



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Írta:

SEVELLA BÉLA

Lektorálta:

KARAFFA LEVENTE

BIOMÉRNÖKI MŰVELETEK ÉS FOLYAMATOK

Egyetemi tananyag

2. javított kiadás

2011



COPYRIGHT: © 2011-2016, Dr. Sevela Béla, BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

LEKTORÁLTA: Dr. Karaffa Levente, Debreceni Egyetem

Creative Commons NonCommercial-NoDerivs 3.0 (CC BY-NC-ND 3.0)
A szerző nevének feltüntetése mellett nem kereskedelmi céllal szabadon másolható, terjeszthető, megjeleníthető és előadható, de nem módosítható.

TÁMOGATÁS:

Készült a TÁMOP-4.1.2-08/2/A/KMR-2009-0028 számú, „Multidiszciplináris, modulrendszerű, digitális tananyagfejlesztés a vegyészmérnöki, biomérnöki és vegyész alapképzésben” című projekt keretében.



KÉSZÜLT: a [Typotex Kiadó](#) gondozásában

FELELŐS VEZETŐ: Votisky Zsuzsa

AZ ELEKTRONIKUS KIADÁST ELŐKÉSZÍTETTE: Faragó Andrea

ISBN 978-963-279-470-9

KULCSSZAVAK:

biotechnológia, enzimhatás és enzimkinetika, biokonverziók, tápoldatok, fermentáció, matematikai modellek, levegőztetés, bioreaktorok, sterilizés, mérés és szabályozás.

ÖSSZEFOGLALÁS:

A jegyzet áttekintést nyújt a biotechnológiai iparban alkalmazott biomérnöki alpműveletekről és alapfolyamatokról, mintegy megalapozandó a biomérnökök mérnöki szemléletének kialakítását.

Az első fejezet a biotechnológia definíciója és történetének rövid ismertetése után a bioeljárások főbb ismérveit mutatja be.

A jegyzet második fő fejezetében az enzimek tulajdonságainak körbejárása és kinetikai viselkedésük leírása ismereteket nyújt az olvasónak az enzimek működésének és felhasználásának kvantitatív alapjairól. A harmadik fő fejezetben az enzim és sejtes biokonverziók (biotranszformációk) iparilag jelentős példáival ismerkedhetünk meg, mégpedig az azokban ható enzimek által katalizált reakciók (alapfolyamatok) csoportjainak szempontjából.

A jegyzet negyedik fő fejezete a fermentációs műveleteket veszi sorra, ismét csak a kvantitatív, mérnöki leírások hangsúlyos felhasználásával. Ennek keretében foglalkozik a fermentációs tápanyagokkal, azok hasznosulásával, illetve a fermentációs folyamat sztoichiometriájával. A különböző fermentációs technikákat, rendszereket kinetikai viselkedésük leírásával ismerteti. Fontos műveletként részletesen taglalja a sterilizést és dezinficiálást. A legfontosabb bioreaktorok csoportjainak ismertetésén túl az azokban folyó történések műszeres követésének, mérésének kérdéseivel is foglalkozik.

A jegyzet fő törekvése a kvantitatív viszonyok megismerése, ami alapvető feltétele a biomérnök által tervezett és vezetett folyamatok sikerességének.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS. A BIOMÉRNÖK ÉS A BIOTECHNOLÓGIA	5
1.1. A biotechnológia vázlatos története	7
1.2. A biotechnológiai eljárások jellemzői	13
2. ENZIMMÉRNÖKI ALAPISMERETEK.....	24
2.1. Az enzimek működésének alapjai	24
2.2. Az enzimek tulajdonságai, nevezéktanuk.....	35
2.3. Egyszerű enzim reakciók kinetikai leírása	38
2.4. Enzimmoduláció, bevezetés, áttekintés.....	51
2.5. Többszubsztrátos reakciók	69
2.6. Egyéb hatások az enzimek aktivitására	74
2.7. Heterogén fázisú enzim reakciók viselkedése.....	77
2.8. Az enzimek alkalmazási területei és néhány enzimtechnológiai alapfogalom.....	94
2.9. Allosztérikus enzimek	103
2.10. Transzportfolyamatok kinetikája.....	114
3. BIONKONVERZIÓK, BIOTRANSZFORMÁCIÓK	122
3.1. Oxidációs/Redukciós biotranszformációk.....	124
3.2. Szteroid vegyületek biotranszformációja	132
3.3. Transzglykozilezés	134
3.4. Kondenzáció, addíció, csoporteltávolítás (liázok reakciói).....	139
3.5. Izomerizálás.....	141
3.6. Reszolválás	143
3.7. Hidrolízis	147
3.8. Foszforilezés.....	158
3.9. Koenzim-regenerálással egybekötött vegyes biotranszformációk.....	160
3.10. Peptidek biotranszformációja, peptidszintézis	164
4. FERMENTÁCIÓS MŰVELETEK ÉS FOLYAMATOK	168
4.1. A mikrobák tenyésztésének alapösszefüggései	168
4.2. Mikroorganizmusok tápanyagigénye, a tápanyagok hasznosulása a fermentáció során	174
4.3. A mikrobiális sztöchiometria alapjai.....	196
4.4. Fermentációs rendszerek és matematikai modellezésük	206
4.5. Fermentációs rendszerek levegőellátása.....	283

4.6. Bioreaktorok.....	325
4.7. A sterilizés és dezinficiálás műveletei.....	361
4.8. A bioreaktorokban folyó történések mérése és szabályozásuk elemei.....	386
SZÓJEGYZÉK.....	399
ÁBRÁK, ANIMÁCIÓK, SZIMULÁCIÓK, VIDEÓK, TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	407
Ábrák.....	407
Animációk.....	417
Szimulációk.....	417
Videók.....	418
Táblázatok.....	418

1. BEVEZETÉS. A BIOMÉRNÖK ÉS A BIOTECHNOLÓGIA

A biotechnológia definiálása, meghatározása nem könnyű, minden definíció a meghatározó szájíze szerint elfogult. Vannak, akik csak az úgynevezett „modern” biotechnológiát tekintik biotechnológiának, azaz a génmérnökség produktumait, míg mások sokkal szélesebben értelmezik a fogalmat. Mi az utóbbi módon tekintjük ezt a tudományágat, elfogadva az [IUPAC](#) által javasolt definíciót, amely az EFB (European Federation of Biotechnology) által 1981-ben elfogadott definícióval azonos:

A BIOTECHNOLÓGIA a	BIOKÉMIA, MIKROBIOLÓGIA és a MÉRNÖKI TUDOMÁNYOK
integrált alkalmazása	mikroorganizmusok állati és növényi sejtek/szövetek vagy ezek részeinek (pl. enzimeinek)
technológiai felhasználása céljából.	

Mi sem jellemzi jobban a definíciók sokféleségét, mint hogy az USA kongresszusa is szükségét érezte a fogalom definiálásának 1984-ben:

Biotechnologies are commercial techniques, that use living organisms or substances from those organisms, to make or modify a product, including techniques used for the improvement of the characteristics of economically important plants and animals and for the development of microorganisms to act on environment (Congress of the USA, 1984)

A biotechnológia kifejezést egy polihisztor magyar mérnök, Ereky Károly¹ találta ki és vezette be 1919-ben, és a következőképpen definiálta: **„Biotechnológia minden munka, amellyel alapanyagokból termékeket állítunk elő élő organizmusok segítségével.”**

Ezt a korát messze megelőző „jó” definíciót Ereky avval is megtette, hogy szerinte a kőkorszak és a vaskorszak mintájára majd egyszer egy biokorszak is eljön. Sokak szerint ma már jócskán e korban élünk.

Természetesen ez az ősedefiníció és a fentebb ismertetett modernebb értelmezések sem örökéletűek, folyamatos revideálásra szorulnak, hiszen a biotechnológia fejlődése rendkívül gyors, hatóterülete egyre bővül, az alapvető lényeg megmaradása mellett a definíciót állandóan finomítani kell. 2005-ben az [OECD](#) egy ún. statisztikai biotechnológia definíciót adott, amely meglehetősen szélesen értelmezi a biotechnológia hatókörét: **„the application of science and technology to living organisms, as well as parts, products and models thereof, to alter living or non-living materials for the production of knowledge, goods and services”.**

Ezt egy listával egészítették ki, amely lista a pillanatnyilag a területhez értendő technikákat, metodikákat, eljárásokat, megközelítéseket tartalmazza. Így a fejlődéssel egyidejűleg e listaalapú definíció is tovább alakítható, kiegészíthető.

A teljesség igénye nélkül az alábbi felsorolás e lista néhány fontosabb elemét tartalmazza. E listát mint magyarázó útjelzést kell tekinteni az egyszerű definícióhoz.

DNS/RNS: Genomika, farmakogenomika, genetic engineering, DNS/RNS szekvenálás/szintézis/amplifikáció, génexpresszió, antiszensz technológia.

¹Ereky Károly (Esztergom, 1878. okt. 20. – Vác, 1952): politikus, miniszter, gépészmérnök, közgazdasági szakember. Tanulmányait a bp.-i Műegyetemen végezte, 1905-től az egyetem adjunktusa. 1911-ben megalapította az állatértékesítő egyesületet, 1912-ben pedig a nagyotényi sertéshízlaldát. Részt vett a Csilléry–Friedrich-féle ellenforradalmi csoport szervezkedésében. A Friedrich-kormányban 1919. aug. 27-től 1919. nov. 24-ig közlelmzési miniszter. A nemzetgyűlésbe a Keresztény Nemzeti Egyesülés Pártja programjával került be, az 1922-i választásokon megbukott és visszavonult a politikai élettől. Elnöke volt a Magyar Gyorsírók és Gyorsírás Barátai Budai Egyesületének. **Forrás:** Életrajzi lexikon

Fehérjék és egyéb molekulák: Fehérjék és peptidok (nagy molekulájú hormonok) szekvenálása/szintézise és engineeringje, proteomika, fehérjekinyerés és -tisztítás, signaling, sejtreceptorok azonosítása.

Sejt- és szövettenyésztés és engineering (beleértve a biomedical engineeringet is)

Sejtfúzió, vakcina-/immunstimuláns termelés, embriómanipuláció.

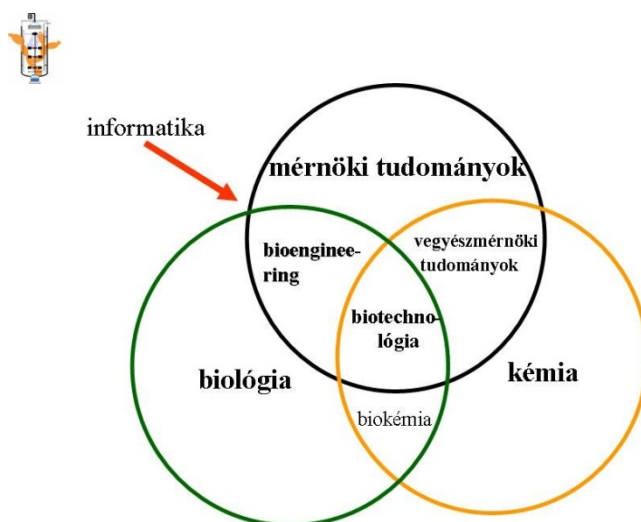
Biotechnológiai folyamatok, technikák: Fermentáció, bioreaktorok, biobányászat, [bioleaching](#), [bioremediáció](#), bio(lógiai)szűrés, fitoremediáció.

Génterápia, vírusvektorok gyógyászati felhasználása.

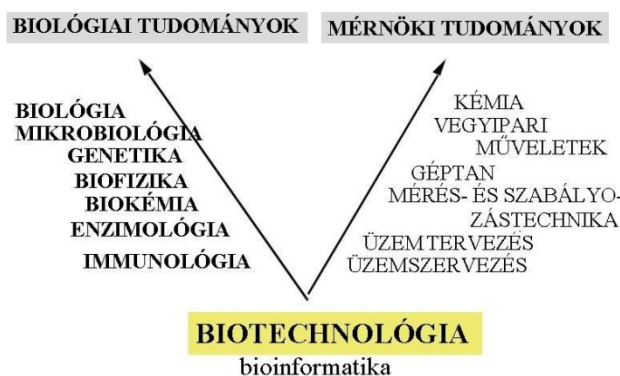
Bioinformatika: genomok, fehérjeszekvenciák, -szerkezetek adatbázisai, komplex biológiai folyamatok modellezése, rendszerbiológia.

Nano-biotechnológia: nano- és mikromanipulációs technikák alkalmazása olyan „szerkezetek” előállítására, amelyekkel a biorendszerek mélységükben tanulmányozhatók, és felhasználhatók pl. hatóanyag bejuttatásra vagy diagnosztikára.

A biotechnológia egy interdiszciplináris alkalmazott tudomány. A kölcsönhatásokat, illetve az alkalmazott alapszciplinákat vázlatosan az 1.1 és 1.2 ábrán mutatjuk be.



1.1. ábra: A biotechnológia interdiszciplináris



1.2. ábra: Kapcsolat az alapszciplinák és a biotechnológia között

A biomérnök feladatai e komplex tudománnyal kapcsolatban abból a tényből adódnak, hogy a bioeljárásokat a valóságban, termelő ipari léptékekben működtetni kell, ami azt jelenti, hogy a

laboratóriumi folyamatok léptéknövelését meg kell oldani, az ipari termelő technológiákat meg kell tervezni és meg kell valósítani, és a már működő technológiákat optimális szinten üzemeltetni kell. Mindeközben minden szinten meg kell felelni a rendkívül szigorú minőségbiztosítási, GLP, GMP és validálási követelményeknek.

Mielőtt a biotechnológiai eljárások néhány jellemzőjével megismerkednénk, vessünk egy pillantást a történeti összefoglalásra, amelyben a hagyományos és modern biotechnológia kialakulását és fejlődésének legjelentősebb állomásait foglaltuk össze.

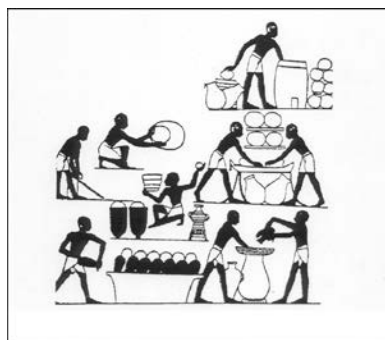
1.1. A biotechnológia vázlatos története

Az alábbi összeállításban a klasszikus és modern biotechnológia történetével, a genetika és biokémia/fiziológia fejlődésének néhány sarokpontjával ismerkedhetünk meg, amelyek hozzájárultak a biotechnológia fejlődéséhez.

Kr. e. 6000–3000

Egyiptom, Babilon, Kína: kenyérkelesztés kovással. Alkoholos erjesztett italok (gyümölcslé, tej). Sörkészítés. Sajtkészítés. Eceterjesztés.

1.3. ábra: Kenyérkészítés.
Egyiptomi sírfestmény, Théba,
Kr. e. 1500 körül



1.4. ábra: Sörkészítés és
söráldozat Nin-Harra
istennőnek. Monument Blau,
agyagtábla, Sumér Birodalom,
Kr. e. 2500 körül.
(Louvre, Párizs)



Kr. e. 2000

Borkészítés Asszíriában.

500

Az első antibiotikum: penészes szójatúrót használnak gyulladások, kelések kezelésére Kínában.

420

Szókratész (470?–399) felveti a genetika első problémáját: Miért nem hasonlítanak a fiúsülöttek mindenben apjukra?

Időszámítás kezdete körül

Sörkészítés a keltáknál és a germánoknál is.

Kr. u. 100 körül

Az első inszekticid: porított krizantém (Kína).

3. század

Marcus Aurelius Probus: szőlőtelepítés Germániában.

1150

Alkohol előállítása borból.

1300

Mexikó: az aztékok algát aratnak a tavaikból élelmiszerként.

1320

Egy arab törzsfő először alkalmaz mesterséges megtermékenyítést „szuper ló” kitenyésztése céljából.

14. század

Ecetmanufaktúra Orléans közelében.

1590

Janssen: mikroszkóp feltalálása.

- 1630 William Harvey megállapítja, hogy a növények és állatok egyaránt szexuálisan szaporodnak.
- 1650 után Mesterséges gombatenyésztés Franciaországban.
- 1663 Hooke: sejtek létezésének felfedezése.
- 1680 körül Antoni van Leeuwenhoek(1632–1723): mikroszkóp, spermium, élesztő, baktérium.

1.5. ábra: Antoni van Leeuwenhoek és mikroszkópja



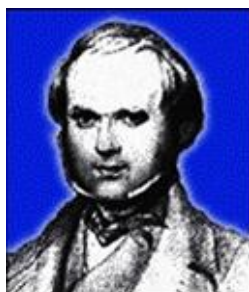
- 1700 Camerarius, Rudolf Jakob (Camerer, 1665–1721) német botanikus bizonyítja, hogy a virágoknak is vannak szexuális szervecskéik.
- 1761 Kölreuter, Joseph Gottlieb (1733–1806) német botanikus leírja az első keresztezést különböző fajtájú növények között.
- 1796 Edward Jenner (1749–1823) angol orvos kifejleszti az első vakcinát a himlő ellen (vaccinus = tehénből eredő).
- 1838 Schleider–Schwann-sejtelmélet: „Every cell arises from a cell.”
- 1857 Pasteur: a fermentációért mikrobák, élesztők a felelősek; a tejsavas erjedés leírása.



1.6. ábra: Louis Pasteur (1822–1895)

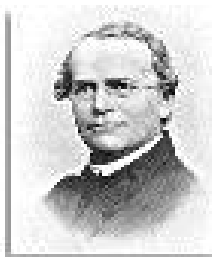
(www.accessexcellence.org/RC/AB/BC/Louis_Pasteur.php)

- 1858 Traube feltételezi, hogy a fermentációt enzimek végzik.
- 1859 Darwin megjelenteti az „On the origin of species” c. munkáját.



1.7. ábra: Charles Darwin (1809–1882)

- 1863–64 Pasteur feltalálja a [pasztörözést](#).
- 1865 Mendel kifejti törvényeit.



1.8. ábra: Gregor Mendel (1822–1884)

(http://en.wikipedia.org/wiki/Gregor_Mendel)

1879	Hansen felfedezi az Acetobactereket.
1881	Tejsav fermentációs előállítás.
1882	Robert Koch azonosítja a tbc-t okozó baktériumot.
~1885	Mesterséges gomba termesztés az USA-ban.
1893	Koch és Pasteur a fermentációs eljárást szabadalmaztatja.



1.9. ábra: Robert Koch (1843–1910)

(http://hu.wikipedia.org/wiki/Robert_Koch)

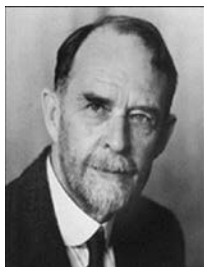
1897	Buchner megállapítja, hogy az élesztőben erjesztő enzimek vannak.
------	---



1.10. ábra: Eduard Buchner (1860–1917)

(http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1907/buchner.html)

19. század vége	Az első kommunális szennyvíztisztító telepek megépülnek Berlinben, Hamburgban, Münchenben, Párizsban és egyebütt.
1900 körül	A kromoszómaelmélet általánossá válik.
1902	Az IMMUNOLÓGIA fogalom megjelenése.
1906	Paul Ehrlich: Salvarsan, az első kemoterapeutikum. GENETIKA fogalom bevezetése.
1908	Calmette és Guerin: BCG-vakcina a tbc ellen (bevezetve: 1921).
1910	Thomas H. Morgan bizonyítja, hogy a gének a kromoszómákon lokalizálódnak.



1.11. ábra: Thomas H. Morgan (1866–1945)

(http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1933/index.html)

1915

A péklesztőgyártás ún. német eljárásának bevezetése.

1914–16.

Péklesztő és takarmányélesztő nagyvolumenű gyártása Delbrück, Hayduck és Hanneberg vezetésével.

1916

Weizmann eljárása az aceton-butanol fermentációra.



1.12. ábra: Chaim Weizmann (1874–1952)

(<http://www.jewishvirtuallibrary.org/jsource/biography/weizmann.html>)

1915

Először találnak bakteriofágot, baktériumvírust.

1915–16

Szulfitos eljárás glicerinfermentációra.

1919

A BIOTECHNOLÓGIA szó először jelenik meg nyomtatásban: Ereky Károly magyar gépészmérnök tollából.



1.13. ábra: Ereky Károly (1878–1952)

1920-tól

Felületi citromsav fermentáció.

1928–29

Fleming felfedezi a penicillint.

1.14. ábra: Alexander Fleming (1881–1955) átveszi a Nobel-díjat 1945-ben

(www.bl.uk/onlinegallery/features/beautifulminds/flemingnobelge.html)



1937

Mamoli és Vercellone felfedezik a mikrobiális transzformációk lehetőségét.

1938

Franciaországban elkezdik gyártani a *B. thuringiensis* toxin

- inszekticidet.
- 1938 A „molekuláris biológia” kifejezés megszületik.
- 1941 Beadle–Tatum: „egy gén egy enzim” elmélet.
- 1941–44 A penicillin ipari gyártása elkezdődik.
- 1944 Schatz és Waksman felfedezik a streptomicint.
Sanger bevezeti a kromatográfiát az inzulin szekvenálására.
Avery bizonyítja, hogy a DNS hordozza a genetikai információt.
- 1946 Tatum és Lederberg felfedezik a konjugációt.



1.15. ábra: Edward Lawrie Tatum (1909–1975)

(http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1958/tatum.html)



1.16. ábra: Joshua Lederberg (1925–)

(http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1958/lederberg.html)

- 1948 Duggar felfedezi a klórtetraciklint.
- 1949 Megindul a [szubmerz](#) ecetsav termelés.
A B₁₂ vitamin fermentációs előállításának kezdete.
Ipari léptékű [biotranszformációk](#) kezdete.
- 1953 Watson, Crick és Wilkins felfedezik a kettős spirált.

1.17. ábra:

Watson, Crick és Wilkins

(www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/)



- 1955 Az állati szövet kémiaiilag definiált közegben szaporítható.
- 1956 Kornberg felfedezi a DNS polimeráz enzimet.
- 1957 Kinoshita és munkatársai: glutaminsav fermentáció
- 1959 JACOB és MONOD: genetikai (génszintű) szabályozás felfedezése.



1.18. ábra: François Jacob (1920–)

(www.nndb.com/people/157/000129767/)



1.19. ábra: Jacques Monod (1910–1976)

(http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1965/monod.html)

1955–60	Szubmerz citromsav fermentáció
1960	Növények vegetatív mikroszaporítása.
1961	Nierenberg poly-U szintézise, UUU a Phe-t kódolja.
1962	Watson, Crick és Wilkins Nobel-díjat kapnak.
1965	Egér és emberi sejtet fuzionáltatnak.
1966	A genetikai kód megfejtése.
1969	Az első <i>in vitro</i> enzim szintézis
1970	Először izolálnak reverz transzkriptázt. Restrikciós enzimek felfedezése
1971	Protoplaszt ból a növény regenerálható.
1972	Első sikeres DNS-klónozás.
1973	Rekombináns DNS-módszerek: „genetic engineering”
1975	Moratórium Asilomarban az rDNS-kísérletekre. Első monoklonális AB (antitest) termelése.
1976	Megalakul a GENENTECH, az első géntechnikai vállalat.
1977	A Genentech bejelenti az első humán fehérje baktériummal történő előállítását: szomatosztatin.
1978	Paradicsom és burgonya szomatikus hibridizációja (POMATO).
1980	A Chakrabarty-eset: az USA megengedi genetikailag módosított létforma szabadalmaztatását: „superbug”: szénhidrogénfaló mikroba. „Anything under the sun that is made by the hand of man is patentable” (USA Suprem Court, 1980).
1981	Az első transzgénikus emlős (egér).
1982	Humán inzulin – az első kereskedelmi rDNS-készítmény.

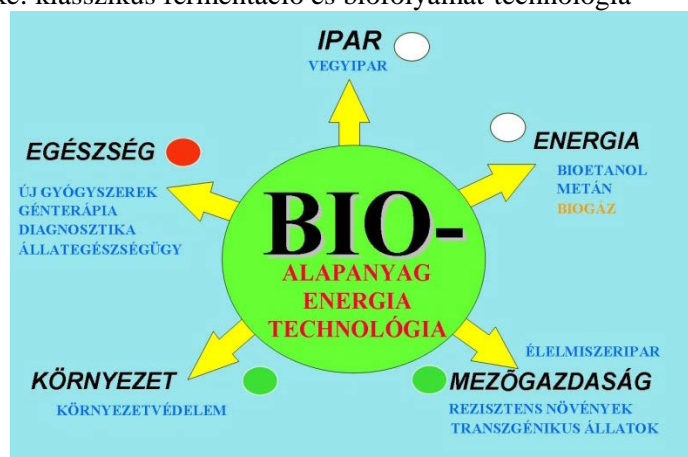
1983	Kary Mullis (CETUS) kifejleszti a PCR technikát (1993: Nobel-díj).
1990	A Humán genom projekt elindul(HUGO).
1992	Birkaklónozás: az állati sejt is totipotens.
1996	A teljes élesztőgenom ismert.
2000	A humán genom teljes szekvenciája ismert.

1.2. A biotechnológiai eljárások jellemzői

Ma a biotechnológiai eljárásokat a felhasználás területeinek megfelelően piros, fehér és zöld biotechnológiák csoportjaiba sorolják. A piros az egészséggel kapcsolatos területeket, a fehér a kémiai iparhoz alapanyag- és köztitermék-előállítás vonatkozásában kapcsolódó biotechnológiai eljárásokat, míg a zöld biotechnológia a mezőgazdasággal, környezetvédelemmel és menedzsmenttel, [bioremediáció](#)val, szennyvíztisztítással stb., valamint a bioüzemanyagokkal kapcsolatos eljárásokat és szolgáltatásokat jelenti.

E háromszínű kategorizálás nem lévén teljes és kielégítő, ma már néha egész színskálát kapcsolnak a biotechnológiák különböző területeihez, amint az alábbi összeállítás mutatja² (ami természetesen a fenti kategóriák tartalmát némileg megváltoztatja):

- Piros: egészség, orvosi diagnosztika
- Sárga: élelmiszer és táplálkozás
- Kék: vízkultúrák, tenger-biotechnológia
- Fehér: bioipar
- Arany: bioinformatika, nano-biotechnológia
- Zöld: mezőgazdaság, bioüzemanyag, biotrágya, bioremediáció, szennyvíztisztítás, geomikrobiológia
- Barna: száraz, sivatagi területek biotechnológiája
- Fekete: bioterrorizmus, biofegyver...
- Bíbor: szabadalom, publikálás, újítás...
- Szürke: klasszikus fermentáció és biofolyamat-technológia



1.20. ábra: A biotársadalom

Erekly Károly megjósolta, hogy az ipari forradalomhoz hasonlóan egyszer eljön egy biokorszak is. Sokak szerint a 21. század éppen ez a biokorszak lesz, és úgy tűnik, hogy ez már el is kezdődött, hiszen már látszanak az úgynevezett „[biotársadalom](#)” körvonalai. Ez a fogalom azt jelenti – és az ábra szerint bizony ma már ez jellemzővé kezd válni –, hogy a mindennapi élet minden szegmensét

² E. J. Da Silva (2005): The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind Electronic Journal of Biotechnology.

átszövik a biotechnológiák. Másképpen fogalmazva: **biológiai** az alapanyag (évenként megújuló lignocellulóz- és cukorbázis), **biológiai** eredetű az energia (lignocellulóz alapú hőerőművek, bioetanol, biodízel) és **bio** a technológia is, amellyel ezeket feldolgozzák, illetve felhasználják.

A klasszikus és modern biotechnológiai eljárások sokféleségét a következő néhány táblázat összeállítással reprezentáljuk, bemutatva egy sor terméket és termelő organizmust, valamint felhasználási területet.

Az első táblázatban olyan élelmiszeripari termékeket soroltunk fel, amelyek közvetlenül végtermékként fogyaszthatóak.

1.1. táblázat: Fermentált élelmiszeripari végtermékek

Termék	Alapanyag	Mikroorganizmus
alkoholos italok sör, bor, pálinkák	szőlő, gyümölcsök maláta , burgonya, gabonafélék	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
nem alkoholos élelmiszerek		
ecet	bor, maláta, etanol	<i>Acetobacter aceti</i>
savanyú káposzta	fejes káposzta	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
olívabogyó	olíva	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
savanyú kovász	roz- és búzaliszt	<i>Lactobacillus sanfranzisko</i> <i>L.fructivorans</i> , <i>L.fermentum</i> <i>Torulopsis holmii</i> , <i>S.cerevisiae</i> ...
sütőipari termékek	...liszt	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
tejtermékek		
tejföl	tej	<i>Streptococcus lactis ssp cremoris</i> <i>Streptococcus lactis ssp diacetylactis</i>
joghurt	tej	<i>Streptococcus salivarius ssp thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>
kefir	tej	<i>Candida kefir</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus lactis</i>
lágy sajtok	tej	<i>Penicillium caseicolum</i> , <i>P.camemberti</i> <i>Penicillium roquefortii</i>
kemény sajtok	tej	<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
húsáruk		
kolbászfélék	hús	<i>Lactobacillus spp</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus varians</i>
sonkafélék	hús	<i>Vibrio costicola</i> , <i>Staphylococcus</i>
élvezeti szerek		
kávé	kávésbab	<i>Enterobacter</i> , tejsavbaktériumok, élesztők
tea, dohány	tealevél, dohánylevél	(endogén enzimek) <i>Pediococcus sp</i>
kakaó	kakaóbab	élesztők, tejsavbaktériumok ecetsav-baktériumok, bacillusok
szójaszós	rizs, liszt, szója	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Lactobacillus</i> , <i>Torulopsis sp.</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

A következő táblázat olyan termékeket tartalmaz, amelyeket adalékanyagként használnak az élelmiszeriparokban a végtermékben vagy a technológiai lépések során.

1.2. táblázat: Biotechnológiai termékek az élelmiszeriparban

Termék	Felhasználás	Termelő mikroorganizmus (forrás)
gyümölcssavak		
citromsav E330-333	italok, dzsemek, szörpök tejtermékek	<i>Aspergillus niger</i>
ítakonsav	margarin	<i>Aspergillus terreus</i>
glükonsav E574-579	sütőpor, kolbász fém tisztítás	<i>Aspergillus niger</i>
fumársav E360-369	desszert, tejtermékek húskészítmények	<i>Rhizopus, Mucor</i>
almasav E350-352	italok, dzsemek, zselék cukorkák, olajok, kenyérszítványok	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium brevicompactum</i>
borkősav E335-337	italok, desszertek, zselék	<i>Penicillium notatum</i> <i>Aspergillus griseus</i>
borostyánkősav E360-369	ízesítő, K-, Ca-, Mg-sók mint NaCl helyettesítők	<i>Rhizopus, Mucor, Fusarium</i>
tejsav E270	gyümölcslé, majonéz, desszertek sütőipar, tejtermékek, húskészítmények	<i>Lactobacillus delbrueckii,</i> <i>Lactobacillus casei</i>
aminosavak		
Glu E620,621	ízesítő, ízesítő: „umami” íz okozója	<i>Corynebacterium glutamicum,</i> <i>Brevibacterium flavum</i>
Lys	ételkiegészítés, takarmány	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Trp	Antidepresszáns, takarmány	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
vitaminok		
kobalamin (B ₁₂)	élelmi kiegészítés	<i>Propionibacterium shermanii</i>
riboflavin (B ₂) E101	élelmi kiegészítés	<i>Ashbya gossypii</i> <i>Eremothecium ashbyi</i>
β-karotin	élelmi kiegészítés	<i>Blakeslea trispora</i>
aszorbinsav E300		biotranszformáció (pl. <i>Gluconobacter</i>)
ízesítő anyagok		
IMP E630-633 GMP E626-629	ízkiemelő, levesporok konzervek	<i>Brevibacterium ammoniagenes,</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i>
gélesítő anyagok		
alginát E400	fagylalt, puding, habok	<i>Acetobacter vinelandii</i> tengeri alga
xantán E415	italok, ömlesztett sajt, krémsajt pudding, dresszinge emulzióstabilizálás	<i>Xantomonas campestris</i>
pektin E440	dzsemek, fagylalt, sajt, majonéz	alma, citrusfélék
enzimek		
glükóz izomeráz	fruktózszirup, izocukor	<i>Arthrobacter sp, B. coagulans</i>
β-glukanáz	lészűrés	<i>Trichoderma harzianum</i>
β-galaktozidáz	tejcukor-eltávolítás	<i>A. oryzae, Kluyveromyces fragilis</i>
α-amiláz	keményítóbontás	<i>B. licheniformis, A. niger</i>
glükoamiláz	keményítóbontás	<i>A. niger, Rhizopus oryzae</i>
pektináz	gyümölcslé-, borszűrés	<i>A. niger, A. oryzae,</i> <i>Penicillium simplicissimum</i>
kataláz	H ₂ O ₂ felesleg eltávolítása pl. tejből	<i>Micrococcus lysodeicticus</i>
glükózoxidáz	O ₂ eltávolítása konzervekből	<i>A. niger</i>
rennin	tejalvasztás, sajtgyártás	<i>borjúgyomor, Bacillus spp</i>

		<i>Streptococcus lactis</i>
proteázok	tésztagyártás, italgyártás sajtgyártás, húskészítmények szójakészítmények	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i> , <i>A. orizae</i>
lipázok	sajttízesítés, fehérjék zsírtmentesítése zsírsavak, zsírok, olajok észterezése	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor javanicus</i>
antocianáz	borok színtelenítése	növényi eredetű
lyozim	késői sajtelfűvödés megakadályozása	tojás

1.3. táblázat: Nagy mennyiségben termelt mikroba eredetű enzimfehérjék és a termelő mikroorganizmusok

α -amiláz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Thermobacterium sp.</i>
β -amiláz	<i>B. polymyxa</i>
amyloglikozidáz	<i>Aspergillus niger</i>
cellulázok	<i>Trichoderma reesei</i>
glükóz-izomeráz	<i>Streptomyces oligochromogenes</i> <i>B. coagulans</i>
glükóz-oxidáz	<i>A. niger</i>
α -D-glükozidáz	<i>A. niger</i>
lipázok	<i>A. niger</i> <i>Candida cylindraceae</i> <i>Geotrychum candidum</i> <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Mucor sp.</i>
pektinészteráz	<i>A. orizae</i>
savas proteináz	<i>A. saitoi</i>
alkalikus proteináz	<i>A. orizae</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>
neutrális proteiáz	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
pullulanáz	<i>Aerobacter aerogenes</i>
poligalakturonáz	<i>A. niger</i>
penicillin aciláz	<i>E. coli</i>

Az enzimek előállításával kapcsolatban jegyezzük meg, hogy a legnagyobb mennyiségben a proteolitikus enzimeket termelik (ez az összes enzim mintegy 58%-a), ezen belül az alkalikus proteázok 25%, az egyéb proteázok 20% és a sajtenzim rennin 10%-ot képviselnek.

Az amilázok és a glükózizomeráz, azaz a keményítőlebontó, illetve cukorátalakító enzimek is mintegy 25%-ot képviselnek a teljes enzimpiacon. A gyógyászati (terápiás) és analitikai, illetve diagnosztikai célra felhasznált enzimkészítmények a piacnak mintegy 10%-nyi szegmensét jelentik.

