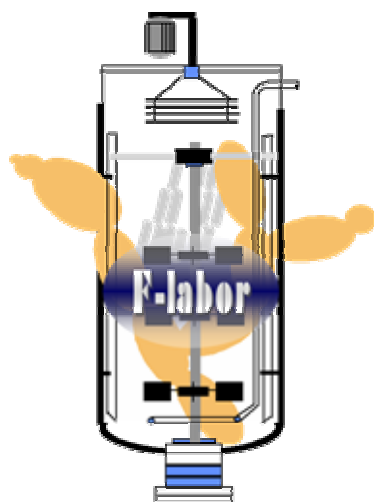


Kupcsulik Bálint

REKOMBINÁNS *PICHIA PASTORIS* FERMENTÁCIÓ FEJLESZTÉSE

témavezető:

Sevella Béla egyetemi tanár



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszermérnöki Kar
Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

2005

BEVEZETÉS

Az első rekombináns gyógyászati fehérjekészítmény, az inzulin törzskönyvezése óta 23 év telt el. 2005-re mintegy 130 rekombináns fehérje alapú humán gyógyszer van piacon, melyek kereskedelmi értéke meghaladja az évi 30 milliárd dollárt. A jelenleg már piacon lévő fehérje alapú gyógyszerek mellett mintegy 500 új termék van kipróbálási stádiumban, tehát várhatóan rövid időn belül a rekombináns készítmények forgalma további jelentős növekedés elé néz. A fehérje alapú készítmények ipari előállításához a komplex gyártási folyamat optimalása vezetett, mely során a célfehérjéhez rendelt leginkább megfelelő expressziós rendszer használhatósága megfelelővé vált a szigorúan szabályzott termelési folyamatokba történő illesztéshez. Mivel a gyártás alapját a hatékony upstream műveletek jelentik, elengedhetetlen ezek biokémiai-elméleti és empirikus-technológiai eredményeken nyugvó optimalása, valamint a szabályzást támogató matematikai leírása. Doktori munkám célja egy, jelenleg főként laboratóriumi szinten elterjedten használt expressziós rendszer, a *Pichia pastoris* élesztőn alapuló eljárás fejlesztése volt. Célkitűzésem az expressziós rendszer olyan szintű megismerése volt, mely adekvát matematikai leírásokon keresztül a *P. pastoris* hatékony és szigorúan szabályozható, nagy léptékben történő alkalmazását támogatja.

A *P. pastoris* élesztő két alkohol-oxidáz enzime (Aox1 és 2, EC 1.1.3.13) segítségével képes metanolt, mint egyedüli szén és energiaforrást hasznosítani. Az Aox enzimek in vivo szintje transzkripciós szabályzás alatt áll: könnyen hasznosítható szubsztrátok (glicerín és glükóz) katabolit represszió keresztül, a metanol pedig indukálószerként hat az enzim termelésére. A szabályzás eredményeképpen jól hasznosítható szubsztrát jelenlétében vagy metanol hiányában gyakorlatilag nem mérhető enzim aktivitás a sejtekben, míg teljesen indukált állapotban az Aox a sejtfehérjék akár 30%-át is kiteheti. A *P. pastoris* két AOX génnel rendelkezik: az AOX1 adja indukált állapotban az enzim 85-90 %-át,

míg az AOX2 biztosítja a maradék 10-15%-ot. A fehérjék aminosav szinten 98 %-os homológiát mutatnak, a szabályzó régiók viszont eltérnek. Expressziós promoterként az AOX1 promotert használják fel leggyakrabban. A gazdasejt az expressziós vektor integrációs helyétől függően rendelkezhet intakt AOX1 és 2 génnel (Methanol utilization type +, Mut⁺), vagy nem funkcionális AOX1 és működő AOX2 génnel (Methanol utilization type Slow, Mut^s). Annak ellenére, hogy a Mut⁺ típus a vad törzssel közel megegyező sebességgel képes növekedni metanolon, míg a Mut^s típus csak ennek mintegy 1/7-1/8-ával, gyakran az utóbbi biztosítja a nagyobb funkcionális termék-koncentrációt. A sikeres Mut^s típusal történő termelési eredményeket a poszt-transzlációs módosítások időigényével magyarázzák: a *P. pastoris* ugyanis általában képes a magasabb rendű élőlényekből származó fehérjék térbeli elrendeződésének megfelelő kialakítására, a diszulfid kötések létrehozására illetve a glikozilezettségi mintázat is hasonló a humán proteinek szerkezethez. A *P. pastoris* általában fölismeri az eredeti leader-szekvenciákat is, de a *Saccharomyces cerevisiae* α -mating-factor expressziós szignálja eredményezi a legbiztosabb extracelluláris kifejeződést. A rekombináns *P. pastoris* fermentációja tipikusan két szakaszra bontható: egy szénforrásként glicerint hasznosító sejttömeg képző szakasz után metanol rátáplálás mellett folyik a heterológ termékképzés. A metanolos szakasz alatt lényeges, hogy a metanol szint ne emelkedjen 15 g/l fölé, mivel a megnövekedő szubsztrát szint következtében felgyorsult metabolizmus a metanol oxidációjakor keletkező káros reaktív köztitermékek (hidrogén-peroxid és formaldehid) feldúsulásával a sejtnövekedés és termékképzés inhibíciójához vezet.

