerül be a sejtmagba. A kisebb molekulák (<~40 kDa) passzív diffúzióval képesek átjutni a magmembrán pórusain, a nagyobb részecskék viszont csak hordozófehérjék támogatásával tudnak belépni. A rossz hatásfok teljesen érthető, hiszen minden sejt nukleázokkal védekezik az idegen DNS-sel szemben. A plazmidok megvédésére többféle módszert is alkalmaznak, így például a liposzómába való beágyazást vagy a DNS kötését dendrimerekhez.

A DNS vakcinákat előbb többféle állati betegség megelőzésére fejlesztették ki, csak ezután került sor a humán vakcinákra.

RNS vakcinák

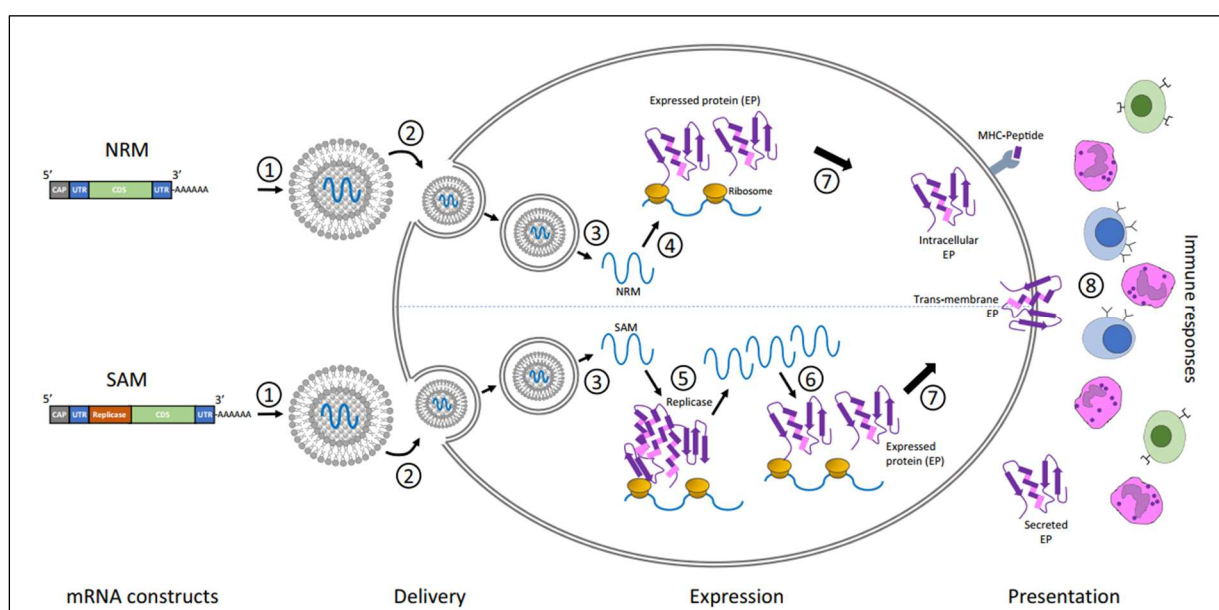
Az RNS vakcináknak két fő típusa létezik, a (passzív) mRNA és az önmagát amplifikáló RNS (saRNS) vakcinák.

Passzív mRNA vakcina

A hagyományos vagy passzív mRNA-vakcinák egy genetikai egységet tartalmaznak, a célantigén mRNA-ét, más fehérjét kódoló génszakaszt viszont nem. A mRNA maximum két nap alatt elbomlik, így nem marad a szervezetben. Templát híján a fehérje termelés is leáll.

Önreprodukáló mRNA vakcina

A mRNA gyors elbomlása miatt fejlesztették ki az önreprodukáló RNS vakcinákat. Ehhez RNS vírusokat alakítanak át. A replikáz egységet megtartják (ez tartalmazza a reverz transzkriptáz enzimet is) és a tokfehérjék génjének helyére illesztik be az epitóp génjét. Az így kapott genomokat replikonoknak nevezik. Az emberi sejtekben másolódnak, mint az eredeti



387. ábra A kétféle mRNA vakcina működésének összehasonlítása

vírus. A genom sok példányban elkészül, és erről rengeteg fehérje is szintetizálódik. De ez idegen antigén fehérje, nem tud a nukleinsavval érett vírussá összeállni. A tok nélküli vírus RNS a sejten kívül életképtelen, nem képes más sejteket megfertőzni. A tokfehérjék helyett keletkező epitóp fehérje viszont bemutatásra kerül a sejt felületén és kiváltja a mind a humorális, mind a sejtes immunválaszt.

A sokszorozódásnak köszönhetően dózisonként kisebb mennyiségű oltóanyagra (saRNS-re) van szükség, mint a nem replikálódó mRNS-vakcinák esetében, ami költségmegtakarítást és nagyobb termelékenységet eredményezhet.

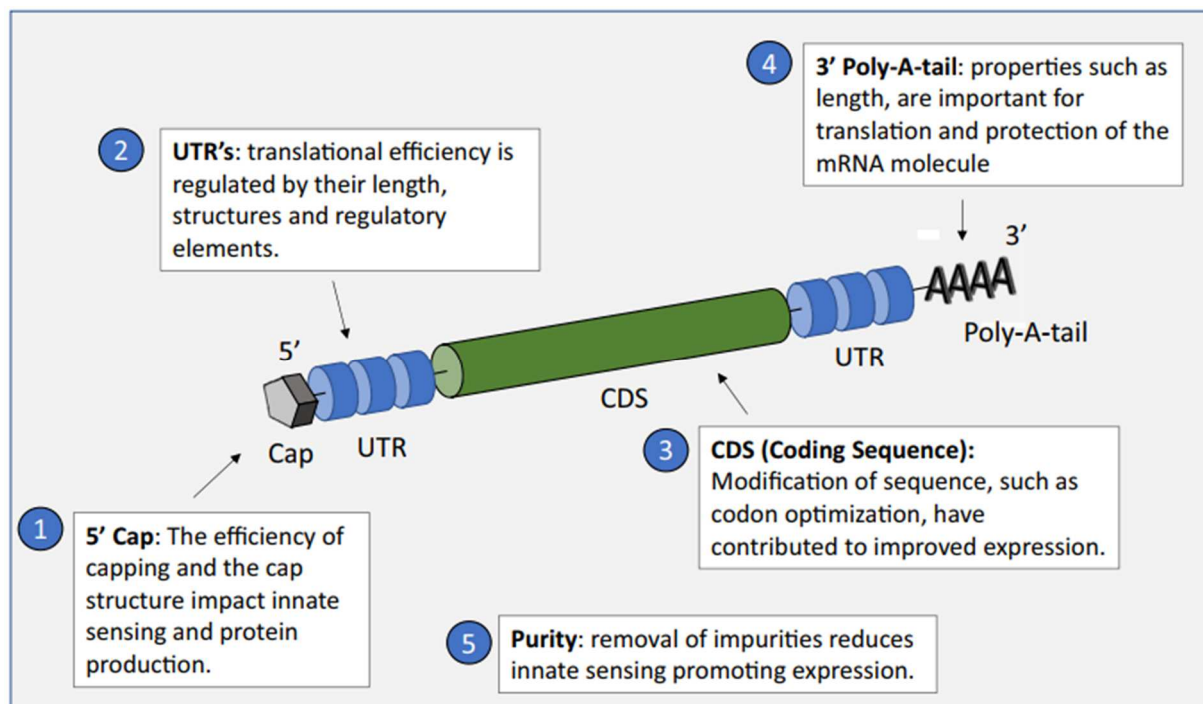
18.4.3.8. Nukleinsav vakcinák gyártása

Mindkét RNS vakcina típus gyártási technológiája azonos lépésekből áll.

Az mRNS sejtmentes enzimikus transzkripcióval *in vitro* is előállítható. Ehhez szükség van az mRNS vakcinát sablonként kódoló linearizált plazmid DNS-re, egy rekombináns RNS-polimeráz enzimre és a nukleozid-trifoszfátok keverékére. A molekula végére egy természetes vagy analóg szintetikus sapkaszervezetet kapcsolnak. A lánc másik végére poli(A) terminátort építenek.

Az eukarióta mRNS általános felépítésének megfelelően (388. ábra) középen áll a kódoló szekvencia (CDS – coding sequence), kifelé haladva nem transzlálódó régiók, a 3' poly-A-farok és 5' Cap analóg. A CDS hordozza a transzlációhoz szükséges információt, valamint a START és STOP kodonokat. Mind a pro-, mind az eukarióta mRNS-ek rendelkeznek 5'UTR és 3'UTR (untranslated, nem transzlálódó) régiókkal. Ezek, ahogy a nevük is jelzi, nem kerülnek transzlációra, hanem az transzláció iniciálásához, a riboszóma kötődéséhez szükségesek.

Az RNS típusú vakcina gyártására a már ismert DNS-templátos, enzimikus RNS-szintézist alkalmazzák. A gyártás cDNS-templáton, tipikusan plazmid DNS-en (pDNS) *in vitro* transzkripcióval történik, ezért a folyamat első lépése a pDNS előállítása. A szintetizált plazmidot *E. coli* fermentációval szaporítják el. A sejteltávolítás után a tisztított pDNS tartalmazza baktérium genom DNS nyomait és a pDNS három formáját (szuper tekercselt, relaxált kör és lineáris) is.



