

# **PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Németh Áron**

**Biotechnológiai/biokonverziós módszerek kutatása glicerinnel kapcsolatos  
előállítására**

**Témavezető: Dr. Sevella Béla**

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem  
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék**

## 1. Bevezetés

A glicerin egy potenciális megújuló nyersanyag, amely előállítható szintetikus úton is, de főtömege elsősorban az egyre bővülő biodízelgyártás során keletkezik. A glicerin hasznosítás aktualitását mutatja az a tény, hogy az európai piacon 2006 végére 500.000 tonna glicerin felesleget prognosztizáltak az év elején. Ekkora mennyiség hasznosítása nagy volumenű, és nagy hozzáadott értékű kemikáliák előállítására nyújt lehetőséget és így, valamint a glicerin megújuló mivolta miatt hatalmas kiaknázandó potenciált rejt magában.

A glicerin platformkötő vegyület, azaz belőle néhány egyszerű technológiai lépésen keresztül számos vegyipari köztitermék állítható elő. Ilyenek az 1,3- és 1,2-propándiol (propilén-glikol), az akrolein, a glicerin-acetát, glicerin-karbonát, glicidol stb. Ezek között kiemelt szerepet játszik az 1,3-propándiol és az 1,3-dihidroxi-aceton. Előbbi nagyrészt szerves szintetikus úton állítják elő évente több mint 100.000 t mennyiségben és döntően a műanyaggyártásban használják fel, utóbbit szintetikusán illetve fermentációval állítják elő a kozmetikai ipar számára.

Kutatásaim középpontjában számos más glicerinhasznosító eljárás mellett a glicerin 1,3-propándiollá és 1,3-dihidroxiacetonná történő szimultán enzimes biokonverziója áll (*I. ábra*). Az erre a célra kidolgozott eljárást szabadalmi oltalom alá helyeztük [21]. Az eljárás alapja az, hogy a mikroorganizmusok egy része a glicerint enzimes diszproporcióval alakítja át koenzim ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$ ) regenerálás közben, és így 1,3-dihidroxiaceton (DHA) és 1,3-propándiol (1,3-PD) keletkezik. Az élő sejtekben a DHA foszforilálódik és bekapcsolódik a glikolízisbe további fermentációs terméket állítva elő (ecetsav, etanol, vajsav stb.). Az enzimes biokonverzió során ezen melléktermékek képződése elkerülhető.

Az enzimes biokonverziót három kulcsenzim végzi: a glicerin-dehidrogenáz (GDH, EC 1.1.1.6), amely  $\text{NAD}^+$  koenzim segítségével oxidálja a glicerin molekulát; a glicerin dehidratáz (GDHt, EC 4.2.1.30.), amely  $\text{B}_{12}$ -koenzimmal (vagy anélkül) a glicerin molekuláról víz kilépését katalizálja 3-hidroxi-propionaldehidet (3-HPA) képezve; és végül az 1,3-propándiol-oxidoreduktáz (PDOR, EC 1.1.1.202), amelyik a képződött 3-HPA-t redukálja a GDH által termelt  $\text{NADH}_2$  reoxidációja közben (*I. ábra*).

A GDH illetve DHA előállítását a széles spektrumú oxidatív folyamatairól ismert *Gluconobacter suboxydans* fermentációjával vizsgáltam.

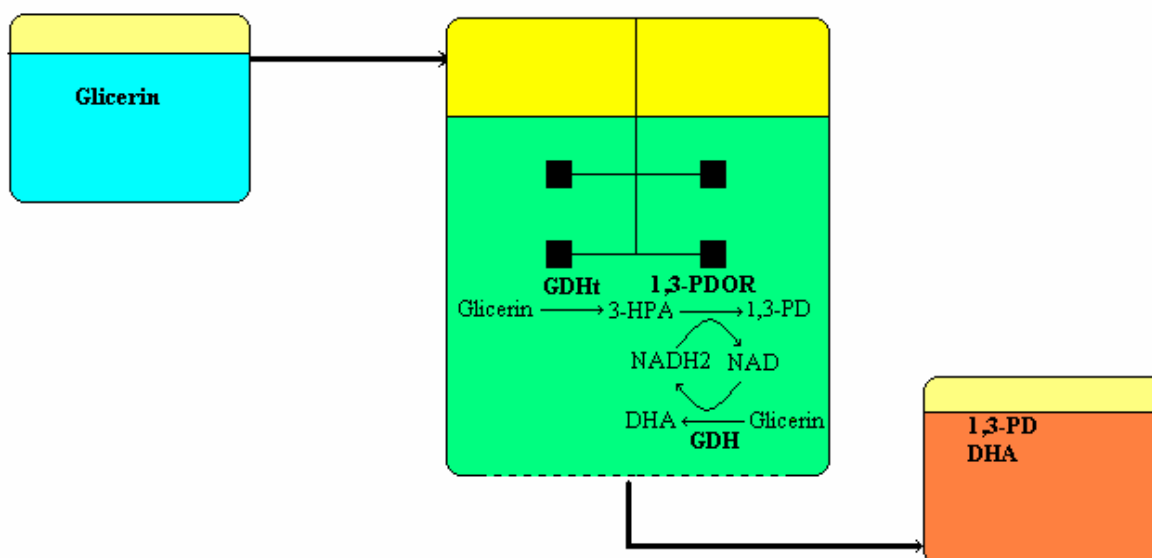
Az enzimes biokonverzió köztiterméke a 3-HPA, amely antibiotikus hatású szer. Mivel vizes oldatban a monomer-, a hidratált-, és a dimer formája dinamikus egyensúlyban

van, és ezek polimerizálódhatnak is, nem elég stabil a kereskedelmi forgalmazáshoz, ezért nem beszerezhető. Mivel toxikus intermedier, ezért vizsgálata fontos a glicerin metabolizmus tanulmányozása során, így a 3-HPA-t magas koncentrációban is jól toleráló *Lactobacillus reuteri* sejtek fermentációját és 3-HPA termelő képességét vizsgáltam.