1.4. táblázat: Mikrobák termelte nemfehérje polimerek és a termelő mikrobák

alginát	<i>Azotobacter vinelandii</i>
cellulóz	<i>Acetobacter sp.</i>
curdlan	<i>Agrobacterium sp.</i>
dextrán	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
foszfomannán	<i>Hansenula capsulata</i>
poli- β -hidroxibutirát	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
szkleroglukán	<i>Sclerotium glucanicum</i>
xantán	<i>Xantomonas campestris</i>

1.5. táblázat: Mikroba-termék aminosavak és a termelő mikroorganizmusok

D, L-alanin	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-arginin	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-citrullin	<i>Bacillus subtilis</i>
L-glutaminsav	<i>Brevibacterium flavum</i>
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-hisztidin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-izoleucin	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-leucin	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-metionin	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-ornitin	<i>Microbacterium ammoniaphilum</i>
L-fenilalanin	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
L-prolin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-treonin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-triptofán	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-tyrozin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-valin	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
L-szerin	<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>

1.6. táblázat: Szerves savak és a termelő mikrobák

ecetsav	<i>Acetobacter aceti</i>
D-arabino-aszkorbinsav	<i>Penicillium notatum</i>
citromsav	<i>Aspergillus niger</i>
eritorbinsav	<i>Penicillium cyaneofulvum</i>
fumársav	<i>Rhizopus delemar</i>
glükonsav	<i>Aspergillus niger</i>
itakonsav	<i>Aspergillus terreus</i>
2-keto-glükonsav	<i>Serratia marcescens</i>
α -keto-glutársav	<i>Candida hydrocarbofumarica</i>
2-keto-L-gulonsav	<i>Gluconobacter melanogenus</i>
tejsav	<i>Lactobacillus lactis...</i>
L-almasav	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>

1.7. táblázat: Illatanyagok, amelyek mikrobákkal termelhetők

ánizsaldehid	ánizs	<i>Trametes sauvolens</i>
benzaldehyd	mandula	<i>Trametes sauvolens</i>
benzil-alkohol	gyümölcs	<i>Phellinus igniarius</i>
citronellol	rózsa	<i>Ceratocystis varispora</i>
γ -dekalakton	barack	<i>Sporobolomyces odorus</i>
diacetyl	vaj	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
p-metil-benzil-alkohol	jácint, gardenia	<i>Mycoacia uda</i>
Me-p-metoxi-fenilacetát	ánizs	<i>Trametes odorata</i>
Me-fenilacetát	méz	<i>Trametes odorata</i>
6-pentil- α -piron	kókusz	<i>Trichoderma viride</i>
tetrametil-pirazinok	dió	<i>Corynebacteriumc glutamicum</i>

1.8. táblázat: Egyéb, vegyes mikroba-termelte vegyületek

antipain	proteáz-inhibitor	<i>Streptomyces sp.</i>
karotenoidok	pigmentek, provitaminok	<i>Dunaliella bardawil(alga)</i>
emulzán	emulgeálószer	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
giberellinek	növényi hormonok	<i>Giberella fujikuroi</i>
herbicidin	herbicid	<i>Streptomyces saganonensis</i>
indigo	pigment	<i>Escherichia coli</i>
inosin	ízfokozó (ételízesítő)	<i>Bacillus subtilis</i>
lizergsav	ergotalkaloid származékok	<i>Clariceps paspali</i>
B ₁₂	vitamin	<i>Propionibacterium shermanii</i>
sikonin	gyógyszer, színezék	<i>Lithospermium sp.</i>

A ma ismert több ezer antibiotikum közül a legismertebbeket listázza a 1.9. táblázat.

1.9. táblázat: Antibiotikumok

Antibiotikum	Típus	Termelő törzs
Penicillin G	laktám	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Streptomycin	aminoglikozid	<i>Streptomyces griseus</i>
Bacitracin	polipeptid	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cefalosporin C	polipeptid	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Klórtetraciklin	tetraciklinek	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Griseofulvin	spirociklohexén	<i>Penicillium griseofulvum</i>
Gentamicinek	aminoglikozid	<i>Micromonospora purpurea</i>
Nistatin	tetraén	<i>Streptomyces aureus</i>
Oleandomicin	makrolid	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Tiroidin	ciklikus polipeptid	<i>Bacillus brevis</i>
Vankomicin	glikopeptid	<i>Streptomyces orientalis</i>

A 1.10. táblázatban rekombináns DNS technikával kifejlesztett (továbbfejlesztett) biotechnológiai eljárásokkal termelt anyagokat sorolunk fel. Ma már természetesen nagyságrendekkel több ilyen termék van. Tudni kell, hogy például a klasszikus fermentációs termékeket is – citromsav, tejsav, mosóporenzimek stb – ma már szinte kizárólag az új biotechnikák segítségével feljavított, fejlesztett, genetikailag manipulált mikrobákkal állítják elő.

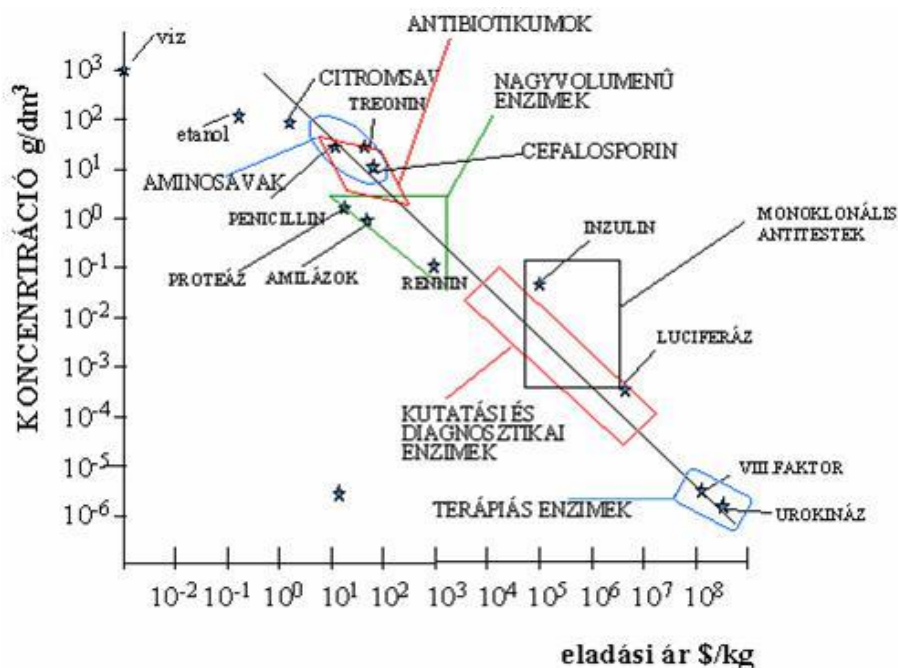
1.10. táblázat: rDNS termékek

TERMÉK	FELHASZNÁLÁS
Humán inzulin	cukorbetegség
Humán interferonok (α -, β -, γ -IFN)	antivírus/antitumor terápia
HGH (emberi növekedési hormon)	törpenövekedés ellen
Hepatítisz B vírusprotein	vírusellenes vakcina előállítás
Urokináz	trombolitikus hatás
L-fenil-alanin	az aszpartám édesítőszer alapanyaga
α -amiláz	keményítőhidrolízis
Állati növekedési hormonok	tej/hústermelés fokozása
Száj-és körömfájás vírusprotein	állatgyógyászati vakcina
E.coli K-88 és K-99 protein	vakcina a borjú és malacneveléshez (toxin okozta hasmenés ellen)
L-triptofán	takarmánykiegészítő
L-treonin	takarmánykiegészítő
Véralvadás VIII és IX faktora	hemofília
Eritropoietin (EPO)	anémia, krónikus veseelégtelenség esetén
Humán szérumalbumin	vértkiegészítő anyag
A herpesz, a malária és az influenza fehérje-antigénjei	vakcinák
Immunglobulinok	monoklonális antitestek
Limfokinek, elsősorban interleukin-2	az immunrendszer serkentése (baktérium/vírusfertőzések, antitumor-terápia)
Szöveti Plasminogen Aktivator (TPA)	trombolitikus hatás
Tumor Nekrosis Faktor (TNF)	antitumor-terápia
Borjúoltó (rennin)	sajtgyártás

A biotechnológiai iparok egy komoly nagyipart jelentenek, hatalmas termelési kapacitással és tetemes termelési értékkel. A USA-ban 2002-ben 1300 biotechnológiai vállalat működött mintegy 140 000 alkalmazottal. Ugyanekkor az EU-ban 1179 biotechnológiai cég 33 000 alkalmazottja 7,6 Mrd euró értékű terméket állított elő.

A biotechnológiai iparok által termelt termékek volumene és termelési, illetve kereskedelmi értéke rendkívül széles határok között mozog, és ez utóbbit elsősorban két tényező határozza meg: a keresettség, illetve a felhasználási mennyiség igény, valamint a fermentáció végén, a fermentáléban hozzáférhető, a feldolgozást nagymértékben befolyásoló termék koncentráció (amelyek az 1.21. ábra szerint a néhány száz gramm per litertől a néhány miligramm per liter tartományba esnek).

Érdekes képet kapunk, ha összevetjük ezt a biotechnológiai eljárások során megtermelt ún. [vágási fermentálé](#)ban mérhető hatóanyag-koncentrációt és az eladási árakat: ez egy világos, egyenes menti korrelációt mutat. Minél kisebb tehát a hatóanyag koncentrációja, annál nagyobb a termék értéke. Ez teljes mértékben egybevág a kereslettel is, minél olcsóbb a termék, annál nagyobb (lehet) az előállított mennyiség. Indokolt ez, hiszen például a mosóporenzim csak akkor eladható, ha olcsó, és akkor viszont igény van arra, hogy minél nagyobb mennyiségben állítsák elő, ami csak úgy lehetséges, ha a koncentrációja is nagy (1.21. ábra).



1.21. ábra: A biotechnológiai termékek kereskedelmi értékének és a koncentrációjának összefüggése

Egy 2005-ben készült piaci elemzés szerint a teljes fermentációs ipar méretét az évi 14,1 milliárd dollár jellemzi, amelyet 2009-re 17,8 milliárdra prognosztizáltak. Ezen belül a nyers antibiotikumok piaca volt a legnagyobb: 5 Mrd, ami érdekes módon ugyanannyi, mint 1998-ban, és ez a növekvő termelés melletti árcsökkenéseket jelzi. Az aminosavpiac volt a második legnagyobb és közel leggyorsabban növekvő piac, míg 2004-ben 3,5 Mrd volt, addig 2009-re 5 Mrd-t jósolnak. A harmadik legnagyobb piaci szereplő a szerves savak köre, amelynek felfutását 3 Mrd dollárra várják. Ezeket az adatokat a világgazdasági válság nyilvánvalóan nagymértékben befolyásolta, azonban a biotechnológiai ipar nagysága és fejlődése így is bizonyítható.

Ezen általános bevezetés után tegyük fel azt a kérdést, most már a biomérnök szemszögéből, hogy mik ma a biotechnológia lehetőségei, milyen célúak lehetnek a biotechnológiák, majd vizsgáljuk meg, hogy mik a feltételei egy-egy ilyen technológia megvalósításának. Az e kérdésekre kapható válaszok egyértelműen ki fogják jelölni azokat a műveleteket, folyamatokat és tárgyköröket, amelyeknek megismerése egy biomérnök számára elengedhetetlen, és amelyek egyszerre mind kijelölik további tárgyalásunk tematikáját is.

A modern fermentáció/biotechnológiai eljárások céljai/lehetőségei a termékek csoportosítása szerint tehát a következők:

SEJTTÖMEGTERMELÉS - péklesztő, [SCP](#)

SEJTKOMPONENSEK ELŐÁLLÍTÁSA - intracelluláris enzimek, nukleinsavak, poliszaharidok, rDNS termékek...

METABOLITTERMELÉS - [PRIMER metabolit](#): etanol, tejsav...
- [SZEKUNDER metabolit](#): antibiotikumok

EGYSZERŰ SZUBSZTRÁT KONVERZIÓ: glükóz → fruktóz
penicillin → 6-NH₂-penicillánsav

MULTISZUBSZTRÁT-KONVERZIÓ: biológiai szennyvíztisztítás

Valamennyi terméktípus esetében az alapanyagokat és segédanyagokat (a biomérnök szóhasználatával: a szubsztrát(um)okat) alakítja át az organizmus vagy annak valamely része egy-egy vagy többlépcsős reakciókban a kívánt haszonertermékké. Ilyen értelemben bármelyik típus esetében

tekinthetjük a sejteket vagy azok átalakítást végző alkotóelemeit *katalizátoroknak*, amelyek mellett, hogy elvégzik az átalakítást, alkalmasint maguk is átalakulhatnak: szaporodhatnak, növekedhetnek. Az átalakító katalizátor, a szubsztrátok és a termékek függvényében beszélünk *de novo fermentációs* folyamatokról, illetve *biotranszformációról*, *biokonverzióról*. Előbbi esetben szaporodó vagy nem szaporodó sejtek (mikroorganizmusok, állati vagy növényi sejtek)³ végzik a termék képzését (amely lehet a saját sejtanyaguk is) összetett táptalajon, tápoldaton, illetve tápoldatban, míg utóbbi esetben egy egyszerű konverzióval A anyagból a sejt vagy alkotórésze (enzime) egy másik B anyagot állít elő. (1.22. ábra)

FERMENTÁCIÓS FOLYAMAT (BIOSZINTÉZIS)

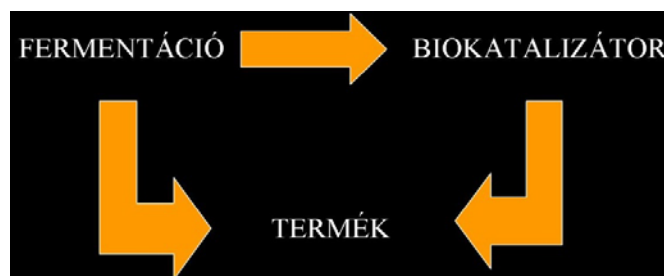
Σ TÁPANYAGOK $\xrightarrow[\text{SEJTEK}]{\text{SZAPORODÓ}}$ Σ TERMÉKEK

BIOTRANSZFORMÁCIÓ / BIOKONVERZIÓ

SEJT
SEJTALKOTÓRÉSZ
A ANYAG $\xrightarrow[\text{ENZIM}]{\text{SEJT}}$ B ANYAG

1.22. ábra: De novo fermentáció és biokonverzió

Azár *de novo* fermentációs folyamatról, akár biotranszformációról van szó, a fermentáció központi helyet foglal el, mivel előbbi esetben maga a termék-előállító folyamat a fermentáció, míg biokonverzió/biotranszformáció esetén a „katalizátor” előállítása történik fermentációval (1.23. ábra).



1.23. ábra: A fermentáció központi szerepe

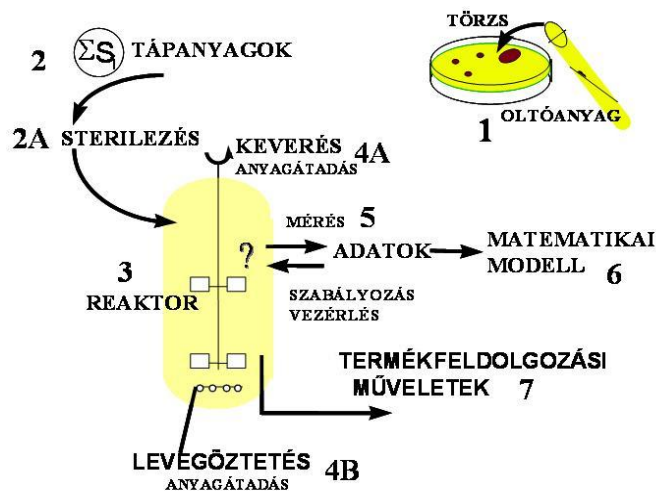
Azok a műveletek, amelyek egymásutánisága az előbbi folyamatok véghezviteléhez szükséges, alapvetően két csoportba sorolhatók:

UP STREAM műveletek: ezek a tenyésztéshez/átalakításhoz közvetlenül kapcsolódó műveletek: tápoldat (reakcióelegy) készítése, sterilizálás, tenyésztés (reakció) optimális környezeti körülményeinek biztosítása, anyagadási és hőátadási műveletek stb.

DOWN STREAM műveletek: a léfeldolgozás, azaz a termék kinyerésének és tisztításának műveletei, a melléktermékek feldolgozása, a környezet mentesítése: szennyvíztisztítás.

Az 1.24. ábrán egy steril fermentációs folyamat létrehozásának feltételeit mutatjuk be, és ezen az ábrán néhány műveletet is felismerhetünk azok közül, amelyekről a jegyzet további fejezeteiben részletesen szólnunk majd.

³ E jegyzetben sokszor csak mikroorganizmusokról beszélünk, de az esetek nem kis részében egyaránt igazak megállapításaink növényi és állati sejttenyésztésekre is.



1.24. ábra: Fermentációs folyamat megvalósításának feltételei és a kapcsolódó műveletek

Mindenekelőtt termelő törzsre van szükség egy eljárás megvalósításához (1). A törzs izolálásáról, a törzsfelzárkózással kapcsolatos klasszikus és modern genetikai módszerekről, a termelő törzsek konzerválásáról, a termelőképesség időről időre szükséges ellenőrzéséről e jegyzetben nem szólnunk, ezek más stúdiumok tárgyai (mikrobiológia, ipari mikrobiológia, mikrobiális genetika, génmérnöki ismeretek stb).

A második feltétel a megfelelő termelő tápanyagok (a nyersanyagok) kiválasztása, előkészítése, ezekből a táptalajnak, illetve tápoldatnak az elkészítése és csímentesítése (2, 2A).

Harmadik feltételként említjük a megfelelő bioreaktort (3), amelyben a fermentációs folyamatot végre lehet hajtani, és amellyel kapcsolatban egy sor művelettel fogunk foglalkozni (4A, 4B).

A reaktorban folyó történésekről csak mérések, a folyamatok nyomon követése útján nyerhetünk információkat (5). A nyert adatokat a matematikai modellezés eszköztárának segítségével dolgozzuk fel, rendszerezük és használjuk fel például a termelő folyamat szabályozásának, vezérlésének, automatizálásának céljaira (6).

Az eddig említett részfolyamatok és ezekkel kapcsolatos műveletek mind az *up stream műveletek* közé sorolhatók, míg az itt csak érintett termékfeldolgozási, izolálási és tisztítási műveletek (7) jelentik a fő *downstream* műveleteket.

A következő összeállításban vázoljuk fel a bioeljárások választásának eseteit (amikor pl. egy klasszikus kémiai előállítási mód és egy biotechnológiai megközelítés között választunk).

HOL HASZNÁLJUNK BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁST?

- Komplex molekulák felépítésekor, amikor nincs alternatíva: antibiotikumok, fehérjék, monoklonális antitestek előállítása.
- Izomerek egyikének exkluzív előállításakor: S vagy R enantiomerek.
- Amikor a természet képes több (sok) konszekutív reakció megvalósítására.
- Amikor a sejtek (enzimek) nagyobb hozammal alakítanak át, vagy a bioeljárásnak nagyobb vagy legalábbis összemérhető a produktivitása.

A bioeljárások sokszor kifejezett előnyökkel rendelkeznek a konvencionális kémiai eljárásokkal szemben. Ahol azonban előnyökről beszélhetünk, ott mindig a lehetséges hátrányokra is figyelemmel kell lenni, ezért az előnyök összefoglalása után néhány felmerülő problémára is felhívjuk a figyelmet.

BIOELJÁRÁSOK ELŐNYEI A KONVENCIONÁLIS KÉMIAI MÓDSZEREKKEL SZEMBEN

- ☉ A reakciókörülmények rendszerint enyhébbek (pH, nyomás, hőmérséklet).
- ☉ A bioeljárások megújuló alapanyagokat használnak fel (mind a szénváz, mind az energiaforrás tekintetében): CUKOR←KEMÉNYÍTŐ,
CUKOR←LIGNOCELLULÓZ
- ☉ Ezek és az egyéb alapanyagok (ásványi sók) olcsóbbak és nagy mennyiségben fordulnak elő a természetben.
- ☉ A környezetre nézve kevésbé veszélyes reakciókörülmények és kisebb környezetterhelés, környezeti ártalom.
- ☉ A biokatalizátorok (sejt, enzim...) sokkal specifikusabbak, mint az egyéb szokásos katalizátorok (szubsztrát-, csoport[reakció]-, régió- és sztereospecifikusság)
- ☉ A bioeljárásoknál alkalmazott készülékpark általában sokcélú (a termékváltás egyszerű).
- ☉ Sokszor nagyobb hozam, rendszerint kisebb energiafelhasználás.
- ☉ Az rDNS technológiáknak ma még beláthatatlan lehetőségei vannak (idegen fehérjék, biokatalizátor-tervezés, metabolikus mérnökség, irányított evolúció stb.).

A BIOELJÁRÁSOK LEHETSÉGES HÁTRÁNYAI

- ☉ Ma sokszor még a [fosszilis](#) alapanyagokon alapuló kémiai eljárások produktivitása és gazdasági eredményessége felülmúlja a bioeljárásokét (ez a fehér biotechnológia kémiai iparokban történő elterjedésének legfőbb gátja).
- ☉ A bonyolult szerkezetű termékek, amelyek rendszerint híg oldatokban vannak jelen, kinyerése és tisztítása bonyolult és drága.
- ☉ Nagy mennyiségű és nagy [BOD](#) tartalmú szennyvíz keletkezik, amely azonban általában könnyen tisztítható.
- ☉ Fertőzés veszélye idegen (mikro)organizmusok, vírusok által.
- ☉ Fertőzésveszély. Szigorú előírásokat kell betartani a biológiai biztonság garantálására ([kontéinment](#) szempontok betartása). Különös szigorúság az [GMO](#)-k felhasználása esetében.
- ☉ Kétoldali változékonyság. Megújuló alapanyagok és természetes eredetű kiegészítők (melasz, kukoricalekvár, élesztőkivonat stb.) minősége és a felhasznált organizmusok tekintetében (mikroba[reverzió](#), sejtvonal-degenerálódás, stb.)
- ☉ Társadalmi idegenkedés, elutasítás a mikroorganizmusokkal és különösen a genetikai manipulációval kapcsolatosan.

2. ENZIMMÉRNÖKI ALAPISMERETEK

2.1. Az enzimek működésének alapjai

Ha néhány mondatban akarjuk az enzimekkel kapcsolatos tudásunk mai szintjének kialakulását bemutatni, nehéz helyzetben vagyunk, mert rendkívül sok mérföldkövet kellene érinteni. Nem lehet azonban még e nagyon rövid áttekintésben sem kihagyni az 1833-as esztendőt, amikor Payen és Persoz francia kutatók csírázó árpa szerepét vizsgálva dextrinek és cukrok megjelenését észlelték⁴ a keményítőhidrolízis során.

1835-ben Berzelius (1779–1848) megállapította, hogy a „diastase” által végzett keményítőhidrolízis katalízis.

1853–1857 körül két nézet csatázott az enzimek mibenlétét illetően. Az egyik szerint a megfigyelt átalakításokért „valami N-tartalmú szerves anyag” felelős, amelyet szervezetlen, élettelen dolognak képzeltek el, míg a másik nézet szerint élő anyag (szervezett anyag) szükséges ezekhez az átalakításokhoz. Ezeket alacsonyabb rendű növényeknek, illetve ún. „infusorium”-nak tekintették (pl. az alkoholos fermentáció esetén).

1858-ban M. Traube (1826–1894) feltételezi, hogy a fermentációt fermentumok végzik, és ő az első körhöz csatlakozott, míg például Pasteur a másik csoportba tartozott, és rendkívüli tudományos tekintélye sokáig akadályozta az enzimek tényleges mibenlétének (azaz a szervezetlen N-tartalmú anyag- képnék) a térhódítását. Ez azonban nem volt például annak akadálya, hogy már 1874-ben megalapítsák az első enzimtermelésre berendezkedő vállalatot, a C. Hansen's Laboratory-t Hollandiában, tejalvasztó rennin gyártására.

A győzedelmes első álláspotot követve 1878-ban nevezte el ezeket a fermentumokat Wilhelm Friedrich Kühne (1837–1900) enzimeknek a görög ενζυμη (enzümé) = **élesztőben** szó felhasználásával. 1897-ben Edward Buchner (1860–1917) megállapítja, hogy az élesztőben erjesztő enzimek vannak. A sejtmentes fermentáció terén kifejtett munkásságáért 1907-ben Nobel-díjjal tüntették ki.

Zemplén Géza, a híres magyar szerves kémikus (Műegyetemünk szerves kémia professzora!) már 1915-ben publikálta azt a felismerését, hogy „kevés fejezete van a chemiának, amely a legutolsó néhány év alatt olyan nagyot haladt volna, mint éppen az enzimeké. Éppen ezért a vegyész léptenyomon érzi, hogy megismerésük és a velük való bánásmód manapság már nélkülözhetetlen”⁵.

1926-ban James Batcheller Sumner (1887–1955) először izolált tiszta enzimet, a kristályos ureázt.

Munkásságáért az enzimek kristályosítása területén megosztott Nobel-díjat kapott 1946-ban (J. H. Northroppal és W. M. Stanley-vel).

A fehérjék speciális csoportját képezik az enzimek, amelyeknek feladata a sejtekben lejátszódó nagyszámú biokémiai reakció gyorsítása, katalízishatás alapján. Általános vélemény szerint minden enzim fehérje, de nem minden fehérje enzim. Utóbbi világos, hiszen egy sor olyan fehérjét is ismerünk, amelyeknek nincsen katalitikus hatása, másoknak van, de nem soroljuk az enzimek közé őket. Az alábbi összeállításban példákat láthatunk a fehérjék ilyen csoportjaira.

⁴ Memoir sur la diastase, les principaux produits de ses reactions, et leurs applications aux art industrielles, *Annales de Chimie et de Physique*, 1833, 2me Serie 53, 73–92

⁵ Az enzimek és gyakorlati alkalmazásuk. A kir. Magyar Term. Tud. Társulat kiadása 1915. 349. oldal

A fehérjék speciális csoportjai és biológiai funkcióik

Regulátorfehérjék*

lac-represszor	RNS-szintézis
interferonok	vírusrezisztencia
inzulin	glükóz-metabolizmus
növekedési hormon	

Transzportfehérjék*

laktóz permeáz	sejtmembrántranszport
mioglobin	O ₂ - izomban
hemoglobin	O ₂ - vérben

Védőfehérjék*

antitestek (abzyme)	idegenanyag-komplex
trombin	véralvadás

Toxinok*

<i>B. thuringiensis</i>	biológiai inszekticid
<i>Cl. botulinum</i>	ételmérgezés okozója

Tartaléktápanyag-fehérjék

ovalbumin	tojásfehérje
kazein	tejfehérje
zein	kukoricacsíra

Kontraktil fehérjék

dynein	cília, flagella
miozin	izom

Szerkezeti fehérjék

kollagén	ízületek, inak
glikoproteinek	sejtfal

Chaperonok*

Prionok

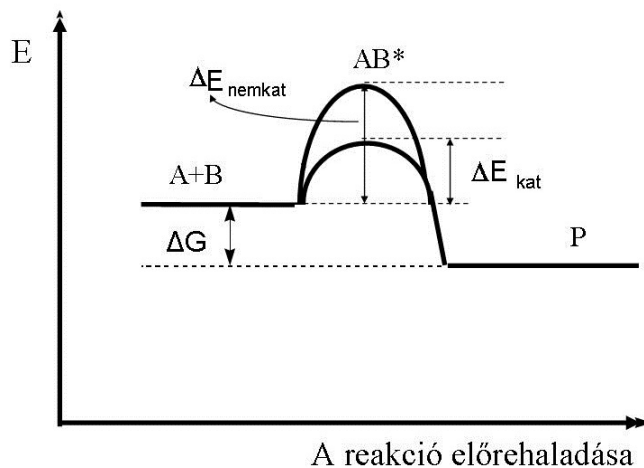
A megjelölt csoportok is rendelkeznek katalitikus hatással, akárcsak az enzimek, azonban nem felelnek meg az enzim klasszikus definíciójának. Azaz, hogy reakciókat katalizálnak. Valójában azonban a működés módjuk teljesen azonos az enzimekével. Ez olyannyira így van, hogy például a hemoglobin nem enzim, de az [allosztérikus enzimek](#) működésének magyarázatánál az a legfontosabb és legismertebb példa. Ugyanígy a [permeázok](#) sem katalizálnak reakciót, de ugyanolyan kinetika szerint működnek, mint az enzimek. Talán éppen ezért ma vannak törekvések az enzimműködés újradefiniálására is: a katalízis lényege marad, de nem reakciót, hanem „valamiféle átalakulást” gyorsítanak meg.

Érdekes avval is árnyalni a képet, hogy olyan katalitikus hatású anyagok is szerepet játszanak a biokémiai történésekben, amelyek nem fehérjék. Így katalitikus hatásúak a [ribozimek](#), az ATP, a NAD, a tRNS-ek. A sok RNS-katalizátor, amelyek ma is szerepet játszanak, erősíteni látszik azt az evolúcióval kapcsolatos nézetet, miszerint előbb voltak a nukleinsavak és a nukleinsav alapú reakciókatalízis, mint a fehérjéhez kötött. Ez az „RNS-világ” azonban – lévén sokkal kevésbé hatékony (sokkal kisebb sebességnövelést eredményeznek az RNS-katalizátorok, mint a fehérjék) – átalakult fehérjealapúvá, azonban maradványai máig fennmaradtak, még olyan vegyes formában is, mint az RnaseP ribozim, amelyben 377 bázispárnyi nukleinsav ~125 kD mőtömeeggel és csak egy 119 aminosavból álló ~14 kD mőtömegnyi fehérje található.

Enzimek nélkül az egyébként termodinamikailag lehetséges (azaz szabadenergia-csökkenéssel járó) reakciók rendkívül lassan mennének végbe, különösen amiatt, hogy az élő anyag reakció körülményei (fiziológias körülmények) enyhék, a 30 °C körüli hőmérséklet, az 1 bar körüli nyomás és a semleges körüli pH csak igen kis reakciósebességeket engednek meg spontán reakciók esetén. A különböző sejtekben a [szárazanyag-tartalom](#) eltérő hányada fehérje, de minimálisan 25% (fonalas gombák), ezek nagy része enzimfehérje, az *Escherichia coli*-nak például mintegy 2-3000 különböző, katalitikus hatású fehérjetípus fordul elő egy sejtjében. Ezek mindegyike egy-egy jól meghatározott feladatot, elsősorban adott reakció katalízisét látja el. A katalitikus hatás *termodinamikai alapja természetesen ugyanaz, mint bármely katalízis esetében, azaz az enzimek is az adott kémiai reakció aktiválási energiáját csökkentik.*

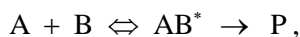
Idézzük emlékezetünkbe ezt a termodinamikai bázist a következő egyszerű gondolatmenettel.

A **Henry Eyring** (1901–1981)-féle abszolút reakciósebességi elmélet értelmében ahhoz, hogy A és B komponens reagáljon, még ha a komponensek szabadenergia szintje magasabb is a képződő P termékénél (azaz termodinamikailag lehetséges reakcióról van szó), a rendszerrel energiát, aktiválási energiát kell közölni, hogy egy átmeneti nagyobb, aktivált energiaszintre kerüljön, s ez mintegy kiváltsa a reakció lezajlását. (2.1. ábra)



2.1. ábra: Az enzim csökkenti a reakció aktiválási energiáját

Az alábbi reakciósémára tehát felírható, hogy



$$\Delta H^* = \Delta G^* + T \cdot \Delta S^*.$$

Az aktivált komplex létrejöttét jelentő reverzibilis reakció egyensúlyi állandója ugyanakkor

$$K^* = \frac{C_{AB^*}}{C_A \cdot C_B}.$$

A termék képződésének reakciósebessége a következőképpen írható fel:

$$\frac{dP}{dt} = k_r C_A C_B = C_{AB^*} \frac{kT}{h},$$

ahol

T az abszolút hőmérséklet (Kelvin fok)

k a Boltzmann-állandó ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)

h a Planck-állandó ($6,62 \cdot 10^{-34}$ J·s)

A előbbi egyenletből az egyensúlyi állandót kifejezhetjük:

$$K^* = \frac{C_{AB}^*}{C_A C_B} = \frac{k_r h}{kT}$$

Ennek felhasználásával a reakció aktiválási szabadenergia változása a következő lesz:

$$\Delta G^* = -RT \ln K^* = -RT \ln \frac{k_r h}{kT} = \Delta H^* - T \Delta S^*,$$

amelyből viszont megkapható a k_r reakciósebességi állandó:

$$k_r = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^*}{R}} \cdot e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} \approx \text{konst} \cdot e^{-\frac{\Delta E^*}{RT}}.$$

Ebből nyilvánvaló, hogy mivel $(\Delta E^*)_{\text{nemkat}} > (\Delta E^*)_{\text{kat}}$, így $(k_r)_{\text{nemkat}} \ll (k_r)_{\text{kat}}$, azaz a katalizált reakció sebessége sokkal nagyobb a nem katalizálténál.

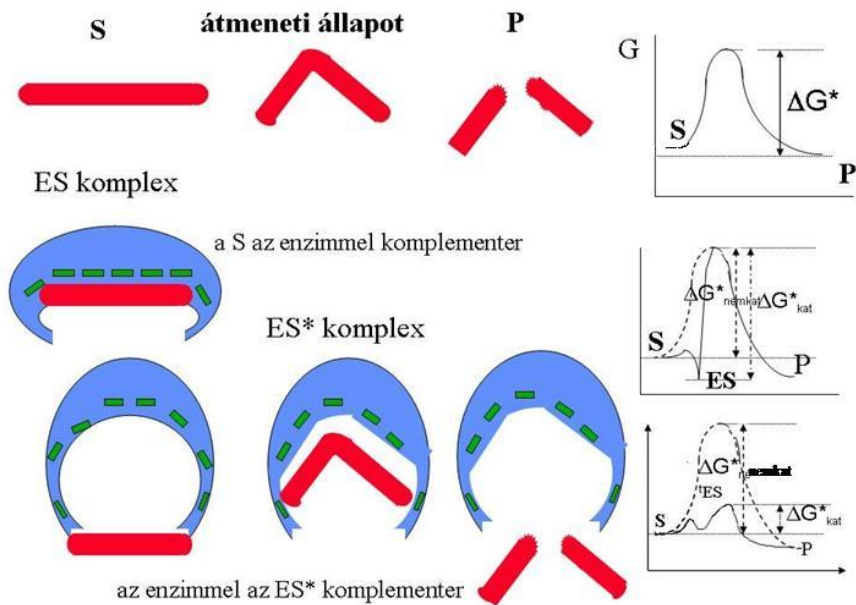
Az enzimes katalízis esetén természetesen ugyanez a helyzet, a reakciósebesség-gyorsítás termodinamikai alapja az aktiválási energia csökkentése. Ez a reakciósebességi állandó drámai, esetenként sok nagyságrendnek megfelelő növekedését jelenti, amint azt a 2. 1. táblázatban nyomon követhetjük. Az enzimes katalízis tehát akár millió-/milliárdszorosa gyorsabb is lehet egy szerves katalizátor által okozottnál.

2.1. táblázat: Az egyszerű és az enzimes katalízis összehasonlítása

Reakció	Katalizátor	Aktiválási energia kJ/mol	$k_{\text{relatív}}$ 25°C
$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2\text{O}_2$	-	75	1
	Γ	56,5	$2,1 \times 10^3$
	kataláz	26,8	$3,5 \times 10^8$
Kazein + nH ₂ O →(n+1)peptid	H ⁺	86	1
	tripszin	50	$2,1 \times 10^6$
Szaharóz + H ₂ O → glükóz+fruktóz	H ⁺	107	1
	invertáz	46	$5,6 \times 10^{10}$
Linolénsav + O ₂ → linolénsavperoxid	-	150–270	1
	Cu ²⁺	30–50	$\sim 10^2$
	lipoxigenáz	16,7	$\sim 10^7$

Annak ellenére, hogy minden enzimre és a katalízis minden részletére érvényes átfogó elmélet nem áll rendelkezésre, az általánosan elfogadott és számos kísérleti evidencia is alátámasztja, hogy létezik az **aktivált komplex**, esetünkben az **enzim-szubsztrát komplex** (illetve komplexek).

Az előző, termodinamikai képet kissé árnyalja a 2.2. ábrán látható kép, amely a „pöcökáz” (azaz a természetesen nem létező „botáz” avagy „stickase”) „enzim” működésének termodinamikai alapját mutatja be (egy vaspálca eltöréséről van szó). Láthatóan nagy termodinamikai különbség van az enzim-szubsztrát átmeneti aktivált komplex létrejöttének változatai között.