CÉLKITŰZÉS

Doktori munkám során a rekombináns *P. pastoris* tenyésztés körülményeit vizsgálva olyan statisztikai és modell alapú megállapításokat kívántam tenni, melyek a vizsgálatba vont heterológ fehérjét termelő törzs felhasználásán kívül

általánosabban, az adott *Pichia* variánssal más célterméket előállítva is hasznosíthatóak. A munkám kiterjedt a pH, hőmérséklet, indukálószer/szubsztrát hatásának vizsgálatára, a termékképzés szempontjából kiemelkedő jelentőségű szubsztrát-koncentráció szabályzásának kétféle módszerének analizésére, valamint az eredmények ismeretében optimált eljárás tesztelésére mind kereskedelmi forgalomban kapható modell törzs, mind tanszéki előállítású, "saját", 1,3-propándiol-oxidoreduktázt termelő törzs esetében.

Mivel a *P. pastoris* tág pH és hőmérséklet tartományban tenyészthető glicerinnel szénforráson, és közzismerten az erre érzékeny termékfehérjéket vakuoláris eredetű neutrális és bázikus proteázok bontják, meg kívántam határozni a heterológ termékképzésre használható pH és hőmérséklet tartományt. A pH csökkentése a proteolitikus degradáció visszaszorítására használható, azonban egyértelműen hatással van a termékfehérje fajlagos képződési sebességére is. A hőmérséklet csökkentése visszaszorítja a sejtek lízisének mértékét, így csökkentve a fermentáléba kerülő vakuoláris proteázok mennyiségét, ugyanakkor a fajlagos termékképzésre is hatással van a metabolizmus során lezajló egyes reakciók sebességének megváltoztatásával. Céлом az volt, hogy a pH és hőmérséklet termékképzésre vonatkozó hatását kvantifikáljam, lehetőleg a proteolízis hatásának beszámítása nélkül. A megfelelő termékképzést mutató tartományban statisztikai analízis segítségével kívántam vizsgálni, hogy a hőmérséklet illetve a pH milyen mértékben hat a fajlagos növekedési és termékképzési sebességre és a két fajlagos érték közül melyik játszik jelentősebb szerepet a térfogati produktivitás meghatározásban. Statisztikai és formális kinetikai modell felállításával meg kívántam határozni a termékképzés optimális körülményeit. Mivel modell termékként a kísérleti körülmények között proteolitikus bomlást gyakorlatilag nem mutató terméket választottam, a matematikai leírás vélhetően tisztán a fajlagos termékképzésre jellemző. A modell normálásával általánosan érvényes fajlagos termékképzési

modell nyerhető, mely – adott termék proteolitikus érzékenységének ismertetében – segítséget nyújt az optimális termelési körülmények megválasztásában.

A *P. pastoris* Mut⁺ változatára komplett kinetikai modell áll rendelkezésre, míg a Mut^S típusra ilyen nincsen. Mivel a fermentációk termelési fázisában általában a metanol szolgál egyedüli szén és energiaforrásként, ennek koncentrációjának változtatásával kívántam olyan mérési adatokat nyerni, melyek alkalmasak a Mut^S változat makrokinetikai jellemzésére. A feladathoz megfelelő kísérleti rendszert kellett kialakítanom, jól működő metanol-koncentrációt szabályzó rendszerrel.

A metanol-koncentráció szabályzásához két módszert kívántam megvizsgálni: a félvezető, illékony szerves anyag koncentrációt mérő szenzorrendszert, illetve a periodikus szubsztrátadagolásra történő oldott oxigén koncentrációváltozáson alapuló módszert. A félvezető szenzor rendszer kialakításához és megfelelő üzemeltetéséhez az arra ható paraméterek statisztikai analízisét kellett elvégezniem, és az üzemeltetéshez szükséges matematikai leírást elkészítenem. Az általános vélekedés szerint elfogadott, ám a gyakorlatban csak kivételesen ritkán alkalmazott oldott oxigén koncentrációváltozáson alapuló szubsztrát adagolás szabályzás használhatóságát tervezett kísérletek varianciaanalízisével, illetve kinetikai modell készítésével *in silico* kívántam vizsgálni.