Az 1,3-PD/DHA-nak a glicerin enzimes biokonverziójával történő egyidejű előállításához szükséges egyik kulcsenzim, a PDOR rekombináns előállításával is foglalkoztam. A metanogén *Pichia pastoris*-ba klónozott PDOR előállítását és tisztítását vizsgáltam. E munka azon koncepció első lépése, hogy valamennyi kulcsenzimet megkíséreljük nagyobb termelőképességű rekombináns törzsekkel előállítani.

A kutatásaim középpontjában a természetes 1,3-PD-t termelő mikroorganizmusok (*Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, és *Clostridium butyricum*) vizsgálata állt a magas enzimtermelés és enzimkihozatal, valamint az enzimeik biokonverzióban való alkalmazhatósága szempontjából.

Ahhoz, hogy az 1,3-PD termelő enzimeket a későbbiekben ipari célokra is fel lehessen használni, meg kellett oldanom az enzimek előállítását, analitikáját, részleges tisztítását, tárolását, és alkalmazását. Az enzimek alkalmazásának optimalizálása valamint az eljárás léptéknövelésének megoldása további kutatásokat igényel.



1. ábra: Az enzimes szimultán 1,3-PD/DHA előállítás vázlata

## 2. Kísérleti módszerek

### 2.1. Fermentációs kísérletek

A génmódosított *P. pastoris* klón szelekciós kísérletekhez forgó kémcsöves tenyésztő berendezést (Rotomix type 2114 MTA Kutesz) használtam. A *G. suboxydans*, *P.pastoris*, és *C.butyricum* sejtek rázólabdikos tenyésztését New Brunswick G10 Gyrotory® és Medicor BRI-1 rázó inkubátorokban végeztem. A kis léptékű fermentációkhoz *G. suboxydans*, *L. reuteri*, *P.pastoris*, *C.freundii*, *K.pneumoniae* és *C.butyricum* esetén B.Braun Biostat Q DCU 0,8/1L hasznos/teljes térfogatú fermentorokat alkalmaztam. A *P.pastoris*, a *L. reuteri*, és a *C. butyricum* esetében 1,5/2L-es hasznos/teljes térfogatú B.Braun Biostat M fermentorban is végeztem kis léptékű fermentációkat. A nagyobb léptékű fermentációkat *G. suboxydans* és *C. butyricum* esetében 20/30L hasznos/teljes térfogatú B.Braun Biostat U30 típusú készülékkel végeztem.

### 2.2. Biokonverziós kísérletek

A *G.suboxydans* és a *L.reuteri* sejtek glicerinnel biokonverzióját DHA-ná illetve 3-HPA-dé B.Braun Biostat Q fermentorban végeztem. Az enzimes biokonverziókhoz Solvent Resistant Stirred Cell (Millipore) membrán bioreaktort használtam, amely 10kDa-os ultraszűrővel volt felszerelve, így oldva meg a mintavételkor az enzimeknek a reaktorban való visszatartását. A párhuzamosan végzett enzimreaktoros kísérleteket 200ml-es üvegedényben illetve 50ml-es műanyag edényben végeztem, mindkét esetben mágnes keverővel felszerelve.

### 2.3. Sejtkinyerés, enzimkinyerés

A sejtek ülepítésére Seisystem Bio (13000rpm 24x1,5ml), Janetzki T24 (12000rpm, 6x30ml), Janetzki MLW K23D (6000rpm, 4x80ml) illetve Janetzki KD23 (3000rpm, 4x800ml) centrifugákat használtam. Az enzimek sejtek feltárással történő felszabadításához Techpan UD-11 (150W, Poland) és Labsonic P (300W, Sartorius) készülékeket használtam.

---

Az enzimek részleges tisztítására FPLC kromatográfot alkalmaztam különböző oszlopokkal (Q-sepharose, Cibacron Blue F-3GA, HiTrap Desalting, HiTrap Chelating HP).

#### **2.4. Analitika**

A fermentációs és biokonverziós minták elemzésére Waters Breeze HPLC rendszert használtam BioRad Aminex HPX87H kolonnával 65°C-on 0,5ml/min térfogatárammal 0,5mM kénsavas vizes eluenssel. A *P.pastoris* fermentációk metanol tartalmú mintáinak metanol koncentrációit HP Chrompack 438A gázkromatográfal Supelco 0,2% Carbowax 1500 80/100 Carbowax C, 6' oszlopon határoztam meg. A fotometriás mérésekhez Pharmacia Ultrospec Plus készüléket használtam.

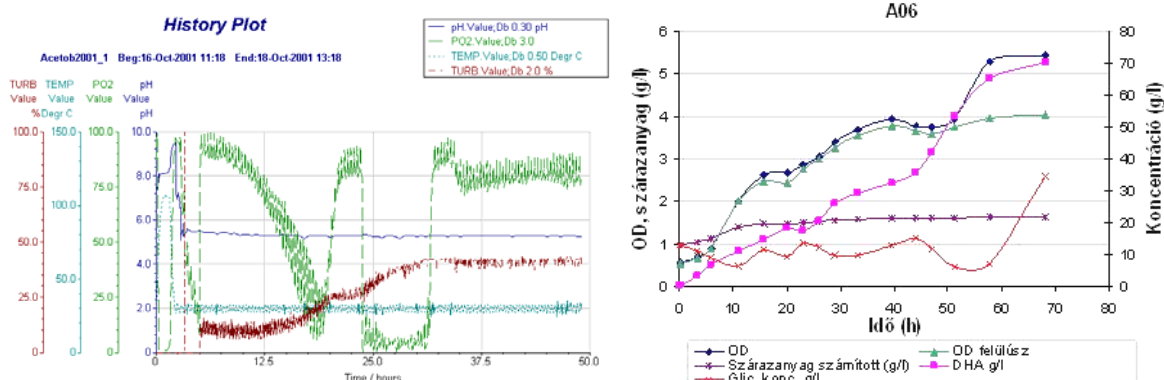
#### **2.5. Alkalmazott szoftverek**

Az enzimaktivitások háttérének megállapításakor szükségessé vált hiperbolaillesztéshez *SigmaPlot 2001* programot használtam. A kísérlettervek statisztikai kiértékeléséhez *Statistica for Windows* és *Minitab 14* szoftvereket alkalmaztam. A differenciálegyenlet rendszerek identifikálásához illetve illesztéséhez valamint a szimulációkhoz *Berkeley Madonna 8.01* programot használtam.