2.2. ábra: Az aktivált átmeneti komplex létrejöttéhez aktiválási energia befektetése szükséges. Energetikailag az a kedvező, ha a szubsztrát és az enzim is változik, miközben létrejön a komplex: indukált illeszkedés

Az enzim az úgynevezett *kötőhelyén* megköti az átalakítandó szubsztrátot, és az *aktív helyen* megtörténik az átalakulás. A kettő nem feltétlenül ugyanaz, lehet, hogy azonosak, lehet, hogy különböznek, és ekkor lehet, hogy egymáshoz közel vagy akár távolabb is elhelyezkedhetnek a fehérje- molekulán. Egy enzim-molekulán nemcsak szubsztrátkötőhelyek, hanem egyéb molekulákat kötő helyek is létezhetnek ([aktivátor](#)-, [inhibitor](#)-, [koszubsztrátkötő](#) helyek). A lényeg az, hogy a megkötésében részt vevő kitüntetett régiót *kötőhelynek*, míg az átalakításért felelős régiót *aktív helynek* (vagy régebben elfogadott kifejezéssel *aktív centrumnak*) nevezzük. Az enzim-szubsztrát komplex létrehozásában gyenge és erős kötéserők is közreműködhetnek (a Van der Waals-erőktől az ionos kötésen át a kovalensig). Sokszor hidrogénhidak, illetve parciális elektromos töltések vonzása hozza létre a szubsztrátum megkötődését az enzimben.

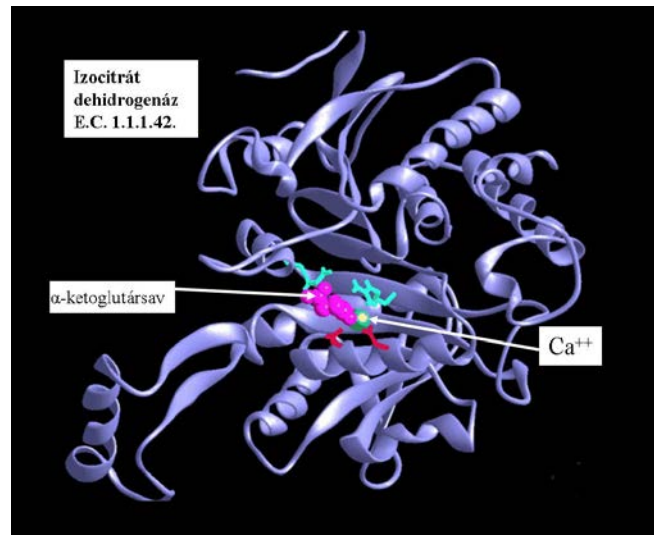
A szubsztrátumkötő-, illetve az aktív helyek (az enzim-molekula különböző régiói, illetve doménei) csak egy relatíve kis felületi részét foglalják el az enzimnek (2.3. ábra).

Mechanikusan szemlélve az enzim megköti a szubsztrátot, átalakítja, a termék(ek) leválik(nak) az enzimről, amely így egy újabb szubsztrátum-molekulát tud megkötni, amint azt az egyszerű 2.1. animáció, a Sima enzimes reakció mutatja.

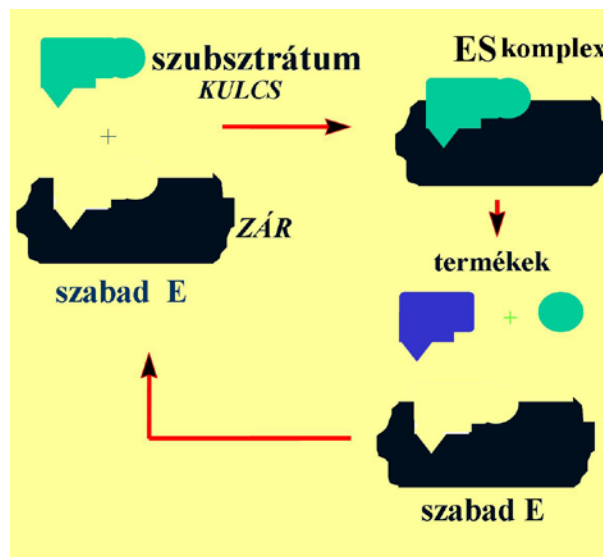


2.1. animáció: Sima enzimes reakció

Az enzimműködés legrégebbi magyarázatát, a **kulcs/zár** hasonlatot E. Fischer (1852–1919) adta 1894-ben (2.4. ábra): az enzim a zár, a beleillő kulcs pedig a szubsztrátum, és ez jól magyarázza az enzimek szubsztrátspecifikusságát.



2.3. ábra: Az izocitrát-dehidrogenáz térszerkezete.
A szubsztrátumkötő, illetve aktív hely csak egy kis terület a teljes enzimmolekulán



2.4. ábra: A kulcs a szubsztrátum, a zár az enzim

A fehérjemolekulák aminosavláncai oly módon csavarodnak, hajtogatódnak össze a térben (ez a **fold**ing), hogy a reaktív aminosav-oldallánkok adott csoportja(i) egy a szubsztrát befogadásához, megkötéséhez specifikusan alkalmas térbeli konformációt (zsebet, zsákot, beöblösödést) hoz(nak) létre, amelyben preformált kötések, illetve kötésmódosulási lehetőségek rejlenek. Ezek a reaktív csoportok a következők, az

Asp (COO⁻),
Cys (-SH),
Glu (COO⁻ illetve -CONH₂),
His (imidazol),
Lys (ε-NH₃⁺),
Met (CH₃-S),
Ser (-OH), illetve
Thr (CH₃CHOH-)

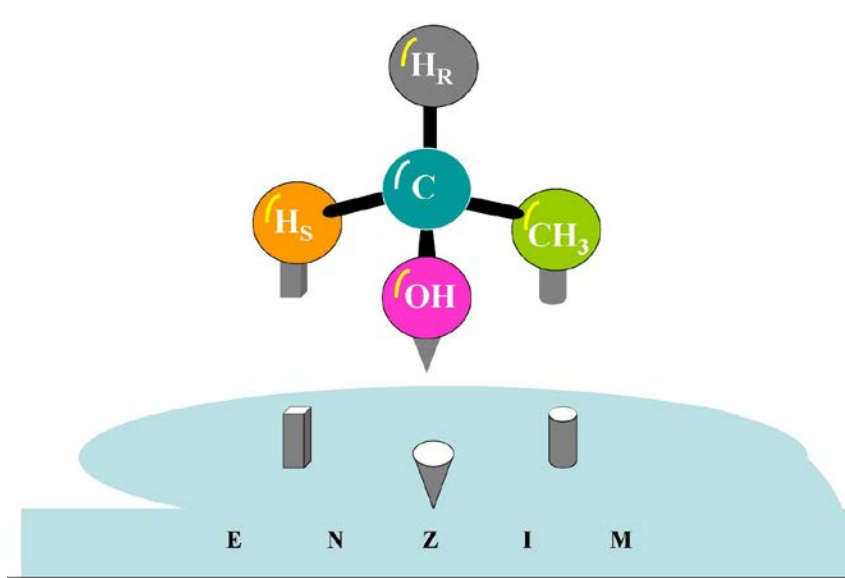
csoportjai vagy oldalláncai és a láncvégi amino-, illetve karboxilcsoportok. Jegyezzük meg, hogy az aktív hely létrehozásában egyébként csak kis hányada vesz részt a fehérjemolekulát felépítő aminosavaknak (lásd a már hivatkozott 2.3. ábrát). Mindazonáltal a többi aminosav is fontos, hiszen részt vesznek a szekunder és terciér fehérjeszerkezet kialakításában, illetve stabilizálásában és így közvetve az enzimkatalízisben is.

A nagy térbeli kiterjedésű enzimfehérjék (illetve a negyedleges szerkezettel is rendelkező, több alegységből álló és gyakran allosztérikus enzimek) gyakorta több szubsztrátumkötő és/vagy aktív hellyel rendelkeznek, és fontos az is, hogy egyéb, nem szubsztrát-, hanem kosubsztrát- és enzimmodulátor-kötőhelyek (domének) is létez(het)nek az enzimeken.

Magában a katalitikus hatásban több hatás érvényesülhet külön-külön és kombináltan is:

sav/bázis katalízis,
fémion katalízis és
kovalens katalízis.

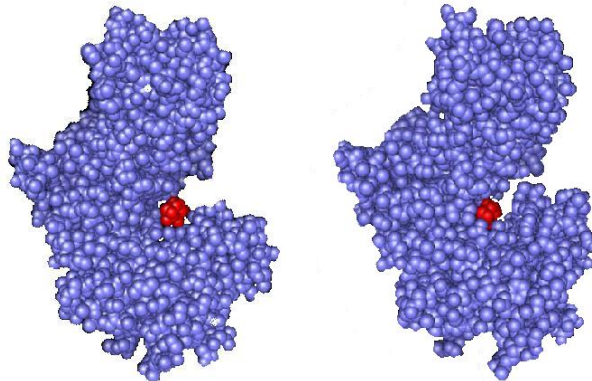
A kulcs-zár hasonlat ugyan sok kérdésre választ ad, pl. magyarázza az enzimek szubsztrát-specifitását, de több kérdést nyitva hagy. Daniel Koshland (1920–2007) fejtett ki úttörő aktivitást az enzimhatás mélyebb megismerésében. Az ő nevéhez fűződik az ún. indukált illeszkedés elméletének (induced fit) (1958) bevezetése, amelynek sommás lényege az, hogy miközben a szubsztrát *kellően megközelíti* az enzim kötő-, illetve aktív helyét (amit egyébként proximitási effektusnak nevezünk), mégpedig térbelileg megfelelően orientált helyzetben (ami a szintén fontos orientációs effektus, lásd 2.5. ábra, a sztereospecifitás alapja), aközben az enzim térszerkezete is változik, mintegy idomul a szubsztráthoz, befogadja azt, létrejönnek a másodlagos kötések, az eredeti szubsztrátkötések fellazulnak és új kovalens kötés-lehetőségek bontakoznak ki. E valójában folytonosan lejátszódó, de modell szinten több vagy sok diszkrét lépésnek elképzelt folyamat (azaz a szubsztrát és az enzim-molekula deformálódása) odáig vezet, hogy az új kötések létrejötte a valószínűsége nagyon megnő (ezt hívják entrópiacsapdának), a termék vagy termékek le tudnak válni az enzimről.



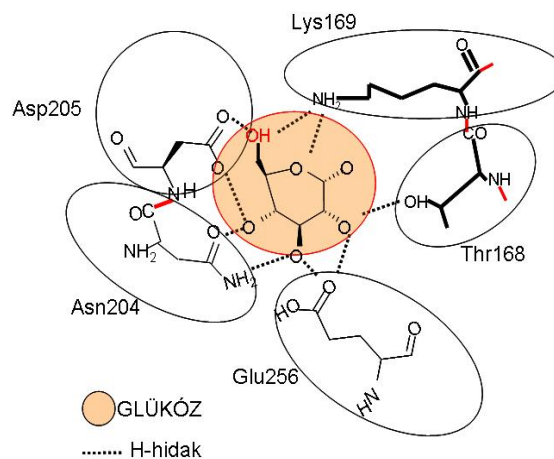
2.5. ábra: Orientációs effektus, *three-point attachment*, az aktív helyen minimum 3 aminosav felelős a megfelelő illeszkedésért: ez a sztereospecifitás alapja

Érdeemes az egyik leginkább ismert és biokémiai regulációs szempontból ugyancsak fontos enzim katalitikus mechanizmusát megvizsgálni a fentiek illusztrálására (2.6. ábra). A **hexokináz** enzim egyes vélemények szerint random bi-bi mechanizmussal foszforilezi a glükózt (lásd a 2.5 fejezetet), amelynek során az enzim, az ATP és a glükóz egy ternér komplexet hoz létre. A glükóz pontosan illeszkedik az aktív centrumba, miközben az enzim mint egy állkapocs rácsukodik (mintegy 8 Å-ös elmozdulás mérhető!), és így kellően intim közelségbe kerül a három reagáló partner. Eközben egy vízmolekula kiszorul az aktív centrumból. A glükózt az aktív centrumban lévő Lys169, Thr168,

Asn204 és Glu256 aminosavak oldalláncain lévő funkciós csoportok rögzítik hidrogénhidakkal. Ekkor az aktív centrum alkotó Asp205 szabad COO^- csoportja, mint egy bázis, elvonja a glükóz C6 OH csoportjának H-jét, és ezzel lehetővé teszi, hogy a OH oxigénje nukleofil támadást indítson az ATP terminális P atomján, leszakítva így a terminális foszfátot és létrehozva a foszforilezett glükózt. Ez a mechanizmus azt is képes megmagyarázni, hogy más OH tartalmú molekulák, mint pl. a koleszterin, miért nem foszforileződnek ezen enzim által (a molekula ugyanis túl nagy ahhoz, hogy a zsebbe beleférjen), illetve pl. hogy a víz miért nem bontja az ATP-t ezzel az enzimmel (ez meg túl kicsi, azaz amikor a zsebben van, nem mozdul el az álkapocs, nem záródik a vízmolekulára, így az nem kerül kellő közelségbe az ATP-vel. Ezt igazolja az is, hogy a xilóz – amelynek nincs C6 OH-ja, de mérete megközelíti a glükózt – fixálni tudja az aktív centrumban a vízmolekulát, és akkor az veszi fel a foszfátot, azaz az enzim ekkor az ATP-t hidrolizálja).



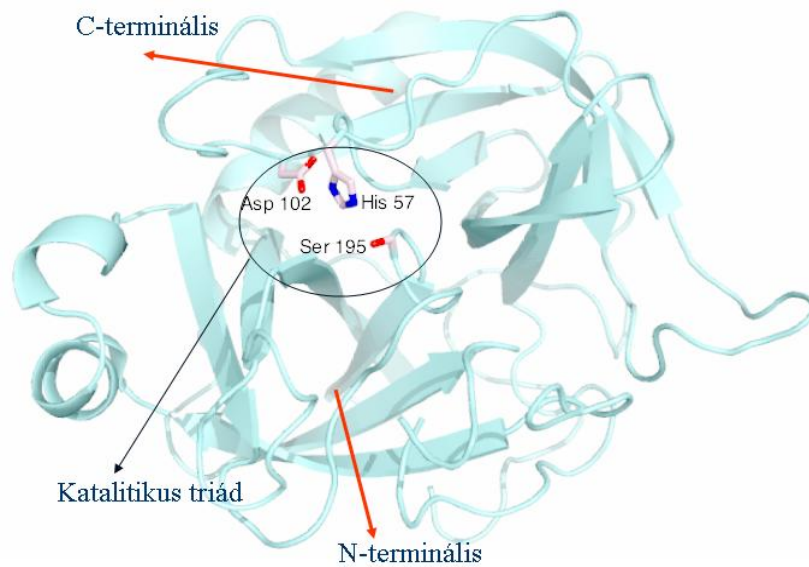
2.6. ábra: A hexokináz enzim „álkapcsa” rácsukodik a glükóz szubsztrátra.
Indukált illeszkedés (a dimer enzimnek csak az egyik aminosav lánc látszik a képen!)



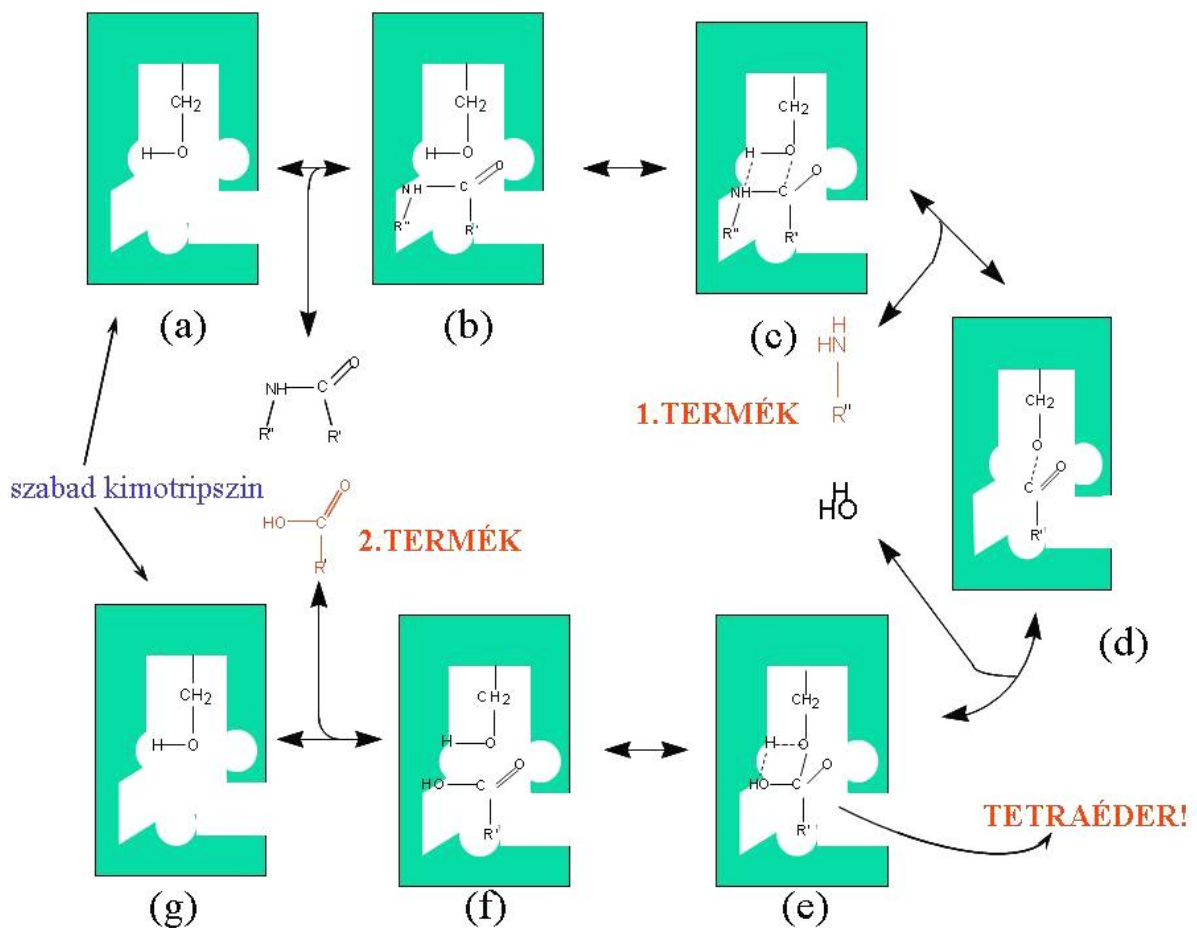
2.7. ábra: A hexokináz enzim aktív centruma a glükózt megkötő H-hidakkal

Az aktív centrum szerkezetének nagy fontosságát mutatja a szintén kovalens katalízist megvalósító pankreasz eredetű **kimotripszin**, amelyről bizonyították, hogy két fő tényező lényeges az enzimhatás szempontjából: egy acilezés történik az enzim Ser-195 hidroxilja és a szubsztrát között, valamint egy protonátadás a His-57 imidazolgyűrűjére.

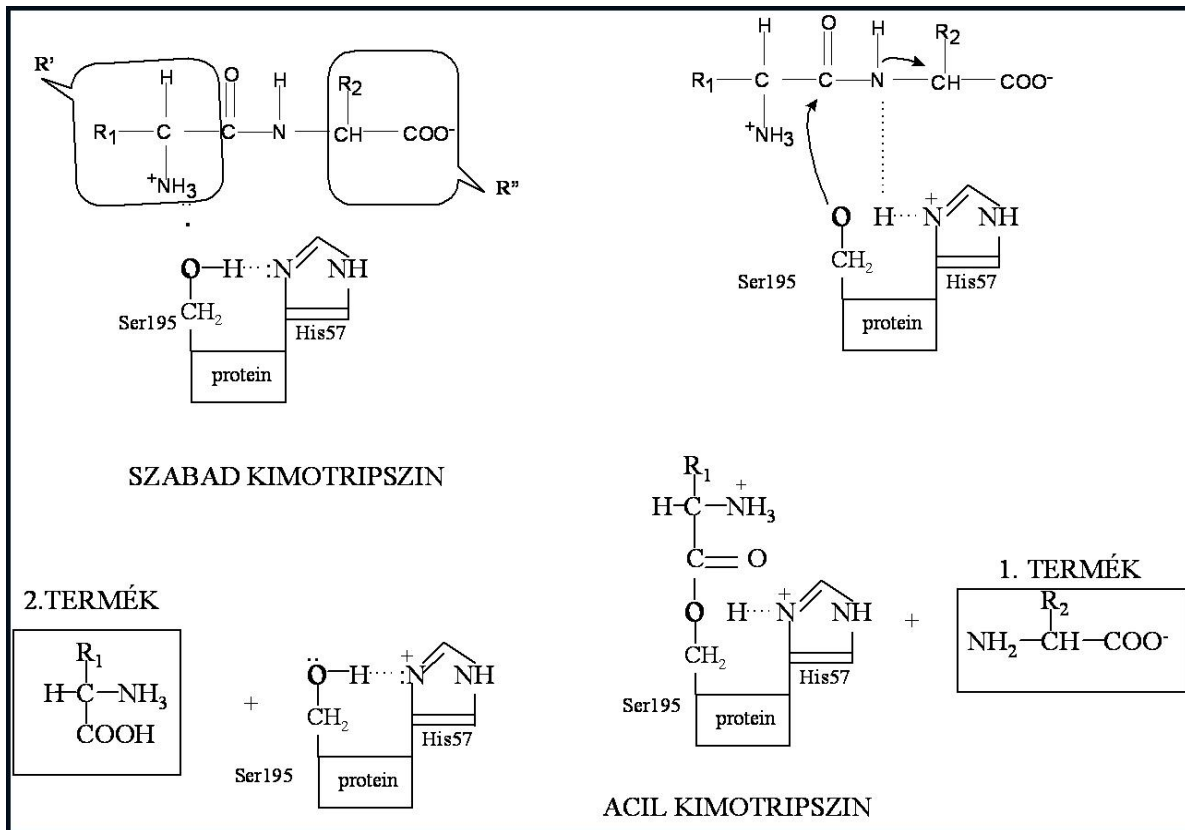
A 2.8. – 2.10. ábrákon követhetőek a történések.



2.8. ábra: Kimotripszin aktív centrumában a szubsztrátum elhelyezkedése



2.9. ábra: Kimotripszin kovalens katalízise



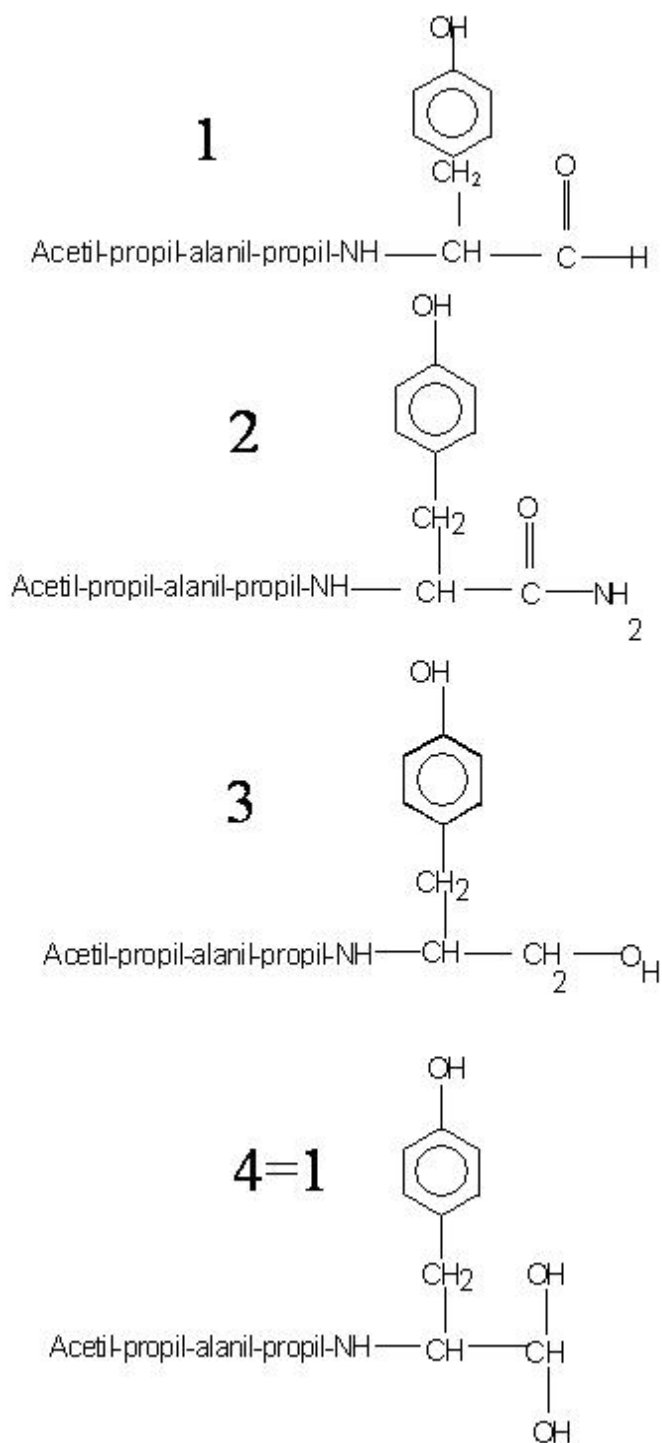
2.10. ábra: A kimotripszin működésének molekuláris mechanizmusa

Az enzim egy trimer, amely az A, B és C polipeptid láncból épül fel. A 2.8. és 2.9. és 2.10. ábrák a peptidkötés lebontásának mechanizmusát mutatják egy dipeptid szubsztráton, amelynek R' csoportjában az R₁ csoport (a karbonil oldalon) Tyr, Phe, Trp, azaz aromás aminosav lehet.

A szabad kimotripszin reagál a dipeptiddel (vegyük észre, hogy a szubsztrát egy szubsztituált amid) belépve az enzim szubsztrátot befogadó „zsebébe”. A His-57 imidazolja igen gyorsan meggyengíti a Ser-195 OH csoportjának kovalens, oxigén és hidrogén közötti kötését, és fel is veszi a H-t proton formájában, lehetővé téve egy nukleofil támadást a karbonilcsoport szénén. Ennek hatására *kovalensen kötött enzim-szubsztrát komplex* jön létre, más szóval az enzim acileződik a szubsztrát által (d). Eközben a meggyengült O-H helyett újonnan létrehozott N-H kötés az egyes számú termék leválását idézi elő: az eredeti peptidkötés NH-csoportjából aminocsoport jött létre, az R₂-t tartalmazó „aminosav” levál az enzimről.

A katalízis második lépéséhez vízre van szükség, most az foglalja el az előbb levált molekularész helyét. Újabb kötéslazulás-új kötés keletkezése útján az acilenzim hidrolizál, a második termék, azaz az eredeti peptid karbonil oldali fragmentumából a másik „aminosav” képződik.

Rendkívül fontos az enzimreakció szempontjából, hogy a (d) és (e) acilezett átmeneti komplexek esetén a karbonil-szénnel meglévő kötések tetraéder elrendezésűek. Ezt bizonyítja például az, hogy az alatt bemutatott műszubsztrátot, a 2.11. ábrán (2), (amely nem egy igazi peptid, hanem egy szubsztituált savamid) a kimotripszin képes bontani, és szerkezeti analogonjai közül az aldehid *inhibitor*(1), míg az alkohol *sem nem szubsztrát, sem nem inhibitor*. Az ok az, hogy az aldehid hidratált formája (4) hasonlít az (2) amid szubsztrátra, és így létre tudja hozni a tetraédes elrendeződést, míg az (3) alkohol nem.



2.11. ábra: A kimotripszin műszubsztrátja és analogonjai

Összefoglalóan: az enzim és a szubsztrát közötti kötés létrejötte során a reagáló molekulák olyan közel kerülnek egymáshoz (**proximitási effektus**), ami megnöveli a valószínűségét az átalakulásnak, másrészt a szubsztrátot csak olyan pozícióban tudja megkötni az enzim, amely például egy adott, esetleg aszimmetrikus molekulát hoz létre, illetve alakít át (**orientációs effektus**). Az átmeneti komplex létrejöttét dinamikusán kell elképzelni: miközben a kötés létrejön, magának az enzimnek is változik a konformációja, egyre kedvezőbbé válik a térszerkezete a szubsztrát megkötéséhez és a kívánt reakcióhoz (ez az ún. **indukált illeszkedési modell**).

2.2. Az enzimek tulajdonságai, nevezéktanuk

Az enzimes reakcióknak, illetve maguknak az enzimeknek van néhány olyan tulajdonságuk, amelyeknek ismerete elengedhetetlen az enzimes folyamatok mélyebb megismeréséhez és kézbe tartásához, gyakorlati célra történő felhasználásukhoz.

1. Az enzimek csak termodinamikailag lehetséges reakciókat katalizálnak, azaz olyanokat, amelyeknél a szabadenergia-változás negatív.

2. Valamennyi enzimes reakció visszafordítható, pontosabban az enzimreakciók reverzibilisek, egyensúlyi állapot eléréséig folynak az adott irányban. Az enzim nem befolyásolja ezt az egyensúlyt. Felmerülhet a kérdés, hogy hogyan lehetséges akkor, hogy a sejtekben funkcionáló metabolit utak mentén a reakciók egy irányba haladnak? Ehhez azt kell szem előtt tartani, hogy egy reakció terméke egy következő reakció szubsztrátja, azaz felhasználódik vagy a metabolit út következő reakciójában, vagy valamely más metabolikus folyamat során, akár a képződés helyétől térbelileg is elválva. Az egyensúlyi reakció egyensúlya tehát az egyik reagáló komponens eliminálása miatt nagymértékben az előremutató irányba van eltolva. A másik szempont pedig az egyensúlyi állandók nagysága, amelyek szintén meghatározhatják, hogy az egyensúly döntően melyik irányú reakciót preferálja.

3. Mivel az enzimek fehérjék, amelyeknek adott konformációját, térbeli szerkezetét az extrém környezeti hatásokra érzékeny harmadlagos és negyedleges szerkezetük határozza meg, így különböző környezeti hatásokra **denaturálódhatnak**. Ez a denaturáció – azaz a katalitikusan aktívától eltérő harmadlagos szerkezet, azaz konformáció létrejötte – lehet reverzibilis, amikor az eredeti állapot a létrehozó hatás megszűntével visszaáll, de lehet visszafordíthatatlan is. Denaturálódást, azaz az enzimhatás megszűntét okozhatják a

növekvő hőmérséklet,
pH-változás,
ionerősség változása,
oldószerek hatása.

4. A fehérjetermészetből és az enzim-szubsztrát átmeneti komplex létéből következik, hogy az enzimek kisebb-nagyobb mértékben és különböző szempontokból *specifikusak*.

A **szubsztrátspecifitás** azt jelenti, hogy egy adott enzim egy adott szubsztrátot alakít át. Így például a glükózoxidáz csak a glükózt alakítja glükono- δ -laktonná, a fruktózt nem.

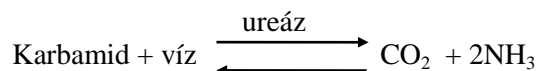
A **csoportspecifitás** azt jelenti, hogy az enzim olyan szubsztrátokat alakít át, amelyek az adott típusú kémiai funkció csoportot tartalmazzák vagy adott típusú csoportot hoznak létre. Például az α -glükózidáz enzim olyan diszaharidokat bont, amelyek α -glikozid kötést tartalmaznak, de az α -amiláz a létrejött α helyzetű glikozidos hidroxilcsoportot tartalmazó termékekre specifikus. Ezzel szorosan összefügg a **reakcióspecifitás** (tulajdonképpen ugyanannak a dolognak más szempontú tárgyalása), azaz, hogy milyen kémiai átalakítás történik az adott csoporton.

A **sztereospecifitás** azt jelenti, hogy egy adott enzim királis centrumot tartalmazó szubsztrát esetén csak az egyik antipód átalakítására képes. Így például az L-aminosav-aciláz csak az acil-L-aminosavakat hidrolizálja, D-származékok változatlanok maradnak.

Végül a **régiospecifitás** azt jelenti, hogy ha egy molekulán több hasonló kémiai csoport lenne átalakítható, akkor az enzim csak egy bizonyos helyzetben lévő fog megátadni.

Az enzimek működésükhöz gyakran nemcsak fehérjérszt, hanem egyéb molekulákat is igényelnek. Az enzim fehérjérsztét apoenzimnek, a hozzá kapcsolódó nemfehérje molekulát kofaktornak nevezzük, míg a kettő együtt alkotja a teljes enzimet, a holoenzimet. A kapcsolódó kofaktor kétféle lehet: gyakran valamilyen **fémion** (Mg, Ca, Zn, Fe, Cu, Mo a leggyakrabban) vagy pedig szerves molekula, azaz koenzim. A koenzimek is kétfélék lehetnek: prosztetikus csoportok, amelyek kovalensen kötődnek a fehérjéhez, ilyenek a FADH₂, hem, Piridoxal-P (B6 vitamin) stb. Másik csoportjuk a koszubsztrátok csoportja, ilyenek a NAD(H), ATP stb. Utóbbiak tulajdonképpen a kétszubsztrátos enzimes reakció második szubsztrátját jelentik.

Az enzimek elnevezése többféle lehet. Utalhat az enzim neve arra a szubsztrátra, amelyet átalakít:



Itt az enzim neve a szubsztrátnév szinonimájából (urea) ered. A szubsztrát nevéhez fűzzük az **-áz** (az angol nyelvű irodalomban: -ase) toldalékot (**suffixumot**).

Más esetben az enzimet a katalizált reakció és a szubsztrát neve után nevezzük el, például az etanol \rightarrow acetaldehid \rightarrow ecetsav átalakulást az alkohol-dehidrogenáz enzim katalizálja. Itt a szubsztrátumon kívül a dehidrogénezési reakcióra is történik utalás. Általánosságban ekkor az enzim neve: **szubsztrát- és reakciónév + -áz toldalék**.

A fehérjebontó enzimek egy csoportjának úgynevezett **triviális neveik** vannak, például pepszin, tripszin, papain, rennin stb. Ezek valamennyien az **-in** képzővel születtek.

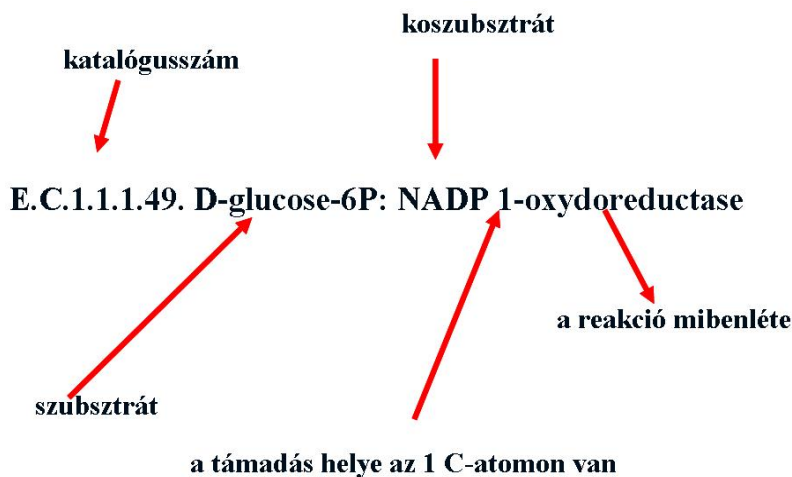
Természetesen igen régen felmerült az igény, hogy valamiféle informatív és szisztematikus elnevezéssel illessék az enzimeket. Ez az igény együtt járt az enzimek csoportosításának igényével is, hiszen az első enzimhatású sejtextinktum kinyerése óta (1897) ma már több ezer az izolált és megismert enzimek száma.

Az iparilag nagy mennyiségben előállított enzimek száma is több tíz, s ez már igencsak indokolja a szisztematikus nevezéktan és csoportosítás szükségességét.

Ma már széleskörűen alkalmazott rendszer az **IUPAC IUB** (=International Union of Biochemistry) illetve ma már IUBMB (Int. Union of Biochemistry and Molecular Biology) szekciói által 1955-ben az enzimek nevezéktanát és csoportosítását megcélzó munkacsoportja (Enzyme Commission <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) által 1964-ben létrehozott, azóta folytonosan felülvizelt, továbbfejlesztett (pl. 1972, 1978 stb.) **EC katalógizálás**.

E szerint az *enzimeket 6 nagy csoportba osztották* a katalizált reakciók alapján. A csoportok alcsoportokat és egyre mélyebb csoportbeosztást tartalmaznak, a reakciók egyre finomabb megkülönböztetése szerint. A 2.2. táblázat tartalmazza az EC alapú enzimecsoportokat.