388. ábra Az érett, transzlációra kész mRNS felépítése

Emiatt a tiszta és invariáns pDNS reprodukálható előállítás - ami egy vakcinához elengedhetetlen - meglehetősen nehéz feladat.

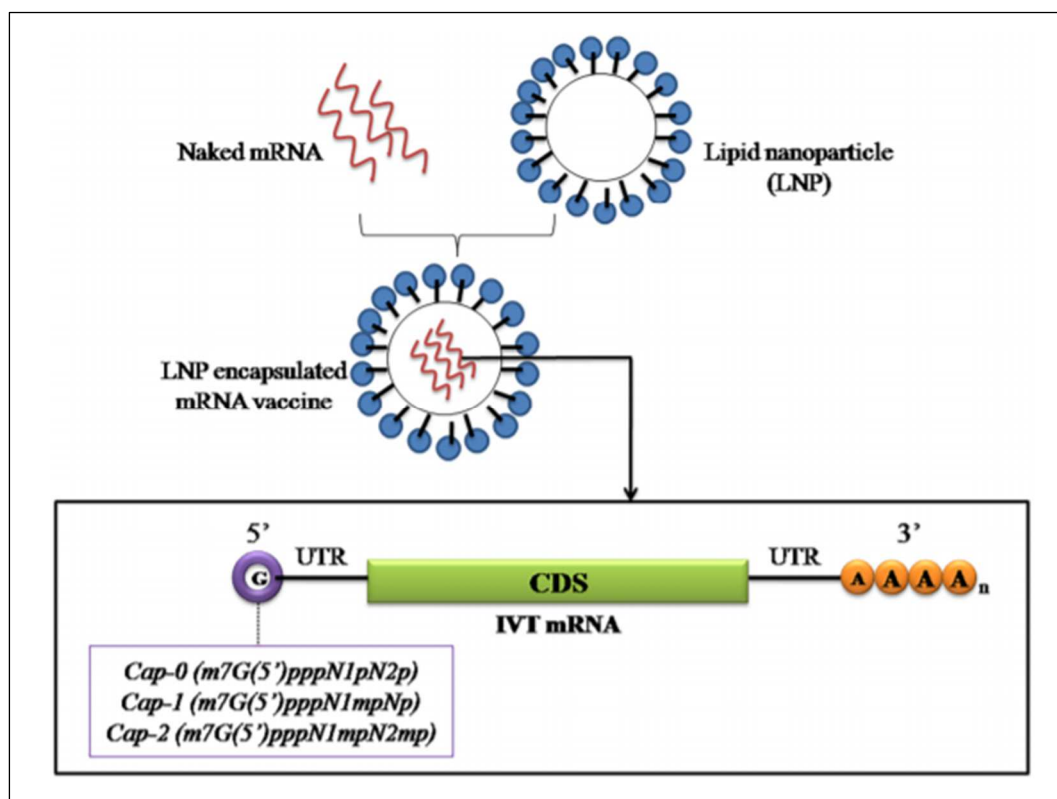
A második lépésben a linearizált pDNS-templátot, rekombináns RNS-polimerázt (T7, T3 vagy SP6) és nukleozid-trifoszfátokat tartalmazó oldatban írják át mRNS-re (37 °C, 2-4 óra).

Alternatív megoldásként a cap, illetve a poli(A) utólag is rákapcsolható az mRNS láncre.

A bakteriális DNS maradványok és a pDNS heterogenitása azonban nem okoz gondot, ha a linearizált pDNS-t már átírták, mert a következő lépésben a szennyező baktérium-DNS, valamint a pDNS-templát DNáz enzim segítségével elemészthető (37 °C, 0,5 óra).

A reakcióelegy azonban szennyező RNS fajtákat tartalmaz, rövidebb és hosszabb transzkriptumokat. Ezeket méret szerinti elválasztással, ultraszűréssel és/vagy kromatográfiával különítik el.

A kész RNS stabilitása függ a formulázás módjától. A tiszta RNS trehalózzal liofilizálva szilárd állapotban szobahőmérsékleten is eláll egy évig. Ez a forma viszont nagyon rossz hatásokkal jut be a sejtbe. Ha viszont a kész RNS hatóanyagot speciális detergenssekkel lipid nanorészecskébe formulazzák, az megkönnyíti a biológiai membránokba való beoldódást, a citoplazmamembránon való átjutást. Ez a gyógyszerforma viszont nagyon bomlékony, egyes gyártmányokat -70-75 °C-on kell tárolni.




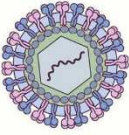
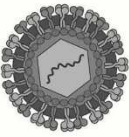
389. ábra mRNS vakcina lipid nanorészecskébe zárva

A terméket steril körülmények között ampullákba töltik és lezárják. Az oltóanyagot felhasználásig az előírt hőmérsékleten kell tartani.

18.4.3.9. A SARS-Covid-19 vakcinák összehasonlítása

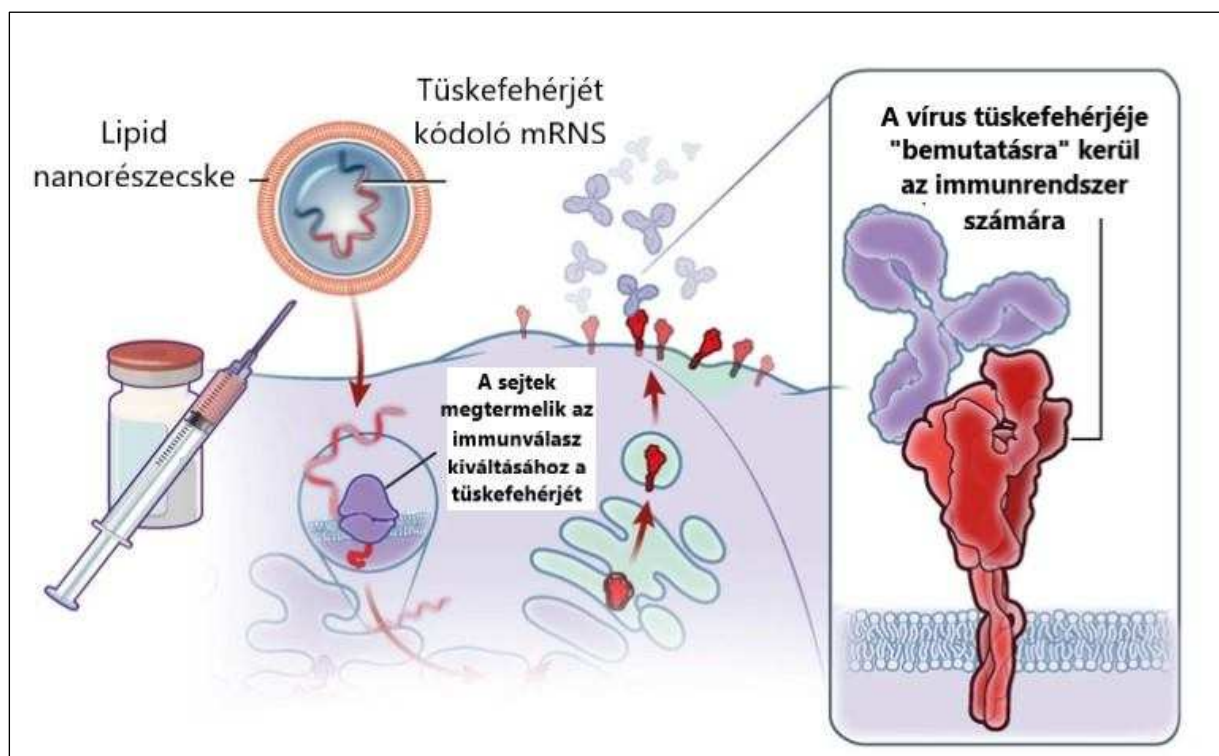
A Covid járvány hirtelen megjelenése és rohamos terjedése hihetetlen mértékben fölpörgette és intenzifikálta a vakcinakutatást és gyártást. A különböző kutatóhelyek sokféle elven működő vakcinák kifejlesztésébe fogtak, a klasszikus inaktivált vírustól a legmodernebb RNS vakcináig. A tucatnyi fejlesztés közül versenyelőnye volt az RNS vakcináknak, mivel az egyszerűbb gyártási eljárás megrövidítette a K+F folyamatot, a rekombináns tüskefehérje alapú oltóanyagok lassabb jutnak el az engedélyezésig.

Magyarországon jelenleg hatféle vakcinát engedélyeztek (390. ábra).

mRNA 	Pfizer/ BioNTech Moderna	A sejtekbe bejutó mRNS hatására a sejteink termelni kezdik a SARS-CoV-2 vírus tüskefehérjét, ami immunválaszt vált ki
Viral vector 	Oxford/ AstraZeneca Sputnik V Johnson & Johnson	Adenovírus vektor A sejtekbe bejutó, ártalmatlan adenovírus tartalmazza a SARS-CoV-2 vírus tüskefehérjét kódoló gént, ami átíródva elindítja a tüskefehérje termelődését – ez váltja ki az immunválaszt
Inactivated 	Sinopharm	Inaktivált vírus Inaktivált (azaz nem fertőzőképes) SARS-CoV-2 vírus – megbetegedést nem okoz, de kiváltja az immunválaszt

390. ábra A Magyarországon engedélyezett vakcinák működési elve

A Karikó Katalin és munkatársai által kifejlesztett, a Pfizer-BioNTech által gyártott mRNA vakcina nukleotid analógokat tartalmaz, így nem aktiválja a veszélyeztetett immunrendszert. A készítmény hatásmechanizmusa a 391. ábrán látható.