### 3. Eredmények

#### 3.1. Megállapítottam, hogy a *G.suboxydans* sejtek GDH enzime nem alkalmazható az enzimes szimultán 1,3-PD/DHA előállításához.

Korábbi tanszéki eredmények és más szerzők publikációi [24] alapján az oxidatív folyamatairól ismert *Gluconobacter suboxydans* 621H ideális enzimforrásnak látszott a glicerín-dehidrogenáz enzim előállítására, ezért 20L-es fed-batch fermentációt végeztem nagy sejttömeg – illetve abból enzim – kinyerése céljából. Mivel a fermentáció során a glicerínből képződő DHA termék-inhibícióval gátolja a sejtek szaporodását, ezért szorbit szénforráson történő fermentációval előbb elszaporítottuk a sejteket, majd glicerín rátáplálással indukáltuk a GDH enzimet. A 2. ábrán látható, hogy az oldott oxigén koncentráció változásából megállapítható, hogy mind a szorbit mind a glicerín felhasználódott, tehát a sejtekben GDH enzim volt jelen. Mivel a kinyert enzimek készítmények  $\text{NAD}^+$  jelenlétében nem mutattak aktivitást, beigazolódott az az újabb szakirodalmi állítás [25], amely szerint a *G. suboxydans* sejtek GDH enzime PQQ (pirrolokinolin-kinon) függő. Mivel az enzimes biokonverzióban felhasználandó PDOR enzim  $\text{NADH}_2$  függő, a *G. suboxydans* sejtek GDH enzime nem kapcsolható hozzá a DHA előállítás céljából.



2. ábra: *G. suboxydans* sejtek szorbit/glicerín fermentációja, illetve DHA termelése

Ugyanakkor kísérleteink során ismét bizonyosságot nyert (a korábbi tanszéki eredményeknek megfelelően) hogy a DHA előállítás lehetséges a *G. suboxydans* sejtekkel történő glicerín fermentációval. Egy ilyen, glicerín rátáplálásos fermentáció képét szemlélteti a 2. ábra, amelynek jobboldali diagramjáról látható, hogy mintegy 20g/L DHA koncentrációnál már észlelhető a termék-inhibíció, amely 70g/L-nél teljessé válik. A

glicerinre vetített hozam (70%) és a DHA végtiter (70g/L) viszont elég magasnak bizonyult ahhoz, hogy optimalás után DHA termelésre felhasználható legyen ez az eljárás.

3.2. A glicerinből történő 3-HPA előállításával kapcsolatban az irodalomban fellelhető módszerek és eredmények, valamint a saját kutatásaink – azaz jelenlegi tudásunk – alapján megállapítottam, hogy a legnagyobb biokonverziós képességű *L. reuteri* sejtek nagy mennyiségben történő előállítására a leghatékonyabb módszer a glükóz alapú, mikroaerofil körülmények melletti tenyésztés, egyszeri manuális glükóz rátáplálással, majd ezt követően a képződött sejtek liofilezése.

A 3-HPA-et, ami a glicerin platform egyik ígéretes molekulája, *L. reuteri* sejtekkel kívántam előállítani. Mivel a 3-HPA egy toxikus intermedier, ebben az esetben is szét kellett választani a sejtelőállítást és a termékképzést. Az előbbinél céltom volt a jó termelőképességű sejtekből maximális mennyiség előállítása. Ebből a célból az 1. táblázatban összefoglalt fermentációs módszereket hasonlítottam össze.

1. táblázat: *L. reuteri* sejtek fermentációs előállítása

Fermentáció	Körülmények	$J_x$ (g/l*h)	$J_{xmax}$ (g/l*h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{Tejsav}$	$Y_{EtOH}$	gHPA/g sejt
LR2006_1	Fed-batch	0,087	0,202	4,2	59,0	36,6	0,048
LR2006_2	Batch(0,7L)	0,092	0,211	6,7	56,6	36,7	0,052
LR2006_3	Batch (1,5L)	0,087	0,087	7,0	57,4	35,6	1,297
LR2006_4	Batch(0,7L)	0,084	0,400	3,6	73,4	23,0	n.a
LR2006_5	Batch(0,7L)	0,093	0,325	4,6	72,7	22,7	n.a
LR2006_6	Batch+1xGlü rátáp.	0,110	0,321*	5,3	67,4	28,0	4,446
LR2006_7	Batch+1xGlü rátáp	0,092	0,311	4,4	62,6	33,0	0,014 (hibás)
LR2006_8	Batch(aerob)	0,028	0,405**	n.a	n.a	n.a	0,399 <sup>#</sup>
LR2006_9	Batch(aerob)	0,023	0,177***	3,8	53,5	42,6 <sup>##</sup>	0,323
Irodalom [26]	Batch(anaerob)						12,58g/30g= 0,42
Irodalom [27]	Batch(anaerob)						5,2g/4g=1,3

\* ráinjektálás előtti (szakaszos) produktivitás

\*\*aerob körülmények között,  $S_0=120$  g/L, csak 40 g/L Glü fogyaszt, kevés N-forrás; <sup>#</sup> nagy biokonverziós aktivitás

\*\*\*aerob körülmények között,  $S_{0,Glü}=20$  g/L,  $S_{0,Glic}=2$  g/L

<sup>##</sup>ecetsavra vonatkozik

A táblázatban bemutatott módszerek közül mind a 3-HPA termelő képesség szempontjából mind a biomassza produktivitás ( $J_x$ ) alapján is a szürkével megjelölt, glükózon történő, szakaszos tenyésztés egyszerű glükóz rátáplálással bizonyult a leghatékonyabbnak.