A nevezéktan valóban szisztematikus, jó példa erre az egyik glükózoxidáz enzim neve. Egy sor információ birtokába jutunk magának az enzimeknek az alapján: ez az enzim az 1.1.1. alcsoport 49. enzime:



2.12. ábra: A glükózoxidáz szisztematikus neve

Az alábbi linkeken bejuthatunk a legfontosabb enzimes adatbázisokba, amelyekben az egyes enzimek neveit, illetve tulajdonságait, szerkezetüket, típusreakcióikat és a rájuk vonatkozó legfontosabb szakirodalmi hivatkozásokat megtalálhatjuk.

[IUBMB Enzyme Nomenclature](#)

[SWISSPROT http://www.expasy.org/enzyme](http://www.expasy.org/enzyme), [BRENDA](#) – Comprehensive Enzyme Information system

[EMP](#) - Enzymes and Metabolic Pathways database, [KEGG](#) – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

[MetaCyc](#) – Metabolic Encyclopedia of enzymes and metabolic pathways,

[BioCarta](#) – Pathways of Life

2.2. táblázat: Az enzimek csoportjai az EC alapján

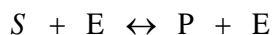
- 1. Oxido-reduktázok** (oxidációs-redukciós reakciók) (több mint 300 csoport)
- 1.1. A primer -OH csoport oxidációja.
 - 1.1.1. NAD(+) vagy NADP(+) akceptorral
 - 1.1.2. Citokróm akceptorral
 - ...
 - 1.1.99. Egyéb akceptorral
 - 1.2. Ketocsoport oxidációja: -C=O
 - 1.3. Metilénecsoport oxidációja: -CH=CH-
 - 1.4. Primer aminocsoport oxidációja
 - 1.5. Szekunder aminocsoport oxidációja
 - 1.6. NADH vagy NADPH oxidációja
 - 1.7. Egyéb N-tartalmúak oxidációja
 - 1.8. Kéntartalmúak oxidációja
 - 1.9. Hem oxidációja
 - 1.10. Difenolok és hasonló vegyületek oxidációja
 - 1.11. Peroxid akceptorokra hatók (peroxidázok)
 - 1.12. Hidrogén donorra hatók
 - 1.13. Mono- és dioxigenázok (oxigénbevétel)
 -
 - 1.19. Redukált flavodoxin oxidációja
 - 1.99. Egyéb oxidoreduktázok
- 2. Transzferázok** (funkciós csoportok átvitele) (több mint 300 csoport)
- 2.1. C1-csoport átvitele
 - 2.2. Aldehyd- vagy ketocsoport átvitele
 - 2.3. Acilcsoport átvitele
 - 2.4. Glikozilcsoport átvitele
 - 2.5. Alkil- és arylcsoport átvitel
 - 2.6. N-tartalmú csoportok átvitele
 - 2.7. Foszfátátvitel
 - 2.8. Kéntartalmú csoport átvitele
 - 2.9. Se-tartalmú csoport átvitele
- 3. Hidrolázok** (hidrolízisreakciók) (430 csoport)
- 3.1. Észterhidrolízis
 - 3.2. Glikozid-hidrolízis
 - 3.3. Éterhidrolízis
 - 3.4. Peptidhidrolízis
 - 3.5. Egyéb C–N kötések hidrolízise
 - 3.6. Savanhidrid-hidrolízis
 - 3.7. C–C kötésre ható enzimek
 - ...
 - 3.12. S–S kötésre ható enzimek
- 4. Liázok** (addíció kettős kötésre és csoporteltávolítás a szubsztrátról, gyakran ily módon kettőskötés létrehozása) (több mint 130 csoport)
- 4.1. C=C
 - 4.2. C=O
 - 4.3. N=O
 - 4.4. C–S
 - 4.5. C–halogén
 - 4.6. P–O
 - 4.99. Egyéb liázok
- 5 Izomerázok** (izomerizációs reakciók) (több mint 50 csoport)
- 5.1. Racemázok és epimerázok
 - 5.2. Cisz-transz izomerázok

5.3. Intramolekuláris oxidoreduktázok
5.4. Intramolekuláris transzferázok (mutázok)
5.5. Intramolekuláris liázok
5.99. Egyéb izomerázok
6. Ligázok (új kötés létrehozása ATP felhasználással) (több mint 60 csoport)
6.1. C–O kötés létrehozása
6.2. C–S kötés létrehozása
6.3. C–N kötés létrehozása
6.4. C–C kötés létrehozása
6.5. Foszforészterkötés létrehozása

2.3. Egyszerű enzimes reakciók kinetikai leírása

Egy rendszer kinetikai leírásával célunk az, hogy gyakorlati alkalmazásra megfelelő matematikai összefüggéseket nyerjünk, amelyekkel a reakció sebessége, az enzimes reakció időbeli lefutása leírható, és amelynek paramétereivel az adott enzim jellemezhető.

Ha a reakció az



sémával írható le, a szubsztrátum S és a termék P értelemszerűen moláris koncentrációban van kifejezve. Ekkor természetesen E-nek is ugyanolyan egységben megadottnak kell lennie. Látni kell azonban, hogy a valóságban g/dm^3 vagy mol/dm^3 koncentrációegységeket az enzimek esetében csak a legritkább esetben alkalmazhatunk, rendszerint ui. nem tiszta enzimpreparátumokkal dolgozunk, és ezekben nem mérhető meg az enzim tömege sem grammal, sem molban. Az enzim mennyiségének megadása ezért hatása alapján *enzimegységben*, *Unit*-ban történik. Ez az egység a valóságban nem mennyiséget, hanem szubsztrátátalakítási vagy termékképződési *sebességet* jelent. Az enzimegység általánosan elfogadott definíciója a következő:

Egy egység az az enzimmennyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át vagy 1 μmol terméket képez 1 perc alatt adott reakciókörülmények között.

Az adott reakciókörülményeket (hőmérséklet, pH, puffer molaritása stb.) tehát minden aktivitás-egység esetén meg kell adni az egyértelműség érdekében.

SI rendszerben az enzimmennyiség egysége az

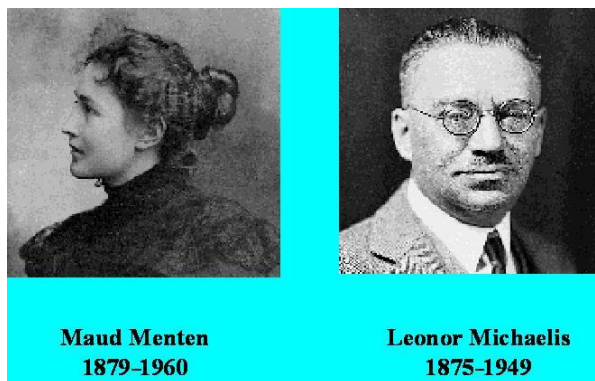
1 Katal, amely annyi enzim, amennyi 1 mol szubsztrátot alakít át 1 s alatt.

Ez azonban olyan hatalmas enzimmennyiség, ami miatt ez az SI egység nem igazán népszerű a gyakorlatban.

Használatos még a $\text{nKat} = 10^{-9}$ Katal egység is. A kétféle enzimegység között az átszámítást a következő relációk teszik lehetővé:

$$1 \text{ Kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}, \quad 1 \text{ U} = 1.6 \cdot 10^{-8} \text{ Kat}, \quad 1 \text{ U} = 1/60 \mu\text{Kat}.$$

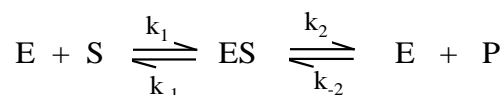
Az egyszerű egyszubsztrátos enzimes reakciók kinetikai leírását kétféleképpen közelítjük meg, a Michaelis–Menten és a Briggs–Haldane-féle tárgyalás szerint.



2.13. ábra: A Michaelis–Menten enzimkinetika szülői

2.3.1. Michaelis–Menten kinetika

Michaelis és Menten (2.13. ábra) 1913-ban tették közzé megközelítésüket, amely szerint az enzimes reakciót az alábbi séma jellemzi:



Tételezzük fel a második lépés irreverzibilitását ($k_{-2}=0$), valamint, hogy az első lépés rendkívül gyorsan egyensúlyra vezet: e kinetikai leírást emiatt *rapid ekvilibrium* kinetikának nevezik. Az első lépés rapid ekvilibriumára felírható, hogy

$$k_1SE = k_{-1}(ES) \quad (2.0)$$

ahonnan az (ES) enzim-szubsztrátum komplex disszociációs állandója

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)} \quad (2.1)$$

A termékképződés sebessége

$$V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES) \quad (2.2)$$

A reakcióban résztvevő összes enzimre felírva az anyagmérleget, bármely időpillanatban igaz, hogy a szabad enzim és a komplexben lévő enzim koncentrációjának összege egyenlő a bemért (E_0) enzimével:

$$E + (ES) = E_0 \quad (2.3)$$

Osszuk el a (2.2) egyenletet E_0 -lal a következőképpen:

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES)} \quad (2.4)$$

Az (2.1)-ből (ES)-t kifejezve és a (2.4) egyenletbe helyettesítve az enzim-szubsztrát komplex nem mérhető koncentrációja kiküszöbölhető

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 \frac{S}{K_s} E}{E + \frac{S}{K_s} E} \quad (2.5)$$

Ez E-vel egyszerűsítve és átrendezve a következő kifejezést adja:

$$\frac{V}{k_2 E_0} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}} = \frac{S}{K_s + S} \quad (2.6)$$

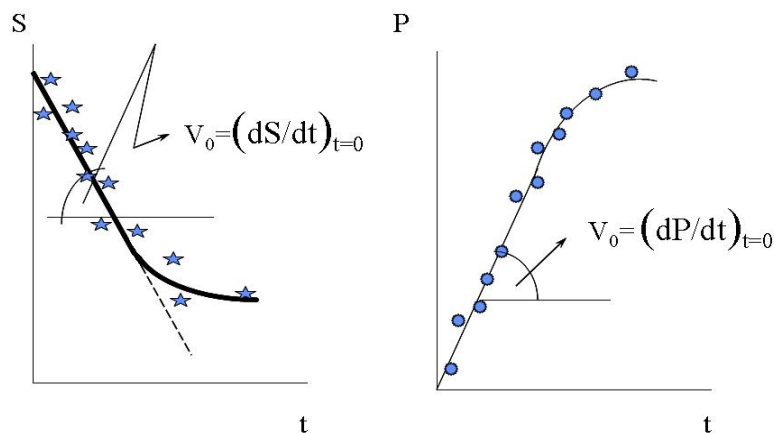
Értelemszerűen a (2.2) egyenlet szerint akkor kapunk maximális reakciósebességet, ha minden enzim komplexben kötött alakban van jelen, azaz

$$V_{\max} = k_2 E_0. \quad (2.7)$$

Ezt a (2.6)-ba írva a Michaelis–Menten enzimkinetika szokásos egyenleteit kapjuk meg:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{I} \quad \frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}} \quad \text{II} \quad (2.8)$$

A Michaelis–Menten-féle rapid ekvilibrium megközelítésben V kezdeti reakciósebességet (V_0) jelent, azaz úgy mért adatokból származó, illetve számolt sebességeket, amikor még a szubsztrátum koncentrációjának változása, illetve a termék koncentrációjának változása egy egyenes mentén történik. Ennek a nulla időpontra extrapolált egyenesnek a meredekségét tekintjük kezdeti reakciósebességnek. Ennek értelmezését a 2.14. ábra szemlélteti.



2.14. ábra: A kezdeti reakciósebesség

További feltételezéseket és elhanyagolásokat is tettek Michaelis és Menten annak érdekében, hogy kinetikájukat levezethessék, ezek a következők:

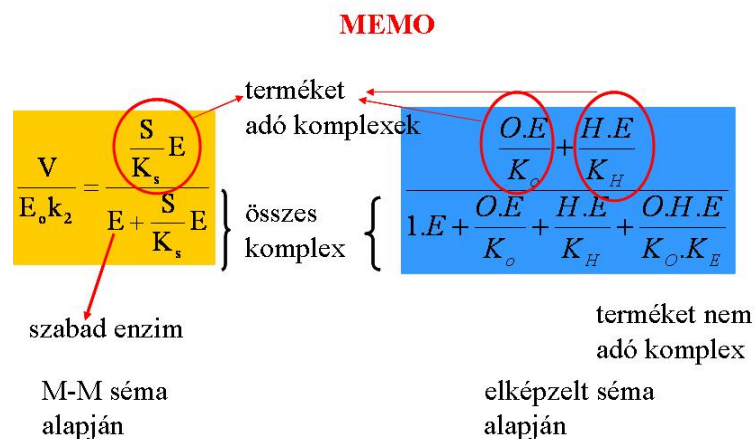
- az enzim valóban csak „katalitikus mennyiségben” legyen jelen, más szóval koncentrációja legyen lényegesen kisebb a szubsztráténál:

$$S \gg E_0 \text{ vagy } E_0 / S \ll 1$$

- az (ES) komplex kinetikai értelemben stabil és jelentős mennyiségű átmeneti termék-enzim (EP) komplex ne halmozódjék fel,
- az enzim egy-egy aktív centrumához csak egy-egy szubsztrátmolekula kötődhet,
- az aktivitások helyett a koncentrációk használhatóak.

A fenti levezetés gondolatmenete valamennyi enzimreakció esetében (tehát komplexebb, például több szubsztrátos, inhibíciós stb. esetekben is), ha a rapid egyensúly feltételezés jogos, akkor teljesen hasonló módon követhető és hasonló felépítésű kinetikai összefüggésekhez juthatunk. A II forma tartalma általánosan, azaz minden rapid egyensúly esetre a következőképpen „memorizálható”. Az alábbi eljárás tehát egy memóriasegítő segédeszköz, amelynek segítségével az egyes enzimkinetikai esetek sebesség-szubsztrát-koncentráció összefüggése levezetés nélkül, a kinetikai séma alapján felírható.

A 2.15. ábrán látható jobb oldali képlet számlálójában olyan tagok vannak, amelyek megfelelnek a termék képző komplexeknek; az egyik tört számlálója utal az enzimnek az O ligandummal alkotott komplexére, és a második tört pedig a H ligandummal alkotott komplexre. Az elképzelt séma szerint mindkettőből lesz termék. A nevezőben lévő tagok reprezentálják a jelenlévő „enzimfajtákat” (ez tulajdonképpen az enzimre vonatkozó anyagmennyiség): itt van szabad és háromféleképpen kötött enzim, tehát négy tagja van a nevezőnek. Az 1 mindig a szabad enzimet jelenti, a komplexben lévők pedig egy-egy újabb tört, amelyeknek a számlálója az adott komplex ligandumjai koncentrációinak szorzata, a nevező pedig a komplex és a szabad enzim közötti disszociációs konstansok (szorzata). A példánkban tehát a nevezőben van egy nem „hasznos” ternér komplex is, azaz az enzimnek mind O-val mind H-val alkotott komplexe. (Ez egy nem létező séma alapján felírt eset, ha azonban mélyebben belegondolunk, így lenne leírható a S-inhibíció egyik esete is, lásd a [2.4. alfejezetet](#).)



2.15. ábra: A kinetikai egyenlet levezetés nélküli felírását elősegítő eljárás

2.3.2. Briggs–Haldane-kinetika⁶

A Briggs–Haldane vagy steady state kinetikai megközelítés szintén a fenti sémából indul ki, felírva az elemi lépések sebességeit jelentő differenciálegyenleteket:

$$\frac{dS}{dt} = -k_1 ES + k_{-1}(ES) + k_2(ES)$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 ES - k_{-1}(ES) - k_2(ES) \quad (2.9)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2(ES)$$

A (2.9) egyenletrendszer numerikus megoldása a 2.16. ábrán látható. Eszerint egy igen rövid felfutási szakasz után viszonylag hosszú időn keresztül az ES enzim-szubsztrát komplex

⁶ Briggs E.B.(1893-1985), Haldane J.B.S.(1892-1964)

koncentrációja alig változik. Ezt a jelenséget nevezzük állandósult állapotnak, illetve steady state-nek, pontosabban kvázi állandósult állapotnak, hiszen valójában – az ábra tanúsága szerint is – egy kis meredekségű (ES) változás azért észlelhető. A 2.17. ábra azt szemlélteti, hogy a pre-steady state igen rövid idejű, a szimuláció szerint 0,1 min alatti, tehát az S és P görbék egy mérés valós ideje (néhány perc, néhány tíz perc) alatt tényleg egyenes mentén kezdenek csökkenni, illetve nőni. Jegyezzük meg, hogy a pre-steady state a valóságban akár millisec rövidebb is lehet. Erre az állapotra nem érvényesek kinetikai egyenleteink, és a kísérletes vizsgálatokra is speciális módszereket dolgoztak ki.

Az állandósult állapot létrejöttének feltételei ugyanazok, mint a M–M kinetika esetén láttuk, ugyanakkor a komplex képződési sebessége lényegesen nagyobb kell hogy legyen a bomlásénál, azaz

$$k_1ES > k_{-1}(ES), \text{ illetve } k_1ES > k_2(ES).$$

Ezt a kvázi állandósult állapotot az jellemzi, hogy

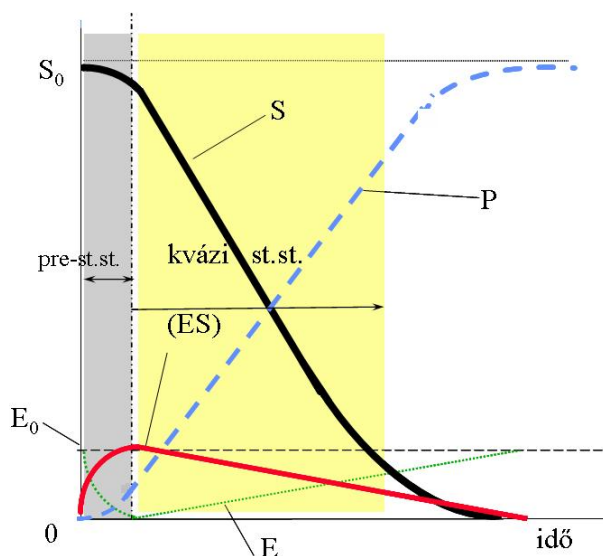
$$d(ES)/dt = 0,$$

azaz

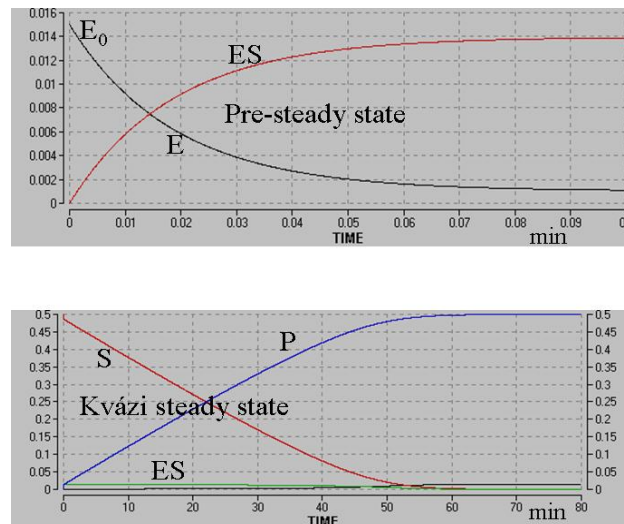
$$k_1ES = (k_{-1} + k_2)(ES) \tag{2.10}$$

$$(ES) = \frac{k_1S}{(k_{-1} + k_2)}$$

Az egyedi reakciósebességi állandókat egy csoportba gyűjtve vezessük be az ún. **Michaelis-konstanst** $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ alakban, amelynek felhasználásával (2.8) egyenletekkel formailag megegyező összefüggéseket nyerünk az enzimreakció kezdeti sebességére, vagyis mint a rapid ekvilibrium feltételezése esetén, itt azonban most K_m nem egy disszociációs egyensúlyi állandó.



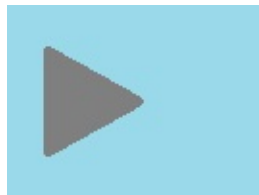
2.16. ábra: A (2.9) egyenlet numerikus megoldása



2.17. ábra: A (2.9) valós idejű megoldásai a presteady state-re és a teljes folyamatra

Jegyezzük meg, hogy a $d(ES)/dt=0$ eset minden megszorítás nélkül, tehát a fenti feltételek nem teljesülése esetén is létezik az (ES)-t görbe egy pontjában (ez a maximum), és ennek alapján ott (és szigorúan véve csakis ott) a levezetés a megszorítások nélkül is érvényes. A feltételek teljesülése esetén azonban az ábra szerinti „elnyúló” kvázi állandósult állapot jöhet létre, amikor tehát az enzimes reakció egy hosszabb szakaszában is érvényes a steady-state egyenlet. Éppen amiatt, hogy nem tudjuk, hogy adott esetben ez a kvázi állandósult állapot milyen hosszú, kell a kezdeti reakciósebességként értelmeznünk V -t. E „kezdeti reakciósebesség” természetesen csak egy extrapoláció útján kapott látszólagos kezdeti sebesség, hiszen a $t=0$ időpontban a valóságban nyilvánvalóan a reakciósebesség is zérus, de a fenti kép alapján „nagyon gyorsan” eléri a „kezdeti” reakciósebességet.

A Briggs–Haldane kinetika, illetve annak 2.17. ábra szerinti valós idejű megoldásai a differenciál-egyenlet rendszerének a [2.1. szimulációkon](#) tanulmányozhatók. Ezzel megvizsgálhatjuk, hogy az egyedi reakciósebességi állandók hogyan befolyásolják az enzimes reakció időbeli lefutását, a pre-steady state-et és az állandósult állapotot.



2.1. szimuláció: Egyszerű enzimes reakciók kinetikai viselkedése

2.3.3. A kinetikai egyenlet diszkussziója, paramétereinek meghatározása és értelmezésük

A kétféle megközelítés kinetikai egyenletei tehát formailag azonosak:

Michaelis–Menten

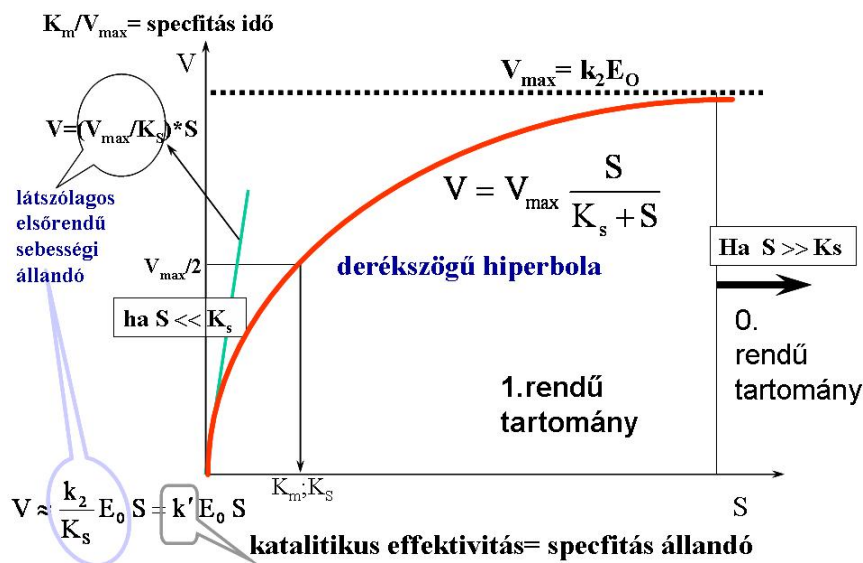
Briggs–Haldane

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S} \qquad V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}, \qquad (2.11)$$

ahol

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1}.$$

Ebből a kifejezésből látszik, hogy $K_m \cong K_s$ csak abban az esetben igaz, ha k_1 számértéke sokkal nagyobb, mint k_2 számértéke (vigyázat, azért csak a számérték, mivel egységeik nem azonosak!), azaz ha a k_2/k_1 tört elhanyagolhatóan kicsiny.



2.18. ábra: A M–M és B–H-egyenletek ábrázolása és diszkussziója

A (2.11) egyenlet ábrázolása V - S görbeként a 2.18. ábrán látható. Két szélső helyzetet érdemes megvizsgálnunk.

A derékszögű hiperbola asszimptótája $V_{\max} = k_2 E_0$.

– Ha ugyanis $S \gg K_s$, akkor a K_s elhanyagolható S mellett, és ekkor

$$V \cong V_{\max}$$

azaz a reakció nulladrendűvé válik a szubsztrátum koncentrációjára nézve. Ez másképpen megfogalmazva azt jelenti, hogy az összes jelen lévő enzim minden aktív centruma szubsztráttal telített.

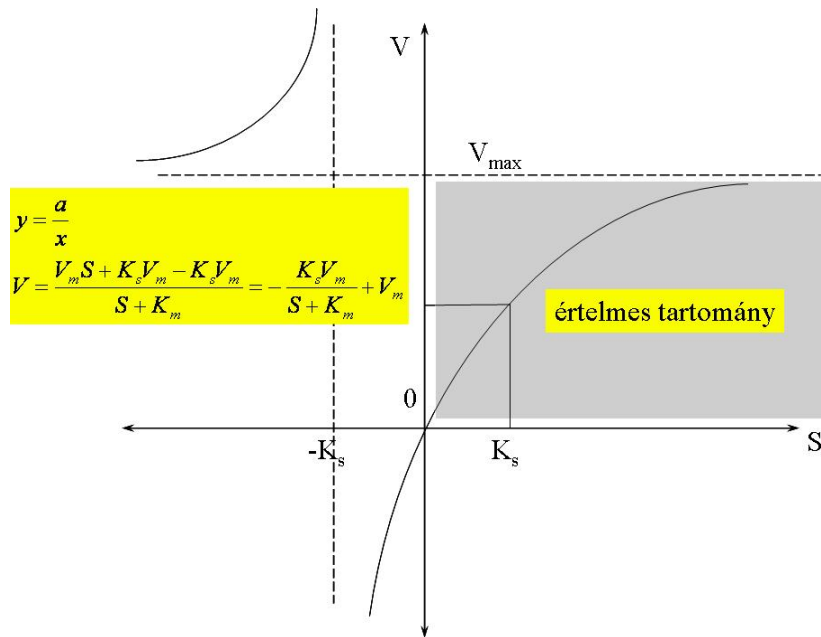
– Ha pedig $S \ll K_s$, akkor az S hanyagolható el K_s mellett, és ekkor

$$V \cong \frac{V_{\max}}{K_s} S = k \cdot S,$$

azaz nagyon kicsiny szubsztrát koncentrációknál az enzimreakció kezdeti sebessége egyenesen arányos a szubsztrát koncentrációjával (a reakció elsőrendű a szubsztrátra nézve). Ne felejtsük el, hogy a (2.11) egyenlet 2.18. ábra szerinti görbéjének minden egyes pontja egy-egy (különböző bemért S_0 kezdeti szubsztrát koncentrációhoz tartozó) V_0 kezdeti reakciósebességet jelent. E pontok kísérletes meghatározása a 2.14. ábrán látható módon, a görbék kezdeti egyenes szakasza iránytangensének meghatározásán alapszik.

– K_s vagy K_m értékét a $V = V_{\max}/2$ értékhez tartozó abszcissa-koordinátaként nyerhetjük, azaz ezek a félmaximumhoz tartozó szubsztrát koncentrációkat jelentik.

A görbe egy valódi hiperbola, amit a 2.19. ábra igazol, amelyen látható a teljes kétszárú hiperbola és a hiperbolaegyenlet transzformációi is, amelyek a számunkra értelmes tartományba „tolták el” a hiperbolát.



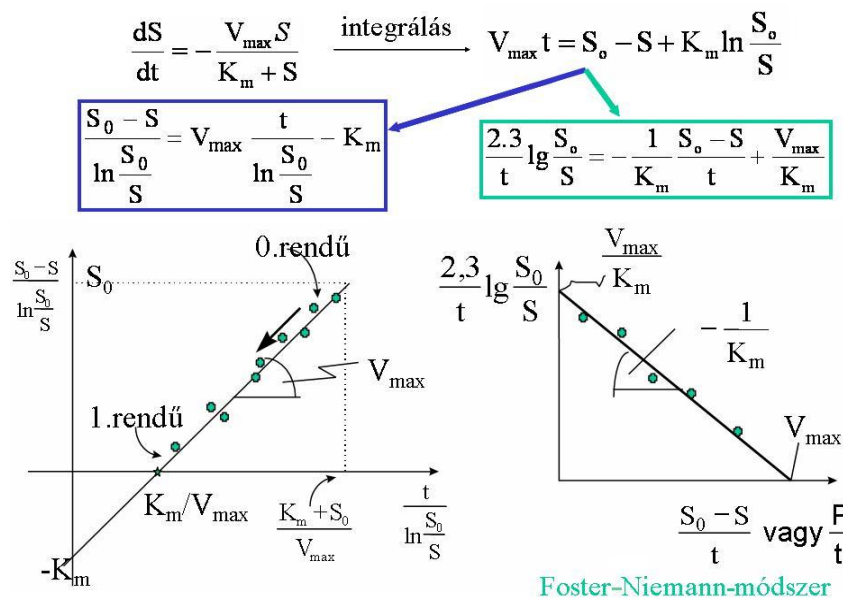
2.19. ábra: A M–M-egyenlet egy hiperbola transzformációja

A (2.11) kinetikai egyenletet differenciálegyenlet alakjában is felírhatjuk, és ekkor a

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$

alakú elsőrendű, a változók szétválasztásával igen egyszerűen megoldható egyenletet nyerjük, amelynek $S(0)=S_0$ kezdeti feltétellel történt megoldása t-re a következő:

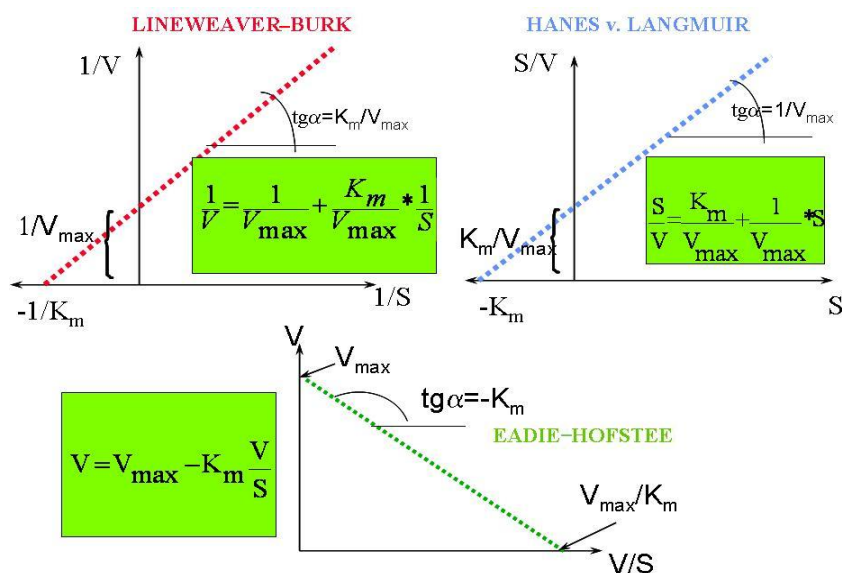
$$V_{\max} t = S_0 - S + K_m \ln \frac{S_0}{S} \tag{2.12}$$



2.20. ábra: Linearizációs módszerek az integrált M–M-egyenlet alapján

Laboratóriumi méréseink ilyen S-t adatsorokat adhatnak (pl. ha az enzimes reakciót a szubsztrátkoncentráció csökkenésének mérésével követjük), ez az alak azonban a paraméterek meghatározására ebben a formájában nem alkalmas, csak némi átalakítás után. Ehhez osszuk végig (2.12)-t $\ln \frac{S_0}{S}$ -sel, rendezzük át, és ekkor egy ábrázolható egyenes egyenletet kapunk. Ugyancsak az állandók meghatározására alkalmas a Foster–Niemann-módszer, amely az integrált formának egy másik, linearizált alakját használja. A 2.20. ábra e két ábrázolásmódot mutatja be. Ezt a módszert tehát akkor lehet a kinetikai paraméterek meghatározására javasolni, ha az egész enzimes reakció időbeli lefutását követjük.

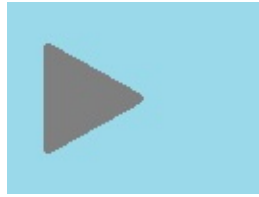
A V_{\max} és a K_s (illetve K_m) paramétereket különböző más grafikus módszerekkel is meghatározhatjuk, ha csak a kezdeti reakciósebességeket mérjük, de azt különböző bemért S koncentrációk esetén. Ezek a Michaelis–Menten-egyenlet lineáris formában való kifejezései, emiatt lineáris regressziószámítással lehetővé teszik a paraméterek meghatározását. A legismertebb és legelterjedtebben használt, ugyanakkor a legkevésbé jó módszer a Lineweaver–Burk-féle ábrázolás. Azok a módszerek, így a Hanes–Langmuir- és az Eadie–Hofstee-féle módszerek is, amelyek esetében valamelyik változó *mindkét tengelyen* szerepel, jobb eredményeket adnak. A három linearizációs módszert összefoglalóan mutatja a 2.21. ábra.



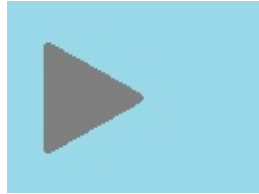
2.21. ábra: A M–M-egyenlet linearizációi

Mind az integrált formához, mind az utóbbi linearizációkhoz megjegyezzük, hogy ezeket a módszereket akkor fejlesztették ki, amikor az adatkezelések a számítástechnika hiányában rendkívül fáradságos munkát jelentettek (a 20. század 70-es éveig bezárólag). Ma ezek a módszerek látszólag feleslegesek, hiszen a személyi számítógépeken is elérhető nemlineáris regressziós algoritmusok segítségével a nyers mérési eredményekhez is illeszthetők az egyenletek, azaz a kinetikai állandók könnyen meghatározhatóak. Mégis érdemes ez utóbbi három módszert megismerni, mert az inhibíciók és aktiválások esetén, azaz az eddig megismertnél komplexebb kinetikai sémák esetén ezek az ábrázolások igen informatívak, jellemző görbéket szolgáltatnak, amelyek alapján az egyes esetek felismerhetőek és egymástól megkülönböztethetőek.

A M–M- és B–H-egyenlet függvényalakjának változásait a paraméterek függvényében a [2.2. szimuláció](#) és a linearizációs módszerek görbéinek változásait (és egyéb aspektusait) a [2.1. szimulációkban](#) ismerhetjük meg részletesebben. Amennyiben saját mérési eredményeinket kívánjuk kiértékelni a linearizációs módszerekkel, használjuk a [2.3. szimuláció](#) munkalapjait.



2.2. szimuláció: M–M-enzimkinetika



2.3. szimuláció: Nemlineáris regressziós illesztés saját adatokhoz

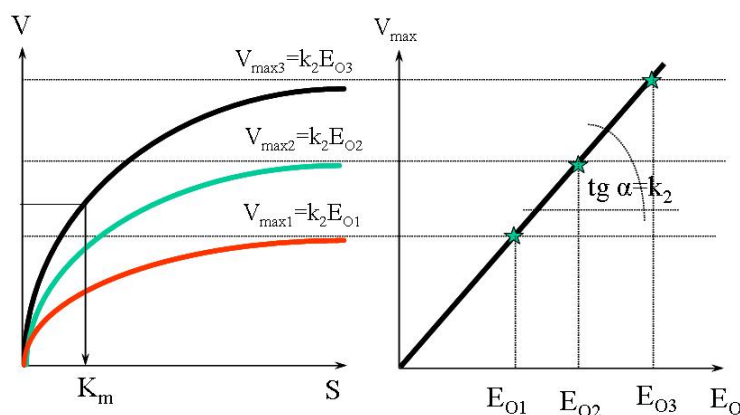
A V_{\max} meghatározásának célja kézenfekvő: arányos lévén a bemért enzim mennyiségével, lényegében az enzimaktivitás mérőszáma, az enzim mennyiségére ad felvilágosítást. Ezt szemlélteti a 2.22. ábra is, amely a derékszögű hiperbolák eltolódását mutatja az enzim mennyiségének függvényében, valamint a k_2 sebességi állandó meghatározásának lehetőségét mutatja be.