391. ábra A Pfizer-BioNTech mRNA vakcina hatásmechanizmusa

Az RNS molekulákat speciális összetételű (három komponensű) lipid burokba formulázzák. A készítmény összetevői:

- a SARS-CoV-2 spike glikoproteint (S) kódoló nukleozid-módosított hírvivő RNS
- polietilén-glikol 2000-dimirisztoil glicerinnel
- koleszterin
- 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfo-kolin
- Trisz-(hidroximetil)-amino-metán = Trisz bázis
- trometamin-hidroklorid = Trisz-HCl
- ecetsav
- nátrium-acetát
- szacharóz

A termék kétféle pufferrendszert is tartalmaz (Tris és acetát puffer). Az ozmózisnyomást szacharózzal állítják be. Az oltóanyagot -75 °C-on tárolják, felolvasztás után 24 órán belül fel kell használni.

18.5. A magyar egészségügy oltási rendszere

Az oltással megszerezhető védelem időtartama változó, ugyanis vannak olyan betegségek, amellyel szemben az oltások életre szóló védelmet adnak (pl. mumpsz, kanyaró), más betegségek esetén rendszeresen ismétlődő oltási program szükséges akkor, ha életre szóló védelmet akarunk elérni.

Magyarországon a lakosság egészségének érdekeit figyelembe véve ingyenes oltási rendszert alakítottak ki. Az általános megelőző jellegű oltásokat életkorhoz kötötten, kötelező jelleggel mindenki megkapja:

BCG, tuberkulózis ellen, minden csecsemő megkapja három napos korától hat hetes koráig. A védelem időtartama egyéenként változó, de minimum 5-10 évig fennáll. (Ez ellenőrizhető szubkután tuberkulin próbával, vagy tuberkulin tapasszal. Ha bőrpír alakul ki, akkor a védelem fennáll.)

DPT (DiPerTe), diftéria (torokgyík), pertusszis (szamárköhögés), tetanusz (merevgörcs) ellen, három részletben adják négy, harminchat hónapos és hatéves korban.

SABIN cseppek (OPV: orális poliovakcina)

SALK vakcina (IPV: inaktivált poliovakcina), járványos gyermekbénulás (poliomyelitis) ellen. A Sabin cseppet szájon át (orálisan) adják, a Salk vakcinát injekcióban. Három hónaposnál idősebb csecsemők kapják, három alkalommal, hat hetes időközönként, majd hároméves korig évente megismétlik.

MMR mumpsz, morbilli (kanyaró), rubeola (rózsahimlő) ellen jó, 1992 óta kötelező jelleggel 15 hónapos korban minden újszülött megkapja.

Az oltások egy másik csoportját csak közvetlen fertőzési veszély esetén adják, bizonyos esetekben kötelező jelleggel. Kötelező pl. a hastífuszos beteg vagy krónikus hordozó környezetében élőket elölt vagy attenuált *Salmonella typhi*-t tartalmazó vakcinával oltani, továbbá a kanyarós beteggel érintkezett 15 hónaposnál fiatalabb csecsemőt (aki még nem kapott MMR-t!) attenuált morbillivírussal immunizálni. Passzív védőoltásban kell részesíteni a hepatitis-A-vírus okozta májgyulladásos beteggel. Tetanus ellen emlékeztető toxoidos oltásban kell részesíteni azokat, akik fertőzési veszélynek vannak kitéve (pl. földdel szennyezett sérülés esetén); viszont azoknak, akik tetanus alapimmunizálásban nem részesültek (házánkban ilyenek az 1941 előtt születettek), antitoxint is kell adni (az aktív és passzív oltás "együttes" alkalmazását szimultán oltásnak nevezzük).

Adható a védőoltás a lakosság egyes veszélyeztetett rétegeinek. Így az influenza vakcina az időseknek és egészségügyi dolgozóknak, ezt évente célszerű megújítani. Kullancs-encephalitis elleni aktív oltást adnak erdészeknek, favágóknak, illetve azoknak, akik sokat kirándulnak. Az egészségügyi dolgozók kérhetik a hepatitisz B elleni védőoltást. A hepatitisz elleni oltás minden orvostanhallgatónak a beiratkozáskor kötelező.

Léteznek még a külföldi utakkal kapcsolatos védőoltások is, ilyenek pl. a kolera és a sárgaláz elleni aktív vakcinák, melyekkel a fertőzött területre utazókat oltják útjuk előtt. A Covid járvány megjelenése óta az egyes országokban eltérő, időben is gyakran változó szabályok érvényesek a beutazók oltottságára. Emiatt utazás előtt célszerű erről érdeklődni.

Az oltások során felléphetnek oltási reakciók, szövődmények, balesetek vagy sérumbetegségek is. Az oltási reakció enyhe betegség tüneteket (pl. láz, bőrpír) jelent, amelyek bizonyos aktív vakcináknál természetes velejárói az oltásnak és épp annak eredményességét jelzik. Az oltási szövődmény már kóros folyamat, amit az egyénnek az átlagosnál erősebb reakciókészsége vált ki. Az oltási baleset azt jelenti, hogy az oltóanyag rossz minősége következtében lép fel valamilyen kóros folyamat (pl. az attenuált törzsek reverziója vagy a toxin nem kielégítő inaktiválása); továbbá ide sorolandó az is, ha az orvos hibásan alkalmazza az oltást (pl. téves technika vagy rossz dózis). A sérumbetegség a fajidegen fehérjét tartalmazó passzív oltóanyagoktól jöhet létre: a tünetek az oltás helyén keletkező enyhe duzzanattól az anafilaxiás sokkig sokfélék lehetnek.

19. TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	1
1.1.1.	A céltermék molekula alapos megismerése.	3
1.1.2.	A megfelelő termelő szervezet kiválasztása/létrehozása.....	4
1.1.3.	Upstream optimalás	4
1.1.4.	Downstream optimalás	5
1.2.	Gazdasági háttér	6
2.	EGYSEJT-FEHÉRJE TERMELÉS.....	10
2.1.	Bevezetés	10
2.1.1.	Proteinigény.....	10
2.1.2.	Történeti áttekintés	11
2.1.3.	Az SCP és termelő mikrobák tulajdonságai	12
2.1.4.	Az SCP-gyártási technológia.....	14
2.1.4.1.	SCP termelés CO ₂ -on	14
2.1.4.2.	Egysejt-fehérje szénhidrátokon	16
2.1.4.3.	Egysejt-fehérje termelés kőolajszármazékokon	21
2.1.4.4.	Egysejt-fehérje termelés metanolon	26
2.1.5.	Az egysejt-fehérje előállítás gazdasági helyzete	31
2.1.6.	Termékminőség és -biztonság	32
3.	AMINOSAVAK, ANYAGCSERE MÉRNÖKSÉG	33
3.1.1.	Anyagcsere mérnökség.....	33
3.1.2.	Aminosavak gyártása.....	34
3.1.3.	Az aminosavak felhasználása	35
3.1.4.	Történet és piac.....	36
3.1.5.	Aminosavak gyártása.....	38
3.2.	Glutaminsav fermentáció.....	40
3.2.1.	Bioszintézis és szabályozása	40
3.2.2.	Fermentáció	41
3.2.3.	Feldolgozás.....	42
3.3.	Lizin fermentáció (α,ε-diamino-kapronsav).....	43
3.3.1.	Bioszintézis, anyagcsere-mérnökség.....	43
3.3.2.	Lizin fermentáció.....	44
3.4.	Treonin előállítása	46
3.5.	Aszparaginsav előállítása biokonverzióval	47
3.6.	L-Alanin gyártás	49
3.7.	Szerin előállítása.....	49
3.8.	L-triptofán termelés	49
3.9.	L-fenilalanin termelés.....	51
3.10.	Reszolválás	53
3.10.1.	A metionin reszolválása (Degussa eljárás).....	54
3.10.2.	A Degussa AG kísérleti enzim membrán reaktora	55
3.10.3.	Lizin előállítása kaprolaktámból aszimmetrikus hidrolízissel	56
4.	SZERVES SAVAK GYÁRTÁSA	58
4.1.	CITROMSAV.....	58
4.1.1.	Előfordulása.....	58
4.1.2.	Felhasználás.....	58
4.1.3.	Története.....	59
4.1.4.	Termelés	60
4.1.5.	Bioszintézis.....	61