Az előállított sejtek kinyerésére is több módszert hasonlítottam össze (2. táblázat)

2. táblázat: *L. reuteri* sejtek feldolgozása

Fermentáció	Kezelés	Fajlagos HPA termelés(g HPA/g sejt)		Változás
		Előtt (szabad sejtes)	Után (kezelt)	
4,5	Perlit	-	0,236	
4,5	Porlasztott	-	0,011	
4,5	Zselatin	-	0,0	
6	Foszfát puffer	4,446	0,0	
6	Biokonverzió után perlitre immobilizált	4,446	0,013	0,3%
7	Liofilezett 1,4ml	0,014 (hibás)	5,963	
7	Liofilezett 10ml	0,014 (hibás)	0,792	
8	Kitozán mikrogyöngy	0,086*	0,557	648%
8	Kitozán makrogyöngy	0,399	0,080	20%

Megállapítható, hogy – bár nem volt adekvát viszonyítási alap (nem sikerült a mérés során elérni a maximális HPA koncentrációt) – a liofilezés kimagasló termelést biztosított. Ugyanakkor a talán kevésbé költséges kitozán gélbe történt sejtrögzítés is jó termelő képességet tett lehetővé, különösen a kezelés előtti aktivitáshoz képest.

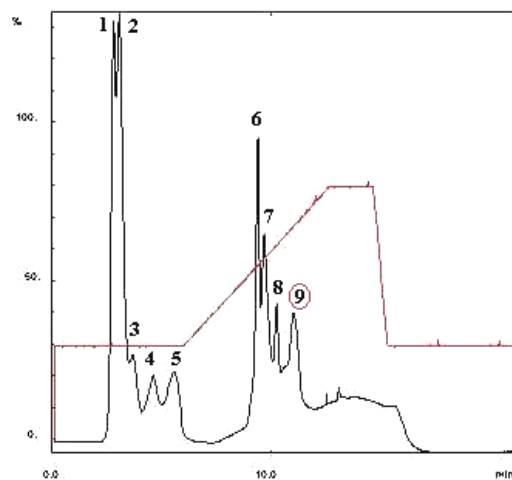
Figyelemre méltó továbbá, hogy az Eppendorf csövekben (1,4ml) végzett biokonverziók magasabb aktivitást adtak, mint az azonos körülmények közötti 10ml-es kémcsövekben (ld.2. táblázat liofilezettek), ami feltehetően az anaerob körülmények szigorúbb biztosításával magyarázható.

3.3 Megállapítottam, hogy a kutatócsoportunkban előállított *C. freundii* PDOR gént tartalmazó rekombináns *P. pastoris* sejtekkel előállított PDOR enzim  $Ni^{2+}$  affin kromatográfiával nem, míg Q-Sepharose tölteten tisztítható.

A genetikai módosítást követő szkrining után a legjobb PDOR termelőnek bizonyult rekombináns *P. pastoris* törzzsel 20L-es léptékű fed-batch fermentációt végeztünk, amelynek során glicerinen elszaporítottuk a sejteket, majd szabályozott metanol rátáplálással előbb



adaptáltattuk és indukáltattuk a tenyészetet, majd metanolon PDOR-t termeltettünk. A fermentlevet lecentrifugáltuk, majd a szeparált sejteket ultrahanggal feltártuk. A klónozáskor a gént úgy módosították, hogy a géntermék C'-terminálisán 6 molekula hisztidinből álló His<sub>6</sub>-fárok legyen, mert így kelátképző oszlopon (HiTrap Chelating) kötött Ni<sup>2+</sup>-ok szelektíven kötik az enzimet, ami elvileg egy lépéses tisztítást tesz lehetővé. Kísérleteim szerint azonban a fenti oszlopon nem köthető meg a rekombináns PDOR, így csak az irodalomból ismert módon Q-sepharose oszlopon sikerült részlegesen tisztítanom. A tisztítás során a 3. ábrán látható kromatogramot kaptam, amelynek 9. csúcsából sikerült a PDOR aktivitást azonosítani.



3. ábra: Rekombináns PDOR tisztítása

3.4 Megállapítottam, hogy a *K. pneumoniae* sejtek nagy mennyiségben történő előállítására a leghatékonyabb módszer az alábbi 4 szakasz konzekutív végrehajtása:  
1. aerob körülmények mellett glükóz alapú szakaszos fermentáció, 2. aerob körülmények mellett glükóz rátáplálás, 3. aerob körülmények mellett glicerinnel rátáplálás, 4. anaerob körülmények mellett glicerinnel rátáplálás. A katabolit-repressziót kihasználva, a levegőztetett glükóz és glicerines fázisok összevonhatóak.

Az 1,3-PD és DHA enzim biokonverzióval történő egyidejű előállításához szükséges GDHt és PDOR enzimeket *C. freundii* és *K. pneumoniae* sejtekből kívántam kinyerni. Ehhez anaerob körülmények között glicerinnel szénforráson végeztem szakaszos és rátáplálós fermentációkat. Mindkét esetben a *K. pneumoniae* bizonyult hatékonyabbnak, mivel magasabb sejtkoncentrációt és enzimkihozataalt sikerült vele elérni. A *K. pneumoniae*-re ezért tovább fejlesztettem a fermentációs eljárást, kihasználva a törzs fakultatív anaerob anyagcseréjét, és a katabolit-repressziót (3. táblázat).