Fontos, hogy V_{\max} nem az enzim tulajdonsága, hiszen az annak mennyiségétől is függ! Az elsőrendű sebességi állandó k_2 azonban *enzimtulajdonság*, s *turnover number*-ként is szokták illetni. Magyar elnevezése: váltásszám. Ennek szemléletes értelme a következő. Megadja az 1 perc alatt (vagy egy s alatt) egy enzim molekula által átalakított szubsztrátmolekulák számát. Ez tehát a frekvenciája az enzim működésének: hányszor „fogad” és alakít át szubsztrátmolekulát egy perc (vagy egy s) alatt.

Pontosabban és általánosságban minden enzimre definiálható egy $V_{\max}=k_{\text{cat}}E_0$ mennyiség, amelyben k_{cat} az úgynevezett katalitikus állandó vagy turnover number.

A Michaelis–Menten-kinetika esetében természetesen k_{cat} egyenlő k_2 -vel, de komplexebb esetekben ez nem mindig van így. Ez a turnover number enzimtulajdonság!

A [metabolikus enzimek](#) (pl. a glikolízis enzimei) k_{cat} értékei 1-től 10^7 s^{-1} tartományban mozognak, míg a lassabb működésű [restrikciós enzimek](#) értékei az $1-10^{-3}$ tartományba esnek, és leglassabbak az ún. [molekuláris kapcsolók](#) (pl. a cirkadián rendszer enzimei), a maguk $10^{-5}-10^{-2} \text{ s}^{-1}$ tartományával.

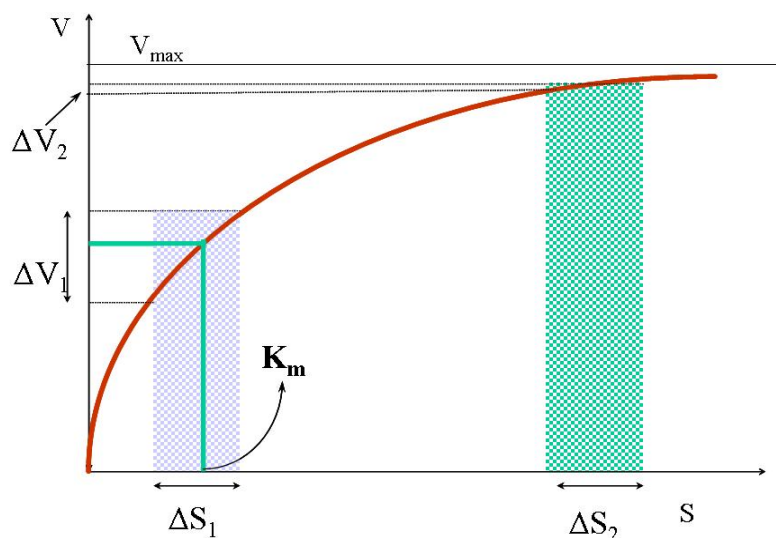
2.22. ábra: V_{\max} arányos az enzimbeméréssel: az aktivitás és k_2 meghatározása

A K_m , illetve K_s értelmezése komplexebb és többsikű. A következő szövegrészben K_m és K_s felcserélhetők, azaz megállapításaink mindkettőre vonatkoznak!

– K_m közelítőleg megadja a S koncentrációját a sejtekben. (lásd a 2.23. ábrát). Valószínűtlen ugyanis, hogy az intracelluláris szubsztrát koncentrációja akár sokkal kisebb, akár sokkal nagyobb

lenne K_m -nél. Előző esetben a reakciósebesség igen érzékenyen reagálna az S kicsiny változásaira is, és ugyanakkor a sejt potenciális maximális átalakító kapacitásától (V_{max} -tól) is igen távol esnék.

($V \ll V_{max}$). Ugyanígy értelmetlen fiziológiai értelemben a második eset is, azaz ha S sokkal nagyobb, mint K_m , mivel elvileg V valamennyivel mindig kisebb, mint V_{max} , és az $S=K_m$ -nél, valamint pl. az $S=1000K_m$ -nél mérhető sebességek között csupán kétszeres a különbség (bizonyítsa be, hogy ez igaz!), ami egyenértelmű avval a megfogalmazással, hogy ilyen körülmények között V igen érzéketlen lenne az S változásaira. Valószínű tehát, hogy az intracelluláris szubsztrát koncentrációja valahol a $V_{max}/2$ körüli tartományra vonatkozik, ahol az S változásra adott V változás elegendően, de nem túlzottan nagy és egyenletes.



2.23. ábra: K_m illetve K_s közelítőleg a sejtbeli szubsztrát koncentráció.

- Jegyezzük meg, hogy K_m tulajdonképpen az enzim **affinitását** mutatja a szubsztráthoz, minél kisebb az értéke, annál nagyobb az adott szubsztrátra vonatkozó affinitás. A „legjobb” szubsztrátnak legkisebb a K_m -je.
- K_m állandó egy adott enzimre, azaz jó összehasonlító adat a különböző sejtekből, szervekből, szervezetekből izolált, vagy különböző korú sejtekből származó, de hasonló funkciójú enzimek esetében. Így alkalmas annak eldöntésére, hogy A enzim azonos-e B-vel, illetve, hogy ezek különböző fehérjék-e azonos vagy hasonló katalitikus hatással.
- K_m módosítása valamely aktivátor vagy inhibitor által alapja lehet bizonyos mértékű enzimszintű szabályozásnak. Ha például az *in vitro* meghatározott K_m túl nagy a „fiziológiásan valószínű” szinthez képest, jó esélyünk van arra, hogy *in vivo* létezik valamilyen aktivátor, ami csökkenti K_m értékét. Hasonlóan a különböző vegyületeknek K_m -re gyakorolt hatását vizsgálva, találhatunk olyanokat, amelyek növelik azt, és így esetleg fontos fiziológiai inhibitorok lehetnek (gyógyszerhatás).
- Ha ismerjük K_m értékét, beállíthatjuk az enzim analitikai meghatározásához fontos kísérleti $S \gg K_m$ körülményeket, és így helyesen mérhetünk V_{max} -ot, azaz enzimaktivitást.
- K_s illetve K_m értékei igen változatosak, a szokásos tartományuk: 10^{-6} – 10^{-2} mol/dm³.

A Michaelis–Menten- és a Briggs–Haldane-egyenlet egyedi reakciósebességi állandóinak tipikus tartományai a következők:

A k_1 másodrendű sebességi állandó szokásos tartománya:

$$k_1 = 10^7\text{--}10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

A maximális érték biztosan kisebb, mint 10^{11} , ami a kis molekulák vizes oldatokban mérhető diffúzió-sebességének a nagyságrendje, hiszen az enzimmal történő szubsztrátérrintkezés a diffúzióval gyorsabban nem történhet.

A k_1 a 10^2 – 10^6 min^{-1} tartományba esik (ez is egy elsőrendű állandó, akár csak k_2).

2.3. táblázat: Néhány enzim kinetikai állandói

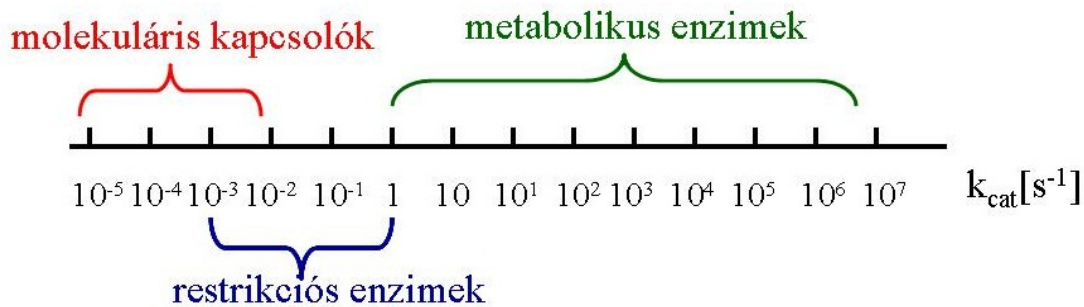
ENZIM	SZUBSZTRÁT	K_m (mol/dm^3)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{s}$)
kataláz	hidrogénperoxid	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^8$
ureáz	karbamid	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^5$
fumaráz	fumársav	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^8$
	almasav	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^7$
acetilkolinészteráz	acetilkolin	$9,5 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^8$

A **katalitikus effektivitás**, vagy **specifitási állandó** értéke ugyanakkora lehet egészen eltérő tulajdonságok esetén is, például 10^7 kétféleképpen is lehet az alábbi példa értelmében:

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} = \frac{10^7 \text{ s}^{-1}}{1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}} = \frac{1 \text{ s}^{-1}}{10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}}.$$

Az egyik enzim itt nagyon kis affinitással, ugyanakkor nagyon nagy k_{cat} -tal rendelkezik, a másik pedig fordítva. Az enzim átalakulás sebességét ez a két paraméter együttesen, a k' értelmében (2.18. ábra) határozza meg. Ez a kombinált kinetikai állandó arra is alkalmas, hogy egy enzimnek több különböző szubsztrát esetében az átalakítási sebességét megadja (=átalakítási hajlandóság, azaz specifitás), például a táblázat szerint a fumaráz enzim a fumársavat „szívesebben” alakítja át, mint az almasavat.

A k_{cat} értékek rendkívül széles skálán mozognak. A 2.24. ábra tanúsága szerint leglassabbak az úgynevezett molekuláris kapcsolók, míg a metabolikus reakciókat katalizálók sokkal gyorsabbak lehetnek, akár 8-10 nagyságrenddel is.



2.24. ábra: A k_{cat} értéktartományai a különböző enzimtípusokra

Az alapvető kinetikai tulajdonságok megismerése után ellenőrizzük megszerzett tudásunkat az [2.2.](#) és [2.3. animációkban](#) található feladatokkal.



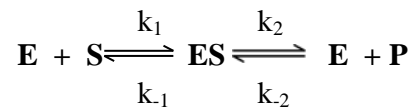
2.2. animáció: Öellenőrzés: enzimkinetika 1.



2.3. animáció: Önellenzés: enzimkinetika 2.

2.3.4. Reverzibilis reakciók – az enzimreakció egyensúlyi állandója

Sok enzim katalizálta reakció – mint például a biopolimer hidrolízisek – nagymértékben a jobb oldali irányba eltolt egyensúlyal rendelkeznek, olyannyira, hogy gyakorlatilag k_{-2} valóban elhanyagolható, mint azt eddigiekben tettük is. Más esetekben, mint például a glükóz→fruktóz átalakulásnál (glükóz izomeráz) a gyakorlatban is egyensúlyi reakcióként viselkedik a rendszer. Tekintsük az enzimes reakciót valóban reverzibilisnek az alábbiak szerint:



Elvileg a reakció mindkét irányban követhető. Jelöljük az előremenő reakciónak a K_m értékét K_{mS} -sel, a visszafelé menő reakciót pedig K_{mP} -vel, és hasonlóan V_{maxS} és V_{maxP} jelölésekkel illessük a két irányba futó reakciók maximális sebességeit.

Ekkor a Michaelis-állandók és a maximális reakciósebességek az alábbiak lesznek:

$$\begin{aligned} K_{mS} &= \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} & V_{maxS} &= k_2 E_0 \\ K_{mP} &= \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}} & V_{maxP} &= k_{-1} E_0 \end{aligned} \quad (2.13)$$

A teljes reverzibilis reakcióra számítható egyensúlyi állandó az egyes lépések egyensúlyi állandóinak szorzata:

$$\begin{aligned} &\text{ez a } K_S \text{ reciproka} && \text{ez maga a } K_P \\ &\downarrow && \downarrow \\ &K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad \text{és} \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} && \\ &K_{eq(uvilibrium)} = K_1 K_2 = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} && \end{aligned} \quad (2.14)$$

Ha elvégezzük a következő osztásokat:

$$\frac{V_{maxS}}{K_{mS}} = \frac{k_1 k_2 E_0}{k_2 + k_{-1}} \quad \text{és} \quad \frac{V_{maxP}}{K_{mP}} = \frac{k_{-2} k_{-1} E_0}{k_2 + k_{-1}},$$

majd e két kifejezést is elosztjuk egymással, akkor éppen az egyensúlyi állandót nyerjük:

$$\frac{\frac{V_{maxS}}{K_{mS}}}{\frac{V_{maxP}}{K_{mP}}} = \frac{V_{maxS} K_{mP}}{V_{maxP} K_{mS}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = K_{eq} \quad (2.15)$$

A (2.15) egyenlet az úgynevezett **Haldane-féle összefüggés**. Ez kapcsolatot teremt az enzimkinetikai, az egyedi reakciósebességi állandók, illetve az egyensúlyi állandó között.

Tételezzük fel, hogy egy reaktorban S és P keveréke van jelen. Adjunk e keverékhez E_0 mennyiségű enzimet egy adott időpillanatban. Felmerülhet a kérdés, hogy mi fog történni, vajon S alakul át P-vé, vagy P alakul át S-sé? A valóban reverzibilis $S \rightleftharpoons P$ reakció tényleges irányát és az eredő reakció sebességét a P és S kezdeti koncentrációja és a K_{eq} egyensúlyi állandó fogja meghatározni.

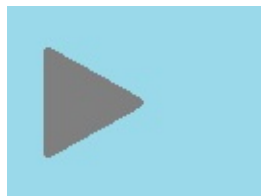
Abból kiindulva, hogy az eredő reakciósebesség

$$V_{\text{netto}} = V_{\text{előre}} - V_{\text{vissza}} = k_2(ES) - k_{-2}(EP), \quad (2.16)$$

levezethető, hogy az eredő sebesség

$$V_{\text{netto}} = \frac{V_{\text{maxS}} \left(S - \frac{P}{K_{eq}} \right)}{K_{ms} \left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right) + S} = \frac{V_{\text{maxS}} \frac{S}{K_{ms}} - V_{\text{maxP}} \frac{P}{K_{mp}}}{1 + \frac{S}{K_{ms}} + \frac{P}{K_{mp}}} \quad (2.17)$$

A (2.17) egyenlet hasonlósága a Michaelis–Menten-egyenlethez kézenfekvő, csak itt a számlálóban S helyett $S - S_{\text{ekvilibrium}}$ (vagyis az egyensúlytól való távolság) szerepel, illetve a nevezőben K_m úgy módosul, mintha a P egy [kompetitív inhibitor](#) lenne. Az egyenlet működését szemlélteti a [2.4. szimuláció](#) munkalap, amely a fumaráz enzim viselkedését modellezi: adott reakció esetében a bemért szubsztrát, illetve termék koncentrációja határozza meg, hogy melyik irányban és milyen sebességgel indul el a reakció.



2.4. szimuláció: Reverzibilis M–M-kinetika

2.4. Enzimmoduláció, bevezetés, áttekintés

Vannak olyan kémiai anyagok, amelyek az enzimhez kötődve megváltoztatják annak katalitikus aktivitását. Ezeket enzimmodulátoroknak vagy enzimeffektoroknak nevezzük, a jelenséget magát pedig enzimmodulációnak. Aktivátoroknak nevezzük azokat a modulátorokat, amelyek növelik, míg inhibitoroknak azokat, amelyek csökkentik az enzim aktivitását. E fejezetben az inhibícióról értekezünk, az aktiválás hasonló kinetikai apparátussal írható le, arról más enzimkinetikai kurzusban olvashatnak.

Az aktiválás, illetve inhibeálás fokát a változásnak az eredeti állapot sebességére vonatkoztatásával fejezhetjük ki:

inhibíció foka

$$\epsilon_i = \frac{V_0 - V_i}{V_0}$$

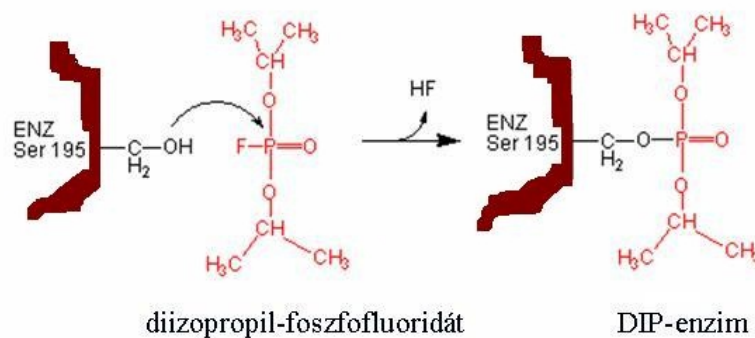
aktiválás foka

$$\epsilon_a = \frac{V_a - V_0}{V_0}$$

Az enzimnek egy effektorral megvalósuló kapcsolódása, az EI komplex létrejötte, teljes mértékben vagy részlegesen reverzibilis, avagy irreverzibilis lehet.

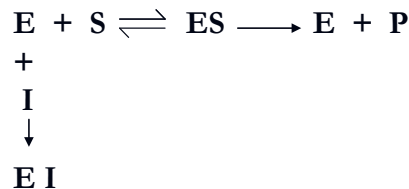
Az **irreverzibilis enziminhibíció** ismert példái az enzimmérgek, mint például a nehézfémek (Hg) és a cianid ionok (amelyek például irreverzibilisen dezaktiválják a xantin-oxidáz enzimet), vagy a jól ismert idegmérgek (mint például a sarin, azaz a di-izopropil-fluoro-foszfát, lásd a 2.25. ábrát), amelyek a neuro-transzmisszióban létfontosságú szerepet játszó acetilkolin-észteráz enzimet inaktíválják.

Az irreverzibilis inhibíció ténylegesen csökkenti az aktív enzim mennyiségét, és gyakran az időben is növekvő hatást gyakorol. Enzimsztítási szempontból jelentős a nehézfémek szerepe, ugyanis amíg egy fehérjekeveréket vizsgálunk (nem tisztított enzim), sokszor a jelen lévő nehézfémek hatását eliminálják a szennyező (komplekképző) fehérjék, míg a tisztább enzimfrakciók esetén a hatás már szembeszökő. A higanyII-vegyületeket az enzimvizsgálatokban gyakran az SH-csoportok jelenlétének bizonyítására is felhasználják.

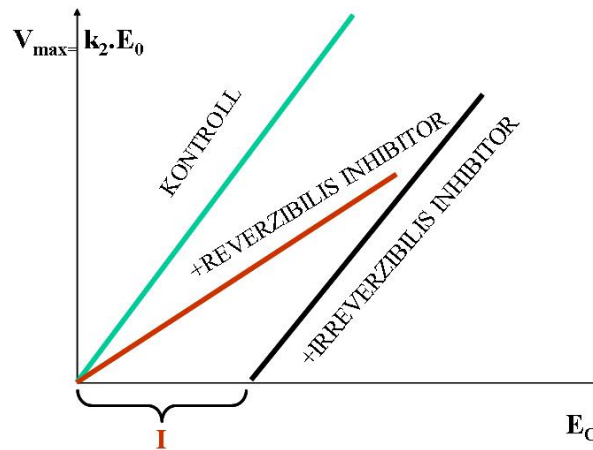


2.25. ábra: A sarin ideggáz hatása

Az irreverzibilis inhibitorok kinetikai hatása némileg hasonló a nemkompetitív inhibitorokéra (V_{\max} csökken, de K_m változatlan marad, lásd később részletesen) az alábbi séma szerint:



A $V_{\max} = k_2 \cdot E_0$ összefüggés alapján bizonyítható egy irreverzibilis inhibitor jelenléte, illetve hatása megkülönböztethető a reverzibilis nemkompetitív inhibitorétól a 2.26. ábra szerint. Ha ugyanis a bemért enzim mennyiségét növeljük, az összefüggés értelmében az E_0 tengelyen lévő pozitív tengelymetszet éppen azt az enzimmennyiséget jelenti, amelyet a jelen lévő inhibitor irreverzibilis módon lekötött.



2.26. ábra: Az irreverzibilis inhibíció azonosítása

A **reverzibilis inhibitorok** dinamikus komplexeket képeznek az enzimmal, és e komplex katalitikus hatása eltér a nem komplexálódott enzimétől. Az inhibíció fajtáit megkülönböztethetjük aszerint, hogy milyen látszólagos hatást fejtenek ki a V_{\max} és a K_m (illetve K_s) kinetikai paraméterekre. Ha az inhibitor növeli a (látszólagos) K_m értéket, de nem befolyásolja a V_{\max} -ot, akkor **kompetitív inhibíció**ról beszélhetünk, ha csökkenti V_{\max} -ot, de nem befolyásolja K_m értékét, akkor tiszta **nemkompetitív inhibíció**val állunk szemben. Ha V_{\max} és K_m egy állandó arányban csökken, akkor esetünk az úgynevezett **unkompetitív inhibíció**, míg ha ezen hatások bizonyos kombinációja jelentkezik, akkor **kevert típusú inhibíció**ról beszélünk. Utóbbi történet sémájából valamennyi inhibíció típus kinetikai viselkedése levezethető annak speciális eseteiként. Jegyzetünkben nem ezt az utat választottuk: minden inhibíció típusot egyenként értelmezünk.

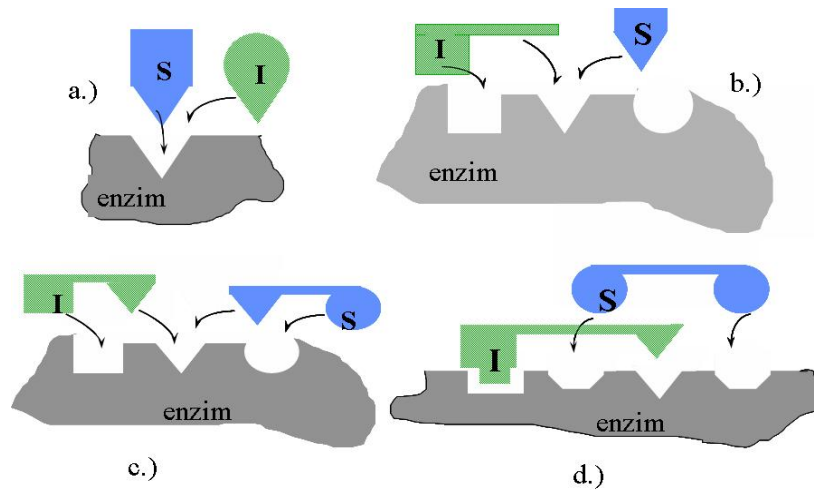
Az inhibíciókat abból a szempontból is megkülönböztethetjük, hogy az inhibitor kapcsolódásakor az enzim teljesen elveszíti-e aktivitását vagy részlegesen aktív marad. Előbbi eset a **komplett inhibíció** vagy **lineáris inhibíció** (ui. K_m/V_{\max} , illetve $1/V_{\max}$ ábrázolása az I inhibitor koncentráció függvényében ilyenkor lineáris [Ez az ún. Dixon-ábrázolás, később ezt részleteiben látjuk majd]), az utóbbi eset pedig a **parciális inhibíció** vagy **hiperbolikus inhibíció** esete (a jelzett grafikon alakja alapján). Elméletileg mind a lineáris, mind a hiperbolikus inhibíció lehet kompetitív, nemkompetitív vagy vegyes típusú.

A továbbiakban a lineáris inhibíció eseteivel fogunk foglalkozni.

2.4.1. Kompetitív inhibíció

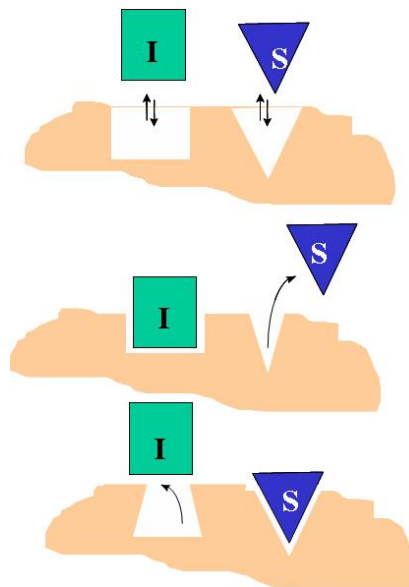
Kompetitív inhibitoroknak nevezzük azokat az anyagokat, amelyek az enzimhez kötődve megakadályozzák a szubsztrátnak az enzimhez kötődését, mégpedig kölcsönösen, azaz ha a szubsztrát már kötődött az enzimhez, akkor az inhibitor molekula erre már nem képes, kizáródik az enzimről, ha pedig az inhibitor kötődött, akkor a szubsztrát kötődése válik lehetetlenné. Ez a valódi versengés a szubsztrát és az inhibitor között magyarázza a kompetitív inhibíció elnevezést.

A kompetitív inhibitorok a valódi szubsztráthoz kémiai felépítésükben hasonló, de az enzim által nem átalakítható (nem metabolizálható) *szubsztrátanalógok*, *szubsztrátszármazékok*, illetve az enzim *alternatív szubsztrátjai*, illetve *termékei* lehetnek (ezek a klasszikus kompetitív inhibíció esetei), de olyan kompetitív inhibíció is létezik, ahol az inhibitor egyáltalán nem hasonlít szerkezetileg a szubsztrátra. A kompetitív inhibíció lehetséges mechanizmusait szemléltetik sematikusán a 2.27. és a 2.28. ábrán látható modellek (valamint az ezeket bemutató animációk: [2.4. animáció](#), [2.5. animáció](#)). Vegyük észre, hogy csak az 1. modell esetében van szó szigorúan szerkezeti hasonlóságról.



2.27. ábra: A kompetitív inhibíció modelljei 1

A 2.27. ábra a) esete felel meg a klasszikus kompetitív inhibíciónak, ekkor szerkezeti hasonlóság van a szubsztrát és az inhibitor között, és mindketten a szubsztrátkötőhelyhez kapcsolódhatnak. A b) eset a sztérikus gátlás, amikor az inhibitor mintegy lefedi a szubsztrátkötőhelyet és így akadályozza meg az S kötődését (és fordítva); a c.) modell lényegében az a)-val azonos, de itt mind az S, mind az I két kötőhellyel rendelkezik, és csak az egyikért versengenek. A negyedik modell átlapoló kötőhelyeket jelez, így ez is a sztérikus gátlás egy esetének tekinthető. A 2.28 ábra vázolta eset a biokémiai szempontból legfontosabb, ugyanis az ún. végtermékgátlást (kompetitív feedback inhibíció) jelenti. Ez az egyik enzim szintű szabályozási lehetőség, amellyel egy sejt meg tudja akadályozni, hogy egy reakciósor végterméke túlermelődjék. Ekkor ez a termék kapcsolódik a reakciósor első lépésének enziméhez, és megváltoztatva annak konformációját, gátolja működését. Itt tehát az inhibitor az enzimen akár az aktív helytől igen távoli helyen is támadhat, csak a konformációváltozás a lényeges. Jegyezzük meg, hogy ez is kölcsönös, a szubsztrát is megakadályozza az inhibitor kapcsolódását.



2.28. ábra: A kompetitív inhibíció modelljei 2

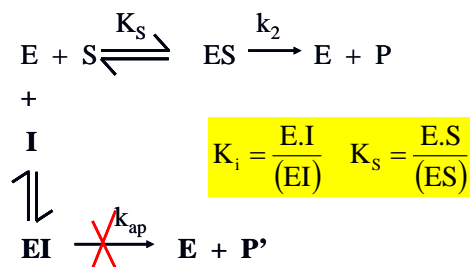


2.4. animáció: Kompetitív inhibíció modelljei 1–4



2.5. animáció: Kompetitív inhibíció 5 modellje

A **kompetitív inhibíció** kinetikai leírásához tekintsük meg az alábbi sematikus történekvázlatot:



Ha $k_{ap} > 0$, akkor az I valójában az E *alternatív szubsztátja*, P' pedig egy *alternatív termék*. Ilyen például a hexokináz enzim esetében a glükóz és a fruktóz: mindkettőt képes a hexokináz hexóz-6-foszfáttá alakítani, tehát alternatív szubsztátok, ugyanakkor egymás kompetitív inhibitorai is.

Ha $k_{ap} = 0$, ez a klasszikus ún. *dead-end kompetitív inhibíció*, azaz az EI komplex nem képez semmilyen terméket.

Hasonlóan eljárva, mint az egyszerű enzim reakció rapid ekvilibrium kinetikája tárgyalásakor tettük, vagy felhasználva a 2.3-ban megismert memotechnikai eljárást, felírhatjuk a kinetikai összefüggést mindkét komplexre a rapid ekvilibrium feltételezésével:

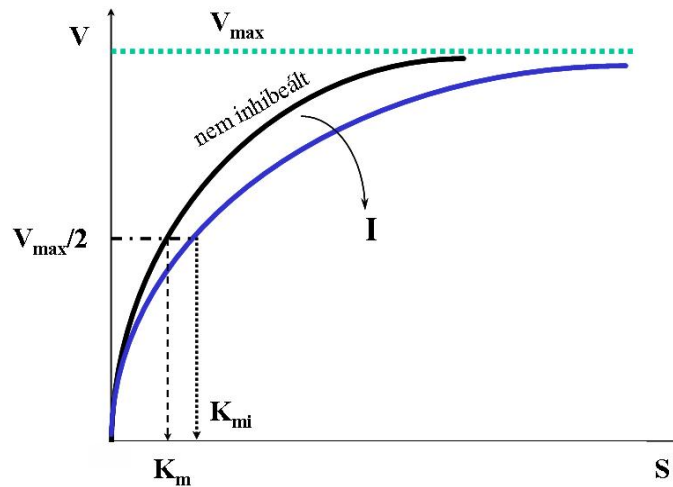
$$\frac{V}{k_2 E_0} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_i}} \quad (2.18)$$

A nem inhibeált esethez képest itt a nevezőben van egy plusz tag, I/K_i , amely az EI komplexet reprezentálja, míg a számláló változatlan, hiszen csak egy termékképező komplex létezik.

Ismertebb összefüggést kapunk, ha (2.18)-at kicsit átalakítjuk K_s -sel történő bővítéssel:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad \text{vagy} \quad V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad (2.19)$$

(Ha a steady state gondolatmenetet követnénk, ugyanezt az összefüggést nyernénk, természetesen K_S helyett K_m -mel. Az alábbi ábrákon mindenütt K_m -et használunk.)



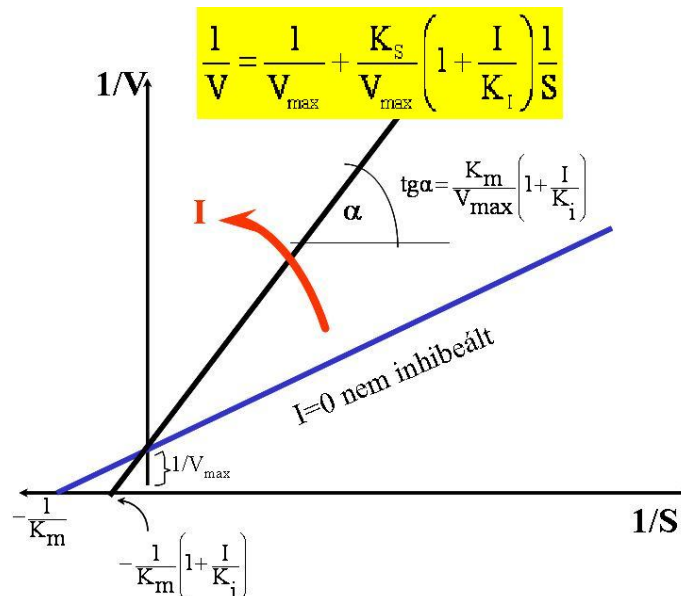
2.29. ábra: A kompetitív inhibíció V-S ábrázolása

A nevező $K_m(1+I/K_i)$ tagját K_{mi} látszólagos Michaelis-állandónak nevezzük. Megállapíthatjuk, hogy kompetitív inhibíciónál V_{max} változatlan, az I csupán a látszólagos K_{mi} (vagy K_{Si}) értékeket növeli, azaz úgy hat, mintha csökkentené az enzim affinitását a szubsztráthoz. A $K_m(1+I/K_i)$ tényezőt érdemes jól megjegyezni, mert ez minden inhibíciótípus kinetikai egyenletében szerepel!

A 2.29.–2.30. ábrákon a kompetitív inhibíciót jellemző ábrázolásokat, illetve a paraméterek meghatározásához felhasználható grafikus reprezentációkat mutatjuk be.

A Lineweaver–Burk-ábrázolásból látszik, hogy a görbék irántangense az inhibitor koncentrációjának a függvénye:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} K_i} I \quad (2.20)$$



2.30. ábra: A kompetitív inhibíció Lineweaver–Burk-ábrázolása

Az (2.20) összefüggés egyenes egyenlet, így egy újraábrázolásra ad lehetőséget: $\operatorname{tg} \alpha$ -I ábrázolásban. Ez lehetővé teszi a K_i paraméter meghatározását.

Vizsgáljuk meg, hogy mekkora az az inhibitor-koncentráció, amely éppen megduplázza a L-B egyenes meredekségét:

$$2 \operatorname{tg} \alpha = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \quad \text{innen } 2 = 1 + \frac{I}{K_i} \text{ és } I = K_i \quad (2.21)$$

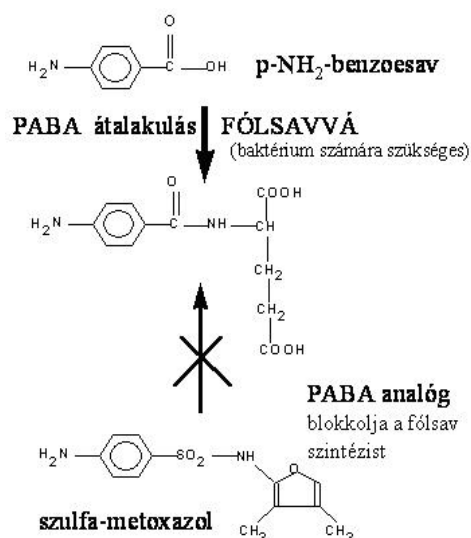
A kompetitív inhibíció esetén tehát K_i éppen azt az inhibitor-koncentrációt jelenti, amely kétszer olyan meredek L-B egyenest ad, mint amilyent a nem inhibeált esetben kapunk. Ne gondoljuk azonban, hogy ekkor az inhibíció foka 50%-os!, utóbbit ugyanis a V_i/V hányadossal számíthatjuk ki:

$$\frac{V_i}{V} = 0,5 = \frac{\frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S}}{\frac{S}{K_s + S}} \quad (2.22)$$

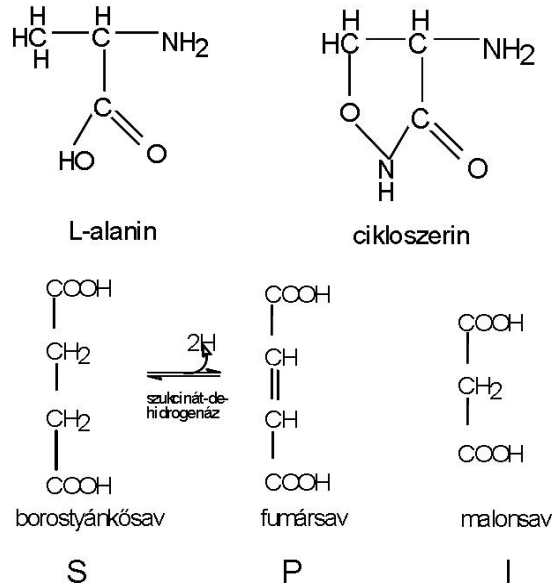
$$I = K_i \left(\frac{S}{K_s} + 1 \right)$$

A kompetitív inhibitorok jelentős szerepet játszanak a kemoterápiában, több gyógyszert ismerünk, amelyek létfontosságú enzimek kompetitív inhibitoraiként fejtik ki hatásukat. A mikrobák számára vitaminszerű p-amino-benzoészav például szerkezeti rokonságot mutat a szulfonamid készítményekkel (mikrobás fertőzések elleni gyógyszerek: Ultraseptyl, Superseptyl stb.), az antibiotikum cikloserin pedig az alanin aminosavval mutat szerkezeti hasonlóságot. Mindkét esetben a gyógyszer hatóanyaga „verseng” egy kulcsenzim szubsztrátjával, azt kiszorítja az aktív helyekről, s így a természetes átalakulás nem tudván végbemenni, a fertőző mikroba elpusztul.

Egy másik klasszikus példája a kompetitív inhibíciónak a szukcinát-dehidrogenáz (EC 1.3.99.1) és szubsztrátja, a borostyánkősav, valamint a kompetitív inhibitor szubsztrátanalógja, a malonsav esete (2.31. ábra). Érdekes módon a szukcinát-dehidrogenáznak a reakcióterméke, a fumarát is kompetitív inhibitora ($K_i = 1,9 \cdot 10^{-3}$ mmol/l inhibíciós állandóval).



