Aszkorbinsav termelése biotechnológiai módszerekkel

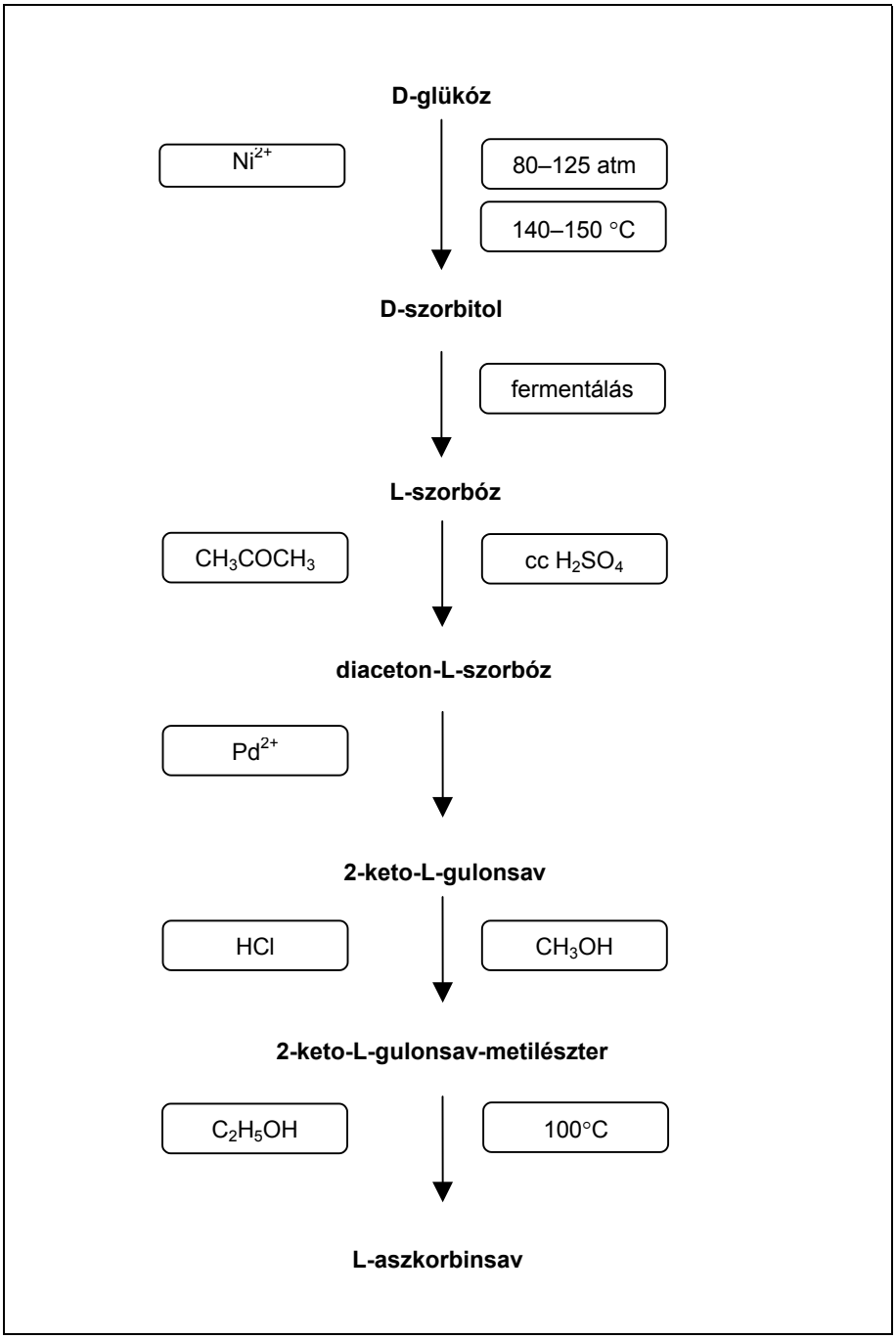
Tárgyszavak: L-aszkorbinsav; élelmiszeripar; takarmánygyártás; bioszintézis; biotranszformáció; biokatalízis.

Az L-aszkorbinsav (L-AA) termelése a világon évente 80 000 t-ra becsülhető, a globális piaci forgalom 600 M USD és az évi növekedési ráta 3–4%. A szintetikus L-AA kb. 50%-át vitaminpótló és gyógyszerkészítményekhez (pl. égések kezelésére szolgáló kenőcsök) használják. Gyorsan bővülő piacot jelent kozmetikai és kollagéntermelést serkentő képessége alapján. Az L-AA antioxidáns sajátságait az élelmiszeriparban (az egész termelés 25%-a) és az üdítőital-gyártás során (15%) is felhasználják a pigment elszíntelenedésének és az enzimes barnulásnak a megelőzésére, az íz és aroma megóvására és a tápérték növelésére. Az L-AA-t gyakran adagolják állati takarmányhoz (10%), bár a háziállatok maguk képesek szintetizálni. Az L-AA-val kiegészített takarmányt általában csirkék, malacok, borjak és stressznek kitett állatok optimális fejlődése és egészségének megtartása céljából alkalmazzák, gyakran haltenyészetek takarmányozásához is, mivel több, kereskedelmi forgalomban levő halfaj (pl. pisztráng) nem képes szintetizálni.