3. táblázat: *C. freundii* és *K. pneumoniae* fermentációk összehasonlítása

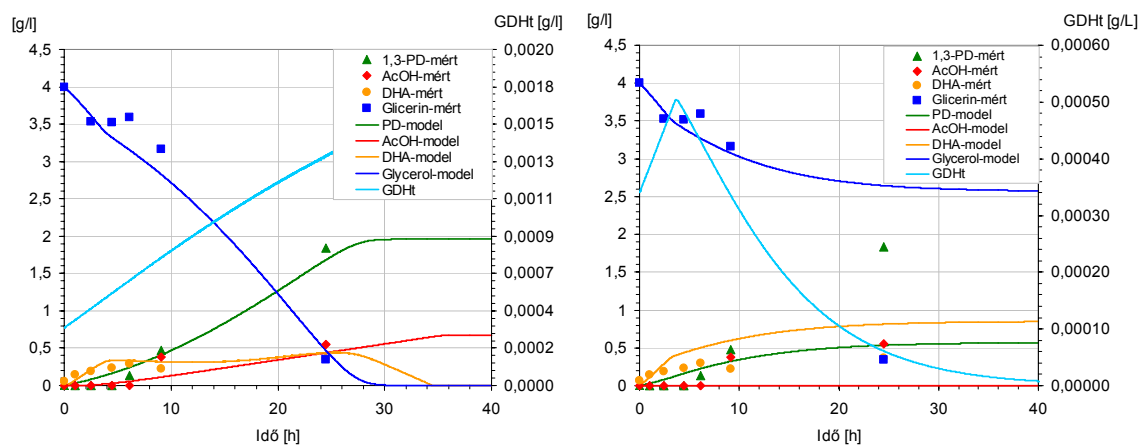
Fermentáció	Jellemzők	Sejttömeg növ. [mért $\Delta OD_{600}$ ]	Enzimaktivitás [U/l fermentlé]	1,3-PD [g/l]
C3	Szakaszos, anaerob, glicerín	0,1	0,0017	0,114
K1	Szakaszos, anaerob, glicerín	4	0,098	13,48
K4	4 szakasz: Glükózon (aerob), Glükóz rátáplálásos (aerob) Glicerín rátáplálásos (aerob), Glicerín rátáplálásos (anaerob)	22,88	90	0,1
C6	3 szakasz: Glükózon+Glicerín (aerob), Glicerín rátáplálásos (aerob), Glicerín rátáplálásos (anaerob)	7,5	0,005	2
K9	3 szakasz: Glükózon+Glicerín (aerob), Glicerín rátáplálásos (aerob), Glicerín rátáplálásos (anaerob)	13,695	73	12
Irodalom	[28]:0,7L fermentor, batch [29]:2L lombik, batch [30]:2L fermentor, folytonos.	8,26* [30]	37,5 [29]	9,12 [28]

\*szárazanyagból számított érték

3.5.A *K. pneumoniae* eredetű nyers enzimoldat minden szükséges enzimet tartalmaz a szimultán glicerín – 1,3-PD/DHA biokonverzióhoz, ám az általam felállított komplex matematikai modellel kapott *in silico* eredményeink szerint, a GDHt szakirodalomból ismert szuicid inaktivációja miatt [30], mégsem alkalmas erre a feladatra.

*K. pneumoniae* sejtekből kinyert enzimoldattal szimultán 1,3-PD/DHA enzimes biokonverziót valósítottam meg glicerín szubsztráton. Enzim oldatként nyers sejtextaktumot használtam, ezért a DHA tovább tudott alakulni ecetsavvá. A melléktermék képződés kiküszöbölésére enzimkinetikai alapokon nyugvó matematikai modellt állítottam fel [7]. Az összetett modellben az egyszubsztrátos enzimreakciókat Michaelis-Menten, a többszubsztrátos (koenzimes) reakciókat *random bibi* mechanizmussal írtam le. Szakirodalmi eredmények alapján [32] a GDH kinetikájának leírásakor *ordered bibi* mechanizmust feltételeztem, a GDHt szuicid inaktiválódását pedig elsőrendű kinetikával írtam le, és ATP függő regenerálását is figyelembe vettem. A „bomlás” – azaz az aktivitás vesztes folyamatáért

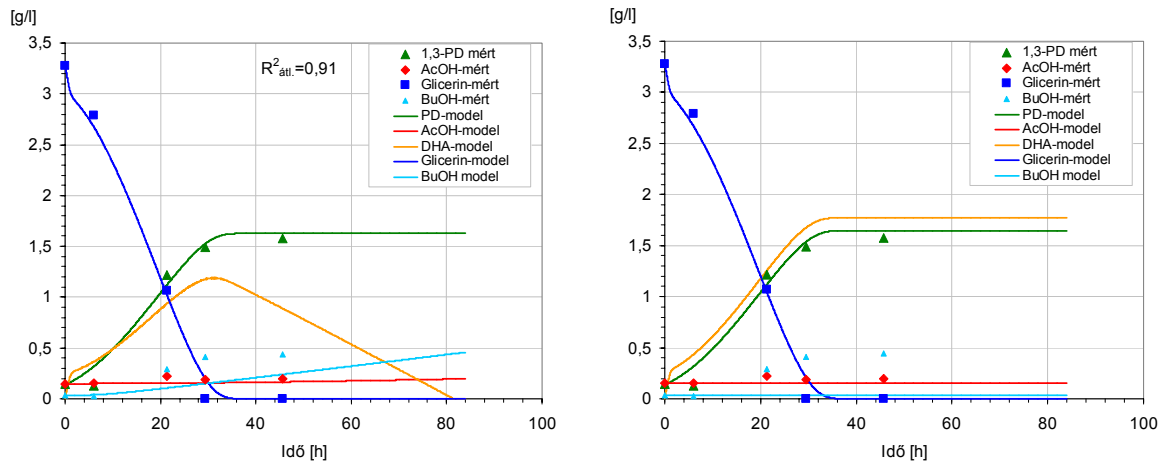
– a B<sub>12</sub> koenzim a felelős, mert minden glicerín molekula átalakításakor a B<sub>12</sub> komplexbe kerül a GDHt enzimmel [31]. A szimulációk megmutatták, hogy az ecetsavképző útvonalat nem szabad eliminálni [11], mert akkor az ATP nem termelődik, így nem áll a rendelkezésre a GDHt regenerálásához. Ha a GDHt-t nem lehet regenerálni, akkor a PDOR számára nem lesz 3-HPA, és így az 1,3-PD képzés is leáll, ezzel pedig a NADH<sub>2</sub> regenerálása is megszűnik, és DHA sem képződhet (4. ábra) [2, 12,]



4. ábra: *K. pneumoniae* eredetű enzimekkel végzett biokonverzió mért és szimulált eredményei a DHA foszforiláció inhibíciója nélkül, illetve inhibícióval

3.6. A *C. butyricum* eredetű nyers enzimoldat, amelyben a GDHt B<sub>12</sub>-független, alkalmas szimultán glicerín – 1,3-PD/DHA biokonverzió megvalósítására. Ezt mind kísérletileg, mind szimulációs úton (*in silico*) bizonyítottam.