4.1.6. Anyagcsere szabályozások	63
4.1.7. Termelő törzsek	64
4.1.8. Tápoldat	64
4.1.8.1. Szénforrás	64
4.1.8.2. N-forrás	64
4.1.8.3. Nyomelemek:	65
4.1.9. Technológiák	65
4.1.9.1. Felületi fermentáció.....	65
4.1.9.2. Szilárd fázisú fermentáció.....	66
4.1.9.3. Szubmerz fermentáció.....	66
4.1.9.4. Fermentációs paraméterek.....	67
4.1.10. Feldolgozás.....	69
4.1.10.1. A micélium elválasztása.....	69
4.1.10.2. Oxalátmentesítés	69
4.1.10.3. A citromsav kicsapása.....	69
4.1.10.4. Feltárás kénsavval	70
4.1.10.5. Tisztítás adszorpcióval	70
4.1.10.6. Koncentráció bepárlással	70
4.1.10.7. Kristályosítás	71
4.1.10.8. Szárítás	71
4.1.11. Melléktermékek, szennyvíz.....	71
4.2. ECETSAV GYÁRTÁS	73
4.2.1. Az ecetsav-baktériumok	74
4.2.2. Az ecetsav képződés biokémiája.....	75
4.2.3. Tápanyagok, szubsztrátok	76
4.2.4. Levegőztetési megoldások.....	78
4.2.5. Technológiák	80
4.2.6. Homoacetogének	81
4.3. GLÜKONSAV GYÁRTÁS	83
4.3.1. A glükonsav képződés biokémiája	83
4.3.2. Glükonsav fermentációs technológiák	85
4.3.3. A glükonsav izolálása fermentléből	86
4.3.4. A glükonsav felhasználása	87
4.4. Almasav gyártás	88
5. NUKLEOTIDOK (NUKLEOZIDOK) ELŐÁLLÍTÁSA	90
5.1. A nukleotidok felhasználása.....	90
5.2. A nukleotidok gyártása.....	91
5.2.1. Az RNS enzimes hidrolízise.....	91
5.2.1.1. Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítás	92
5.2.1.2. Az RNS kivonása	92
5.2.1.3. Enzimes hidrolízis (enzimtermelés, kinyerés)	92
5.2.2. De novo fermentáció	93
5.2.2.1. Mutációs beavatkozások IMP- és XMP-termelő törzseknél.....	94
5.3. ATP-bioszintézis	97
6. VITAMINOK	99
6.1. B ₁₂ -vitamin (kobalamin).....	99
6.1.1. Felépítés, szerkezet.....	99
6.1.2. Bioszintézis.....	101
6.1.3. Előállítás	101
6.1.3.1. B ₁₂ fermentáció Propionibacterium törzsekkel.....	101

6.1.3.2.	B12 fermentáció <i>Pseudomonas denitrificans</i> törzssel.....	102
6.1.3.3.	B12 fermentáció <i>Rhodopseudomonas protamicus</i> törzssel	102
6.1.3.4.	B12 fermentáció metanolhasználó baktériumokkal	102
6.1.3.5.	Feldolgozás.....	102
6.1.4.	Felhasználás.....	103
6.2.	B2-vitamin (riboflavin, laktoflavin)	103
6.2.1.	Gyártások.....	104
6.2.1.1.	Riboflavin termelés <i>Ashbya gossypii</i> törzssel	104
6.2.1.2.	Riboflavin termelés <i>Bacillus subtilis</i> törzssel	104
6.2.1.3.	Riboflavin termelés <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> törzssel	105
6.3.	C-vitamin (L-askorbinsav).....	105
7.	ANAEROB TECHNOLÓGIÁK	108
7.1.	Tejsav gyártás	109
7.1.1.	Tulajdonságok	109
7.1.2.	Bioszintézis.....	109
7.1.3.	A tejsav termelő törzsek	110
7.1.4.	A tejsav termelő törzsek tápanyagigénye	112
7.1.5.	A tejsav fermentáció	112
7.1.6.	A tejsav izolálása (downstream processing).....	113
7.1.7.	A tejsav felhasználása.....	116
7.2.	Aceton-butanol-etanol (ABE) fermentáció	117
7.2.1.	Bevezetés	117
7.2.2.	Bioszintézis.....	118
7.2.3.	ABE termelő törzsek	120
7.2.4.	Aceton-butanol fermentáció, a klasszikus technológia	121
7.2.4.1.	ABE fermentáció kukorica szénforráson	123
7.2.4.2.	ABE fermentáció melasz szénforráson	123
7.2.4.3.	Erjesztési technikák.....	124
7.2.5.	További fejlesztési irányok.....	125
7.2.5.1.	További lehetőségek: olcsóbb szénforrások.....	125
7.2.5.2.	További lehetőségek: Génmanipuláció	126
7.2.5.3.	További lehetőségek: Downstream fejlesztések.....	126
8.	IPARI ENZIMEK.....	129
8.1.	Az enzimek használatának története	129
8.2.	Lehetséges enzim források	130
8.3.	Az enzimek piaca és alkalmazásai	130
8.3.1.	Stratégiák a mikrobiális enzimek tulajdonságainak javítására	133
8.3.2.	Rekombináns fehérjék gyártása mikroba gazdaszervezetekkel	135
8.4.	Enzim fermentációk.....	136
8.5.	Ipari enzimek	138
8.5.1.	Amilázok	138
8.5.1.1.	α -amilázok.....	138
8.5.1.2.	Maltamilázok.....	140
8.5.1.3.	Amiloglukozidáz, glükóamiláz	142
8.5.1.4.	Pullulanáz, izoamiláz	143
8.5.2.	Glükóz és izocukor előállítás.....	143
8.5.2.1.	Enzimekkel módosított keményítők.....	144
8.5.2.2.	Glükóz szirupok igény szerint.....	144
8.5.2.3.	Technológia.....	144
8.5.2.4.	Glükóz-izomeráz (xilóz-izomeráz)	147

8.5.3. Pektinázok	150
8.5.4. Celluláz.....	152
8.5.4.1. Trichoderma enzimek.....	153
8.5.4.2. Felhasználás	154
8.5.5. β -galaktozidáz (laktáz).....	154
8.5.5.1. Termelő organizmusok.....	155
8.5.5.2. Felhasználás	155
8.5.5.3. Technológiák.....	156
8.5.6. Proteázok	156
8.5.6.1. Alkalikus proteázok.....	159
8.5.6.2. Neutrális proteázok	163
8.5.6.3. Savas proteázok.....	165
8.5.6.4. A kimozin szerepe a sajtgyártásban	171
8.5.6.5. Fémproteázok	173
8.5.7. Lipázok.....	176
8.5.7.1. Fermentáció.....	177
8.5.7.2. Izolálás, tisztítás	178
8.5.7.3. Enzim rögzítés.....	178
8.5.7.4. Alkalmazások.....	178
8.5.7.5. Esettanulmány: kakaóvaj pótló anyag előállítás	180
8.5.7.6. Esettanulmány: átészterezés alkoholokkal – biodízel üzemanyag enzimes előállítása 181	
8.5.7.7. Esettanulmány: észter képzés lipázzal – izopropil-palmitát/mirisztát	182
9. MIKROBIÁLIS POLISZACHARIDOK	184
9.1. Általános bevezetés	184
9.1.1. Tulajdonságok	185
9.1.1.1. Reológiai tulajdonságok.....	185
9.1.1.2. A poliszacharidok szerkezete:.....	186
9.1.1.3. Funkcionális tulajdonságok és alkalmazások.....	189
9.1.2. A poliszacharidok bioszintézise	190
9.1.3. Termelő törzsek	192
9.1.4. A poliszacharidok gyártása (általános elvek).....	192
9.1.4.1. Kinyerés és tisztítás	195
9.2. TERMÉKEK, TECHNOLÓGIÁK.....	196
9.2.1. XANTÁN	196
9.2.1.1. Szerkezete:	196
9.2.1.2. A xantán bioszintézise.....	197
9.2.1.3. Xantán gyártása	198
9.2.1.4. A xantán felhasználása	201
9.2.2. DEXTRÁN	203
9.2.2.1. Tulajdonságok	203
9.2.2.2. Bioszintézis	204
9.2.2.3. Fermentáció:.....	204
9.2.2.4. Feldolgozás.....	205
9.2.3. Leván:	205
9.2.4. Gellán	207
9.2.5. „Helyettesítő” poliszacharidok.....	208
9.3. Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)	209
9.3.1.1. Szerkezet és tulajdonságok.....	209
9.3.1.2. Bioszintézis	211

9.3.1.3.	Törzsek	212
9.3.1.4.	Gyártási technológiák.....	212
9.3.1.5.	Oldószeres eljárások.....	213
9.3.1.6.	MERCIAN eljárás	215
9.3.1.7.	A ciklodextrinek alkalmazása	216
10.	ANTIBIOTIKUMOK.....	219
10.1.	Általános bevezető.....	219
10.1.1.	Osztályozás:.....	220
10.1.1.1.	Antibiotikum érzékenység és rezisztencia	221
10.2.	Sejtfal szintézist gátló antibiotikumok	224
10.2.1.	Penicillin.....	224
10.2.1.1.	A penicillin felfedezése – a penicillin story	225
10.2.1.2.	A fermentált alapvegyületek	226
10.2.1.3.	A penicillin bioszintézise	227
10.2.1.4.	Gyártásfejlesztés.....	227
10.2.1.5.	Az anyagcsere-folyamatok irányítása a fermentáció során	232
10.2.1.6.	Feldolgozás.....	235
10.2.1.7.	Hatásmechanizmus	236
10.2.1.8.	Félszintetikus penicillinek.....	238
10.2.2.	Cefalosporinok	241
10.2.2.1.	Cefalosporin fermentáció	242
10.2.3.	További β -laktám vázas antibiotikumok	244
11.	CITOSZTATIKUMOK.....	245
11.1.	Mikrobiális citosztatikumok.....	245
11.2.	Növényi citosztatikumok.....	245
11.3.	Epotilonok	245
12.	NÖVÉNYI SEJTTENYÉSZETEK	246
12.1.	Történeti áttekintés	247
12.2.	A növényi tenyészetek fajtái	247
12.2.1.	Explantátum.....	247
12.2.2.	Merisztéma	248
12.2.3.	Kallusz tenyészet	250
12.2.4.	Hajszálgyökér (hairy root) kultúrák	251
12.2.5.	Szuszpenziós tenyészet.....	252
12.2.6.	Protoplaszt tenyészet	253
12.3.	A növényi szövetek tenyésztése	254
12.3.1.	Táploldatok	254
12.3.2.	Tenyésztési körülmények	256
12.3.3.	Laboratóriumi edények, eszközök.....	257
12.3.4.	A léptéknövelés lépései	258
12.3.5.	Növekedés, sejtaggregáció, falnövekedés	258
12.3.6.	Levegőztetés	259
12.4.	Bioreaktorok.....	259
12.4.1.	Keverős tartályreaktorok	259
12.4.2.	Airlift reaktorok.....	259
12.4.3.	Perfúziós bioreaktorok.....	260
12.5.	Fermentációs technikák	260
12.6.	A tenyészet jellemzése: sejttömeg mérés	260
12.7.	Növényregenerálás	262
12.7.1.	Edzés, kiültetés	262