2.31. ábra: A szulfagyógyszerek kompetitív inhibitorok



2.32. ábra: Példák a kompetitív inhibitorokra

A kompetitív inhibíció (2.19) egyenletét nem nehéz felismerni a következő analógiák esetén sem:

Kompetitív termékinhibíció:

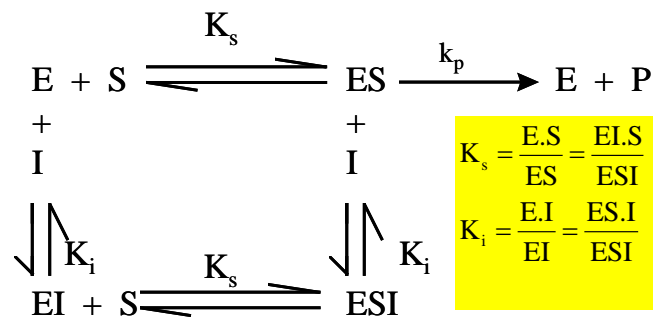
$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p} \right) + S}$$

Alternatív vagy versengő szubsztrátok (hexokináz: glükóz, fruktóz):

$$V_1 = V_{1\max} \frac{S_1}{K_s^1 \left(1 + \frac{S_2}{K_s^2} \right) + S_1} \quad V_2 = V_{2\max} \frac{S_2}{K_s^2 \left(1 + \frac{S_1}{K_s^1} \right) + S_2}$$

2.4.2. Nemkompetitív inhibíció

A nemkompetitív inhibíció esetén az inhibitornak nincs hatása a szubsztrát kötődésére és fordítva: a szubsztrátnak az inhibitor kötődésére. Az S és az I véletlenszerűen, *reverzibilisen és egymástól függetlenül* az enzim különböző kötőhelyeire kapcsolódnak, azaz I és E létrehozza az EI, S és E pedig az ES komplexeket, ugyanakkor azonban a ternár ESI komplex is létrejöhet az alábbi séma szerint:





2.6. animáció: Nemkompetitív inhibíció

A történéseket a 2.6. animáció megtekintésével is követhetjük.

Hasonló gondolatmenettel, mint amit eddig is követtünk, mivel $V = k_p(ES)$

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{ES}{E + ES + EI + ESI},$$

ahonnan némi átalakítás után (valamennyi komplexet E-vel és K_S -sel, illetve K_i -vel kifejezve és helyettesítve) kapjuk a nemkompetitív inhibíció sebességi egyenleteit:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_i} + \frac{S \cdot I}{K_s K_i}}$$

vagy

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (2.23)$$

illetve

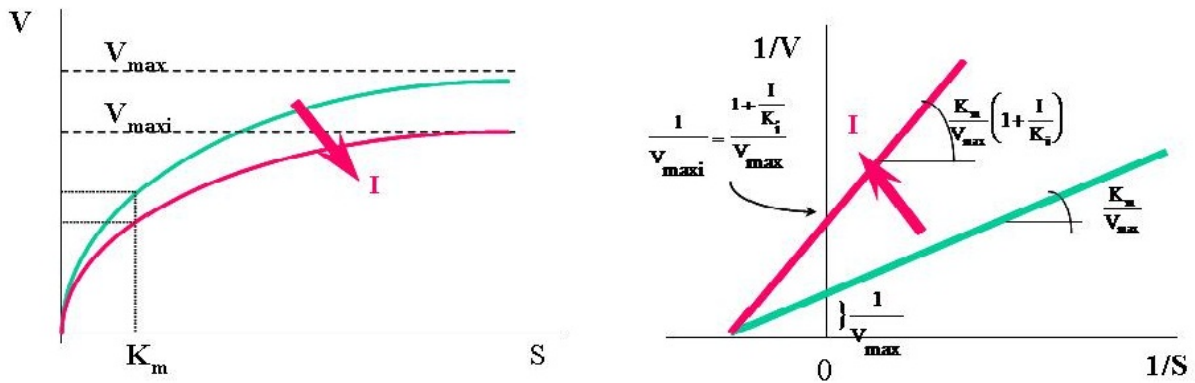
$$V = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \frac{S}{K_s + S}$$

Szokásos a látszólagos $V_{\max i}$ bevezetésével (2.23)-t a következőképpen is felírni:

$$V = V_{\max i} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{ahol} \quad V_{\max i} = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}}$$

Láthatóan a nemkompetitív inhibíció esetén az inhibitor a látszólagos V_{\max} értéket változtatja meg csupán, míg K_S (illetve K_m) értékét nem befolyásolja. Ez azt jelenti, hogy az inhibitor az enzimnek egy másik aktív helyéhez kötődik, mint az S, és ugyanakkor nem befolyásolja a szubsztrát kötődését – nem változtatja meg az enzimnek a szubsztráthoz való affinitását. Fontos megjegyezni, hogy a klasszikus nemkompetitív inhibíció csak a rapid ekvilíbrio körülményei között létezik, úgyhogy $K_S = K_m$.

A következő 2.33. ábrán a nemkompetitív inhibíció jellemző kinetikai ábrázolásait láthatjuk.ö



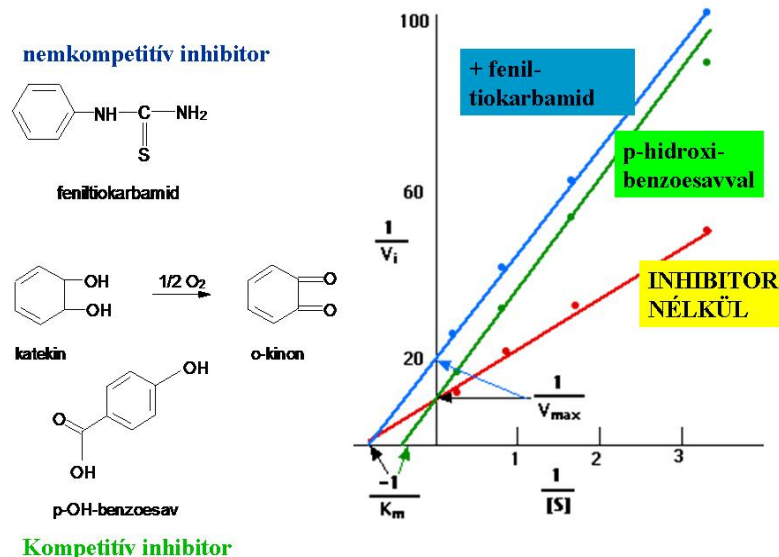
2.33. ábra: Nemkompetitív inhibíció Michaelis–Menten- és Lineweaver–Burk-ábrázolása

A Lineweaver–Burk-görbék meredekségei itt is az inhibitor koncentrációtól függenek, és ez a függvény és ábrázolása is teljesen azonos a kompetitív inhibícióéval.

A nemkompetitív inhibícióra kevés példát találunk, ilyen lehet például a H^+ ionok hatása a **kimotripszin** esetében. Itt az aktív centrumban egy protonakceptor hely van, amely inhibeálható növekvő H^+ -ion koncentrációval. A Lineweaver–Burk-ábrázolás tiszta nemkompetitív inhibíciót mutat, azonban ne feledkezzünk meg a pH-nak komplex enzimbefolyásoló hatásáról sem.

Más példaként megemlíthetők bizonyos **nehézfém**-molekulák (-SH reagensek) vagy **cianidok**. Ezeknél azonban – mint láttuk – gyakran a hatás irreverzibilis.

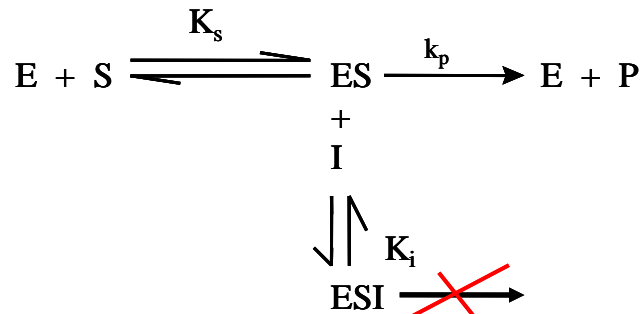
A kompetitív és nem kompetitív inhibícióknak a Lineweaver–Burk-ábrázolás alapján történő megkülönböztetőségét szemlélteti a 2.34. ábra. Az almaszeletnek levegőn történő oxidatív barnulásáért a katekin-oxidáz (ez egy o-difenol oxidáz) enzim a felelős, amely a katekint o-kinonná oxidálja. (Hasonló reakciót katalizál a tirozináz is, amely a tirozint melaninná alakítja át.) Ennek az enzimnek kompetitív inhibitora a szubsztrát analóg p-hidroxi-benzoosav, míg nemkompetitív inhibícióját a feniltiokarbamid okozza. A kettő kinetikai viselkedésének különbözőségét jól követhetjük az ábrán.



2.34. ábra: A katekin-oxidáz kompetitív és nemkompetitív inhibíciója

2.4.3. Unkompetív inhibíció

Az unkompetív inhibíció esetében az inhibitor molekula nem képes a szabad enzimhez, csupán a már előzetesen létrejött ES komplexhez kötődni, így egy inaktív ESI komplex jön létre, amelyből nem képződik termék. Az egyszerűsített séma a következő:



A sémából szembetűnik, hogy még végtelen nagyságú S sem szünteti meg I hatását, mindig lesz jelen – I-től és K_i -től függő mértékben – nem produktív ESI komplex. A molekuláris mechanizmust a 2.7. animáción is megismerhetjük.

Molekuláris szinten ezt úgy lehet elképzelni, hogy az eredeti enzimén nincsen inhibitor-kötésre kész domén (inhibitor kötőhely), az csak a szubsztrát kötődése során (indukált illeszkedés!) megvalósuló konformációváltozással jön létre. Az ekkor kötődő inhibitor viszont az aktív hely konformációját változtatja meg annyira, hogy noha a szubsztrát kötve marad (sőt, az ES komplex stabilabb, mint inhibitor nélkül) de reakció nem játszódik le.

*2.7. animáció: Unkompetív inhibíció*

A két előző esetben bevált levezetést itt is követhetjük, vagy gondoljuk végig, és írjuk fel formálisan az egyenletet a tanultak értelmében: a számláló = a terméket produkáló komplex: (ES); a nevező = az összes enzimfajta összege (1 jelenti a szabad enzimet, S/K_s felel meg az (ES) és SI/K_sK_i az (ESI) komplexeknek):

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{SI}{K_sK_i}} \quad (2.24)$$

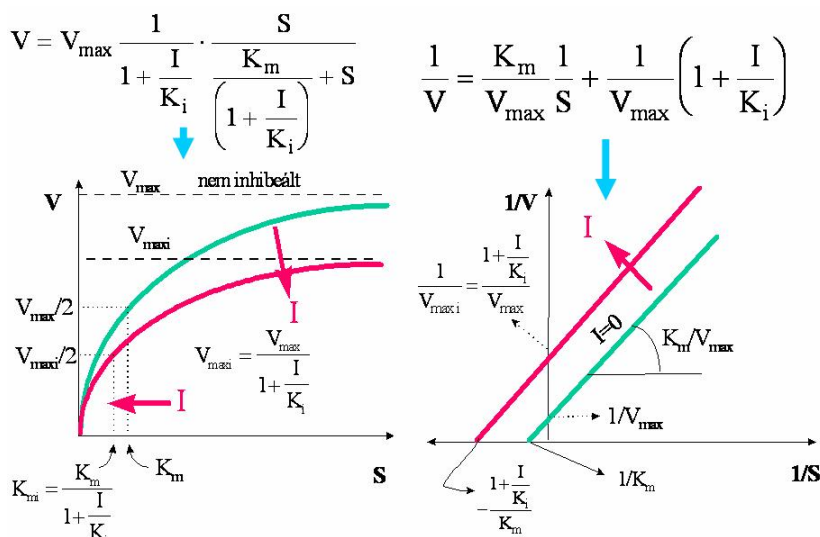
vagy

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)}$$

A Briggs–Haldane-levezetés formailag ugyanezt az egyenletet adja K_s -t K_m -mel helyettesítve. Ebből az egyenletből még nem látszik, hogy vajon V_{\max} -ot és/vagy K_m -et befolyásolja-e az inhibitor. Ehhez a nevezőben S mellől távolítsuk el a szorzófaktor:

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}} \cdot \frac{S}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} + S} \quad (2.25)$$

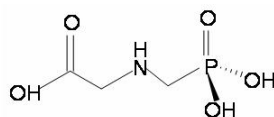
Vegyük észre, hogy ez az egyenlet nem a „keveréke” a kompetitív és a nemkompetitív inhibíciót leíró egyenleteknek: míg a V_{\max} -ra gyakorolt hatás ugyanaz, mint a nem kompetitív inhibíciónál, addig a K_m -re gyakorolt hatás fordított, a látszólagos K_m csökken. Ezt mutatja a 2.35. ábra is, vagyis egy unkompetitív inhibitor mind K_m -et, mind pedig V_{\max} -ot ugyanolyan mértékben csökkenti.



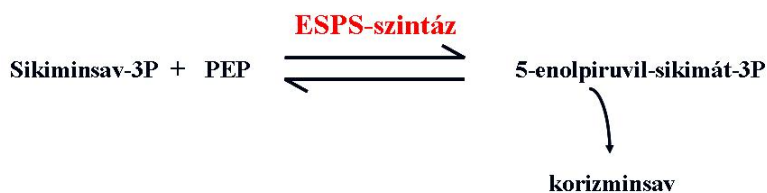
2.35. ábra: Unkompetitív inhibíció

Az unkompetitív inhibitorok rendkívül nagy hatást fejtenek ki az enzimes reakciókra, ráadásul ez a nagy szubsztrátkoncentrációnál egyre kifejezettebb, ami magyarázza, hogy miért oly ritkák a természetben (szemben pl. a kompetitív inhibitorokkal) és hogy a mesterségesen előállított ilyen inhibitorok miért olyan hatásosak.

Az unkompetitív inhibícióra példa a Glyphosate (Roundup) nevű [N-(foszfonometil)-glicin (2.36. ábra)] ismert [herbicide](#), ami az aromás aminosavak szintézisében kulcsszerepet játszó 5-enolpiruvilsikimát-3-foszfát szintáz [(ESPS)-szintáz] enzimnek unkompetitív inhibitora, és így akadályozza bizonyos évelő gyomnövények aromásaminosav-szintézisét. A gátolt reakció során tehát nem képződik az 5-enolpiruvil-sikimát-3P, ami az esszenciális korizminsav előanyaga, és így nem képes a növény aromás aminosavainak szintézisére.



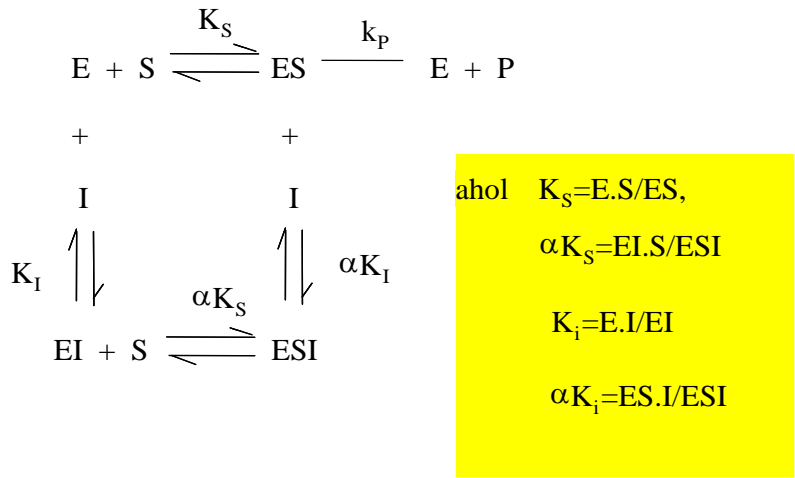
Glyphosate ($K_i = 54 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



2.36. ábra: A Glyphosate egy unkompetitív inhibitor

2.4.4. **Kevert típusú inhibíció**

A következő séma mutatja be a kevert típusú inhibíciót, amely tulajdonképpen a nemkompetitív inhibíció egy speciális formája:

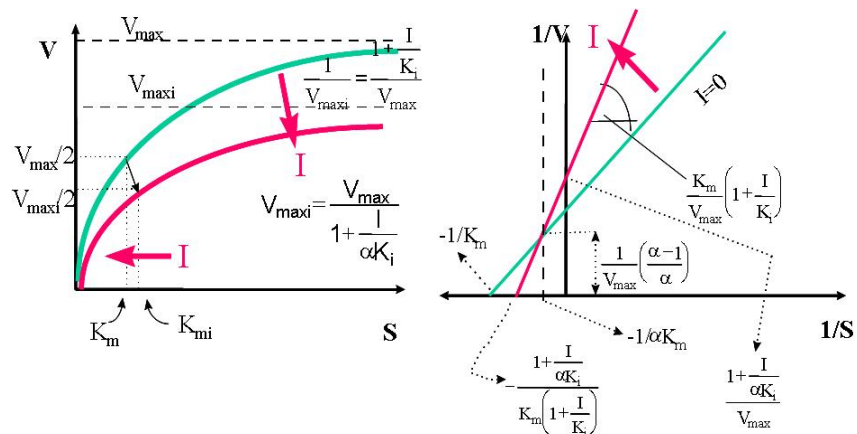


A séma értelmében az inhibitor jelenléte módosítja a szubsztrát enzimről történő disszociációját, ezért az effektív K_S az $EI+S$ lépésre αK_S . Ugyanezért ESI disszociációs állandója αK_i -vé válik. Ez másképpen azt jelenti, hogy az $E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ESI$ és az $E \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons ESI$ eredő folyamat egyensúlyi állandója független az úttól, azaz

$$K_{eq} = \frac{1}{K_S(\alpha K_i)} = \frac{1}{K_i(\alpha K_S)}$$

A szokásos levezetéssel vagy akár a már megismert formális gondolkodással eljuthatunk a kevert inhibíciót leíró kinetikai egyenletekhez.

A (2.26) egyenletből látható, hogy ebben az esetben mind a látszólagos K_S , mind a V_{max} módosul az inhibitor-koncentráció függvényében. A jellemző kinetikai ábrázolásokat a 2.37. ábra szemlélteti.



2.37. ábra: Lineáris kevert típusú inhibíció ($1 < \alpha < \infty$) ($K_S = K_m$)

Ha alaposabban szemügyre vesszük a kiindulási sémát, láthatjuk, hogy akár valamennyi eddig tárgyalt inhibíciótípus levezethetnénk a kevert típusú inhibíció sémájából. Egyes szakkönyvek követik is ezt a módszert.

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_i} + \frac{S \cdot I}{\alpha K_s K_i}}$$

vagy kissé átalakítva

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$$

vagy

$$V = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \cdot \frac{S}{K_s \cdot \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} + S} \quad (2.26)$$

2.4.5. A lineáris reverzibilis inhibíciótípusok összefoglalása

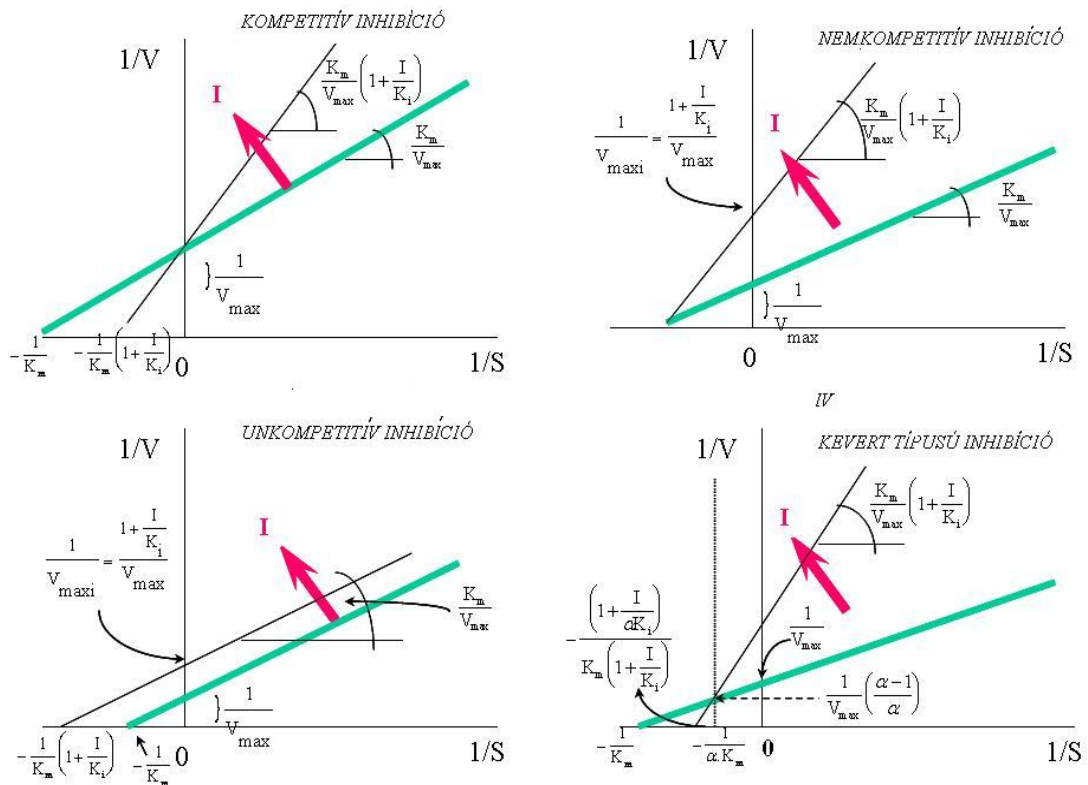
Ha egy egyszubsztrátos reakcióban a jelenlévő inhibitor az enzimhez kapcsolódva inaktív, azaz *terméket nem eredményező enzim-inhibitor komplexet* hoz létre, akkor:

- ha az S és az I kölcsönösen kizárják egymást a kapcsolódásból, akkor **I kompetitív inhibitor**
- ha nem kölcsönösen kizáró a kapcsolódásuk, hanem egymástól függetlenül tudnak az E-hez kötődni, akkor **I nemkompetitív inhibitor**
- ha I ugyanúgy kötődik, mint előbb, de megváltoztatja az enzim affinitását a szubsztráthoz, akkor az **I kevert típusú inhibitor**
- ha I csak az S kötődése után tud az enzimhez kapcsolódni, akkor **I egy unkompetitív inhibitor**

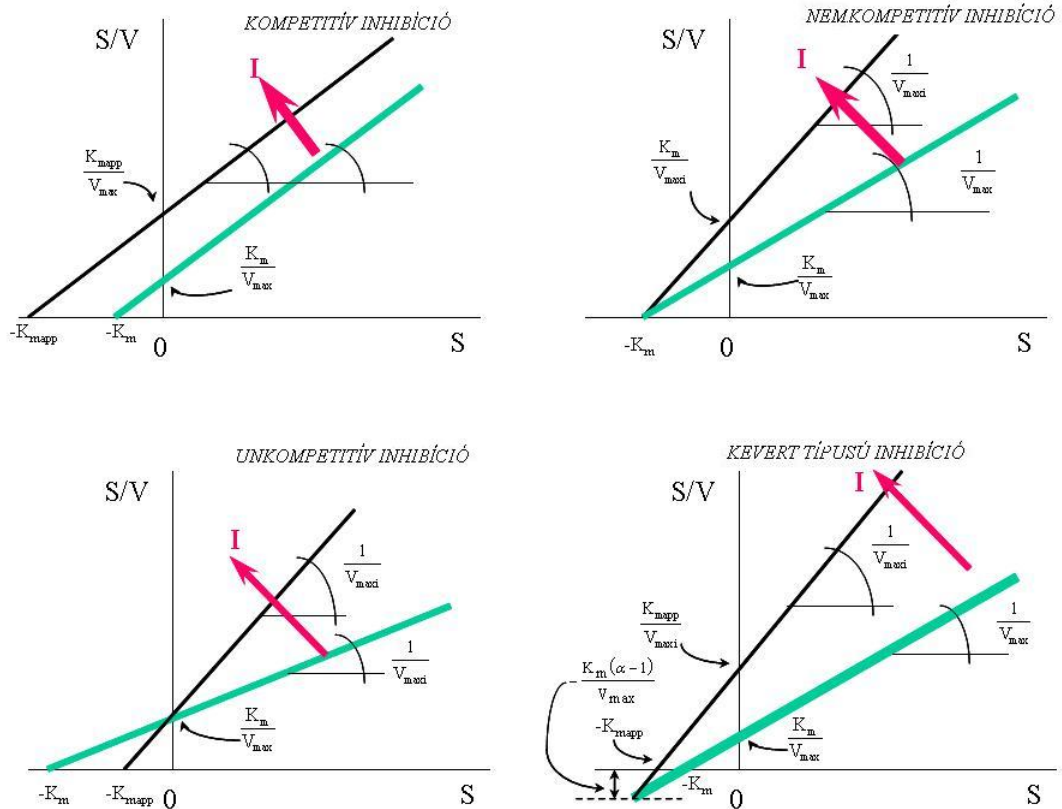
A jellemző kinetikai ábrázolásokat az összefoglaló 2.38.–2.42. ábrákon mutatjuk be.

kompetitív	nemkompetitív	unkompetitív
$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$	$V = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \cdot \frac{S}{K_s + S}$	$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$
	kevert	$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}} \cdot \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$
	$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$	
	$V = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \cdot \frac{S}{K_s \cdot \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} + S}$	

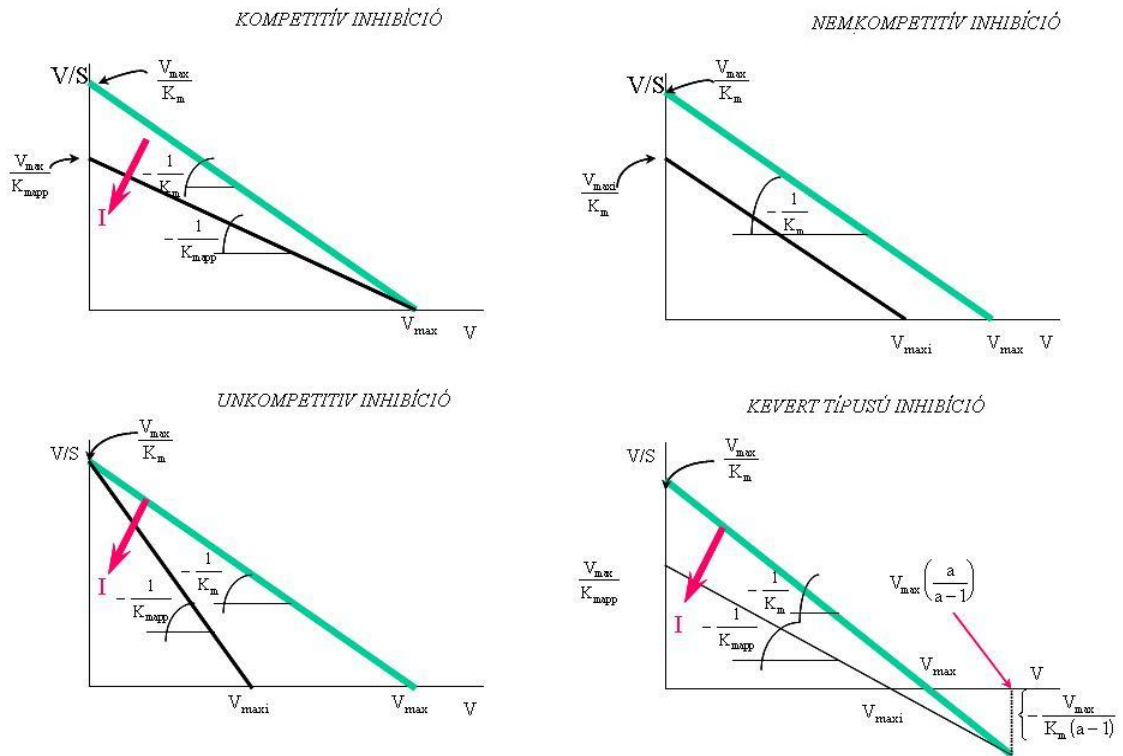
2.38. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók kinetikai egyenleteinek összefoglalása



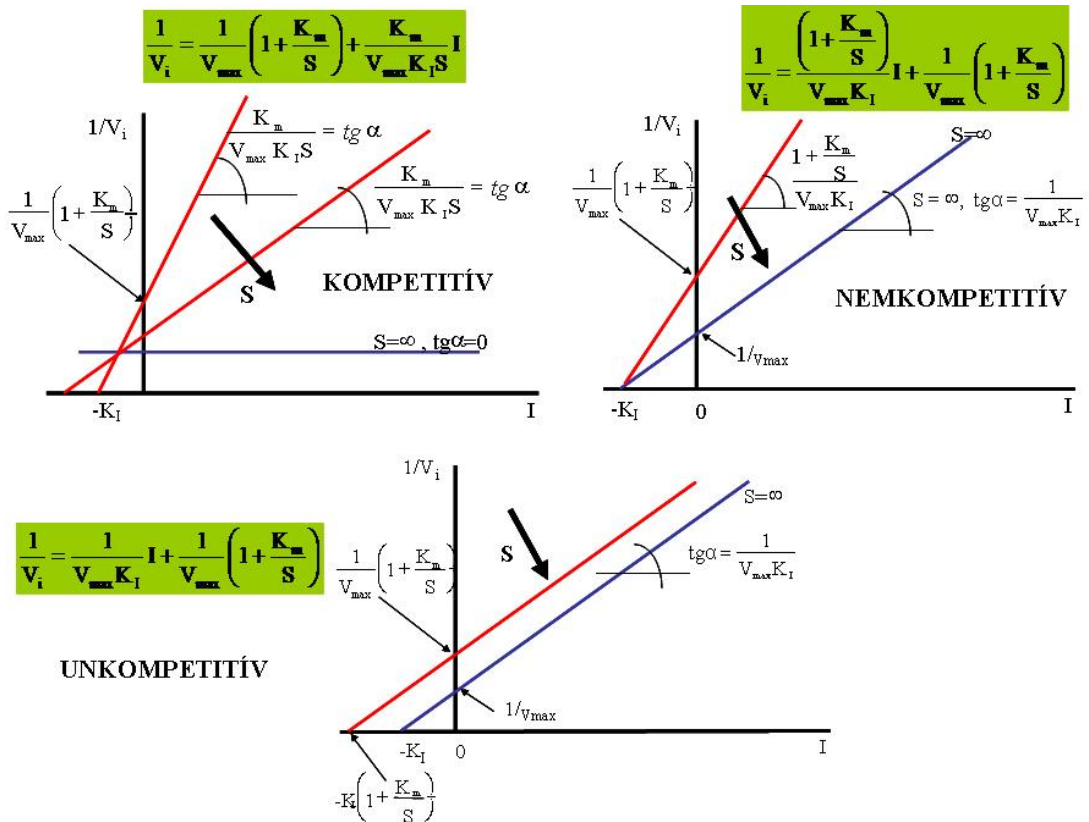
2.39. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók Lineweaver–Burk-ábrázolása



2.40. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók Hanes–Langmuir-ábrázolása



2.41. ábra: Lineáris reverzibilis inhibitorok Eadie-Hofstee-ábrázolása

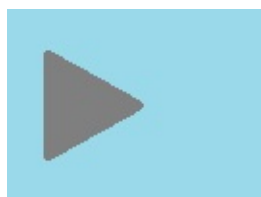


2.42. ábra: Lineáris reverzibilis inhibitorok Dixon-ábrázolása

A lineáris reverzibilis inhibíciókról tanultak elsajátítását ellenőrizheti a következő interaktív 2.8. animációval. Valamint érdemes az inhibitoroknak a kinetikára gyakorolt hatását, a jellemző linearizációk változásait tanulmányozni a 2.5. szimuláció segítségével.



2.8. animáció: Öellenőrzés: inhibíciók.

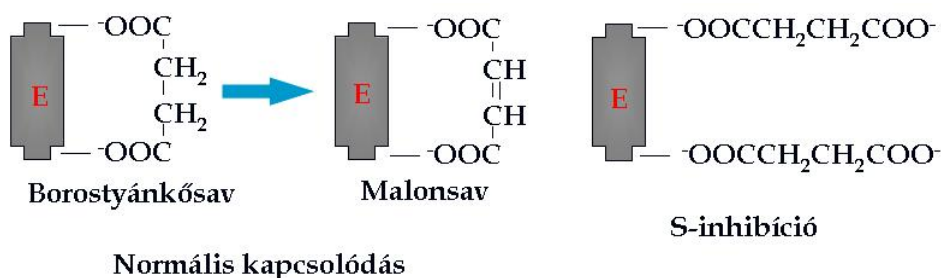


2.5. szimuláció: Inhibíciók

2.4.6. Szubsztrátfelesleg-gátlás

Számos enzim esetében a reakciósebesség-szubsztrátkoncentráció görbének maximuma van, a maximum előtt a kis szubsztrátkoncentrációk tartományában követi a M-M-hiperbolát, de a szubsztrát- koncentráció növekedtével fokozatosan és egyre nagyobb mértékben csökkenőleg eltér attól, és a nagy szubsztrátkoncentrációk tartományában ténylegesen csökken a reakció sebessége. Ezt a jelenséget nevezzük szubsztrátfelesleg-gátlásnak vagy szubsztrátinhibíciónak. A szubsztrátinhibíció mechanizmusa többféle lehet:

- A szubsztrátnak ahhoz, hogy termékképző átmeneti komplex jöjjön létre, két (pl a 2.43. ábrán a szukcinát dehidrogenáz esete) vagy több helyen (például a lizozim esetében) kell hogy az enzimhez kötődjenek. Ha sok szubsztrátmolekula van jelen, előfordulhat, hogy egy S molekula az egyik, egy másik S molekula pedig egy másik kötéshelyhez kapcsolódik, s így inaktív komplexek jönnek létre (lássuk be, hogy ez is reverzibilis inhibíció).

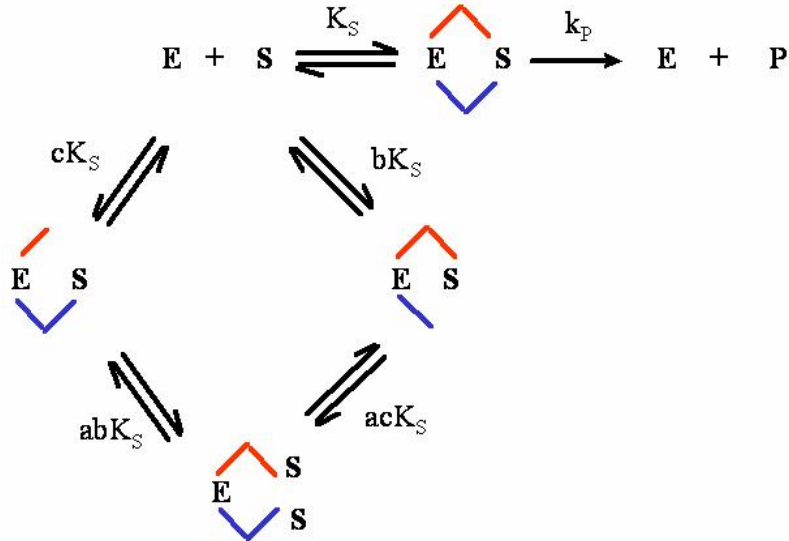


2.43. ábra: A szukcinát dehidrogenáz szubsztrát inhibíciója

- Nagy S koncentrációnál egy S molekula olyan kötéshelyhez is kapcsolódhat az enzimen, amely nem az aktív centrum része, az ilyen kötődés mintegy nemkompetitív módon megakadályozza a normális S kötődést.
- Az enzimműködéshez szükség lehet egy aktivátormolekulára. Ha ez kapcsolódni képes a szubsztráttal, sok S molekula „elvonja” az enzimtől az aktivátort, így csökkentve annak tényleges aktivitását.

- Két (vagy több) szubsztrátos reakciók esetén az egyik szubsztrát feleslege lekötheti a másik szubsztrát kötőhelyeit, megakadályozva a szükséges második szubsztrát kapcsolódását, így megint csak inaktív komplexek jönnek létre.
- Végül a nagy S koncentráció aspecifikus módon is gátolhatja a reakciót, például az ionerősség megnövekedése miatt.

Az első és itt kinetikáját tekintve egyedül tárgyalandó esetben az egyszerűsített reakcióséma a 2.44. ábrán látható.