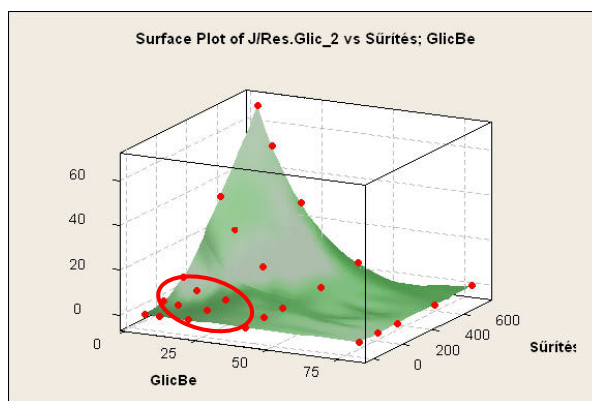
*C. butyricum*mal végzett fermentációk sejtjeiből ultrahangos feltárással nyertem ki a nyers sejtextraktumot, amely tartalmazta mindhárom kulcsenzimet (GDH, GDHt, PDOR). Ezt az extraktumot enzimoldatként használva több cikluson keresztül vezettem sikeres biokonverziót [13], de DHA helyett ebben az esetben vajsav képződött. A melléktermék képződés lehetséges kiküszöbölésének céljából az előbbivel analóg matematikai modellt hoztam létre [14]. Az összetett modellben az egyszubsztrátos enzimreakciókat Michaelis-Menten, a többszubsztrátos (koenzimes) reakciókat random bibi mechanizmussal írtam le. A szimulációk bebizonyították, hogy a vajsavképződés inhibeálásával (DHA-foszforiláció eliminálása) megvalósítható a szimultán 1,3-PD/DHA előállítás enzimes biokonverzióval (5. ábra). Ezt a modellt további szimulációs kísérletekre is felhasználtam.



5. ábra: *C. butyricum* eredetű enzimekkel végzett biokonverzió mért és szimulált értékei DHA foszforiláció inhibíciója nélkül és inhibíciójával

3.7. A verifikált szimulációs modell alapján bebizonyosodott, hogy a jelenleg használt biológiai 1,3-PD előállítással versenyképes, enzimes, szimultán glicerín – 1,3-PD/DHA biokonverzió is megvalósítható lehet.

2006-ban indult az első „BioPDO” üzem, ahol az 1,3-PD-t biológiai úton állítják elő a műanyaggyártás (Poli-Trimetilén-Tereftalát, PTT) számára. Ez a technológia egy rekombináns *Escherichia coli* fermentáción alapszik, amely gazdaszervezetbe *Saccharomyces* eredetű, glükóz-glicerín átalakításért felelős géneket, illetve *C. freundii* eredetű *dha* regulont (GDHt, PDOR) klónoztak. Mivel a gazdaszervezet nem tud *de novo* B<sub>12</sub>-koenzimet előállítani, ezt adagolni kell a fermentáció során, ami növeli a költségeket. Az új törzs kifejlesztésekor magas 1,3-PD koncentráció toleranciára szelektáltak, és az extracelluláris metabolitok képződését eliminálták. Így végül mintegy 2 napos glükóz fermentációval állítanak elő 100g/L 1,3-PD-t, ami kb. 2 g/L\*h térfogati produktitásnak felel meg. Az előző tézispontban bemutatott szimulációs modellel folytonos üzemeltetést szimulálva vizsgáltam a betáplált glicerinkoncentráció és az enzim koncentráció hatását a hatékonyságra ( $P=J_{PD}/Res.glic$ , ahol  $J_{PD}$  az 1,3-PD térfogati produktivitása, Res.Glic a maradék glicerín koncentráció, 6. ábra) [15].



6. ábra: Folytonos üzemű enzimeaktor hatékonysága (a megjelölt pontoknál  $J_{PD} > 2,5 \text{ g/L} \cdot \text{h}$  és  $\text{Res.Glic} < 1 \text{ g/L}$ )

Megállapítható, hogy az enzim szimultán 1,3-PD/DHA előállítás versenyképes lehet a jelenleg használt fermentációs eljárással.

3.8.A *K. pneumoniae* és a *C. butyricum* sejtekből kinyert enzimkészítmények összehasonlítása alapján elmondható, hogy a *C. butyricum*-ban kiegyensúlyozott az enzimek aránya, ami valószínűleg annak tudható be, hogy a sejtek fermentációjakor nem alkalmaztunk anyagcsere váltást (aerob->anaerob). A *K. pneumoniae* esetében a GDH aránya két nagyságrenddel nagyobb a többinél. Ennek oka feltehetően az, hogy a *K. pneumoniae* fermentációjakor hosszú, aerob körülmények melletti, glicerinn alapú szakasz is volt, ilyenkor nagy GDH aktivitás szükséges.

A két különböző baktérium (*K. pneumoniae*, és *C. butyricum*) glicerinn hasznosító enzimeinek optimális előállításait hasonlítja össze a 4. táblázat.