A felállított modellek és kísérleti eredmények ismeretében kialakított fermentációs stratégiát a modell törzsként használt HSA termelő *P. pastoris* GS115 Mut^S törzsén, valamint - amennyiben funkcionális enzimet eredményez, - a "Rekombináns *Pichia pastoris* fermentáció" című projektünk (OM-00173/2002) keretében előállított propándiol-oxidoreduktáz (PDOR, EC 1.1.1.202) termelő törzsek közül szelektált legsikeresebb termelő törzssel kívántam tesztelni. A feladat végrehajtásához kvantitatív törzs szelekciós rendszer és reprodukálható sejtfeltárási módszer kialakítása is szükséges volt. A fermentációk méretnövelésével kívántam eldönteni, hogy a kialakított eljárás megfelel-e kísérleti üzemi léptékben, illetve, hogy az élesztő alapú rekombináns PDOR termelés eredményesebbé tud-e válni, mint az

*Enterobacter*rel végzett fermentációk. A méretnövelési kísérletek során meg kívántam vizsgálni a hagyományos kevert tankreaktor mellett az air-lift reaktor rekombináns *P. pastoris* fermentációra való alkalmasságát is.

EREDMÉNYEK

1.1. A rekombináns *Pichia pastoris* glicerinnel szénforráson táp pH és hőmérséklet határok között képes növekedni, ám a metanol szénforráson végzett heterológ fehérjetermelést általában pH 5,0-án és 30°C-on végzik. Számos termékfehérje érzékeny a sejtek líziséből a fermentáléba kerülő proteázok által történő degradációra. Mivel a proteázok jelentős része neutrális vagy alkalikus proteáz, fölmerül a *Pichia* savasabb pH-n történő fermentációja. A hőmérséklet mérséklése bizonyítottan csökkenti a sejtek lízisének mértékét, így a termék proteolitikus bomlását is, valamint fölmerült annak lehetősége is, hogy az alacsonyabb hőmérséklet a metanolt hasznosító enzimek promotereinek aktivitás változtatásával növeli a fajlagos termékképzési sebesség értékét is. Egy pH [3,2 ; 5,2] és [23; 29]°C lineáris ortogonális kísérleti tervet kibővítve egy pH [5,2 ; 7,2] és [17 ; 23]°C teljes másodfokú kísérleti tervvel, varianciaanalízissel vizsgáltam, hogy a pH és hőmérséklet milyen mértékben hat a fajlagos növekedési sebesség, fajlagos termékképzési sebesség, a térfogati termékre vetített produktivitás, valamint a hozam értékeire. A vizsgálatához *P. pastoris* GS115 Mut^S humán szérumból albumin (HSA) termelő modell törzset használtam. A statisztikai analízis azt mutatta, hogy a fajlagos növekedési sebesség kevéssé függ a pH-tól és a hőmérséklettől, míg a hozamot, a produktivitást és a fajlagos termékképzési sebességet erősebben befolyásolják a vizsgált faktorok. A fentiek értelmében HSA-t termelő rekombináns *P. pastoris* GS115 Mut^S termékképzésre vetített térfogati produktivitását a pH és hőmérséklet tekintetében a fajlagos termékképzési sebesség határozza meg. A fajlagos termékképzési sebesség matematikai leírásával mind önmaga, mind a produktivitás optimálható [4, 7].

1.2. A fajlagos termékképzési sebesség leírására két módszert használtam: teljes másodfokú modell lépésenkénti lebontásával kapott statisztikai modellt és formális kinetikai modellt:

$$q_p = z_0 + z_1 \cdot pH + z_2 \cdot pH^2 + z_3 \cdot T + z_4 \cdot T^2$$

$$q_p = v_p \cdot \frac{K_1 \cdot [H^+]}{K_1 \cdot K_2 + K_1 \cdot [H^+] + [H^+]^2} \cdot \left\{ a \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H_1}{RT}\right) - b \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H_2}{RT}\right) \right\}$$

ahol:

q_p – fajlagos termékképzési sebesség

z – illesztési paraméterek

T – hőmérséklet

v_p – fehérje függő képzési sebesség

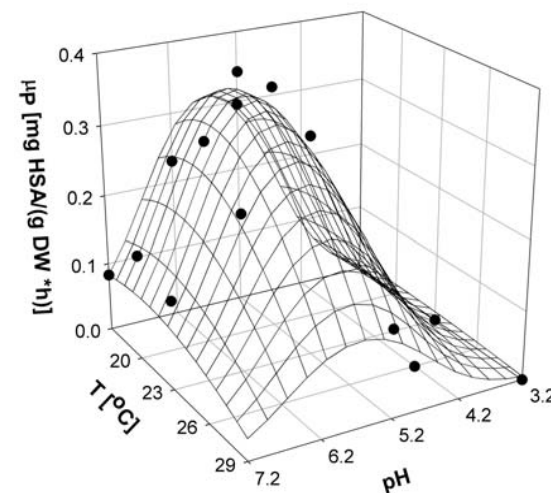
K_1, K_2 – Michaelis pH függvény paraméterei

a, b – Arrhenius egyenletek paraméterei

$\Delta H_1, \Delta H_2$ – látszólagos Gibbs energia

R – Regnault állandó

A fajlagos termékképzési sebesség adekvát leírását a formális kinetikai modell biztosította (1. ábra). A modell alapján számolt fajlagos termékképzési maximum pH 5,64 és 20,24°C. A modell és a maximum validálására végzett fermentáció mutatta a legnagyobb fajlagos termékképzési sebesség értéket (0,379 mg HSA / g szárazanyag / óra) a vizsgált pH [3,2 ; 7,2] és [17 ; 29]°C kísérleti tartományban. Az optimum pontban mért fajlagos termékképzési sebesség értéke 8,3 %-os pozitív eltérést mutatott a modell által jósolt értékhez képest, tehát a modell megfelelő [11]. A kinetikai modell által végzett optimálás eredményeképpen megállapítható, hogy a korábban ugyanazon a hőmérsékleten illetve pH-n glicerinen végzett sejttömeg képzés és a metanolon végrehajtott termékképzési szakasz optimuma eltér, és ezért az eljárás produktivitásának növelése érdekében eltérő körülmények között kell végrehajtani azokat.



1. ábra A fajlagos termékképzési sebesség [mg fehérje / g szárazanyag / h] pH és T függése az illesztett formális kinetikai modell szerint.

1.3. A kísérletekhez választott HSA termék nem mutatott jelentős mértékű bomlást, így feltételezhető, hogy a modell és az optimum valóban a fajlagos termékképzési sebességre vonatkozik. Amennyiben ez így van, az optimum minden kevéssé degradálódó, jelentős poszt-transzlációs módosításokat nem tartalmazó, *P. pastoris* GS115 Mut^S rendszerrel expresszálatott fehérjére alkalmazható. A proteolitikus degradációra érzékeny fehérjék pH és hőmérséklet optimalása során a termék specifikus v_p meghatározásával alkalmazható a fajlagos termékképzési sebesség leírására.

2. A rekombináns *P. pastoris* fermentációk on-line módon történő metanol szabályzására illékony szerves anyagot detektáló, SnO₂ félvezető szenzoron alapuló mérőrendszert fejlesztettem ki [1]. A mérőrendszer a fermentáléba merülő szilikon membránon keresztül szabályozható levegőáramba jutó metanol mennyiségét méri. A mérőrendszerre ható változókat varianciaanalízissel vizsgálva az alkalmazott anyagátadó felület hatása ("csőhossz") bizonyult szignifikánsnak. A szenzor kimenő jele az alábbi modellel jellemezhető víz-metanol rendszerben:

$$U = \frac{(0,0059 * H + 2,4604) * C}{-0,0078 * H + 0,7710 + C}$$

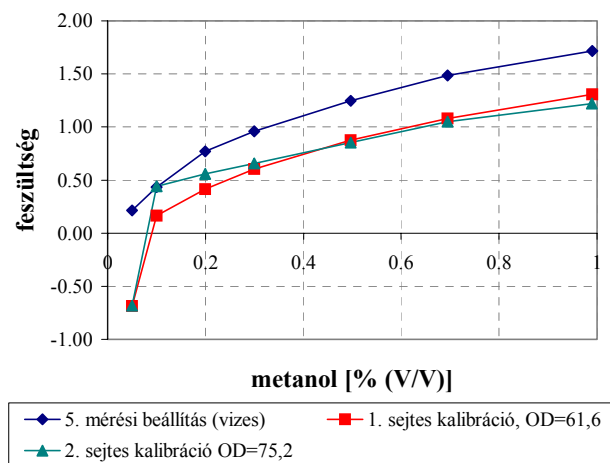
ahol:

U- a szenzoron mérhető feszültség [V]

C- metanol koncentráció a fermentáléban [(V/V)%]

H- csőhossz [cm]

Sejtes rendszerben alkalmazva a mérőrendszer alapjele tolódik el, a kalibrációs görbe meredeksége nem változik (2. ábra) [14].