Jelenleg a szokványosan gyártott L-AA-t a hétlépéses Reichstein eljárással szintetizálják D-glükózból (d-glc) kiindulva *(1. ábra).* Ez a módszer hat kémiai és egy fermentációs lépésből áll a D-szorbitol D-szorbózzá oxidálása céljából. A így előállított L-AA hozama ~50%. Bár ez az eljárás valamennyi előnnyel rendelkezik, amely több mint 60 évi fejlesztés után várható, azonban igen energiaigényes és sok lépésében nagy hőmérséklet és/vagy nyomás szükséges.

Ezenkívül a kémiai átalakítások zöme jelentős mennyiségű szerves és szervetlen oldószert és reagenst (pl. aceton, kénsav, NaOH) igényel. Bár néhány vegyület újrahasznosítható, szigorú környezetvédelmi intézkedésekre van szükség, ami jelentős hulladéklerakási költséget okoz. Ezek és egyéb gazdasági tényezők fokozták a érdeklődést a mikrobiális biotranszformációknak az L-AA gyártásához való felhasználása iránt. A legújabb technológiai innovációk fermentációs eljárásokkal és sejtmentes biokatalitikus rendszerekkel kapcsolatosak, és előmozdítják a további fejlő

dést. Ezenkívül a biokémiában a rekombináns DNS-technológiában elért eredmények – a genomika forradalmával együtt – bővítették a hozzáférhető lehetőségek körét az L-AA-gyártáshoz és L-AA-tartalmú biomassza előállításához alkalmazható biotechnológia céljából.



1. ábra L-AA előállítása
Reichstein eljárással

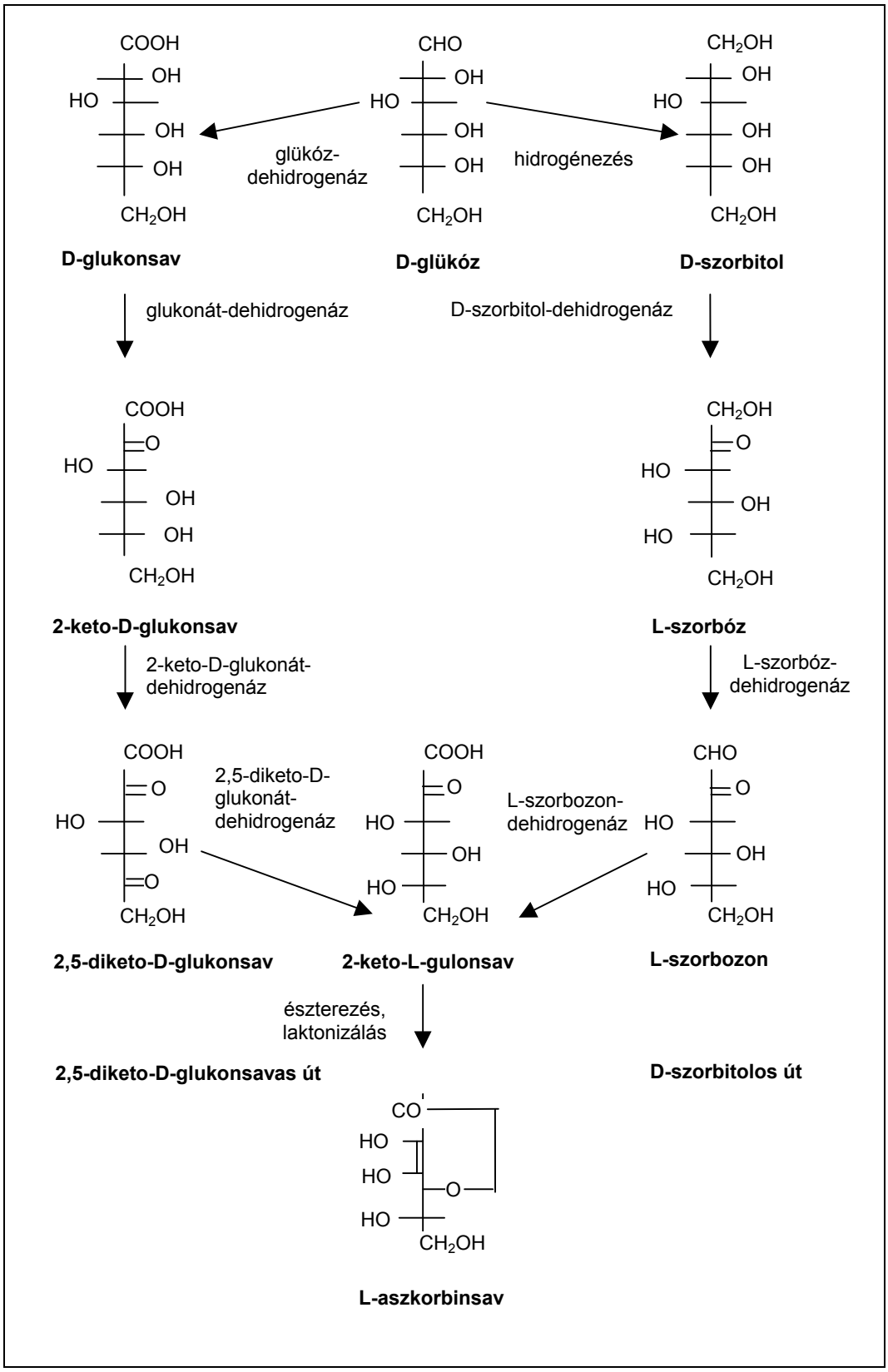
Reichstein köztitermékek szintézise bakteriális biotranszformációval