4. táblázat: Az enzimkihozatalok összehasonlítása

U/L fermentlé	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. butyricum</i>
<b>PDOR</b>	14,9	2,1
<b>GDH</b>	1366,6	13,5
<b>GDHt</b>	85,0*	3,3*

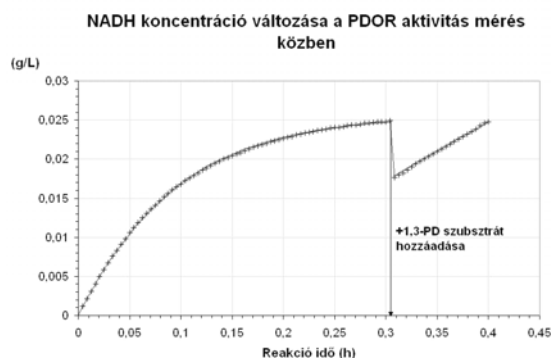
\*1,2-PD volt a szubsztrát az assay során

Megállapítható, hogy a *C. butyricum* nyers enzimoldatában is a GDH-ból található meg a legnagyobb aktivitás, de ez csak egy nagyságrenddel nagyobb a másik két, közel azonos aktivitású enzimhez képest, szemben a *K. pneumoniae* esetével, ahol két nagyságrend a különbség. Figyelemre méltó továbbá az is, hogy ezt a két enzimoldatot glicerinn enzim

biokonverzióban felhasználva nagyon hasonló eredményt kaptam (4. ábra és 5. ábra) annak ellenére, hogy a *K. pneumoniae* eredetű készítményben minden enzim legalább egy nagyságrenddel magasabb aktivitást mutatott. Feltehetően az utóbbi esetében – mivel hozzáadott ATP-t nem tartalmazott az elegy – a GDHt regenerálás ATP limitben működött, és ez csökkentette a magas enzimaktivitások hatékonyságát.

3.9. Analitikai módszerfejlesztés során megállapítottam, hogy a NAD-függő enzimek nyers sejtextraktumban történő meghatározásakor a zavaró komponensek kiküszöbölésére legcélszerűbb az a megoldás, ha a mérés során előbb egy lecsengő háttéraktivitást mérünk a célenzim szubsztrátja nélkül, majd a háttér megszüntével adjuk a szubsztrátot az elegyhez, és mérjük a célenzim aktivitását.

Az irodalomból a PDOR [29] enzim aktivitásmérésére ismert módszer vizsgálataim szerint módosításra szorult, mivel a nyers sejtextraktumban olyan metabolitok és koenzimek maradtak a sejtörmelék eltávolítása után, amelyek jelenlétükkel nem kívánatos enzimreakciókat (pl.:  $\text{NAD}^+$  redukció) katalizáltak és így ezek zavarták az aktivitásmérést. A PDOR aktivitásmérésekor a fiziológiai (3-HPA  $\rightarrow$  1,3PD) iránnyal szemben (1,3-PD  $\rightarrow$  3-HPA) kell az aktivitásmérést végezni Lin módszere szerint. Mivel ebben az irányban a  $\text{NAD}^+$  redukciójának eredményeként képződött  $\text{NADH}_2$ -t kell mérni, a mérést zavarja a fermentléből visszamaradó glicerín, mert a  $\text{glicerín} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{DHA} + \text{NADH}_2$  reakció is lejátszódik többek között. A fermentációnál előnyös a magas, 10-16 g/L glicerín koncentráció szinten tartása, ezért mindig kerül glicerín az enzimotozatba. A PDOR aktivitás meghatározásához tehát célszerű, ha előbb a szennyező glicerín (és más anyagok) elreagál(nak) (=”háttér mérése”), majd 1,3-PD hozzáadásával indítható a PDOR aktivitás meghatározása (7. ábra) [3].



$$\text{Enzim aktivitás} \left[ \frac{\text{U}}{\text{ml}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right] = \frac{\Delta A_{\text{lin}} - \Delta A_{\text{exp}} \cdot 60}{\Delta t [\text{sec}]} \cdot 6,220 \left[ \frac{1}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \cdot \text{cm}} \right]$$

7. ábra: továbbfejlesztett PDOR mérési módszer

A PDOR aktivitás kvantitatív meghatározásakor előnyös, ha a szubsztrát (1,3-PD) beadagolásakor a „háttér reakció” már lecsengett, és megszűnt az abszorbancia változás. Ilyenkor a 7. ábra jobboldalán bemutatott képletben a  $\Delta A_{\text{exp}} = 0$  helyettesítést kell alkalmazni. Ha nem szűnik meg a „háttér reakciók” okozta abszorbancia változás, akkor a *szubsztrát nélküli* mérési pontokra egy maximumhoz tartó exponenciális függvényt célszerű illeszteni. A *szubsztráttal* kapott mérési pontokra egyenest lehet illeszteni, amelynek meredeksége tartalmazza mind a háttér, mind a PDOR enzimek aktivitását. Az exponenciális függvényt a lineáris szakasz időtartalmára extrapolálva becsülhető a háttér aktivitás, amellyel az egyenes meredeksége kisebbítendő.

#### 4. Alkalmazási lehetőségek

Kutatásaim eredményeképpen az enzimes 1,3-PD/DHA egyidejű előállításához eljárást dolgoztam ki amely eljárásra vonatkozóan 2005-ben szabadalmi bejelentést tettünk[21].

A 3-HPA (antibiotikus szer) előállítására is sikerült hatékony módszert kifejlesztenem.

Négy enzimforrás mikroorganizmus közül sikerült a legmegfelelőbbet kiválasztani a glicerinnel enzimes biokonverziójához, amelynek segítségével a 1,3-PD és a DHA szimultán módon állítható elő.

Az enzimalitika terén a fenti kutatásokhoz nélkülözhetetlen újításokat vezettem be, amelyek munkámon túlmutatóan is alkalmazhatóak.