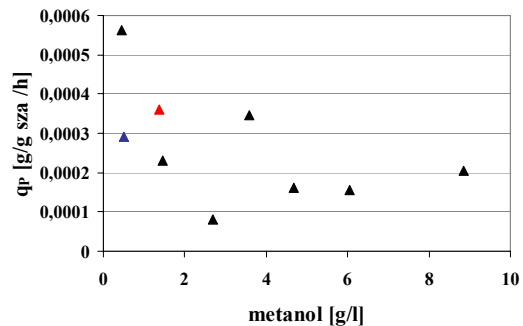
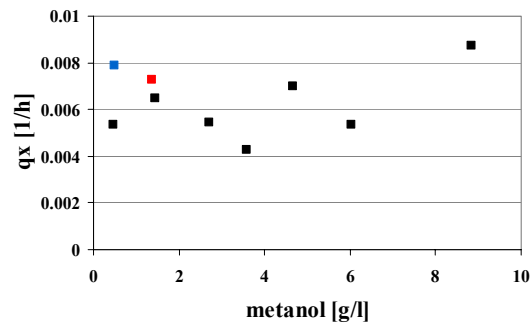
2. ábra Metanol-szenzor rendszer kalibráció vizes és sejtes rendszerben. A szenzor jel [V] a metanol-koncentráció függvényében.

3. A *P. pastoris* GS115 Mut⁺ fajlagos növekedési sebessége maximumos lefutású a metanol koncentráció függvényében. A szubsztrátgátlás elsődleges okaként a metanol lebontása során képződő toxikus hatású formaldehidet és hidrogén-peroxidot jelölik meg, de fölmerült a metanol hasznosításához szükséges alkohol-oxidáz (AOX) metanol okozta katabolit repressziójának lehetősége is. A termékképzési sebesség Mut⁺ típusú sejtek esetén lineáris egyenlettel kapcsolható a fajlagos növekedési sebességhez.

Az általam különböző metanol koncentrációkon végzett rátáplálásos fermentációk eredményei szerint a fajlagos növekedési sebesség a 0,45-8,85 g/l-es metanol koncentráció tartományban független a metanol koncentrációtól, tehát szubsztrát inhibíció, vagy az AOX2 promoteren ható metanol általi katabolit represszió nem mérhető a vizsgált tartományban. A fajlagos termékképzési sebesség értékét erősen befolyásolja a metanol koncentráció, maximuma 0,45 g/l értéknél mérhető (3. ábra). A *P. pastoris* GS115 Mut^S HSA fajlagos termékképzési sebessége és fajlagos növekedési sebessége között – a Mut⁺ típusúval ellentétben – nem áll fönt lineáris kapcsolat. Míg Mut⁺ típusú sejteknél a produktivitás maximumát a növekedési sebesség és a fajlagos termékképzési sebesség metanol függése együttesen határozza meg, és ezért a produktivitás maximuma a két fajlagos sebesség maximuma közé esik a metanol koncentráció függvényében (2,1 g/l), méréseim szerint Mut^S sejtek esetén a termékre vetített térfogati produktivitás alakulását a metanol koncentráció függvényében elsődlegesen a fajlagos termékképzési sebesség határozza meg, ezért maximuma szintén 0,45 g/l-nél van (0,0187 mg/ l fermentlé /óra). A Mut^S sejtek esetén a fenntartási koefficiens értékét 0,026 1/h-nak mértem, ami nagyságrendileg megegyezik a fajlagos növekedési sebességgel. A fermentációk a metanol koncentrációtól függetlenül energialimitben működnek [3, 5, 8].

Az optimumokra mért fajlagos értékek méretnövelés során reprodukálhatónak bizonyultak. A reprodukálhatóságot és az eredményes fermentációt elsősorban a teljes térfogat megfelelő átkeveredés biztosítja. Air-lift reaktor nem bizonyult megfelelőnek rekombináns *P. pastoris* Mut^S fermentációjához.

Amennyiben igaz, hogy a heterológ termékképzés és az alkohol-oxidáz enzim egyensúlyi szintje által a növekedési sebesség is alapvetően transzkripció szinten meghatározott és a lassú szubsztrát hasznosulás miatt a Mut^S változatnál nem hat jelentős metabolit (formaldehid, hidrogén-peroxid) inhibíció, akkor feltételezhető, hogy az AOX1-en metanol általi katabolit represszió hat, míg az AOX2-ön nem.