A Reichstein eljárást röviddel az L-AA felfedezése után dolgozták ki (1928). A szintézis kémiai módszereken alapszik és nincs kapcsolatban az L-AA-szintetizáló szervezetek által használt biokémiai folyamatokkal. Azonban hamarosan arra törekedtek, hogy biotranszformációt alkamazzanak az L-AA termelésére. Erre utal, hogy egy mikrobiális lépést iktattak be a D-szorbitolnak L-szorbózzá oxidálásához. Olyan baktériumtörzseket (pl. *Gluconobacter oxydans*) fejlesztettek ki a transzformáció céljára, amelyekkel rendkívül nagy (közel 100%-os) hozam érhető el. Mivel az iparilag hasznos prokarióták nem szintetizálnak L-AA-t, ezért a Reichstein köztitermékek szintetizálására próbálták ezeket felhasználni. A két legelterjedtebb módszer:

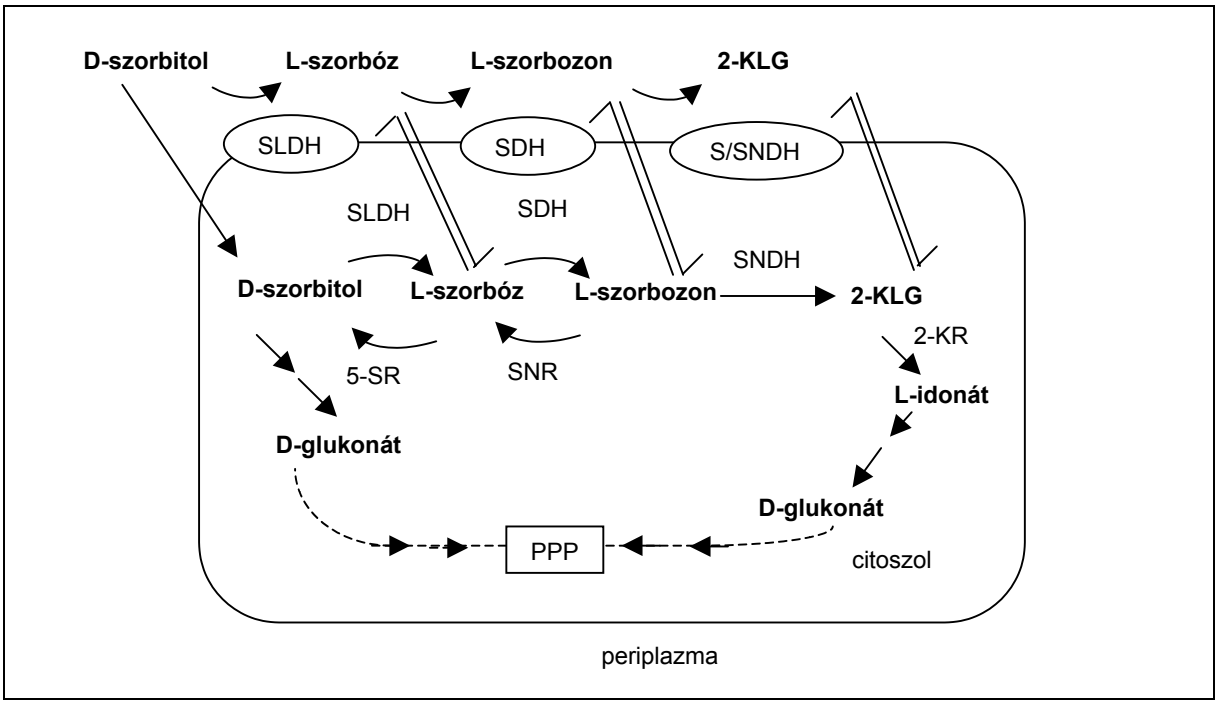
1. a D-glc oxidálása 2-keto-L-gulonáttá (2-KLG) D-glukonáton, 2-keto-D-glukonáton és 2,5-diketo-D-glukonáton (2,5 DKG reakcióút) keresztül, és
2. D-szorbitol vagy L-szorbóz oxidálása 2-KLG-vá az L-szorbozon köztitermékeken keresztül (szorbitol út *2. ábra).*