2.44. ábra: A szubsztrátinhibíció sémája

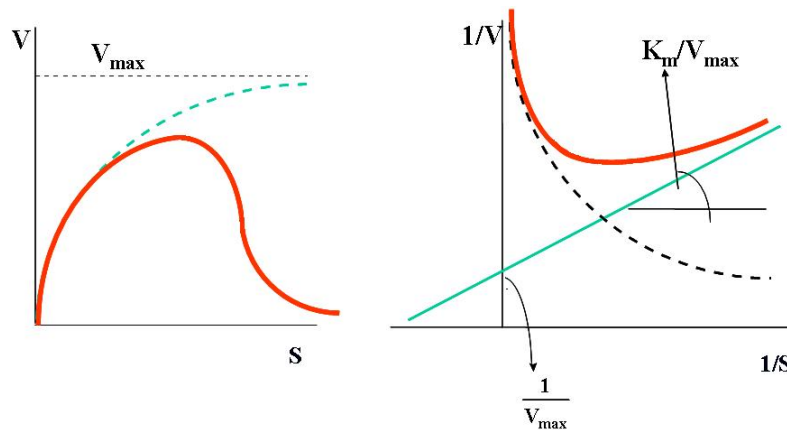
Az ábrán a **b** és **c** a disszociációs állandó megváltozását jelző faktorok egyszeres S kötés esetén, míg **a** az ún. kölcsönhatási együttható, amely az egyik S-nek a másik S kötődésére gyakorolt hatását méri.

A **b** és **c** állandók általában nagyobbak, mint egy, azaz a szubsztrátmolekula egyszeres kötődése gyengébb, mint a kétszeres (kiseb az affinitás). Egyszersmind **a** is nagyobb általában mint **1**, mivel a két szubsztrát kötése gyengébb, mint egy S kétszeres kötődése (túl közel vannak térbelileg). E séma alapján levezethető a szubsztrátinhibíciót leíró sebességi egyenlet, amelynek már egyszerűsített formája az alábbi (amelyben a egy összevont állandó)

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{a^* K_s}} \quad (2.27)$$

Megjegyezzük, hogy ezt az összefüggést az unkompetitív inhibíció sémájából is megkaphatjuk.

A kinetikai képet a 2.45. ábrán mutatjuk be. A Lineweaver–Burk-ábrázolás görbéje egy egyenes (nem inhibeált reakció) és egy hiperbola (inhibeált reakció) szuperpozíciója, amely kis szubsztrát-koncentrációknál átmegegy a normális egyenesbe, tehát meghosszabbítása a neminhibeált esetnek megfelelő $1/V_{\max}$ értéket adja.

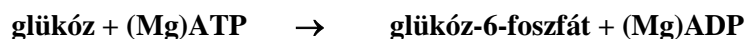


2.45. ábra: A szubsztráthinhibíció V-S- és Lineweaver–Burk-ábrázolása

2.5. Többszubsztrátos reakciók

Többszubsztrátos enzimreakciókról beszélve két teljesen különböző reakciótípust kell megismernünk.

A.) Egy enzim ahhoz, hogy terméket képezzen, *egyszerre több különböző szubsztrátot kell hogy megkössön*. Példa erre az egyik legismertebb kétszubsztrátos reakció, a



foszforilezéses átalakulás, amelyet a hexokináz enzim katalizál.

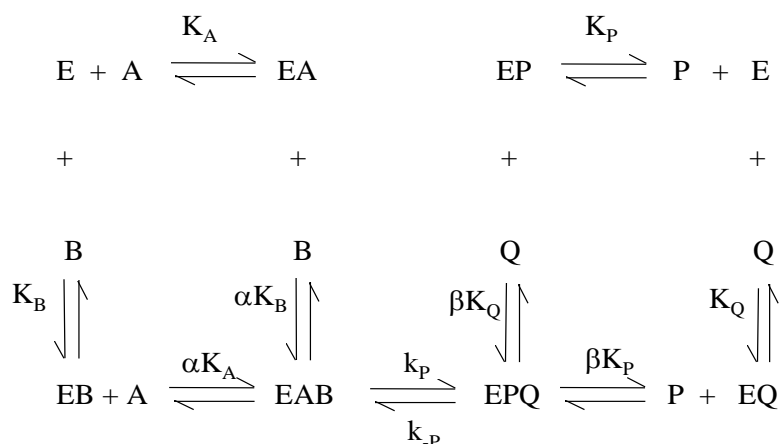
Itt a reakció végbemeneteléhez az enzimnek mind a glükózt, mind pedig az ATP-t meg kell kötnie ahhoz, hogy termék (a legtöbb ilyen esetben két termék) képződjék.

B.) A másik esetben a reakciókeverékben egy enzim és több különböző, lényegében alternatív szubsztrát van jelen. Erre példát szolgáltat a legtöbb biopolimer hidrolizáló enzim, mint például az α -amiláz és az amilo-glikozidázok, cellulázok és a proteinázok. Függetlenül attól, hogy ezekben az esetekben exo- vagy endoenzimekről van-e szó, a reakciókeverékben *egyidejűleg több, különböző polimerizációs fokú szubsztrát van jelen*.

Az A.) esetben a kétszubsztrátos reakciók tipikus esetét vizsgáljuk meg részletesebben.

Két szubsztrát és egy enzim reakciójakor a közöttük létrejövő kapcsolódás történéseit tekintve többféle mechanizmus képzelhető el:

1. Random bi-bi reakciók, azaz véletlenszerű, mind a szubsztrát, mind a termék oldaláról nézve **bimolekulás** reakciók: a két szubsztrát, **A** és **B** véletlenszerű sorrendben kapcsolódnak az enzimhez, hasonlóan a nemkompetitív inhibíció S és I molekuláinak kapcsolódásához, és a két termék is véletlenszerűen válik le az enzimről az alábbi séma szerint. A sémából következik, hogy a mechanizmus és a nemkompetitív vagy a lineáris kevert típusú inhibíció között csupán az a különbség, hogy itt a ternár EAB komplex katalitikusan aktív, azaz belőle termékek képződnek, míg az ESI komplex – mint láttuk – inaktív.

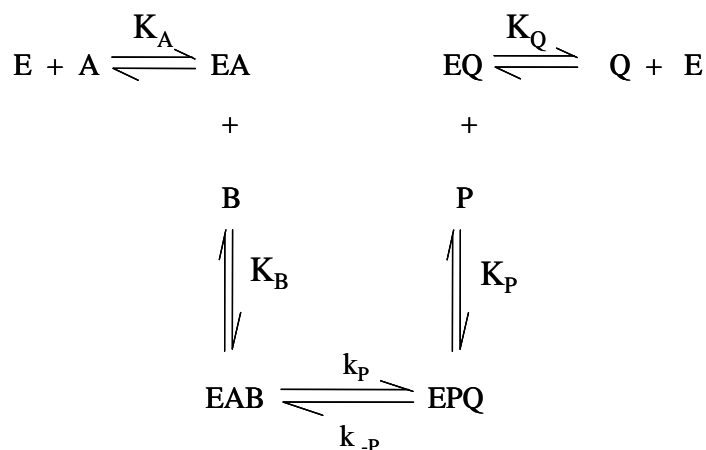


A sebességmeghatározó lépés a lassú $EAB \rightarrow EPQ$ átalakulás, és ekkor a $P+Q$ irányában levezethető egy sebességi egyenlet (vegyük észre, hogy ez is felírható mechanikusan levezetés nélkül, ha feltételezzük a rapid ekvilibrium kinetikát):

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{A \cdot B}{\alpha K_A K_B}}{1 + \frac{A}{K_A} + \frac{B}{K_B} + \frac{A \cdot B}{\alpha K_A K_B}} \quad (2.28)$$

2. Határozott sorrendű bi-bi reakciók

Lehetséges, hogy B csak akkor tud az enzimhez kapcsolódni, ha az A már kapcsolódott, és e komplex képződés következtében az enzim olyan konformációváltozáson ment keresztül, amely lehetővé teszi a B kapcsolását is. Nem nehéz észrevenni ennek hasonlóságát az unkompetitív inhibícióhoz. Az egyszerűsített séma ekkor a következő:

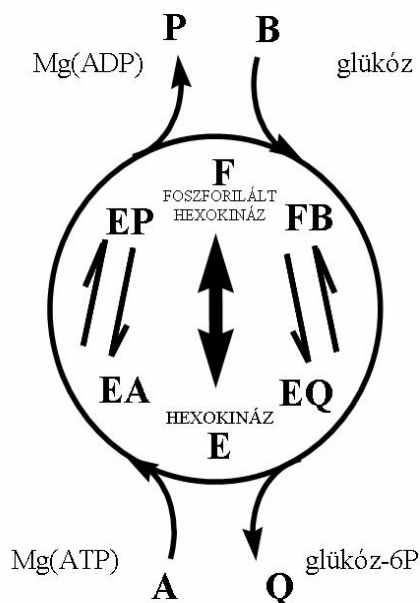


Ha a k_P a legkisebb, azaz az $EAB \rightarrow EPQ$ átalakulás a sebességmeghatározó (vagyis E, A, EA és EAB egyensúlyi koncentrációk, tehát a rapid ekvilibrium feltételezés itt is igaz), akkor a sebességi egyenlet a következő lesz:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{A \cdot B}{K_A K_B}}{1 + \frac{A}{K_A} + \frac{A \cdot B}{K_A K_B}} \quad (2.29)$$

3. Pingpongmechanizmus (2.46. ábra)

A harmadik lehetséges mechanizmus szerint (a hexokináz-reakció példájánál maradva) először az enzim foszforileződik, azaz reagál az $A=MgATP$ -vel, majd a $P=MgADP$ leválásával létrejön a foszforilált enzim (F). Ezután történik meg a B szubsztráttal (itt a glükóz) való komplex képzése (FB, FQ), végül a foszforilált szubsztrát (itt: glükóz-6-foszfát) és az eredeti enzim molekula szétválnak. A mechanizmus neve onnan ered, hogy az enzim itt két stabil módosulat között oszcillál, pattog ide-oda, mint a pingponglabda.



2.46. ábra: A pingpongmechanizmus sémája

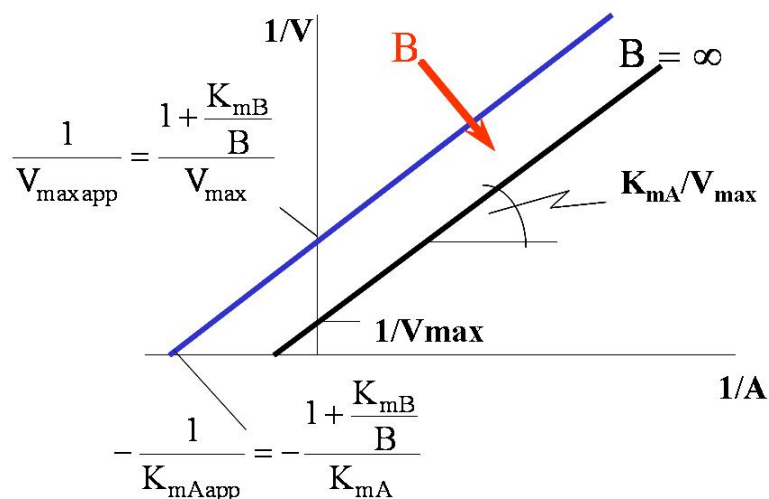
A steady state feltételezésen alapuló kinetikai egyenlet ebben az esetben:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{A \cdot B}{K_{mB}A + K_{mA}B + A \cdot B} \quad (2.30)$$

Némi átalakítással a következő egyenlethez jutunk, ami azt mutatja, hogy rögzített B koncentráció mellett hogyan változik a reakciósebesség az A koncentrációjának változásával:

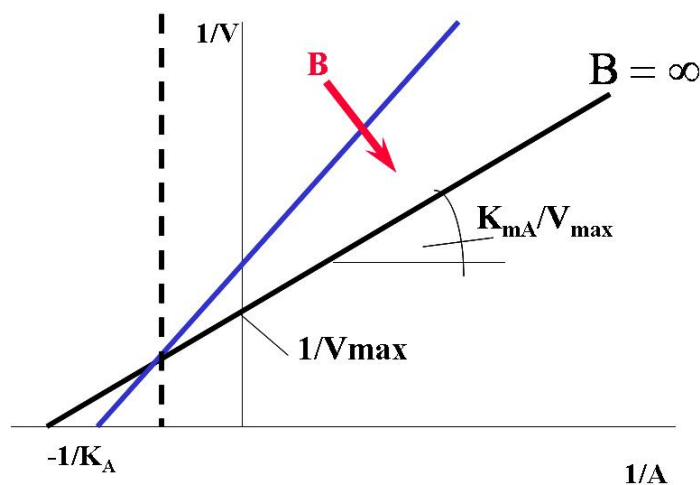
$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{A}{K_{mA} + A \left(1 + \frac{K_{mB}}{B} \right)} \quad (2.31)$$

A pingpongmechanizmusnak megfelelő dupla reciprok Lineweaver–Burk-ábrázolás a 2.47. ábrán látható. Vegyük észre, hogy az egyenlet szimmetrikus, azaz A és B felcserélhető.



2.47. ábra: Pingpongmechanizmus Lineweaver–Burk-ábrázolása

A valóságban a hexokináz esetében nem kapunk az ábrán látható párhuzamos reciprok görbéket, tehát biztosan nem a pingpongmechanizmust követik a foszforiláció történései. A valódi görbesereg a 2.48. ábrán láthatóhoz hasonlít. Ennek alapján azonban még nem tudhatjuk, hogy vajon a két lehetséges másik mechanizmus közül melyik írja le a valóságot, mivel mind az 1., mind a 2. modell ugyanolyan Lineweaver–Burk-görbesereget produkál. A hexokináz-reakció valódi mechanizmusának kiderítéséhez egy sor egyéb kinetikai vizsgálatot is el kell végezni.



2.48. ábra: Random bi-bi és határozott sorrendű bi-bi mechanizmusok Lineweaver–Burk-ábrája

A többszubsztrátos reakciók B.) esetét vizsgálva meg kell állapítanunk, hogy sok enzim képes egynél többféle szubsztrátnak az átalakítására is. Ilyen esetekben a különféle alternatív szubsztrátok versengenek egymással az enzim aktív helyéért, helyeiért.

A legkézenfekvőbb példát erre a hidrolitikus depolimeráz enzimek szolgáltatják, amelyek sok azonos kötésre hatnak, sokszor attól függetlenül, hogy milyen hosszú a polimerszegmens, sokszor pedig a kinetikai paraméterek dimer, trimer, oligomerek esetén mások, mint nagy polimerfokszám esetében. Az ilyen polimerek esetében valamennyi, a monomereket összekapcsoló kondenzációs kötés úgy viselkedik, mint egy-egy különálló szubsztrát. Az ilyen polimerek abban az értelemben sem tekinthetők közönséges egyszerű szubsztrátoknak, hogy általában már eleve különböző lánc-hosszúságú polimerek keverékei.

A hidrolitikus enzimek némelyike szelektivitást mutat aszerint, hogy a polimer mely részét bontja:

exo-hidrolázok – láncvégi vagy közel láncvégi kötéseket bontanak,
endo-hidrolázok – láncon belüli kötéseket statisztikusan bontanak.

Komplex kinetikai tárgyalást igényel a fehérjéknek, keményítőnek a bontása, illetve a celluláz komplex kinetikai viselkedése cellulózbontáskor. E kérdéseket csak részletes enzimkinetikai stúdiumok tárgyalják, vagy technológia tárgyak kereteiben kaphatunk kérdéseinkre választ.

E helyütt csak egy igen egyszerű kétszubsztrátos rendszer kinetikai leírását adjuk meg, amely a következő sémán alapszik:



Mindkét szubsztrát a jelenlévő enzimnek csak egy adott hányadával tud reagálni, mint a kompetitív inhibíció esetén, a különbség abban áll, hogy itt mindkét enzim-szubsztrát komplexből termék jön létre. A kinetikai egyenletek az egyes részreakciók sebességeit külön-külön leírva a következők:

$$V_1 = \frac{\frac{k_1 E_0 S_1}{K_1}}{1 + \frac{S_1}{K_1} + \frac{S_2}{K_2}} \quad (2.32)$$

$$V_2 = \frac{\frac{k_2 E_0 S_2}{K_2}}{1 + \frac{S_1}{K_1} + \frac{S_2}{K_2}}$$

Az egyenletekből láthatóan mindkét reakció sebessége kisebb, mintha csak az egyik vagy csak a másik szubsztrát lenne jelen egyedül. Ezt a tényt ki lehet használni arra, hogy eldöntsük, hogy vajon egy ismeretlen mintában egy adott enzim két szubsztrátra hat-e, vagy mindkét szubsztrátra más-más enzim hat.

Ilyen típusú reakciók esetében gondot okozhat, ha mindkét szubsztrátból ugyanaz a termék képződik (például β -amilázos keményítő bontásnál: maltóz), ekkor csak az eredő reakciósebességet tudjuk megmérni a két előző egyenlet összegeként:

$$V_T = V_1 + V_2 = \frac{E_0 \left(\frac{k_1 S_1}{K_1} + \frac{k_2 S_2}{K_2} \right)}{1 + \frac{S_1}{K_1} + \frac{S_2}{K_2}} \quad (2.33)$$

S_1 -nek és S_2 -nek a relatív mennyiségét változtatva az eredő reakciósebesség is megváltozik. Világos, hogy így az eredő reakcióra a kísérletileg meghatározott V_{\max} és K_m nemcsak a teljes szubsztrát-koncentrációtól, hanem az egyes szubsztrátok S_1/S_2 arányától is függ.

Ha az összes szubsztrát S_1 , vagyis nincs jelen a másik szubsztrát, vagy ha a fordított esetet tételezzük fel, akkor az egyszubsztrátos kinetikát kapjuk vissza.

2.6. Egyéb hatások az enzimek aktivitására

Az eddigiekben megvizsgáltuk a szubsztrát és az inhibitorok hatásait a reakciósebességre. Tudnunk kell, hogy az *in vitro* reakcióelegy vagy a természetes sejtmillió egy sor egyéb tulajdonsága is befolyást gyakorol az enzimek katalitikus aktivitására. Ezek elsősorban az enzimek szerkezetének (térszerkezetének, konformációjának), kémiai állapotának befolyásolásán keresztül hatnak. Ilyen hatások a következők:

Ionerősség (lásd a fehérjetisztításban alkalmazott ammóniumsulfát-telítést), **pH**, **hőmérséklet**, **hidrodinamikai (nyíró-) erők**, **a hidrosztatikai nyomás**, **felületi feszültség**. **Ugyancsak hathatnak kémiai szerek, mint az alkoholok** (szintén használt fehérjekicsapási módszer az alkohollal történő kicsapás), **karbamid**, **hidrogén-peroxid** (és más oxidálószer) **vagy különféle rezgések, mint a fény, a hang, illetve az ionizáló sugárzások.**

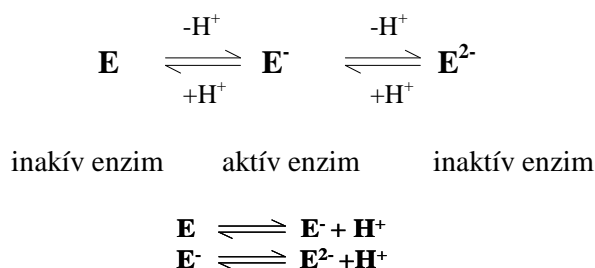
Ezeknek a külső hatásoknak az eredménye az enzimaktivitás reverzibilis vagy irreverzibilis megváltozása lehet. A reverzibilitás és irreverzibilitás gyakran az adott hatás időtartamának a függvénye, ami érthető, ha a szerkezet-hatás összefüggésére gondolunk. Valamely konformáció-változást okozó, szerkezetmódosító hatás rövid expozíciója – időben lejátszódó folyamatról lévén szó – még visszafordítható változásokat okozhat, míg egy előrehaladottabb szerkezetmódosulás – amelyet már esetleg új stabil kötések rögzítenek – maradandó (irreverzibilis) struktúraváltozást idézhet elő.

A következőkben a két legfontosabb környezeti hatást, a pH és a hőmérséklet hatását elemezzük.

2.6.1. A pH hatása az enzimes reakciókra

Az enzimfehérjéket felépítő aminosavak semleges, bázikus, illetve savas karakterű csoportokat, oldalláncokat tartalmaznak, tehát oldatban a natív enzim egy adott pH-n mind pozitív, mind negatív töltésű csoportokat hordoz. Ezek az ionizálható csoportok gyakran az aktív vagy egyéb kötőhelyek részei, aminek következtében maguk ezen aktív helyek lehetnek részlegesen negatív, illetve pozitív töltésűek, és katalitikus hatásukat igen gyakran tulajdonképpen valamilyen sav/bázis katalízis alapján fejtik ki, és az a benne részt vevő csoportoknak éppen egy adott ionizációs állapotát igényli. Így érthető, hogy a pH változása, amely megváltoztathatja (áttöltheti) e csoportokat, igen nagy befolyást gyakorol az enzim aktivitására. Ezek az ionizálható csoportok a következők: az Asp második -COOH, a Cys -SH, a Glu -COOH és a Gln -CONH₂ csoportjai, a His imidazolcsoportja, a Lys ε-NH₂ csoportja, a Met CH₃-S, a Ser -OH csoportjai és a terminális amino- és karboxilcsoportok. Ezeken kívül az elektrosztatikus kölcsönhatások, valamint a H-kötések is változhatnak a pH hatására.

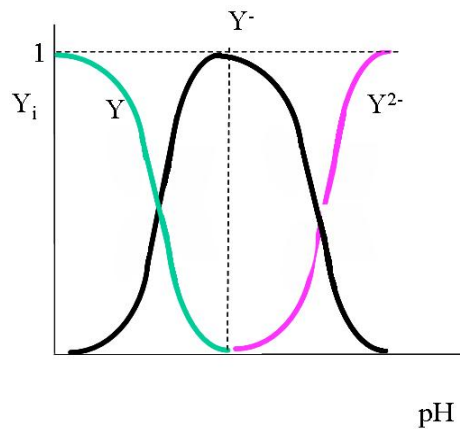
Egy igen egyszerű képpel tehetjük ezt kinetikailag is érthetővé. Legyen E⁻ egy adott sav/bázis típusú katalízisnél az aktív enzimet jelentő jelölés, míg az ionizálatlan E, illetve a kétszeresen ionizált E²⁻ inaktív formák, és ezek protonfelvétellel, illetve -leadással alkulhatnak egymásba:



Mivel e két reakció egyensúlyi állandói $K_1 = \mathbf{H}^+ \mathbf{E}^- / \mathbf{E}$, illetve $K_2 = \mathbf{H}^+ \mathbf{E}^{2-} / \mathbf{E}^-$ és $E_0 = \mathbf{E} + \mathbf{E}^- + \mathbf{E}^{2-}$ mérlegegyenlet is igaz, az enzim aktív hányada ($Y^- = \mathbf{E}^- / E_0$) a következő összefüggéssel adható meg:

$$Y^- = \frac{1}{1 + \mathbf{H}^+ / K_1 + K_2 / \mathbf{H}^+} \quad (2.34)$$

Ugyanígy fejezhető ki az Y és az Y^{2-} függvény is, azaz a nemionizált enzimnek, illetve a kétszeresen ionizált enzimnek a teljes enzimmennyiségre vonatkozó hányada. Ezeket a függvényeket *Michaelis-féle pH-függvényeknek* nevezzük. Ezeket a függvényeket mutatja a 2.49. ábra.



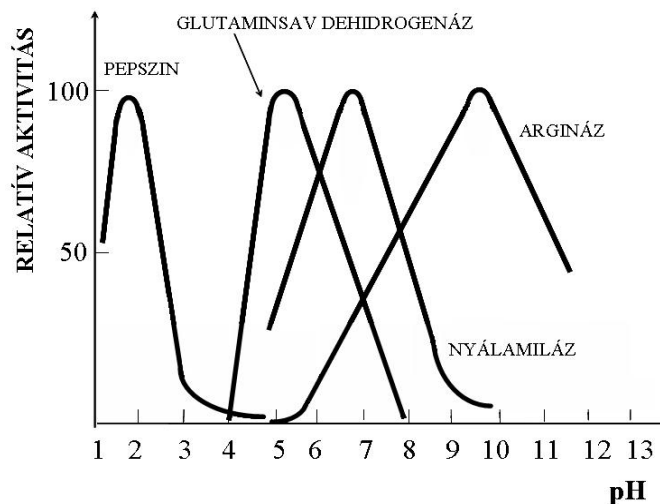
2.49. ábra: A Michaelis-féle pH- függvények

Az Y^- görbe maximuma, azaz az enzim pH-optimuma a következő értéknél van:

$$H^+_{\text{optimum}} = \sqrt{K_1 K_2} \quad \text{vagy} \quad (pH)_{\text{optimum}} = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) \quad (2.35)$$

Az aktív enzim Michaelis-függvénye ugyanolyan, mint bármely enzim pH-optimum görbéje. Néhány enzimre ilyen pH-optimum görbét mutatunk be a 2.50. ábrán. Értelemszerűen az enzimreakció sebességét megkapjuk, ha az aktív enzim koncentrációját helyettesítjük, azaz

$$V_{\text{max}} = k_2 E_0 Y^- = k_2 E_0 / (1 + H^+ / K_1 + K_2 / H^+). \quad (2.36)$$



2.50. ábra: Különböző enzimek pH-optimum görbéi

A fenti összefüggések lehetővé teszik az egyensúlyi állandók meghatározását egyrészt az optimum és ezek közötti összefüggés ismeretében, másrészt V_{max} -nak különböző pH-kon történő mérése útján.

Érdemes megjegyezni, hogy elméletileg a K_s és K_m is függ a pH-tól (hiszen valamennyi egyedi reakciósebességi állandó is függ attól), ennek azonban gyakorlati jelentősége nincs, a pH-nak az enzimhatásra gyakorolt befolyását rendszerint csak a V_{max} -on keresztül írják le.

Jegyezzük meg végezetül, hogy a fentiekben leírt elmélet csak a pH-optimum közelében igaz, attól távoli extrém pH-tartományokban nem, a teljes pH-tartományra vonatkoztatva az optimumgörbe aszimmetrikus, illetve az optimumtól távol az irreverzibilis denaturáló hatások érvényesülhetnek. Valamint az egyes enzimek esetében a pH-optimum görbe lapos vagy éles maximumot adhat, azonban mindig van egy pH-optimum!

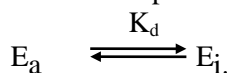
Érdeemes megjegyezni, hogy egy enzim pH-optimuma közel azonos a stabilitási pH-val, azaz azon a pH-n érdemes az enzimet eltartani is, amelyen a legaktívabb.

2.6.2. A hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra

A hőmérséklet hatása kettős: egyrészt nő az enzim reakciók sebessége a hőmérséklet növelésével, ugyanis valamennyi sebességi állandó az Arrhenius-összefüggés szerint függ a hőmérséklettől. Ugyanakkor az emelkedő hőmérsékletek hatására az enzim reverzibilis és/vagy irreverzibilis konformációváltozásának valószínűsége is nő, azaz olyan térszerkezetek jöhetnek létre, amelyek nem rendelkeznek katalitikus aktivitással. Ennek mechanizmusa világos: a nagyobb hőmérséklettel nő a felépítő atomok energiája, nő annak a valószínűsége, hogy a gyenge kölcsönhatások, H-hidak, diszperziós, parciális ionos kötések fellazulnak és szétszakadnak. Újra csökkentve a hőmérsékletet, lehet, hogy az előző térszerkezet visszaáll (reverzibilis hőinaktiválódás), de lehet az is, hogy egy másik – nem aktív – térszerkezet stabilizálódik (irreverzibilis hőinaktiváció).

A legtöbb fehérje hőhatásra történő denaturációja már 45–50 °C-on elkezdődik. Az enzimek hőinaktiválódása tehát reverzibilis, irreverzibilis vagy a kettő kombinációja lehet.

Tételezzük fel, hogy az enzim aktív és inaktív állapotban van jelen, azaz



Az egyensúlyi állandó
$$\frac{E_i}{E_a} = K_d = \exp\left(\frac{-\Delta G_d}{RT}\right) = \exp\left(\frac{-\Delta H_d}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right).$$

A ΔH_d dezaktiválási entalpia meglehetősen magas, pl a tripszin és a tojásfehérje eredetű lizozim enzimek esetében 280, illetve 310 kJ/mol (vö. pl. a hidrogénhidaké csak 12,5–29,3 kJ/mol), a dezaktiválási entrópia pedig 890 kJ/mol·°K. Tekintve a nagy ΔH_d értékeket, az inaktív enzim hányada igen érzékenyen nő a hőmérséklet növekedésével, például az iménti esetekben 30 °C hőfoknövekedés majdnem teljes inaktiválódáshoz vezet.

Mivel az enzim vagy aktív vagy inaktív formában van jelen, tehát $E_0 = E_a + E_i$, így:

$$E_a = \frac{E_0}{1 + K_d} \quad \checkmark_s \quad V_{\max} = k_2(T) E_a$$

ahol (2.37)

$$k_2(T) = \beta \left(\frac{k_B T}{h} \right) e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-E/RT}$$

Ebben a k_B és h sorrendben a Boltzmann- és a Planck-állandók és β egy arányossági tényező.

A három egyenletet kombinálva végül is a reakciósebesség hőfokfüggésére a következőt kapjuk:

$$V_{\max} = \frac{\alpha T e^{-E/RT}}{1 + e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-\Delta H_d/RT}}, \quad (2.38)$$

ahol az eredő arányossági tényező α tartalmazza a β , k_B , h , E_0 és ΔS^* tényezőket.

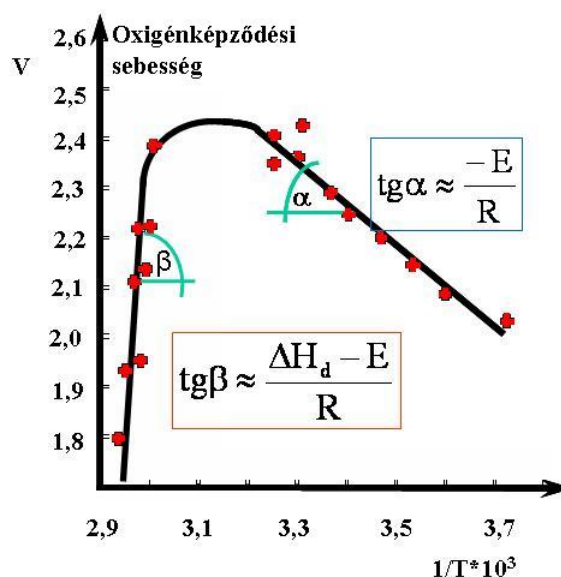
A 2.51. ábrán az előbbi egyenletnek megfelelő ábrázolás látható a kataláz enzimre. Az irántangens nagy $1/T$ értékeknél közelítőleg $-E/R$, míg a nagy hőmérsékleteknél mérhető irántangens közelítőleg $(\Delta H_d - E)/R$. A ΔS_d^* itt nem részletezendő módon kiszámítható a maximum értékéből. Mivel a K_m és K_S is a sebességi állandók függvényei, így természetesen azok is függenek a hőmérséklettől, valamint hasonlóan hőfokfüggők a különféle inhibíciós állandók is.

A hődenaturáció időben lejátszódó folyamat, amelynek sebességét elsőrendű folyamatként szokták leírni

$$\frac{dE_a}{dt} = -kE_a \quad (2.39)$$

Ennek a megoldása egy exponenciális függvényt ad, azaz az időben exponenciális mentén csökken az enzimaktivitás egy adott denaturációt okozó hőmérsékleten:

$$E_a(t) = E_{a0} e^{-kt} \quad (2.40)$$



2.51. ábra: A hőfokfüggés ábrázolása a hőmérséklet aktiválási és inaktiválási hatásának elkülönítésére

A működési hőmérséklet optimuma nem kell hogy egybeesik az eltarthatósági vagy stabilitási hőmérséklet optimumával, oldatban az enzimeket rendszerint 4–5 °C-on tároljuk.

2.7. Heterogén fázisú enzimes reakciók viselkedése

Az enzimek nagy része néhány tízezer Dalton molekulatömegű globuláris fehérje, s így vízben oldható. A vizes rendszerben oldott állapotban lévő enzimekkel végzett reakciók előnye a rendszer homogenitása, valamint, hogy az enzim izolálásán kívül egyéb előkészítést nem igényel. Evvel azonban ki is merült az előnyök felsorolása, míg az ilyen rendszerek hátrányai jelentősebbek és számosabbak:

Gazdasági hátrányok:

Az enzimek drágák (a kommersz vegyszerekhez viszonyítva).

Homogén rendszerben csak egyszer használhatók fel, a reakció után elvesznek, illetve kinyerésük a reakcióelegyből bonyolult és drága.

Technológiai hátrány:

Mivel eltávolításuk a reakcióelegyből nehéz, valójában szennyezik a terméket, annak tisztítását nehezítik.

Ezeket a hátrányokat ki lehet küszöbölni, illetve hatásukat elkerülni az enzimek rögzítésével, azaz az enzimes reakciónak olyan heterogén fázisúvá alakításával, amikor az enzim szilárd, a szubsztrát, illetve a termék pedig oldatfázisban van jelen.

Az immobilizált enzimes rendszerek főbb előnyei a következők:

Az enzim könnyen elválasztható a reakcióelegytől az enzimes reakció után, ezáltal a termék elválasztása és tisztítása könnyebb és olcsóbb.

Az elválasztott enzimet újra fel lehet használni.

Folytonos üzemű reaktor használható, amikor is a rögzített enzim a reaktor töltete, a szubsztrátot folytonosan tápláljuk a rendszerbe, és a terméket szintén folytonosan vesszük el a rendszerből. (Lásd még a folytonos reaktorok előnyeit általában.)

Kedvező, hogy a reakciót igen könnyen le lehet állítani („terminálni”), azaz az átalakulást adott kívánt időben abba lehet hagyni az enzim és a termék kontaktusának megszakításával.

Gyakran a rögzített enzim stabilisabb az oldottnál, nő a hő- és pH-stabilitása.

Természetesen *hátrányai* is vannak a rögzített enzimek használatának:

Az enzim rögzítése (a folyamat, a hordozó, a reagensek) növeli az eljárás költségeit.

Legtöbbször a rögzítés csökkenti az enzim aktivitását.

Mivel a hordozó az enzimet fizikailag elkülöníti a szubsztráttól, a szubsztrát hozzáférése az enzimhez térbelileg korlátozott lehet, illetve diffúziós gát limitálhatja a reakció sebességét.

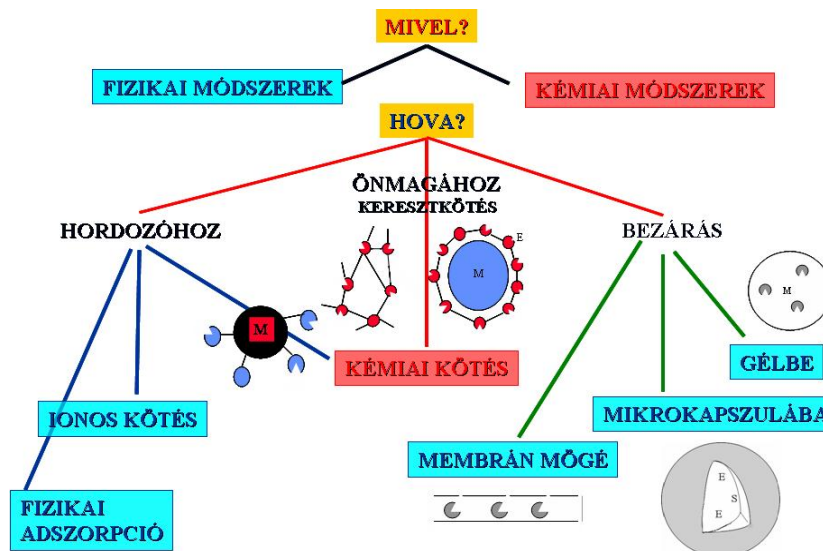
Nelson és Griffin 1916-ban véletlenül fedezte fel, hogy a pékélesztő invertáz enzime aktív szénen, illetve alumínium-hidroxid csapadékon adszorbeálódott, de megőrizte szaharózt hidrolizáló aktivitását. Igazi gyakorlattá akkor vált az enzimrögzítés, amikor *Grubhofer* és *Schleith* egy sor enzimet rögzítettek: karboxipeptidázt, diasztázt, pepszint és ribonukleázt.