12.8. Esettanulmány: a taxol gyártása növényi sejttenyészettel.....	263
12.8.1. A taxol előállítási lehetőségei.....	263
12.8.2. A taxánok előállítása növényi sejt kultúrával.....	265
12.8.2.1. Nagy hozamú sejt vonalak kiválasztása.....	266
12.8.2.2. A tenyésztési körülmények.....	266
12.8.2.3. A fermentációs folyamat.....	266
12.8.2.4. Tápoldat.....	266
12.8.2.5. Fitohormonok.....	267
12.8.2.6. Elicitorok használata.....	267
12.8.2.7. Prekursorok és inhibitorok.....	267
12.8.2.8. A taxol izolálása.....	268
13. BIOPESTICIDEK, B. thuringiensis TOXIN.....	270
13.1. A biológiai eredetű szerek csoportosítása.....	270
13.1.1. Növényi eredetű szerek.....	271
13.1.2. GMO növények.....	271
13.1.3. Mikrobiális eredetű szerek.....	271
13.2. A Bacillus thuringiensis törzs.....	272
13.3. A δ -endotoxin.....	273
13.3.1. Bti toxin.....	274
13.3.2. A δ -endotoxin hatásmechanizmusa.....	274
13.4. A Bacillus thuringiensis toxinok fermentációs előállítása.....	276
13.4.1. Fermentáció, upstream.....	276
13.4.2. Feldolgozás, down stream.....	277
13.4.3. Formulázás.....	277
13.4.3.1. Folyékony készítmények.....	278
13.4.3.2. Szilárd készítmények.....	278
13.5. Minőség-ellenőrzés - analitikai módszerek.....	279
14. SZTEROIDKONVERZIÓK.....	280
14.1. A szteroidok felépítése és csoportjai.....	280
14.2. Előállítás, alapanyagok.....	281
14.2.1. A fitoszterinek képviselői, kinyerése és felhasználása.....	282
14.2.2. Források.....	283
14.2.2.1. Kinyerés dezodorálási párlatból.....	283
14.2.2.2. Kinyerés fagyantából.....	283
14.2.2.3. Az oldallánc lehasítása.....	284
14.3. A konverziók általános lefolyása.....	285
14.4. Szitoszterolból előállított vegyületek.....	287
14.4.1. Androszténdion (AD).....	287
14.4.2. 9α -hidroxí-androsztén-dion (9α OH-AD).....	289
14.5. Gyulladás gátlók.....	290
14.6. Nemi hormonok.....	292
14.6.1. Androgén szteroid hormonok.....	292
14.6.1. Anabolikus dopping szerek.....	293
14.6.2. Női szteroid hormonok.....	295
14.7. Mineralokortikoid antagonisták.....	297
14.8. Szintetikus szteroid (analóg)ok.....	297
14.9. Törzsfeljesztés.....	299
REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA.....	301
15. Rekombináns fehérjék gyártásának technikai megoldásai.....	302
15.1. A molekulától a termelő törzsig.....	302

15.1.1. A molekula megismerése, megtervezése.....	302
15.1.2. A megfelelő analitika kidolgozása	302
15.1.3. Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról.....	303
15.1.3.1. Prokarióták (baktériumok)	303
15.1.3.2. Élesztők	304
15.1.3.3. Állati sejttenyészetek.....	304
15.1.4. Fehérjék glikozilálása	307
15.1.4.1. N-glikozilálás	308
15.1.4.2. O-glikozilálások	310
15.1.5. Kodonoptimalás.....	311
15.1.6. A vektor létrehozása, génbevitel, expresszió	312
15.1.7. Sejtbankok.	312
15.1.7.1. Research Cell Bank (RCB)	313
15.1.7.2. Master Cell Bank (MCB)	313
15.1.7.3. Working Cell Bank (WCB).....	314
15.2. Gyártási technológiák (upstream, downstream) fejlesztése, optimalása	315
15.2.1. Rekombináns fehérjék gyártása génmanipulált baktériumokkal.....	315
15.2.1.1. Indukció.....	315
15.2.1.2. Táploldatok.....	318
15.2.1.3. Fermentáció	318
15.2.1.4. Feldolgozás.....	319
15.2.1.5. A folding befolyásolása fehérjemérséggel	326
15.2.2. Rekombináns fehérjék gyártása génmanipulált állati sejtekkel.....	327
15.2.2.1. Fermentáció (upstream).....	327
15.2.2.2. Feldolgozás.....	346
16. REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – esettanulmányok	352
16.1. Inzulin.....	352
16.1.1. Az inzulin szerkezete.....	353
16.1.2. Az inzulin érése	354
16.1.3. Az inzulin előállítása	355
16.1.3.1. Kivonás hasnyálmirigyből – átalakítás.....	355
16.1.3.2. Az inzulin fermentációs előállítása	356
16.1.3.3. Az inzulin feldolgozása	359
16.1.4. Inzulin analitika	360
16.1.5. Módosított inzulin molekulák.....	360
16.1.5.1. Gyors hatású inzulinok:.....	360
16.1.5.2. Elnyújtott hatású inzulinok:	361
16.2. Eritropoietin (EPO) gyártása	363
16.2.1. Az EPO szerkezete	364
16.2.2. Az EPO előállítása.....	365
16.2.2.1. Az EPO génbevitel vektora	365
16.2.2.2. EPO fermentáció (upstream).....	365
16.2.2.3. Az eritropoietin izolálása (downstream processing)	366
16.2.3. Eritropoietin készítmények.....	366
17. VÉRFEELDOLGOZÁS, PLAZMAFEHÉRJÉK	368
17.1. A vér	368
17.2. A vér és komponenseinek pótlása	370
17.3. Az alakos elemek pótlása	372
17.3.1. Vörösvérsejt-koncentrátumok	372
17.3.2. Trombocita-készítmények	372

17.4. Plazmakészítmények	372
17.4.1. Technológiák kialakulása, fejlődése.....	372
17.4.2. A humán plazma, mint alapanyag	373
17.4.2.1. Friss Fagyasztott Plazma (FFP).....	373
17.4.2.2. Krioprecipitátum	374
17.4.2.3. A Cohn-féle csapadékos fracionálás	374
17.4.2.4. Albumin.....	376
17.4.2.5. Immunglobulinok	376
17.4.2.6. Véralvadási faktorkoncentrátumok	377
17.5. Esettanulmány: a Faktor-IX előállítása vérplazmából	381
17.5.1. A hemofília-B betegség	382
17.5.2. Izolálás vérplazmából	384
18. VAKCINAGYÁRTÁS	388
18.1. A passzív immunizálás oltóanyagai	388
18.2. Az oltóanyagok története.....	388
18.3. A vakcinák típusai	389
18.3.1. A teljes kórokozót tartalmazó vakcinák	391
18.3.1.1. Inaktivált vakcinák	391
18.3.1.2. Élő, attenuált vakcinák	391
18.3.1.3. Toxoid vakcinák	392
18.3.1.4. Alegység vakcinák	392
18.3.1.5. Víruszerű részecskék (virus-like particle, VLP).....	392
18.3.1.6. Poliszacharid vakcinák, konjugált vakcinák	393
18.3.1.7. Nukleinsav vakcinák	393
18.4. Technológiák	395
18.4.1. Baktériumok elleni vakcinák előállítási technológiája.....	395
18.4.2. Toxinok, toxoidok	395
18.4.3. Vírusok elleni vakcinák előállítási technológiája.....	397
18.4.3.1. Vakcina gyártás tojásban.....	397
18.4.3.2. Vakcinagyártás sejtenyészetekben	398
18.4.3.3. Alegység vakcina gyártás	400
18.4.3.4. Adjuválás.....	400
18.4.3.5. Esettanulmány: a hepatitis B vírus (HBV) vakcina gyártása	401
18.4.3.6. Konjugált vakcinák gyártása	404
18.4.3.7. Nukleinsav vakcinák	404
18.4.3.8. Nukleinsav vakcinák gyártása	407
18.4.3.9. A SARS-Covid-19 vakcinák összehasonlítása.....	408
18.5. A magyar egészségügy oltási rendszere	410
19. TARTALOMJEGYZÉK	412
20. Ábrajegyzék.....	420