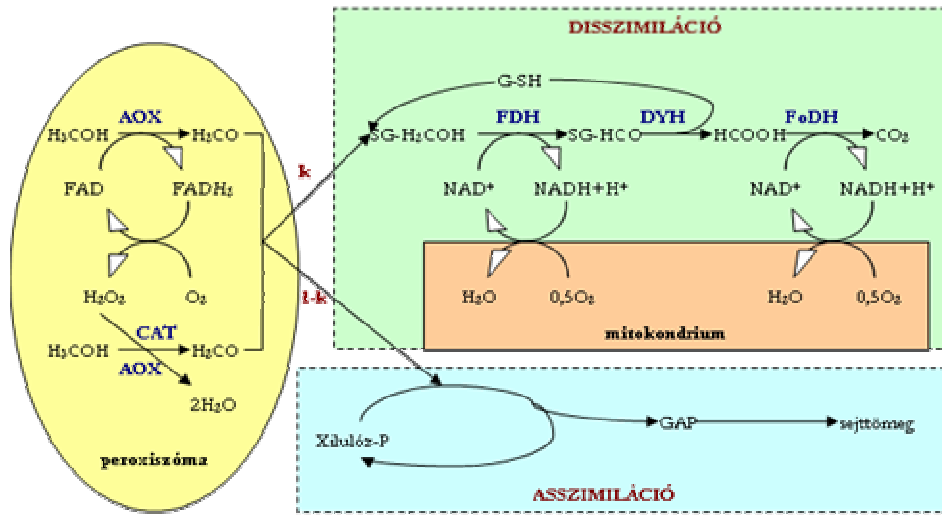


3. ábra *P. pastoris* GS115 Mut^S HSA egyensúlyi fajlagos növekedési sebessége (q_x) és fajlagos termékképzési sebessége (q_p) a metanol koncentráció függvényében. Biostat M 1200 ml; Biostat U kevert 19 l; Biostat U air-lift 19 l

4. A *P. pastoris*-ban a *Citrobacter freundii* eredetű propándiol-oxidoreduktáz (PDOR, EC 1.1.1.202) aktív formában kifejezhető. A rekombináns változatok közül a termelési tesztrendszer megfelelő kialakítása után sikerült kiválasztanom a legjobb termelő törzset. A törzs mind forgókémcsöves, mind rázatott lombikos és fermentoros tenyésztési rendszerben reprodukálható termékképzést mutatott. A felhasznált törzs kísérleti eredményeim szerint komplex kiegészítő tápanyagokat igényel. A kiválasztott *P. pastoris* SMD1168 /49 törzsszel az optimált *Klebsiella pneumoniae* fermentációval gyakorlatilag megegyező térfogati produktivitás mellett (10,7 U/ l fermentlé/ óra *Pichia*-ra illetve 10,3 U/ l fermentlé/ óra *Klebsiella*-ára) a fermentlé térfogatra vetített fajlagos aktivitás érték a 15-szörösére nőtt (1540 U/l). Az eljárás a produktivitás megtartása mellett méretnövelhetőnek bizonyult [2, 23].

5. A rekombináns *P. pastoris* Mut⁺ fermentáció metanol rátáplálása általánosan elfogadott nézet szerint szabályozható a periodikus szubsztrát adagolásra bekövetkező oldott oxigén koncentráció (DO) változással. Az állítás igazolására Zhang és mtsi. szubsztrátgátlást tartalmazó modelljét az oxigénre vetített mérlegegyenlettel egészítettem ki. A leírás a felvett metanol asszimiláló és disszimilációs úton történő hasznosulásának oxigén igényét külön kezelte, a két útvonal közötti metabolitfluxus megoszlási arányát illesztendő paraméterként kezelve (4. ábra). A modellfejlesztés során a leírásba építettem a folyadékoldali oxigénabszorpciós együttható kísérletesen meghatározott metanol koncentráció függését, valamint a mérési eredményekre történő illesztési folyamat során megváltoztattam az eredetileg használt hozam értékét is. Az illesztett modell $Y_{x/MeOH}=0,104$ g nedves tömeg/ g metanol és $a=0,764$ mol O_2 / mol metanol értékeket használ (5. ábra). A 0,764 paraméter érték az asszimiláló út dominanciáját mutatja, és a Ren által használt 0,5 illetve a Jahic által javasolt 1,17 között van [8, 14].

A szubsztrátadagolás a kísérleti adatokra illesztett modell vizsgálata alapján nem szabályozható megbízhatóan a periodikus metanol adagolás hatására bekövetkező oldott oxigén koncentrációváltozással. A kísérleti eredmények varianciaanalízise megerősítette az *in silico* eljárás tanulságait.