Mivel egyedi baktériumtörzsek, amelyek képesek a D-glc 2-KLG-vá való hatékony átalakítását katalizálni nem ismertek, így kezdetben kevert vagy szakaszos fermentációt alkalmaztak. Ezeket a törekvéseket később kiszorította a baktériumtörzsek metabolikus kapacitásának kibővítése géntechnikával. Hamarosan kifejlesztettek egy olyan *Erwinia herbicola* törzset, amelyben kifejeződik a *Corynebacterium* sp.-ből származó, a 2,5-DKG-reduktázt kódoló gén, és így lehetővé válik a 2-KLG bioszintézise közvetlenül D-glc-ből. Azonban igen gyenge (~5%) 2-KLG-hozamot értek el, mivel a 2,5-DKG-termeléshez szükséges három dehidrogenáz máshol helyezkedik el a sejtben (periplazma), mint a 2-KLG-vé való átalakításhoz szükség 2,5-DKG (citoplazma). Később kifejlesztették az *E. citreus* törzset, amely kifejezi a 2,5-DKG-reduktázt kódoló gént, és ez 49%-os hozammal termel 2-KLG-t D-glc-ből. Közölték, hogy *Pantoea citrea* törzsek 120 g/l 2 KLG-t termelnek D-glc-ből <120 h alatt, fermentorokban. Váratlanul azt észlelték, hogy a törzsek kezelése egy látens plazmiddal javította a szaporodási jellegeket magasabb hőmérsékleten, így csökkentette a teljes fermentációs időt.

A géntechnikát is alkalmazták a törzsek javítására, hogy növeljék a hozamot a D-szorbitol folyamaton keresztül, amikor a D-szorbitolt egy dehidrogenáz-sorozat 2-KLG-vé oxidálja. Erre a célra a *Gluconobacter oxydans* alkalmas, de az átalakításhoz szükséges, három dehirdogenáz szubcelluláris elhelyezkedése törzsenként változik *(2. ábra).* A D-szorbitol folyamat köztitermékeinek átvitele a sejtplazmába a citoszol-reduktázok jelenléte miatt káros, mert ezek átvezetik a köztitermékeket a pentóz-foszfát ciklusba. Ennek a problémának a megoldása céljából más forrásokból származó, membránhoz kötött dehidrogenázokat fejeztek ki rekombináns *Gluconobacter oxydans*ban,



2. ábra L-AA-szintézis mikrobiális útja



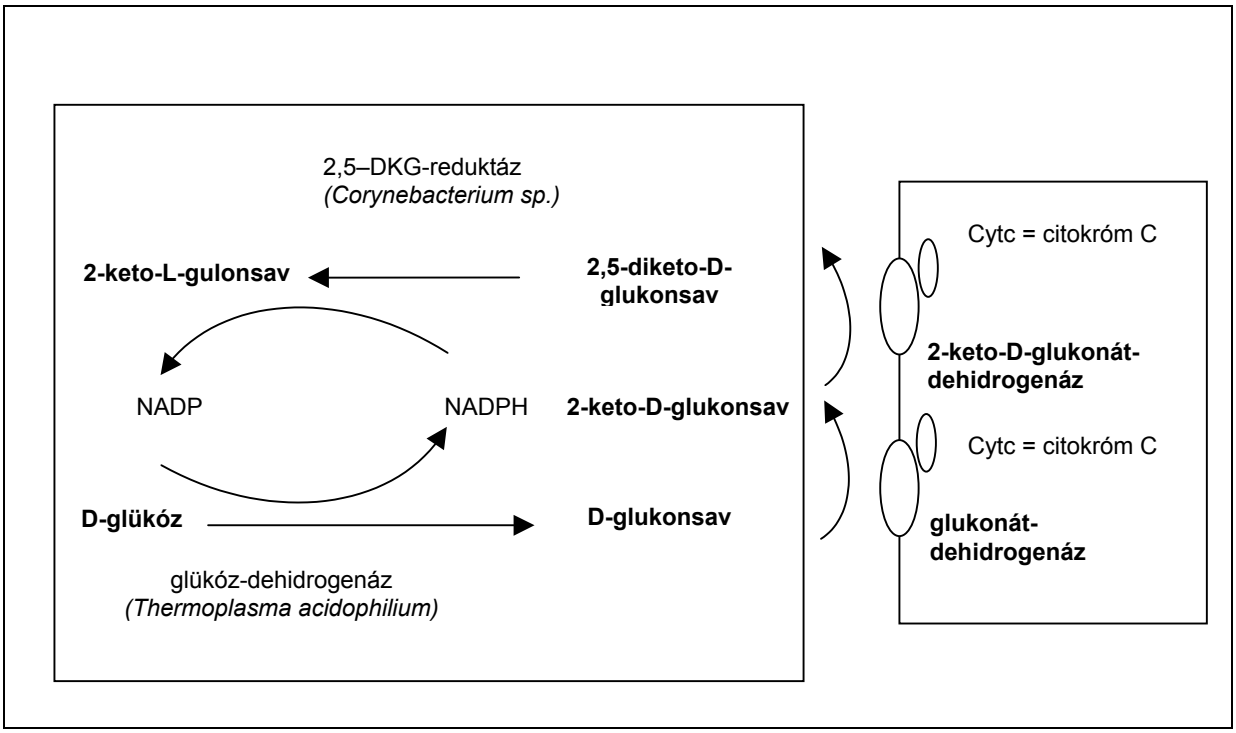
3. ábra A 2-KLG szintézise és lebomlása ecetsav-baktériumok hatására