20. Ábrajegyzék

1. ábra Biotechnológiai gyártási technológiák	1
2. ábra Primer és szekunder metabolit fermentációk lefutása	1
3. ábra A termelés és az ár kapcsolata biotechnológiai termékeknél	2
4. ábra A fermentációs technológia fejlesztés fázisai	3
5. ábra A törzsfejlesztési módszerek fejlődése	4
6. ábra Az upstream optimálás részfeladatai	5
7. ábra A downstream optimálás részterületei	6
8. ábra K+F beruházások a különböző iparágakban	7
9. ábra A bulk termékek piacának növekedése	7
10. ábra A gyógyszeripar legnagyobb árbevételű termékei	8
11. ábra A biotechnológia részterületeinek életciklus-görbéje	9
12. ábra A húsfogyasztás alakulása	11
1. táblázat Különböző fehérjeforrások összetétele	12
2. táblázat A különböző szubsztrátokon szaporítható mikroorganizmusok	13
13. ábra A Texcoco tóra épülő technológia	15
14. ábra Étkezési Spirulina termékek	15
15. ábra Az élesztőgyártás teljes folyamata	17
16. ábra BEL Fromagerie eljárás	18
17. ábra Étkezési Quorn termékek	19
18. ábra Symba eljárás	20
19. ábra Az alkánok biológiai lebontási útvonalai	22
20. ábra Egysejt-fehérje gyártás n-paraffinokon	24
21. ábra Az „U-loop” fermentor kialakítása	25
22. ábra A metán alapú egysejt-fehérje gyártás folyamata	26
23. ábra A metanol hasznosításának biokémiai útvonalai	27
24. ábra A ribulóz-monofoszfát körfolyamat lépései	28
25. ábra A metanol hasznosulásának metabolikus fluxusai a szerin úton	28
26. ábra Az ICI fermentor felépítése	30
27. ábra Az ICI fermentor szállítása és felállítása	30
28. ábra Az ICI fermentor bontása	31
29. ábra A törzsfejlesztési módszerek fejlődése	33
30. ábra A klasszikus anyagcsere-mérnökség beavatkozási pontjai	34
3. táblázat Néhány, mutációval létrehozott aminosav túltermelő törzs	34
31. ábra Liebig minimum elvének szemléltetése	35
32. ábra Kukorica fehérje hasznosulásának fokozása lizin hozzáadásával.	36
4. táblázat Az aminosav termelés megoszlása (1998)	36
5. táblázat Az aminosav termelés áttekintése (2006)	37
33. ábra Az aminosav termelés léptéke és az árak összefüggése	37
34. ábra Aminosav feldolgozási műveletsorok	38
35. ábra A glutaminsav bioszintézisének reakciói és szabályozása	41
36. ábra Na-glutamát kinyerése fermentléből	42
6. táblázat Takarmányok lizin tartalma	43
37. ábra Az aszparaginsav aminosav család bioszintézise és szabályozási mechanizmusai a C. glutamicumban	43
38. ábra A lizin túltermelés érdekében végrehajtott anyagcsere módosítások	44
39. ábra A lizin feldolgozás lépéssora	45
40. ábra Az aszparaginsav aminosav család bioszintézise és szabályozási mechanizmusai E. coli-ban	46

41. ábra Fumársav átalakítása aszparaginsavvá	48
42. ábra Az aszparaginsav gyártás folyamatábrája.	48
43. ábra A metanol hasznosítás szerin útja	49
44. ábra Triptofán túltermelő törzs anyagcseréjének átalakítása	50
45. ábra A triptofán-szintetáz reakció	50
46. ábra A triptofán előállítása enzimes konverzióval	51
47. ábra Fenilalanin túltermelő törzs anyagcseréjének átalakítása	52
48. ábra Fenilalanin előállítása fenilpiroszőlősavból	52
49. ábra Fenilalanin előállítása transz-fahéjsavból	53
7. táblázat Fenilalanin termelő technológiák összehasonlítása	53
50. ábra Aszimmetrikus hidrolízis	54
51. ábra Metionin reszolválása	55
52. ábra Enzim rögzítés ultraszűrő membránnal	55
53. ábra Tanabe eljárás rögzített enzimmal	56
54. ábra Lizin gyártás kaprolaktám aszimmetrikus hidrolízisével	57
55. ábra A félszintetikus lizinggyártás folyamatábrája	57
8. táblázat A citromsav termelés növekedése	60
56. ábra A citrátkör az anaplerotikus utakkal	61
57. ábra A citrát kilépése a mitokondriumból antiporttal	62
58. ábra A citromsav bioszintézist befolyásoló anyagok	63
59. ábra A citromsav fermentáció lefutása	67
60. ábra Pelletes növekedés rázott lombikban	68
61. ábra A nyers citromsav kinyerése	69
9. táblázat A trikálcium-citrát oldhatósága a hőmérséklet függvényében	70
62. ábra Kristályos citromsav előállítása	71
63. ábra Az ecetsav ipari felhasználása	73
64. ábra Ecetsavbaktériumok	74
65. ábra Gluconobacter Acetobacter Frateuria	74
66. ábra Az ecetsav képződése	75
67. ábra Az ecetsav képződésének enzimeit és koenzimeit	76
68. ábra Ízesítő ecetek	76
69. ábra Frings Alcosens	77
70. ábra Orleans-i ecetgyártás	78
71. ábra Mozgócefrés ecetsav generátor	78
72. ábra A Frings turbina és turbinaház (forgó- és állórész) kialakítása	79
73. ábra A Frings acetátor metszete	79
74. ábra Frings turbinák, motorral szerelve (katalógus fotó)	80
75. ábra Keresztáramú (cross flow) szűrés üreges szál (hollow fiber) modulban	81
10. táblázat Homoacetogén technológiák összehasonlítása	82
76. ábra A glükonsav bioszintézise Gluconobacter suboxidans-ban (A)és Aspergillus niger-ben (B)	83
77. ábra Glükonsav bioszintézise Aspergillus-okban.	84
78. ábra Becsapódó sugaras levegőztető rendszer	85
79. ábra Indulási cukorkoncentráció hatása a glükonsav fermentáció lefutására	85
80. ábra A fumaráz reakció	88
81. ábra Csapadékos almasav gyártás	88
82. ábra A csapadékos almasav gyártási technológia lépései	89
83. ábra A purin-nukleotidok szerkezete	90
11. táblázat A purin-nukleotidok szubsztituensei	90
84. ábra Guanin, inozin és Na-glutamát az ételízesítőkből	90

12. táblázat Nukleotidok felhasználása	91
13. táblázat: Mikroorganizmusok nukleinsav tartalma	92
85. ábra Az RNS hidrolízis enzimjei	93
86. ábra A purin-nukleotidok bioszintézise és ennek szabályozása <i>Bacillus subtilis</i> törzsben Rövidítések: SAICARP: 1-(5'-foszforibozil)-4-(N-szukcinokarboxamid)-5-aminoimidazol, AICARP: 5-amino-1-(5'-foszforibozil)-imidazol-4-karboxamid	94
87. ábra IMP és XMP előállítása anyagcsere mérnöki beavatkozásokkal	95
14. táblázat: Mutáns törzsek 5'-IMP hozamai	95
Ade ⁻ : adeninra auxotróf, Gua ⁻ : guaninra auxotróf, Nuc ⁻ : nukleotidáz-negatív (nem bontja le a terméket), 6 MP ^r : 6-merkaptopurin-rezisztens (antimetabolit)	95
88. ábra A purinvázis vegyületek lebontási útvonala	96
89. ábra B. ammoniagenes KY 13102 törzssel végzett 5'-IMP fermentáció lefutása	96
90. ábra pH-változás az IMP fermentáció során	97
91. ábra Ipari ATP előállítás élesztővel	97
92. ábra ATP anyagcsere a glikolízis folyamatában	98
93. ábra A kobalamin származékok szerkezete	100
15. táblázat B12 termelő törzsek	101
94. ábra: A B2-vitamin szerkezete	103
16. táblázat Riboflavin termelő törzsek	104
95. ábra Az L-aszkorbinsav szerkezete	105
96. ábra A Reichstein eljárás	106
97. ábra Szorbit – szorbóz oxidáció	106
98. ábra C-vitamin gyártás rekombináns <i>Erwinia herbicola</i> törzssel	107
99. ábra Az anaerob termékek sokfélesége	108
100. ábra A tejsav optikai izomerei	109
101. ábra A tejsav képződés a glikolízishez kapcsolt reakció	109
102. ábra A homo- és heterofermentatív tejsav képződés	110
17. táblázat A tejsav termelő törzsek jellemzői	111
103. ábra A tejsav gyártás anyagforgalma	114
104. ábra A tejsav származékai és alkalmazása	117
18. táblázat Üzemanyag komponensek tulajdonságainak összehasonlítása	118
105. ábra Az ABE termékek bioszintézise	119
106. ábra Spórás <i>Clostridium</i> ok mikroszkópos képe	120
19. táblázat Különböző <i>Clostridium</i> törzsek butanoltermelésének összehasonlítása	121
107. ábra Szakaszos ABE fermentáció lefutása	122
108. ábra A kukorica alapú ABE fermentáció anyagforgalma	123
109. ábra A melasz alapú ABE fermentáció anyagforgalma	124
20. táblázat Integrált ABE fermentációk hatékonysági paraméterei	128
21. táblázat Ipari enzimek és használatuk	132
110. ábra Az enzimek használatának megoszlása iparágak szerint	133
	133
111. ábra Az enzimek fejlesztése fehérjemérnöki úton	134
112. ábra Folyékony enzim preparátum ipari kiserelésben	137
113. ábra A keményítóbontó enzimek támadáspontjai	139
114. ábra A keményítőszemcse szerkezete	141
22. táblázat Amiloglikozidáz hidrolízis sebességének összehasonlítása	142
115. ábra A keményítő feldolgozásának a fő lépései	145
116. ábra A folyósítás berendezései	146
117. ábra Izoszörp előállítása	148
118. ábra A fruktóz tartalom beállítása	149