4. ábra A *P. pastoris* oxigén fölhasználása metabolizmusa során. GSH - redukált glutation; AOX - alkohol-oxidáz; CAT – kataláz; FDH – formaldehid-dehidrogenáz; DYH – S-formil-glutation-hidroláz; FoDH – hangyasav-dehidrogenáz; GAP – gliceraldehyd-3-foszfát

A *P. pastoris* GS115 Mut⁺ -t leíró, oxigénre vonatkozó mérlegegyenlettel kiegészített egyenletrendszer:

$$q_x = \frac{0,146 \cdot c_{\text{MeOH}}}{1,5 + c_{\text{MeOH}} + \frac{c_{\text{MeOH}}^2}{8,86}}$$

$$\frac{dx}{dt} = q_x \cdot x$$

$$q_{\text{MeOH}} = 0,84 \cdot q_x + 0,0071$$

$$\frac{dc_{\text{MeOH}}}{dt} = F \cdot c_{\text{MeOH,be}} - q_{\text{MeOH}} \cdot x$$

$$\frac{dc}{dt} = K_L a \cdot (c^* - c) - a \cdot q_{\text{MeOH}} \cdot x$$

$$K_L a = 75,54 + 0,1471 \cdot 2,9174^{c_{\text{MeOH}}}$$

ahol

q_x – fajlagos növekedési sebesség [1/h]

c_{MeOH} – metanol-koncentráció a fermentlében [g/l]

t – idő [h]

x – sejt nedvesanyag koncentráció [g/l]

F – szubsztrát betáplálás sebessége [g/h]

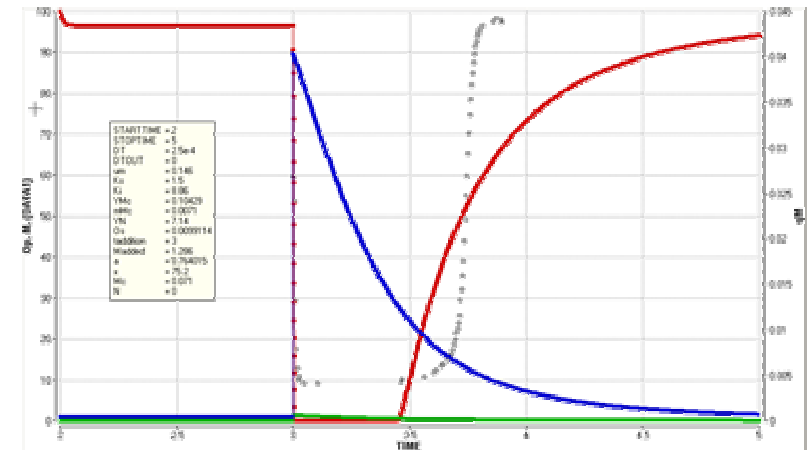
$c_{\text{MeOH,be}}$ – metanol-koncentráció a bemenő térfogatáramban [g/l]

$K_L a$ – eredő folyadékoldali oxigénabszorpciós tényező [1/h]

c^* - telítési oldott oxigén koncentráció [g/l]

c - oldott oxigén koncentráció [g/l]

a – a metanol fluxus asszimiláló és disszimilációs útvonal közötti megoszlását jellemző paraméter, $a=0,5+k$



5. ábra A telítési oldott oxigén-koncentráció, a hozam és "a" illesztésének eredménye. — illesztett oldott oxigén koncentráció %; — fajlagos növekedési sebesség [1/h]; — fajlagos metanol fogyasztási sebesség [g metanol / g nedves tömeg / h]; ° mért oldott oxigén koncentráció %

KÖZLEMÉNYEK:

LEKTORÁLT FOLYÓIRATCIKKEK:

1. Kupcsulik, B., Sevela, B., Ballagi, A. & Kozma, J. (2001) Evaluation of three methanol feed strategies for recombinant *Pichia pastoris* Mut^S fermentation. *Acta Aliment*, **30**, 99-111.
2. Németh, Á., Kupcsulik, B. & Sevela, B. (2003) 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae*. *World J Microbiol Biotechnol*, **19**, 659-63.
3. Kupcsulik, B. & Sevela, B. (2004) Effect of Methanol Concentration on the Recombinant *Pichia pastoris* Mut^S Fermentation. *Periodica Polytechnica Ser Chem Eng* **48**, 73-84.
4. Kupcsulik, B. & Sevela, B. (2005) Optimization of specific product formation rate by statistical and formal kinetic model descriptions of an HSA producing *Pichia pastoris* Mut^S strain. *Chem Biochem Eng Q* **19**, 99-108.