hogy kiegészítsék vagy pótolják a citoszol enzimeket. Ezen a módon jelentősen javult a 2-KLG hozama mind L-szorbózból (68–81%), mind L-szorbozonból (25–83%) nyugvó sejtekben, azonban fementációs viszonyok között nem javult a hozam. Nemrég izoláltak egy *G. oxydans* törzset japán őszibarackból, amely közel kvantitatívan átalakította a D-szorbitolt L-szorbózzá membránon között szorbitol-dehidrogenáz útján, de 2-KLG-t nem tudott szintetizálni. Újabban japán szerzők közölték, hogy tisztítottak és klónoztak egy kettős specificitású L-szorbóz/L-szorbozon-dehidrogenázt, amely képes L-szorbóz oxidálására 2-KLG-vé *in vitro.* Feltételezik, hogy a fehérje periplazmás elhelyezkedése fokozza felhasználhatóságát egy teljesen periplazmás D-szorbitol reakcióút kifejlesztéséhez.

Folyamatos biokatalitikus rendszerek

Az eddig javasolt rendszerek közül egyedül a 2,5-DKG folyamaton alapuló módszer fejleszthető ki ipari alkalmazás céljára *(4. ábra).* Ebben a rendszerben a D-glükózt D-glukonáttá alakítják *Thermoplasma acidophilum*ból származó, NADP-függő, oldható glükóz-dehidrogenáz útján. A 2,5-DKG-vé való további átalakítás olyan sejtpreparátumokkal érhető el, amelyek membránhoz kötött D-glukonátot, 2-keto-D-glukonát-dehidrogenázt és citokróm C

kofaktort tartalmaznak. Végül a 2,5-DKG-t 2-KLG-vé alakítják egy oldható, NADPH-függő



4. ábra 2-KLG szintézisének biokatalitikus útja

2,5-DKG-reduktázzal, egyidejűleg a NADP regenerálódik és D-glukonát-dehidrogenáz által felhasználható. Ezt a technológiát valószínűleg egymástól függetlenül fejlesztették ki az USA-ban és Kínában. A kínai kutatócsoport laboratóriumi méretekben dolgozta ki a módszert, D-glukonát és 2-keto-glukonát-dehidrogenáz forrásaként *G. oxydans* nyugvó sejtjeit alkalmazva. Így D-glc-ből 16,8%-os 2-KLG-hozamot értek el 30 h alatt, 388-as kofaktorciklussal. Hasonló koncepciót fejlesztettek ki az USA-ban különböző vállalatok és a Szabványügyi Intézet közreműködésével. Ennek során a *Pantoea citrea* sejtjeit mutagenizálták, hogy inaktiválják a membránhoz kötött glükóz-dehidrogenázt, majd permeabilizálták szerves oldószerekkel. Ezek a sejtek a D-glukonát 2,5-DKG-vá való átalakításért felelős, két membránhoz kötött dehidrogenáz forrásaként működtek. A bioreaktort 6 óráig járatták 60%-os oxigéntelítettség mellett, mialatt a kezdeti 2-KLG-képződési arányok 10 g/l · h-t értek el – 5 g/l · h integrált produkciós arányok mellett – és a teljes kofaktorciklus >500 volt. Ezután a bioreaktort leállították és lassú keveréssel biztosították a végső 2-KLG-titert (42 g/l) és a 100%-ot megközelítő hozamot. A két oldható enzim aktivitása nem csökkent a kísérlet folyamán. Ennek az eljárásnak számos előnye várható: költségcsökkenés a drága enzimkofaktorok újrafelhasználásával, melléktermék képződésének kiküszöbölése, tisztább termékkinyerés, kvanti