#### 5. A disszertáció témájában született közlemények

##### *Lektorált folyóirat cikkek*

1. Németh, Á.; Kupcsulik, B.; Sevela, B., 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2003**, 19, (7), 659-663.
2. Németh, Á.; Sevela, B., Development of a New Bioprocess for Production of 1,3-propanediol I.: Modeling of Glycerol Bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2008**, 144(1) 47-58. DOI: [10.1007/s12010-007-0040-5](https://doi.org/10.1007/s12010-007-0040-5)
3. Németh, Á.; and Sevela, B., Difficulties and solutions for the assays of the key enzymes of a new enzymatic glycerol bioconversion. *Periodica Polytechnica* **2008**, közlésre elfogadva

##### *Nem lektorált folyóirat cikkek*

4. Németh, Á.; and Sevela, B., Kutatások a biodízel melléktermékének hasznosítására. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2007**, 113 (2), 58-61



*Előadások*

5. Németh, Á., Kupcsulik, B. and Sevela, B., 1,3-propanediol dehydrogenase production with *Klebsiella pneumoniae*. *KÉKI 307. Tudományos Kollokvium 2002*, Budapest, 3.
6. Németh, Á.; és Sevela, B., Biotechnológiai/biokonverziós módszerek kutatása glicerinné származékok előállítására. *BME-VEK 1. Dokotrans konferencia 2003*, Budapest, 78-79.
7. Németh, Á., Kupcsulik, B. and Sevela, B., Többenzimes (membrán)reaktor modellezése. *32. Műszaki Kémiai Napok 2004*, Veszprém, 123-127.
8. Németh, Á., and Sevela, Béla, Glicerinszármazékok biotechnológiai előállítása. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Éves Naggyűlése és X: Fermentációs Kollokvium 2004*, Keszthely.
9. Sevela, B.; Kupcsulik, B.; Németh, Á. Mezőgazdasági melléktermékek felhasználása finomkémiai alapanyagként. *KÉKI 315. Tudományos Kollokvium 2004*.
10. Németh, Á., és Sevela, Béla, Melléktermékek visszaszorítása enzimes membránreaktorban glicerinné biokonverzió esetén. *33. Műszaki Kémiai Napok 2005*, Veszprém, 141-144.
11. Németh, Á.; and Sevela, B., Forschungen für enzymatische Herstellungen der industriellen wertvollen Glycerin-Derivate. *17. Frühlingsakademie 2005*, Balatonfüred.
12. Németh, Á.; and Sevela, B., Új lehetőségek a glicerinné származékok enzimes biokonverziója területén. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Éves Naggyűlése és I. Középeurópai Mikrobiológiai Fórum 2005*, Keszthely.
13. Németh, Á.; and Sevela, B., Új eredmények a glicerinné enzimes biokonverziója területén. *34. Műszaki Kémiai Napok 2006*, Veszprém, 95-97.
14. Németh, Á.; and Sevela, B., A glicerinné hasznosításának legújabb fejleményei. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Éves Naggyűlése 2006*, Keszthely.
15. Németh, Á., and Sevela, Béla, Technológia fejlesztés a glicerinné enzimátikus hasznosítására. *35. Műszaki Kémiai Napok 2007*, Veszprém, 164-167.
16. Balássy, A., Németh, Á. and Sevela, B., A New Biotechnological Method for Glycerol Utilization. *The Young Scientists and Students International Scientific Conference on "MODERN PROBLEMS OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY" 2007*, Odessa, Ukraine.

17. Németh, Á. a. S., B, Kutatások a biodízel melléktermékének hasznosítására. *KÉKI 328. Tudományos Kollokvium 2007*, Budapest.

*Poszter bemutatók*

18. Németh, Á., Kupcsulik, B. and Sevela, B., 1,3-propanediol-dehydrogenase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. *4. European Symposium on Biochemical Engineering Science 2002*, Poszter prezentáció, Delft.
19. Hetényi, K., Németh, Á. and Sevela, B, Researches on renewable resources at BUTE ABFS F-Labor. *Fifth Croatian Professional and Scientific Conference on Biotechnology with International Participation 2007*, Stubicke Toplice.

*Szabadalom*

20. Sevela B.; Kupcsulik B.; Németh Á.; Novák L.; Poppe L.; Dukai J.; Nagy F., Eljárás 1,3-propándiol előállítására biotranszformációval. *P 05 00961 2005*.

*Más témájú publikációk*

21. Németh, Á.; Harmati, E.; Kupcsulik, B.; Radnai, G.; és Sevela, B., Szennyvíztisztítás biomasszával. *Biokémia 2005*, 1, 15-17.
22. Németh, Á., és Sevela, Béla., Biotechnológia és bioenergetika Magyarországon a 21. században. *Veszprémi Napló 2006*, 2006.08.15.
23. Hetényi, K.; Németh, Á.; and Sevela, B., Tejsavtermelő technológia kidolgozása. *35. Műszaki Kémiai Napok 2007*, Veszprém, 164-167.

**6. További Hivatkozások**

24. Batzing, B. L.; Claus, G. W., Biphasic Growth of *Acetobacter suboxydans* on a Glycerol-Limiting Medium. *J. Bacteriol.* **1971**, 108, (1), 592-595.
25. Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. and Adachi, O, Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agric Biol Chem* **1985**, 49, (4), 1001-1010.

26. Luthi-Peng, Q.; Scharer, S.; Puhán, Z., Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**, 60, (1-2), 73-80.
27. Luthi-Peng; Dileme; Puhán, Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, 59, (2 - 3), 289-296.
28. H. Biebl, A.-P. Z., K. Menzel, W.-D. Deckwer, Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **1998**, 50, (1), 24-29.
29. Lin, E. A. J. a. E. C. C., *Klebsiella pneumoniae* 1,3-Propanediol:NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* **1987**, 169, (5), 2050-2054.
30. Menzel K, Z. A. P. a. D. W. D., High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme microb. technol* **1997**, 20, (2), 82-86.
31. Tobimatsu, T.; Kajiura, H.; Toraya, T., Specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Archives of Microbiology* **2000**, 174, (1 - 2), 81-88.
32. McGregor, W. G.; Phillips, J.; Suelter, C. H., Purification and Kinetic Characterization of a Monovalent Cation-activated Glycerol Dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, (10), 3132-3139