NEMLEKTORLÁT FOLYÓIRATCIKKEK:

5. Kupcsulik B., Sevela B., Bertalan G. & Vámosi B. (2000) Fermentáció oktatás számítógéppel. *Acta Biologica Debrecina*, Debrecen, **22**, 163-169.
6. Kupcsulik B., Sevela B., Ballagi A. & Kozma J. (2000) Rekombináns *Pichia pastoris* Mut^S tenyésztés. *Acta Biologica Debrecina*, **22**, 103-107.
7. Kupcsulik, B. & Sevela, B. (2003) Rekombináns *Pichia pastoris* Mut^S termékélesztése a pH és a hőmérséklet függvényében. *Biokémia*, **27**, 19-21.
8. Kupcsulik, B., Bécsi, J., Párta, L. & Sevela, B. (2003) Az oldott oxigén-koncentrációval történő szubsztrátátplálás lehetőségének vizsgálata rekombináns *Pichia pastoris* Mut^S esetén. *Biokémia*, **27**, 74-76.
9. Németh, Á., Harmati, E., Kupcsulik, B., Radnai, Gy. & Sevela, B. (2005) Szennyvíztisztítás biomasszával. *Biokémia*, **19**, 15-17.

ELŐADÁSOK:

10. Németh Á., Kupcsulik B. & Sevela B. (2002) 1,3-propándiol dehidrogenáz előállítása *Klebsiella pneumoniae*-val MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottsága, Magyar Élelmészeti Tudományos Egyesület és Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet 307. Tudományos Kollokviuma, Budapest

11. Kupcsulik, B., Kalocsai, G. & Sevela, B. (2002) Rekombináns *Pichia pastoris* Mut^S fermentáció leírása magas termékhozamok eléréséhez. Magyar Mikrobiológiai Társaság Naggyűlése, Balatonfüred
12. Kupcsulik, B. & Sevela, B. (2003) Rekombináns *Pichia pastoris* fermentáció – alapoktól a termelésig. MTA Biotechnológiai Munkabizottság, Budapest
13. Sevela, B., Kupcsulik, B. & Németh, Á. (2004) Mezőgazdasági melléktermékek felhasználása finomkémiai alapanyagként. MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottsága, Magyar Élelmészeti Tudományos Egyesület és Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet 315. Tudományos Kollokviuma, Budapest
14. Kupcsulik, B., Harmati, E. & Sevela, B. (2004) A rekombináns *Pichia pastoris* fermentáció szabályozása. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Naggyűlése és X. Fermentációs Kollokvium, Keszthely
15. Kupcsulik, B. (2005) *Gluconobacter oxydans*-sal végzett poliál oxidációk kinetikai leírása. Műszaki Kémiai Napok '05, Veszprém

POSZTERBEMUTATÓK:

16. B. Kupcsulik, B. Sevela and A. Ballagi: The problematics of recombinant *Pichia pastoris* Mut^S fermentation. 10th European Congress on Biotechnology, Madrid, Spanyolország
17. Kupcsulik, B., Kalocsai, G. & Sevela, B. (2002) A metanol koncentráció hatása a rekombináns *Pichia pastoris* Mut^S fermentációra. II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged
18. Kupcsulik, B., Kalocsai, G. & Sevela, B. (2002) The Effect of Methanol Concentration on Recombinant *Pichia pastoris* Fermentation. 4th European Symposium on Biochemical Engineering Science. Delft, Belgium
19. Németh, Á., Kupcsulik, B. & Sevela, B. (2002) 1,3-propanediol Dehydrogenase Production by *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. 4th European Symposium on Biochemical Engineering Science. Delft
20. Kupcsulik, B., Berkó, B., Halmos, Sz., Dienes, D. & Sevela, B. (2003) Development of itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus*. 25th

Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Breckenridge, Colorado, USA

21. Kupcsulik, B., Szikszai, B. & SevelleB. (2003) Comparison of 1,3-dihydroxyacetone and L-erythrulose production of *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Chemické Listy* **97**, 505.
22. Kupcsulik, B., Párta, L., Bécsi, J., Nyeste, L. & Sevelle, B. (2003) Possibilities of substrate feed control of recombinant *Pichia pastoris* fermentation by DO spike method. 11th European Congress on Biotechnology, Basel
23. Párta, L., Bécsi, J., Kupcsulik, B., Holczinger, A. & Sevelle, B. (2003) 1,3-propanediol oxidoreductase production by recombinant *Pichia pastoris*. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred

DISSZERTÁCIÓK:

24. Kupcsulik, B. (2003) Technológia transzfer az itakonsav gyártásban. minőségmenedzsment szakmérnöki szakdolgozat, BME GTK
25. Kupcsulik, B. (2004) Biológiai biztonsági rendszer tervezése egy BME tanszék számára. Master of Business Administration szakirányú továbbképzési szak, szakdolgozat, BME GTK