tatív hozam, nagy térfogati produktivitás, a tőkeberuházás csökkentése a termelőreaktor méretének kisebbítésével. Várhatóan ezt a technológiát hamarosan alkalmazzák ipari méretekben is. A folyamatos biokatalitikus eljárás egyik korlátja az alkalmazott 2,5-DKG-reduktáz nagy K_m-értéke (2–13,5 mM). A *Corynebacterium*ból előállított enzimek ezenkívül nem hőállóak. Az eljárás tökéletesítése céljából megpróbáltak izolálni olyan 2,5-DKG-reduktázokat, amelyek kedvezőbb katalitikus sajátságokkal rendelkeznek. Nemrég sikerült izolálni és kifejezni két új és kisebb K_m-értékű 2,5-DKG-reduktázt, amelyek 1000-szer nagyobb katalitikus hatékonyságot mutatnak az eddigieknél. Ezenkívül mindkét enzim mind NADPH-t, mind NADH-t hasznosít kofaktorként. Az egyik enzim ezenkívül hőstabilabb, mint a korábban izolált reduktázok.

2-KLG biokonverziója L-aszkorbinsavvá

Jelenleg a kutatás hangsúlya a 2-KLG termelésére helyeződött, amely felhasználható L-AA szintézisére. A hagyományos kémiai konverziós módszerek több problémával járnak (sok lépésre van szükség, HCl-gázt alkalmaznak, a végtermék jelentős tisztításra szorul). Ezek kiküszöbölésére hidrolázenzimeket használtak a 2-KLG-észterek L-AA-vá konverziójához, bár ennek a módszernek a hatékonysága még ismeretlen. Közölték, hogy *Zymomonas mobilis*ből, *E. coli*ból és *Fusarium oxysporum*ból izolált laktonázokkal átalakítható a 2-KLG L-AA-vá. Azonban jelenleg egyik módszer sem eredményez elég nagy L-AA-hozamot, hogy gazdaságos lenne.

Újabban közölték, hogy sikerült olyan élesztőtörzsek *(Candida blankii* és *Cryptococcus dimennae)* azonosítása, amelyek képesek a 2-KLG-t L-AA-vá alakítani. Azonban az így elért hozamok igen alacsonyak voltak. Mindkét faj képes szaporodni L-AA-n – mint egyedüli szénforráson –, a katabolikus folyamat mutagenezise és a tenyésztési viszonyok optimálása javíthatja a hozamot.

L-AA direkt bioszintése eukariótákban

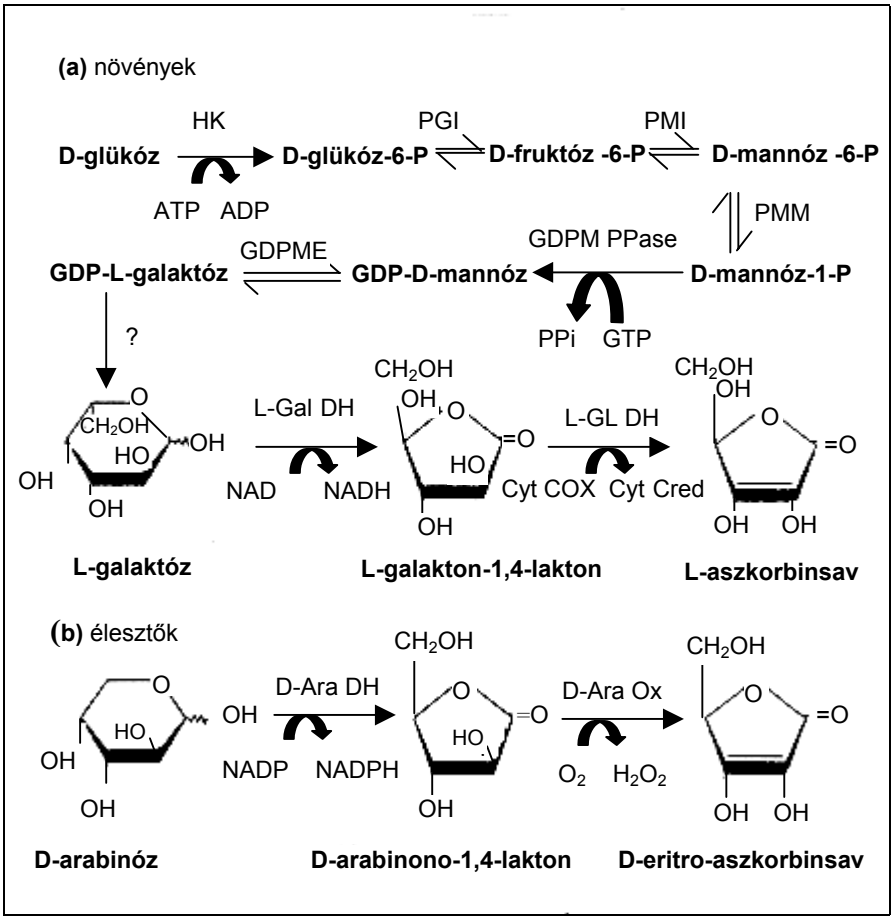
A természetesen L-AA-t szintetizáló, eukariotikus rendszer felhasználása L-AA előállítására még gyermekcipőben jár, bár már több szabadalmat vettek nyilvántartásba.