119. ábra A pektin alaplánca	151
120. ábra Endopektinázok hatása	151
121. ábra Pektin liáz	152
122. ábra A celluláz enzimek támadáspontjai	153
123. ábra A tejcukor hidrolízise	154
124. ábra A proteázok alapreakciója	157
23. táblázat Kereskedelmi forgalomban lévő enzimek tulajdonságai	158
24. táblázat Enzimek alkalmazása a bőrfeldolgozás egyes fázisaiban	160
125. ábra Bőrök kezelése áztatókádban	161
126. ábra Proteázok általános gyártási sémája	163
127. ábra Kimozin A, két Asp az aktív centrumban	165
128. ábra A kimozin aktiválódása különböző közegekben	166
129. ábra A κ -kazein hidrolízise	167
25. táblázat A különböző eredetű enzimek tulajdonságainak összehasonlítása	168
130. ábra Kimozin gyártás technológiája fonalas gombával	169
131. ábra Kimozin gyártás technológiája E. coli-val	170
132. ábra A tej alvasztásának lehetőségei	171
26. táblázat A tehéntej fő fehérje frakciói	172
133. ábra A tej micelláris szerkezete	172
134. ábra Az aszpartám szerkezete	173
135. ábra Az aszpartám előállítása	174
136. ábra Az aszpartám gyártás reakciói	175
137. ábra Aszpartám gyártás technológiai lépései	176
138. ábra Régiószelektív lipázok reakciója	176
139. ábra Lipázok átészterezési reakciói	179
27. Táblázat Zsiradékok triglicerid összetétele	180
140. ábra Napraforgó olaj átészterezése	180
141. ábra Kakaóvaj pótló anyag előállítása napraforgó olajból	181
142. ábra Biodízel üzemanyag gyártása napraforgó olajból	181
143. ábra A biodízel gyártás technológiai folyamata	182
144. ábra Észter előállítása lipáz enzimmel	183
145. ábra A reológiai folyásgörbék alaptípusai	185
146. ábra A látszólagos viszkozitás értelmezései pszeudoplasztikus fluidumnál	186
28. Táblázat A legismertebb mikrobiális poliszacharidok: a fizikai-kémiai és funkcionális tulajdonságok, a fő alkalmazási területek és a piaci adatok áttekintése	188
147. ábra A mikrobiális polimerek alkalmazási területei	189
148. ábra A nukleotid-cukrok kialakulása	190
149. ábra A poliszacharidok bioszintézise	191
29. táblázat Ipari jelentőségű poliszacharidokat termelő baktériumok	192
150. ábra Poliszacharid fermentlé látszólagos viszkozitásának változása a fermentáció során, log-log ábrázolásban	194
151. ábra A xantán kémiai szerkezete	196
152. ábra A xantán bioszintézise	197
153. ábra A xantán gyártás folyamatábrája	198
154. ábra Xantán batch fermentációja X. campestris-szel	199
155. ábra Keverők hatásának összehasonlítása	199
156. ábra Az oxigénátadás változása xantán fermentlében	200
157. ábra Poliszacharid oldatok alkalmazása a másodlagos olajkinyerésben	201
158. ábra A fúróöblítő folyadék áramlása	202

159. ábra Fúróberendezés és öblítő folyadék (ferde fúrás a Karinthy Frigyes út alatt, saját felvétel)	202
160. ábra A dextrán szerkezete	203
161. ábra A dextrán képződése	204
162. ábra A leván szerkezete	206
163. ábra A gellán szerkezete	207
164. ábra A ciklodextrinek szerkezete	209
165. ábra A ciklodextrinek mérete	210
30. táblázat A ciklodextrinek méretei	210
166. ábra Apoláris vendégmolekula befogása	211
167. ábra A CGT-áz enzim által katalizált reakciók	211
168. ábra A ciklodextrinek képződése	212
169. ábra A ciklodextrin gyártás általános sémája	212
170. ábra A ciklodextrin gyártás két változata	213
31. táblázat Specifikus komplexáló ágensek a ciklodextrinek gyártásánál	214
171. ábra A Mercian eljárás folyamatábrája	215
172. ábra Ciklodextrin-hatóanyag komplexek	217
173. ábra Az ismert antibiotikumok számának alakulása az elmúlt évtizedekben	219
174. ábra Az antibiotikumok támadáspontjai	221
175. ábra Az egyes antibiotikum csoportok hatásspektruma	222
176. ábra Az antibiotikumok támadáspontjai és a rezisztencia	223
177. ábra A G-penicillin szerkezete	224
178. ábra A 6-APA alapváz két aminosavból tevődik össze	224
179. ábra Fleming eredeti felvétele	225
180. ábra A G és V penicillin szerkezete	227
181. ábra A penicillin G bioszintézisének fő lépései	228
182. ábra A <i>Penicillium chrysogenum</i> mutációs törzsfája az 1950-es évekből	230
183. ábra A penicillin-termelő törzsek fejlesztése, hozamok alakulása	231
184. ábra A laktóz szénforrás hasznosulása a penicillin fermentáció során	232
185. ábra Penicillin fermentáció glükóz adagolással	233
186. ábra Az antibiotikum termelés csak a foszfát teljes elfogyása után indul meg	233
187. ábra Penicillin fermentáció glükóz, ammónium szulfát és prekursor adagolásával	234
188. ábra Koncentrációk alakulása a penicillin fermentáció során	235
189. ábra A penicillin gyártás folyamatábrája	236
190. ábra A bakteriális sejtfal szerkezete és kialakulása	237
191. ábra A penicillin és a D-Ala-D-Ala dipeptid szerkezete	237
192. ábra A penicillin bekötődése a transzpeptidáz kötőhelyére	238
193. ábra Fermentációval előállított penicillinek	238
194. ábra Félszintetikus penicillinek	239
195. ábra A cefalosporin molekula szerkezete	241
196. ábra Cefalosporin prekursorok	243
197. ábra Béta-laktám vázas metabolitok	244
198. ábra Explantátumok polaritása	248
199. ábra Explantátumok polaritása	248
200. ábra Merisztémák elhelyezkedése	248
201. ábra Merisztéma szövetek elhelyezkedése a növekvő csúcsokban	249
202. ábra Merisztémák tárolása mélyfagyasztással	249
203. ábra Kallusz tenyészetek fenntartása	250
204. ábra Több hetes kallusz tenyészetek	251

205. ábra Hajszálgyökér tenyészet sárgarépból	252
206. ábra Hajszálgyökér tenyészet laboratóriumi fermentorban	252
207. ábra Szuszpenziós tenyészet	253
208. ábra Növényi protoplasztok	253
32. táblázat Gyakran használt növényi tápoldatok összetétele	254
209. ábra Auxinok	255
210. ábra Gibberellinsav	255
211. ábra Citokininek	256
212. ábra Hajtástenyészetek kémcsőben	257
213. ábra Növények „befőttes” üvegben	257
214. ábra Műanyag nevelő doboz	257
215. ábra Kallusz tenyészet növekedése	261
216. ábra Szuszpenziós tenyészet növekedése	261
217. ábra Gyökeresített tenyészet (alulnézetben)	262
218. ábra A taxol szerkezete	263
219. ábra A tiszafa hajtása és termése	264
220. ábra A taxol különböző előállítási lehetőségei	265
221. ábra A paclitaxel előállítása növényi sejtenyészettel (Python eljárás)	268
222. ábra A paclitaxel kinyerése makropórusos gyantával	268
223. ábra Bacillus thuringiensis érett sejtje, benne a spóra és a kristályok	272
224. ábra A különböző típusú toxinok hatásossága	273
225. ábra A δ -endotoxin leegyszerűsített hatásmechanizmusa	274
226. ábra A δ -endotoxin részletes hatásmechanizmusa	275
227. ábra Az endotoxin harmadlagos szerkezete (az előző ábrával azonos színezéssel)	275
228. ábra Folyékony toxin készítmény	278
229. ábra Poralakú toxinkészítmény gyártási folyamata	278
230. ábra A szterán váz felépítése	280
231. ábra A humán szteroid hormonok bioszintézise	281
232. ábra A leggyakoribb növényi szteroidok	282
33. táblázat Növényi olajok szterin tartalma	283
233. ábra androsztén-dion 9α OH-androsztén-dion androsztén-dién-dion	284
234. ábra A biokonverziós technológia lépései	285
235. ábra Szteroid kristályok mikroszkópos képe (300x)	285
236. ábra Szteroid-ciklodextrin komplex	286
34. táblázat AD termelésére alkalmas mikrobatörzsek	287
8. ábra Az AD intermediér gyártása	288
238. ábra A 9α OH-AD létrehozása	289
239. ábra A 9α OH-AD átalakítása	289
240. ábra Gyulladásgátlók kialakítása	290
241. ábra A klasszikus gyulladásgátlók	290
242. ábra Depersolon	291
243. ábra Triamcinolon-acetonid	291
244. ábra A szteroid nemi hormonok bioszintézise	292
35. táblázat Férfihormonok androgén hatásának összehasonlítása	293
245. ábra A finaszterid szerkezete	293
246. ábra A Nerobol gyártási lépései	294
247. ábra Boldenon	294
248. ábra Nandrolon	294