Ez főleg annak tulajdonítható, hogy nem ismeretes az L-AA-bioszintézis folyamata és szabályozása biológiai rendszerekben. Azonban az elsősorban növényekben és élesztőkben elért legújabb eredmények, valamint a rendelkezésre álló adatgyűjtő és genomanalizáló berendezések szaporodása arra utal, hogy a következő években jelentős szerepe lesz ennek a módszernek.

Növények és mikroalgák alkalmazása L-AA termelésére

Kísérleteket végeztek a mikroalgák közvetlen L-AA termelésére való felhasználására olcsó nyersanyagokból. Azonban igen kis L-AA-hozamot értek el a *Chlorella* mikroalga vad típusú sejtjeinek tenyésztésével fermentorokban. Egy

mutagenezis-program és a fermentálás optimálása segítségével a hozam 2 g/l L-AA-ra emelkedett. Az algák által termelt L-AA zöme a sejten belül maradt, és az eljárást úgy szabadalmaztatták, mint egy L-AA-val dúsított biomassza-előállítási módszert, főleg állati takarmány vagy táplálékkiegészítő céljára. Sikerült feldúsítani az L-AA-t a fermentlében, amikor átálltak a *Prototheca* színtelen, acidofil mikroalga alkalmazására. Ez a módszer még nem jelent iparilag versenyképes lehetőséget L-AA-gyártás céljára. Azonban a magasabb rendű növényekben folyó, primer L-AA-bioszintézis tisztázása *(5. ábra)* újabb lehetőséget nyújt az eljárás javítására géntechnikai módszerrel. A növényekben az L-AA D-glükózból szintetizálódik egy tízlépéses folyamat során, L-galaktózon (L-gal) keresztül. Gyorsan sikerült azonosítani és klónozni azokat a fontos géneket, amelyek kapcsolatosak a bioszintetikus folyamattal, és már számos enzim szekvenciáját közölték. A GDP-mannóz-3,5-epimeráz klónozása lehetővé teszi a GDP-L-galaktóz egyszerű szintézisét. Várható, hogy a közeljövőben a többi enzimet is megtisztítják és génjeiket klónozni fogják.



5. ábra Növényi (a) és gomba (b) antioxidáns reakcióutak bioszintetikus hasonlóságai

Amerikai kutatók közölték, hogy összefüggést észleltek a GDP-mannóz-3,5-epimeráz aktivitása és mutagenizált törzsek *(Prototheca)* L-AA-tartalma között. Arra utaltak, hogy ennek a lépésnek a fokozott szabályozása lehetővé teszi nagyobb L-AA-tartalmú algák és növények termelését. A növényi L-AA-tartalom fokozására irányuló, egyetlen sikeres kísérlet – amelyet géntechnikai módszerrel végeztek – eredményeiről 2000-ben számoltak be. Ennek során az L-gulono-1,4-lakton-oxidáz kódoló patkánygént salátában fejezték ki, és a transzgénikus vonalakban az L-AA-tartalom hétszeres növekedését figyelték meg. Még nem világos, hogy egy emlősgén expressziója miért okozza az L-AA-termelés fokozódását növényekben. Azonban *Arabidopsis* sejtkultúrával végzett vizsgálatok szerint a növényekben egy másodlagos L-AA-bioszintetikus folyamat megy végbe, amelyben L-gulono-1,4-lakton szerepel köztitermékként. További vizsgálatok során jellemezni akarták az L-AA-bioszintézis fokozásának legjobb módszerét egy- vagy többsejtes növényekben, géntechnikával. A lehetőségek közé tartozik a növényi teljesítmény fokozása a helyszínen, nagy L-AA-tartalmú takarmány termelése, funkcionális és egészséges tápanyagok gyártása. A jelenlegi közhangulatban nem valószínű, hogy egy emlősgén kifejezésére módosított és tápanyagként használható növényfajta elfogadható lesz a szabályozó szervek vagy a közvélemény számára, bár a géntechnikai módszereket kedvezőbben kellene fogadni.