249. ábra Stanozolol	295
250. ábra Női nemi szteroid hormonok	296
251. ábra 19-nor-szteroidok	296
252. ábra Etinil-ösztadiol	297
253. ábra Spirinolakton	297
254. ábra Dietil-sztilbösztrol	297
255. ábra A dietil-sztilbösztrol - átrajzolva	298
256. ábra A metil-szekodion előállítása	298
257. ábra Hidrokortizon termelése élesztőben, heterológ expresszióval	300
258. ábra A rekombináns fehérjék gyártásának fejlesztési lépései	301
259. ábra Rekombináns humán eritropoietin O-glikozilációs láncainak MS felvétele	303
260. ábra A különböző gazdaszervezetek összehasonlítása	305
261. ábra Az élő szervezetek és fehérjék komplexitása	305
262. ábra E. coli S. cerevisiae Chinese Hamster Ovary, CHO	306
263. ábra A különböző eukarióták jellemző glikozilációs mintázatai	306
264. ábra N- és O-glikánok	307
265. ábra A glikáció folyamata	307
266. ábra A 14-tagú oligaszacharid kialakulása	308
267. ábra Az oligoszacharid-transzferáz működése	309
268. ábra A fehérjék útja az érés során	310
269. ábra Az O-glikoziláció felépülése	310
270. ábra A vércsoportot meghatározó O-glikozilálások	311
271. ábra Tárolás cseppfolyós nitrogénben	313
272. ábra Szubkultúrák	313
273. ábra Nitrogén tartály és a bemelegítő tartóedények	313
274. ábra A sejtbankok egymásra épülése	315
275. ábra Különböző indukciós hatások	316
276. ábra Plazmidos és plazmidmentes sejtek növekedése	317
277. ábra A kettős indukció mechanizmusa	317
278. ábra Glicerines coli tápoldatok jellemző komponensei	318
279. ábra Egy tipikus rekombináns coli fermentáció lefutása. Az oldott oxigén szintet az indukció után már csak tiszta oxigén hozzávezetésével tudták tartani.	319
280. ábra A fermentlevek általános feldolgozási sémája	320
281. ábra: Zárványtestek E. coli-ban	320
282. ábra A folding és a zárványképződés alternatív utak	321
283. ábra A folding folyamata és mellékreakciói	323
284. ábra A fehérjehajtogatási formák energia- és entrópiaviszonyai	324
285. ábra A diszulfidhidak újrakapcsolódása	325
286. ábra A diszulfid hidak „újrakeverése”	326
287. ábra A 17-cisztein kicserélése szerinre megakadályozza a téves kapcsolódást	326
288. ábra A glikolízis és a glutaminolízis kapcsolata	328
289. ábra Készen kapható tápoldat, egyszer használatos T-flaskában	328
290. ábra Módosított Eagle médium (MEM) összetétele	329
291. ábra Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi tenyésztéshez)	331
292. ábra Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi tenyésztéshez)	332
293. ábra Multitray	332
294. ábra Forgó palack (roller bottle)	333
295. ábra Inokulálási/tapadási fázis kialakult monolayer	333
296. ábra Spinner flask	334
297. ábra Spinner flask „bim-bam” keverővel	335

298. ábra 12 ml-es minibioreaktor	335
299. ábra 200 ml-es minibioreaktorok	335
300. ábra 2 literes sejtfermentorok	336
301. ábra 1 m ³ -es termelő bioreaktor (a Richter debreceni üzemében)	336
302. ábra 15 m ³ -es termelő bioreaktor, nagy része a padozat szintje alatt	337
303. ábra Keverők: lekerekített formák, hajócsavar alak, 25-150 rpm	337
304. ábra Lépcsőzetes szaporítás	338
305. ábra A különböző fermentációs technikák sémája	339
306. ábra Külső és belső sejtleválasztók	340
307. ábra Kiszerezelt forgó acélszita	340
308. ábra Sejtviisszatartás membránmodullal	340
309. ábra ATF = alternating tangential filtration	340
310. ábra Ultrahangos sejtviisszatartás	341
311. ábra Centritech harangcentrifuga	341
312. ábra Az akkumulált termékmennyiség összehasonlítása	342
313. ábra Sejtszám és termékkoncentráció összehasonlítása	342
314. ábra 5000 forgó palackot mozgató berendezés	343
315. ábra Hullám bioreaktor	343
316. ábra Keverős egyszerhasználatos bioreaktor	344
317. ábra Steril terek összekapcsolására szolgáló csatlakozó	344
318. ábra 200 literes keverős egyszer használatos bioreaktor beállítása	345
319. ábra Tároló tartály helyett egyszer használatos fóliazsákok, 1000 literes térfogatig	345
320. ábra Egyszerűsített feldolgozási séma	346
321. ábra Tipikus fehérje izoláló műveletsor	346
322. ábra Az affinkromatográfia kromatogramja	347
323. ábra A Protein-A kromatográfia sémája	347
324. ábra Ipari kolonna, (a saját felvétel)	348
325. ábra A kolonnák léptéknövelésénél a keresztmetszetet növeljük, a magasság állandó marad	348
326. ábra Vírusmentesítési módszerek	349
327. ábra A különböző vírusok mérete	350
328. ábra Beriplex P/N (Faktor-IX) pasztörizációs vírus-inaktiválásának kinetikája	351
329. ábra Az inzulin hatása a különböző anyagcserefolyamatokra	352
330. ábra Az inzulin szerkezete	353
331. ábra A humán, marha és sertés inzulin csak néhány aminosavban különbözik egymástól	353
332. ábra A preproinzulin lánc felbontása	354
333. ábra Az inzulin érése	354
334. ábra A láncvégi alanin lecserélése treoninra	355
335. ábra Az észter védőcsoport eltávolítása	356
336. ábra Inzulin rekombináns előállítás két külön fehérjeláncként	356
337. ábra A preproinzulin enzimes hasításai	357
338. ábra Az élesztőben termeltetett inzulin prekursor fehérje	358
339. ábra Az inzulin útja az élesztősejten belül	359
340. ábra Az inzulin molekulák hisztidinjei kapcsolódnak a Zn ionhoz	359
341. ábra Cink-inzulin kristályok	360
342. ábra Módosított inzulinok hatásgörbéi	361
343. ábra Módosított inzulinok szerkezete	361
344. ábra. De az, aki idáig eljutott az olvasással, az biztosan érti.	362

345. ábra Az EPO glikozilációs mintázata	363
346. ábra Az EPO 3D szerkezete	364
347. ábra Az EPO izoformák hatásának összehasonlítása	364
348. ábra Különböző mértékben szializált EPO molekulák	364
349. ábra Továbbfejlesztett EPO készítmények	367
350. ábra A vér lecentrifugált alakos elemei	368
351. ábra A vér alkotó elemei	369
352. ábra A testfolyadékok ionösszetétele	369
353. ábra Szérum fehérjék elválasztása elektroforézissel	370
354. ábra A véradás és a plazmafrakcionálás kapcsolata	371
355. ábra Krioprecipitátum	374
356. ábra A pH és etanol koncentráció változtatása a Cohn frakcionálás során	375
357. ábra A Cohn frakcionálás lépései és termékei	375
358. ábra A Cohn frakcionálás első lépése	376
359. ábra Egyensúly a véralvadási faktorok és inhibitorok között	378
360. ábra A tenáz komplex	379
361. ábra A véralvadási kaszkád	379
362. ábra Fibrinogén – fibrin átalakulás	380
363. ábra A F-IX domén szerkezete	382
364. ábra Az F-IX aktiválása	382
365. ábra A genetikai eredetű vérzékenység öröklődése	383
366. ábra Az első lépés a krio csapadék leválasztása	384
367. ábra A Humafactor-9 gyártásának blokksémája	385
368. ábra Technológiai lépések az affinkromatográfia után	386
369. ábra A kiszerelt Humafactor-9 készítmény	387
370. ábra Vérvétel immunizált lótól	388
36. táblázat A vakcinagyártás története	389
371. ábra A vakcinák alaptípusai	390
372. ábra Az uridin analógok szerkezete	393
373. ábra Különböző vakcinák hatékonyságának és biztonságának összehasonlítása	394
374. ábra Tetanuszos izomgörcsben elhunyt beteg	396
375. ábra Toxin és toxoid	396
376. ábra SPF tojásokbeoltása vírussal	397
377. ábra SPF tojások megnyitása vírus aratáshoz	397
378. ábra Trivalens influenza vakcina termelése tojásban	398
379. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártása	399
380. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártásának blokksémája	399
37. táblázat Különböző adjuváns anyagok (katalógus részlet)	400
381. ábra A hepatitis B vírus felépítése	401
382. ábra A HBV genom felépítése	402
383. ábra Az élesztőbe bevitt ingázó vektor (kettős plazmid) szerkezete	403
384. ábra HBV vakcina felfolgozási lépéssora	403
385. ábra A DNS és mRNS vakcinák működésének összehasonlítása	404
386. ábra A DNS vakcina (plazmid) jellemző részei	405
387. ábra A kétféle mRNS vakcina működésének összehasonlítása	406
388. ábra Az érett, translációra kész mRNS felépítése	407
389. ábra mRNS vakcina lipid nanorészecskékbe zárva	408
390. ábra A Magyarországon engedélyezett vakcinák működési elve	409
391. ábra A Pfizer-BioNtech mRNS vakcina hatásmechanizmusa	409