Közvetlen L-AA-szintézis élesztőkkel

Mivel az élesztőket a biológiai iparban elég széleskörűen alkalmazzák, igen vonzó olyan törzsek kialakítása, amelyek egyszerű cukrok L-AA-vá való direkt fermentálására képesek. A korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy az élesztősejtek tartalmaznak L-AA-t, de az újabb vélemények szerint a szokásos szénszubsztrátumon tenyésztett élesztősejtekben nincs L-AA, de ehelyett D-eritro-aszkorbinsavat (D-EAA) tartalmaznak. Ez a vegyület hasonló antioxidáns funkciókat teljesít élesztőkben, de nincsen skorbut elleni aktivitása. Azonban az élesztősejtek felhalmoznak L-AA-t, ha nem élettani szubsztrátumok jelenlétében – L-gulono-lakton (L-GuL), L-galaktono-lakton (L-GL) vagy L-galaktóz – szaporodnak, amelyek az állati és növényi L-AA-bioszintézis köztitermékei. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy ezekből a szubsztrátumokból az élesztőkben a D-EAA-bioszintézis enzimjei útján szintetizálódik az L-AA (5. ábra). Így pl. a megfelelő növényi enzimektől eltérően az élesztőenzimek – D-arabinóz(D-ara)-dehidrogenáz, D-arabinono-lakton(D-AL)-oxidáz – *in virto* igen széles szubsztrátspecificitással rendelkeznek és képesek oxidálni nemcsak D-ara-t, hanem L-gal-t, L-fruktózt és L-xilózt is, valamint ezek megfelelő savas laktonjait. Az *S. cerevisiae* sejtek előinkubálása 30 mM D-ara-val erősen csökkenti (85%-kal) a sejtek L-(1-^{14}C)galaktózt L-AA-vá való átalakítási képességét, ami a szubsztrát ugyanazon aktív hely(ek)ért való versengésére utal. Ezenkívül *S. cerevisiae* D-AL-oxidázának expressziója *E. coli*ban kibővíti

a szervezet metabolikus kapacitását, és képes D-EAA szintetizálására exogén L-GL vagy L-GuL hozzáadásával, vagy pedig L-AA szintézisére exogén L-GL vagy L-GuL jelenlétében. Ezek alapján feltételezhető, hogy a D-EAA bioszintézisére használt enzimek lehetővé teszik, hogy a jövőben élesztőket használjanak L-AA termelésére. A hasznosítási lehetőség attól függ, sikerül-e biztosítani olcsó forrást a kiindulási szubsztrátumhoz (L-gal vagy L-GL). Az L-GL a cukoripar melléktermék, amelyet az L-AA közvetlen, mikrobiális fermentálására lehet felhasználni. Az L-gal igen ritka cukor és olcsó forrása nem áll rendelkezésre. Azonban a szabad L-gal termelésében részt vevő gének izolálása – L-AA-bioszintézis folyamán, növényekben – hasznos biokémiai eszközöket biztosíthat az ipari mikroorganizmusok metabolikus kapacitásának bővítéséhez. Ezt az irányt követi jelenleg világszerte több kutatócsoport. Az a tény, hogy az élesztősejtek képesek L-AA-t szintetizálni L-galaktózból arra utal, hogy csak három enzim (GDP-D-mannóz-3,5-epimeráz, valamint a szabad L-gal-t GDP-L-gal-ból felszabadító enzimek) expressziója szükséges a szintetizáló kapacitás kiterjesztéséhez élesztőre.

Következtetések és távlatok

A Reichstein módszer uralma véget ért, mivel igen költséges. Emellett a fenntartható alternatívák kifejlesztése irányában való eltolódás észlelhető a kémiai eljárásokkal szemben. A 2-KLG termeléséhez kétszakaszos fermentációs technológia áll rendelkezésre, amely tisztább és hatékonyabb módszer, ráadásul egyharmaddal olcsóbb, mint a Reichstein eljárás. A legfontosabb ipari vállalatok fokozott érdeklődést mutatnak a fermentációs technológia iránt. Új szereplők jelennek meg a piacon, akik valószínűleg hamarosan megkedik a C-vitamin termelését fermentációval.

A növényekben és élesztőkben folyó L-AA-bioszintézis jobb megértése lehetővé fogja tenni új, direkt L-AA-termelési módszerek kifejlesztését. Az emberi fogyasztásra és állati takarmány céljára szánt növényi termékek L-AA-tartalmát növelő genetikai módszerek már hozzáférhetők. Az élesztősejtek L-AA-szintetizáló képessége felhasználható egylépéses fermentálási eljárás kidolgozásához.

(Dr. Pálfi Ágnes)

Hancock, R. D.; Viola, R.: Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. = Trends in Biotechnology, 20. k. 7. sz. 2002. p. 299–305.

Eschenfeldt, W. H.: DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. = Applied Environmental Microbiology, 67. k. 2001. p. 4206–4214.

Ji, A.; Gao, P.: Substrate selectivity of *Gluconobacter oxydans* for production of 2,5-diketo-D-gluconic acid and synthesis of 2-keto-L-gluconic acid in a multienzyme system. = Applied Biochemistry and Biotechnology, 94. k. 2. sz. 2001. p. 213–223.