Ezt a sorozatos rögzítést diazotálással végezték poliaminosztirol gyantára, kovalens kötés létrehozásával (lásd az ilyen módszert lejjebb).

A rögzített enzimek első ipari alkalmazása *Chibata* nevéhez fűződik, aki 1969-ben aminoacilázt rögzített DEAE Sephadex-re ionos kötéssel, és ezt N-acyl-D, L-aminosav rezolválására használta fel.

2.7.1. Az enzimrögzítés módszerei

Az enzimrögzítés módszerei alapvetően *fizikai* vagy *kémiai* módszerek lehetnek. E módszerek vázlatos áttekintésekor két kérdés merül fel: milyen módszerrel és hova történhet az enzim rögzítése.



2.52. ábra: Milyen módszerekkel és hova rögzíthetjük enzimünket?

Az **enzimrögzítés kémiai módszerei** két nagy csoportba sorolhatók:

hordozóra rögzítés és
kereszt-kötéses rögzítés.

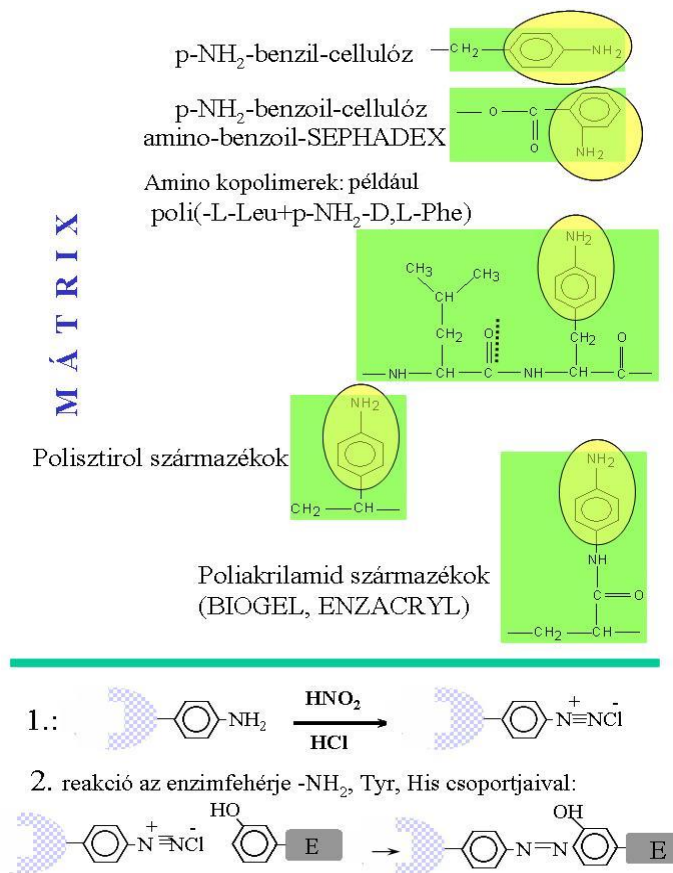
Kovalens kötés létesítése az enzimmolekula valamely nem esszenciális funkciós csoportja és valamely vízben nem oldódó, funkciós csoporttal ellátott hordozó mátrix között történik, ahol a hordozó lehet valamilyen természetes polimer, mint az *agar*, *agaróz*, *kitin*, *kitozán*, *cellulóz*, *kollagén* stb., vagy mesterségesen előállított szintetikus polimerek, mint amilyenek a *poliuretán*, *polisztirol*, *nylon* stb., illetve *szervetlen hordozók*, mint az *üveg*, *alumínium*, *szilikagél*, *magnetit* stb.

Magán a fehérjemolekulán a szabad α -, β -(Asp) vagy γ (Glu)-karboxil csoportok, α - vagy egyéb aminocsoportok, illetve a fenil-, hidroxil-, szulfhidril- vagy imidazolcsoportok vehetnek részt a kovalens enzim-hordozó kötés kialakításában.

A rögzítés két lépése:

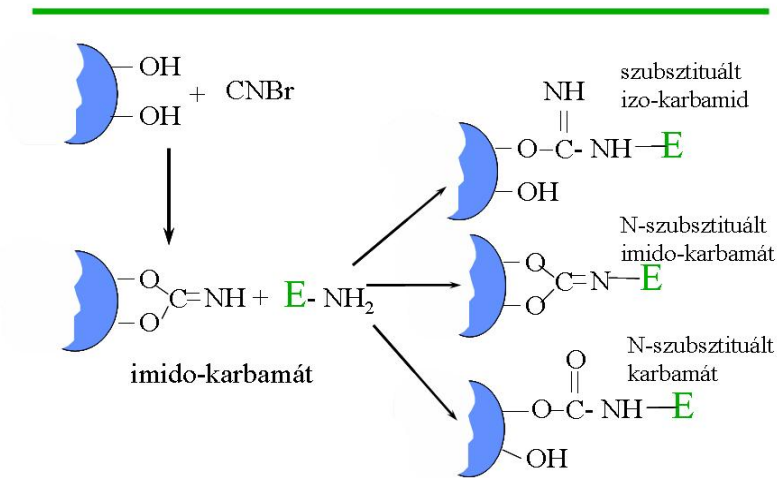
1. a hordozó, illetve funkciós csoportjainak aktiválása (azaz egy reaktív csoport felvitele a hordozóra), majd
2. a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.

A hordozó aktiválásának, illetve az enzim hordozóhoz kötésének módszerei közül néhányat a következő ábrákon mutatunk be.



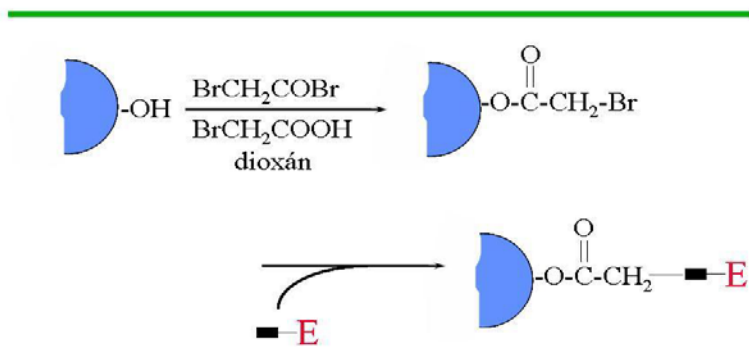
2.53. ábra: Enzimirögzítés diazotálással

MÁTRIX: vicinális -OH : cellulóz, sephadex sepharose



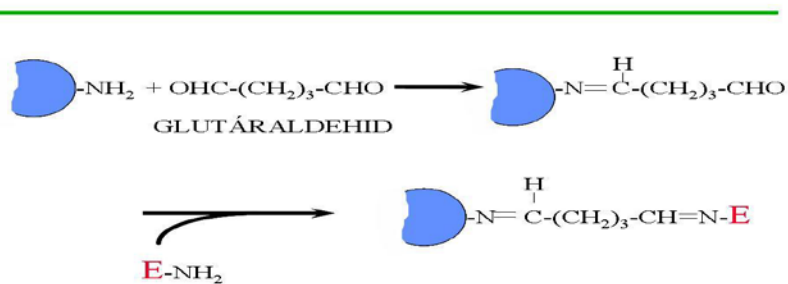
2.54. ábra: Brómcianós enzimrögztés

MÁTRIX: METAKRILÁT és CELLULÓZ származékok homo- és kopolimerjei

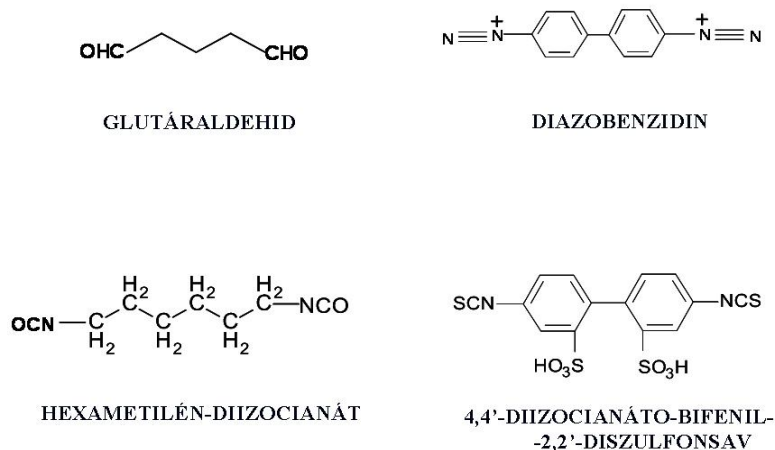


2.55. ábra: Az enzim fenil-, amino-, szulfhidril csoportjainak alkilezése

MÁTRIX: -NH₂ csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ, KOLLAGÉN, KITIN, NYLON stb.

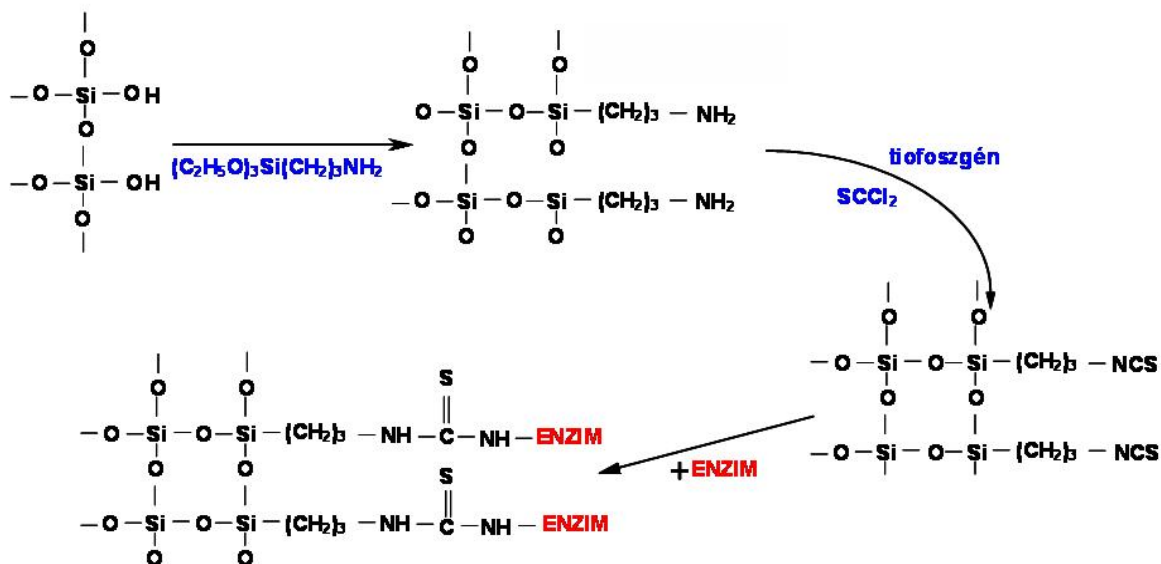


2.56. ábra: Kémiai rögztés glutáraldehiddel



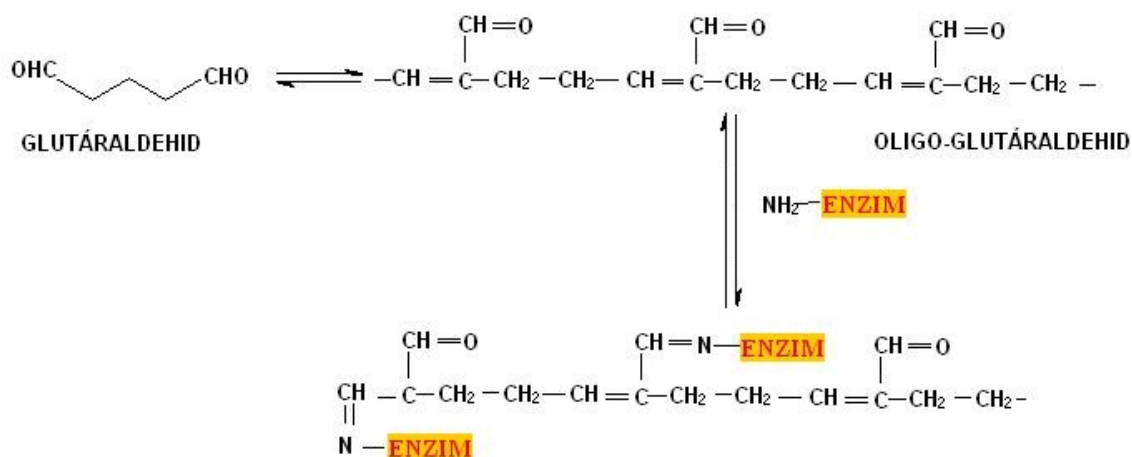
2.57. ábra: Keresztkötések létrehozására alkalmas vegyületek

Meglepő, de használt módszer a 2.58. ábrán látható, üvegyöngyök felületére történő rögzítés is, amellyel rendkívül teherbíró oszloptöltetek állíthatóak elő.



2.58. ábra: Üvegfelületre történő enzimrögzítés

Szintén a kémiai módszerek közé tartozik a keresztkötések létrehozása az enzimmolekulák között. Keresztkötés létrehozható egy sor két- vagy többfunkciós vegyület felhasználásával (lásd 2.57. ábra), ezek között a leginkább elterjedt a glutáraldehid felhasználása, amikor is a glutáraldehid és az enzimmolekulák -NH_2 csoportjai között Schiff-bázis-szerű kapcsolatok jönnek létre a 2.59. ábrán látható séma szerint. A keresztkötésekkel összekötött enzimmolekulák – mivel molekulaméretük így igen megnövekedik – oldhatatlan, de gélyszerű részecskéket hoznak létre, amelyeknek a mechanikai tulajdonságai nem jók ipari felhasználásra (nem készíthető pl. oszloptöltet belőlük). Ezért gyakran először fizikai módszerekkel adszorbeáltatják az enzimet valamely hordozó felületén, majd ezután hozzák létre a keresztkötéseket.



2.59. ábra: Keresztkötéses immobilizálás glutáraldehiddel

Rendszerint más fehérjével együtt immobilizálják keresztkötés létrehozásával az enzimfehérjéket, ezek mintegy inert hordozói lesznek az enzimaktivitásnak. Ilyen inert fehérje a zselatin, albumin, kollagén, tojásfehérje (utóbbi lizozimtartalma bizonyos védelmet is képes nyújtani a rögzített készítmény elfertőződése ellen).

Kristályosítható enzimeket is rögzítenek keresztkötésekkel, az így létrejött CLEC-ek (crosslinked enzyme chrystals) igen jó katalitikus tulajdonságokkal rendelkeznek, nem utolsósorban amiatt, hogy maga az enzim lehet pl. egy oszlop töltete, így alig van inert hordozó. Ezt a technikát a 90-es években fejlesztették ki. Ilyen CLEC-et mutat a 2.60. ábra, amelyen a lakkáz enzim rögzített kristályainak elektronmikroszkópos képe látható. Ebben az esetben igen jelentős katalizátorfelület, mintegy $2500 \text{ m}^2/\text{g}$ volt elérhető⁷.

Ennél is újabb eljárás az ún. CLEA (crosslinked enzyme aggregates) technológia, amelynek során az enzimnek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal, illetve butanollal történő (esetleg frakcionált) kicsapása közben történik meg a glutáraldehydes (vagy más, esetleg polifunkciós csoportokkal rendelkező keresztkötő ágenssel, pl. dextrán-polialdehyddel történő) keresztkötés. Ily módon ez az eljárás némileg kombinálja az enzim részleges tisztítását a rögzítéssel.

Az egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő módszer egyik előnye, hogy tisztított és nem tisztított enzimpreparátumokkal is végrehajtható, a képződött enzimaggregátumok hőstabilitása nagy, valamint ellenállóak szerves oldószerekkel és a proteolízissel szemben. Nagy előnyük továbbá, hogy a részecskék nem oldódnak vízben, és szerves fázisban is alkalmazhatók pl. biotranszformációra.

Nagy stabilitás jellemzi őket hővel, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben.

A Combi CLEA esetén két vagy több enzimet együtt immobilizálnak, és ily módon akár reakciósorozatokat (konszekutív reakciók) gyorsító vegyes katalizátorokat is előállíthatunk.

A fentiekben vázolt kémiai módszerek gyakran csökkentik az enzim aktivitását, hiszen véletlenszerű az, hogy az aktív centrum funkcionális oldalláncai részt vesznek-e a kémiai kötés kialakulásában, vagy sem. Célszerű ezért a rögzítés előtt *az aktív centrumot védeni*, ez az enzim szubsztrátjának vagy még inkább szubsztrátanalogonjának (kompetitív inhibitorának) adagolásával és így az aktív centrum funkcionális csoportjainak blokkolásával érhető el.

⁷ Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase
J. Jegan Roy, T. Emilia Abraham: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 38 (2006) 31–36



2.60. ábra: Keresztkötött enzimkristályok(CLEC)

A **fizikai rögzítés módszerei** között három fő csoportot különböztethetünk meg ([2.52. ábra](#)):

- *adszorpció* valamely hordozó felületén,
- az enzim *bezárása* egy polimer mátrixba, illetve
- az enzimoldat visszatartása *membránok* segítségével, amelyek az enzimet nem, de a szubsztrátot és a terméket átengedik.

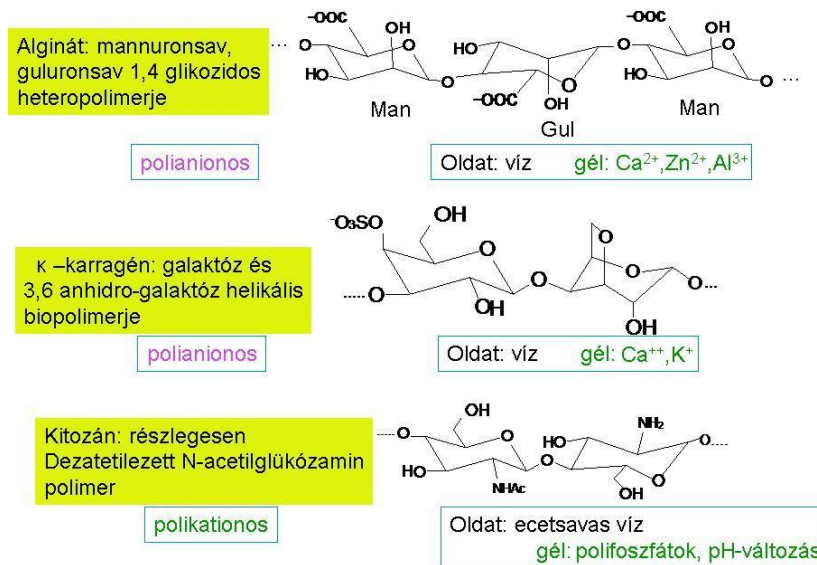
Az első esetben leginkább ioncserélőkön történő **adszorpció** jön számításba. A módszer egyszerű, de az enzim könnyen leválik az oszlopról (ionerősség, pH megváltozásakor), ugyanakkor az ioncserélő egyéb, a reakcióelegyben jelen lévő anyagokat is hajlamos megkötni.

A gélbe zárás legerjedtebb és legegyszerűbb módszere az **alginátba zárás**. E módszernél az enzimtartalmú pufferolt oldatot nátrium-alginát oldattal keverik össze, majd az oldatot lassan, kis cseppeket képezve Ca^{2+} ionokat tartalmazó pufferbe csepegtetik. Ekkor ioncserélődés zajlik le a Na^+ és a Ca^{2+} ionok között. Mivel a Ca-alginát vízben nem oldódik, ezért a cseppekből kialakuló vízdoldhatatlan Ca-alginát gélgolyócskák bezárva tartalmazzák az enzimmolekulákat. Az alginátba zárt enzimekkel folyó munka során mindvégig fenn kell tartani egy jól definiált kalciumkoncentrációt, máskülönben a golyócskák feloldódnak. Ez az oka, hogy ilyen gélbe zárt enzimeket nem igen kaphatunk a kereskedelmi forgalomban, hanem saját magunknak frissen kell elkészíteni az ilyen rögzített készítményeket. Érdekességként megjegyezzük, hogy ezt a módszert gasztronómiai célokra is használják: szájban szétolvadó és belsejükben tetszőleges folyadékot tartalmazó „kaviár” készítésére.

Más gélképző polimerek is alkalmasak hasonló rögzítésre, például a kitozán és a karragén, előbbi részlegesen dezacetilezett kitin, utóbbi pedig tengeri vörösmoszat eredetű poliszaharid-szulfátészter. E gélképzők vázlatos szerkezetét a 2.61. ábrán mutatjuk be, a 2.1. videón pedig láthatjuk a kitozángél képződésének folyamatát.



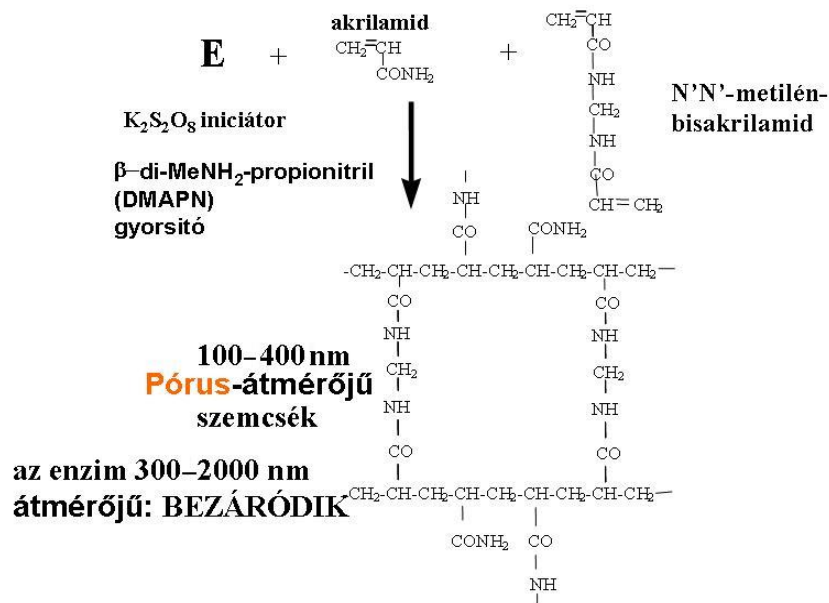
2.1. videó: Kitozángél készítése



2.61. ábra: Enzimrögzítésre alkalmazott gélképzők

Stabilis, technológiai célokra jól felhasználható rögzített enzim szolgáltató, és emiatt igen elterjedt gélbezárási módszer az, amikor **akrilamid** monomert az enzim, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (kálium-perszulfát) polimerizáció-iniciátor és β -dimetilamino-propionitril gyorsító jelenlétében polimerizálnak. Ekkor 100–400 nm pórusátmérőjű polimerszemcsék keletkeznek, amelyekben a legtöbbször 300–2000 nm átmérőjű enzim molekulák retenciója hatékonyan megvalósul. E kiváló módszert azonban élelmiszeripari célú enzim esetében nem lehet felhasználni, mivel az akrilamid mérgező (azaz nem GRAS=generally regarded as safe).

POLIAKRILAMID GÉLBE ZÁRÁS

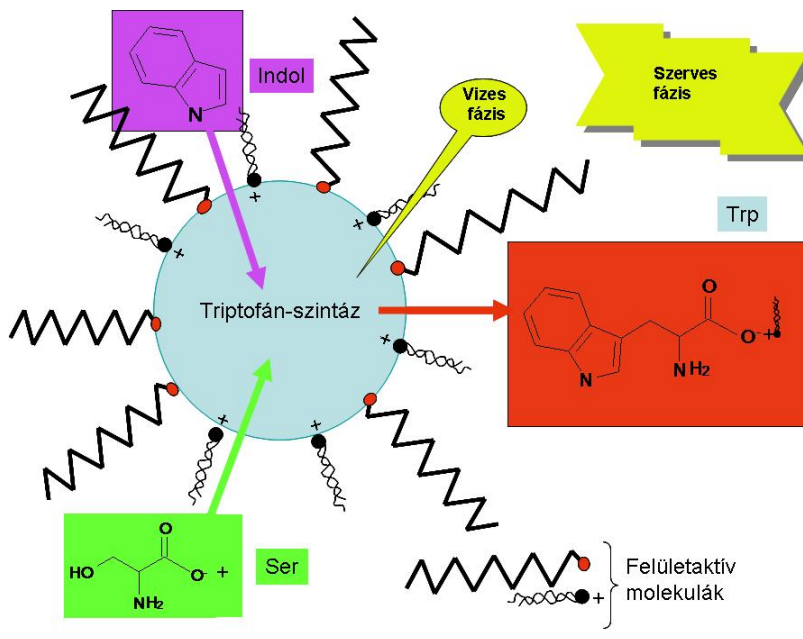


2.62. ábra: Akrilamid gélbe zárása: poliakrilamid-mátrix készítése

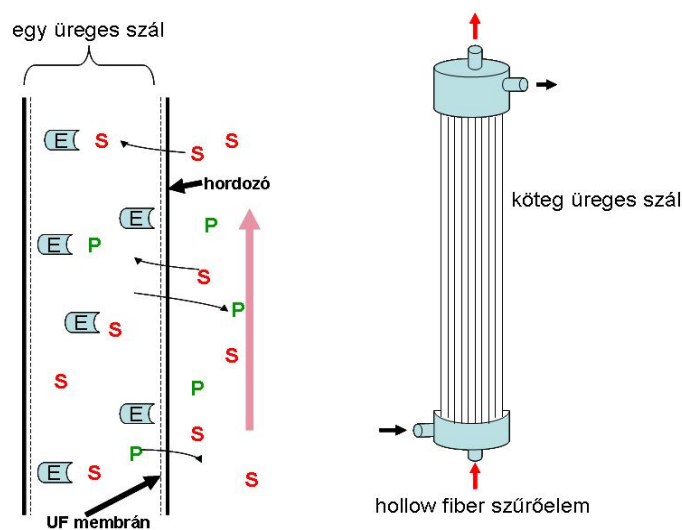
A **mikrokapszulázás** eljárás során az enzimeket kicsiny, 300 μm körüli átmérőjű kapszulákba zárják, amelyeket a kismolekulákat átteresztő membrán határol, azaz az enzimet visszatartja, míg a szubsztrátok és a termékek szabadon diffundálhatnak a kapszulába/-ból. Két típusú mikrokapszula létezik: az egyik állandó polimer membránnal rendelkezik, a másikonál nem állandó koacervátumok vannak jelen.

Az első esetben két olyan monomert polimerizáltatnak az enzim jelenlétében, amelyek egyike vízben rendkívül csekély mértékben oldódik, (így azt a szerves fázisban oldják fel), a másik viszont kissé vízoldható és oldódik a szerves fázisban is. Az enzimet tartalmazó vizes oldatot (puffert, amelyben az egyik monomert is feloldják) keveréssel finoman diszpergálják a szerves fázisban. Mivel kémiai potenciálkülönbség van mindkét monomerre nézve, ezért diffúzió indul meg ellenkező irányba, és a diffundáló monomerek a cseppecskék határfelületén találkoznak, így kopolimerizáció fog végbemenni a szerves és vizes fázis *határfelületén, amelynek eredményeképpen* igen vékony polimer héj fogja bevonni az enzimoldat cseppecskéket, azaz kialakulnak a mikrokapszulák.

A másik típusnál egy vizes enzimoldatnak felületaktív anyag jelenlétében történő emulgeálása hozza létre a nem állandó, koacervátum-szerű mikrokapszulákat (2.63. ábra). Mindkét módszernél hatalmas felület jön létre (akár $2500 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ enzimoldat), több enzim is bezárható a kapszulába, és noha a héj, a membrán határozott diffúziós gátat jelent a szubsztrátok/termékek anyagátadásában, mégis nagy reakciósebességek érhetők el. E módszerek természetesen csak akkor alkalmazhatók, ha a szubsztrát- molekula sokkal kisebb, mint az enzimmolekula.



2.63. ábra: Tryptofán szintáz enzim nem állandó membrán mögé zárása



2.64. ábra: Üreges szál, UF membrán mögé zárás

Végezetül megemlítjük a membránnal történő enzimrögzítés „makro” módszerét, amikor **ultraszűrő membránnal** tartjuk vissza az enzimet a reakciótérben. Ez valójában nem igazi rögzítési módszer, hiszen az enzim oldott állapotban van, csupán egy zárt térben elkülönítve a szabadon diffundáló szubsztráttól és a terméktől. Az UF membránt befoglaló elemek sokfélék lehetnek, enzimes technológiákban leginkább az ún. hollow fibre (üreges szál) (2.64. ábra) felépítésű szűrőelemeket kedvelik.

A különböző rögzítési módszereket a 2.4. táblázat segítségével hasonlíthatjuk össze.

Megemlítjük, hogy sokszor a különböző módszereket kombináltan alkalmazzák az enzimek rögzítésére. Így például a kereskedelemben kapható glükóz-izomeráz készítményt úgy gyártják, hogy a nyers enzimet először fizikai módszerrel zselatinba ágyazzák, ezt követi a zselatin polimerizáltatása, majd az enzimet glutaraldehyd segítségével keresztkötésekkel a zselatinhoz rögzítik.

2.4. táblázat: A különböző rögzítési módszerek összehasonlítása

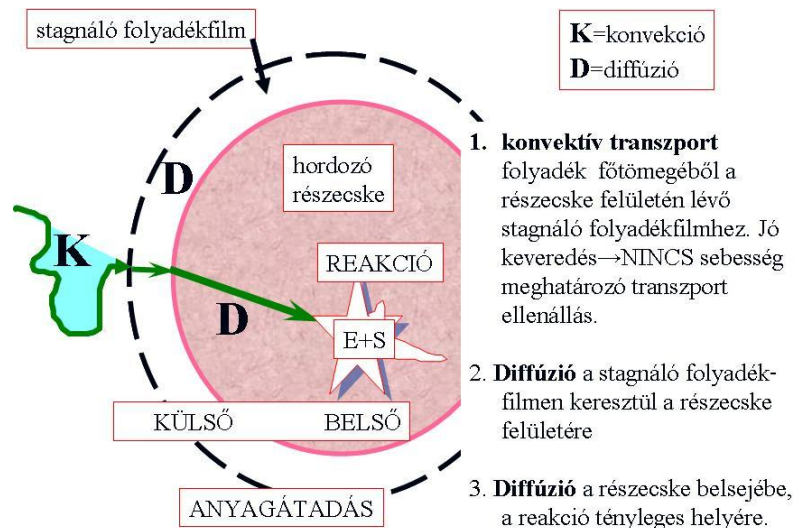
Módszer Jellemző	Fizikai adszorpció	Ionos kötés	Kovalens kötés	Keresztkötés	Gélbe zárás
Megvalósítás	könnyű	könnyű	nehéz	nehéz	nehéz
Enzimaktivitás nagysága	kicsi	nagy	nagy	közepes	nagy
S-specificitás	nem változik	nem változik	változhat	változhat	
Kötőerő	gyenge	közepes	erős	erős	erős
Regenerálhatóság	lehetséges	lehetséges	lehetetlen	lehetetlen	vagyilag
Alkalmazhatóság	gyenge	közepes	közepes	gyenge	jó
Költség	alacsony	alacsony	magas	közepes	alacsony
Mikrobás fertőzés elleni védelem	nincs	nincs	nincs	lehetséges	megvalósul

2.7.2. Rögzített enzimes rendszerek kinetikája

A rögzített enzimes rendszerek olyan speciális heterogén katalízisrendszerek, amelyeknél az átalakítandó szubsztrátnak a katalizátorszemcse felületére, illetve belsejébe kell transzportálódnia, a keletkező terméknek pedig egy fordított irányú transzportfolyamaton kell keresztülmennie. Mindkét esetben a szubsztrátra és a termékre nézve koncentrációgradiens alakul ki a folyadék főtömegében mérhető és a reakció tényleges helyén mérhető koncentrációk között. Ez a koncentrációgradiens a hajtóereje azoknak a diffúziós folyamatoknak, amelyeket a 2.65. ábrán szemléltettünk.

Az ábra szerint három jól megkülönböztethető transzportrégióról beszélhetünk:

1. A szubsztrát rendszerint konvektív transzportja a folyadékfázis főtömegéből a rögzített enzim felületén lévő stagnáló (azaz nem kevert) folyadékfilmhez. E fázist legtöbbször jó keveredés jellemzi, itt nem kell sebességmeghatározó transzportellenállással számolnunk.
2. Diffúzió a stagnáló folyadékfilmen keresztül a részecske felületére (felületen rögzített enzimmél itt vége az ellenállásoknak), majd
3. diffúzió a részecske belsejébe, a reakció tényleges helyére abban az esetben, ha a részecske belsejében van az enzim rögzítve.



2.65. ábra: Szubsztrát anyagátadási viszonyok a rögzített enzimszemcsénél

Az 1. és 2. transzport az úgynevezett **külső anyagátadási ellenállás**, míg a 3. az úgynevezett **belső anyagátadási ellenállás**. A következőkben ezen ellenállásoknak az enzimes reakcióra gyakorolt befolyását vizsgáljuk meg.

2.7.2.1. Külső anyagátadási ellenállás hatása az enzimreakcióra

Ha egy enzim valamilyen hordozó felületére van rögzítve, akkor csak az 1. és 2. ellenállások lépnek fel, s ekkor a diffúziós határrétegben (Nernst-féle diffúziós határréteg) az anyagtranszport sebessége egységnyi térfogatban

$$N_s = \frac{dS}{dt} = k_s a (S_0 - S) \quad (2.41)$$

ahol S_0 és S sorrendben a szubsztrátkoncentrációk a folyadékfázis főtömegében, illetve a hordozó részecske felületén és k_s az anyagátadási tényező (cm/s), az a pedig az anyagátadási felület egységnyi térfogatban (cm²/cm³).

Ha a felületen végbemenő reakció sebessége megfelel a Michaelis–Menten-enzimkinetikának, és egyenlő a szubsztráttranszport sebességével (azaz nincs szubsztrátakkumuláció a felületen, ami nyilvánvaló), akkor felírhatjuk, hogy a reakció sebessége:

$$v = k_s a (S_0 - S) = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (2.42)$$

A rendszert tehát öt paraméter határozza meg: k_s , a , S_0 , V_{\max} és K_m . Ez kettőre redukálható, ha bevezetjük az alábbi *dimenziómentes, normált változókat*, illetve mennyiségeket:

$$x = S/S_0 \quad \text{és} \quad \kappa = K_m/S_0$$

valamint az ún. **Damköhler-számot** (Da), amit reakciószámnak vagy dimenziómentes reakciósebességnek is neveznek:

$$Da = V_{\max}/k_s S_0 a = \text{maximális reakciósebesség} / \text{maximális anyagátadási sebesség}$$

Ezekkel a bevezetésekkel (2.42) dimenziómentes formába hozható:

$$\frac{1-x}{Da} = \frac{x}{\kappa+x} = \frac{\frac{1}{\kappa}x}{1+\frac{1}{\kappa}x} \quad (2.43)$$

Ha a Damköhler-szám sokkal kisebb mint 1, azaz az anyagátadási sebesség sokkal nagyobb, mint a maximális reakciósebesség (ezt gyakran *reakciólimitált tartománynak* nevezik), akkor

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}$$

Azaz az enzimes reakció sebessége a Michaelis–Menten-egyenlettel számolható, és nem kell foglalkozni az anyagátadással, ha pedig $Da \gg 1$, azaz az anyagtranszport a sebességmeghatározó (gyakran beszélnek ilyenkor *diffúziólimitált vagy transzport rezsimről*), akkor az eredő reakció sebessége

$$V = \kappa_s a S_0$$

Azaz csak az anyagátadás sebességét kell figyelni. (2.43)-ból az x kifejezhető egy másodfokú egyenlet jól ismert megoldásaképpen:

$$x_{1,2} = \frac{-\beta \pm \sqrt{\beta^2 + 4\kappa}}{2}$$

ahol

$$\beta = Da + \kappa - 1$$

(Ha a $\beta > 1$, akkor a pozitív, ha $\beta < 1$, akkor a negatív előjel érvényes, ha pedig $\beta = 0$, akkor $x = \sqrt{\kappa}$ adódik!)

Vezessük be az úgynevezett effektivitástényezőt, ami az enzimirögztetés által az enzimaktivitásban bekövetkezett csökkenésnek a mértéke, a következőképpen:

$$\eta = \frac{\text{észlelt reakciósebesség}}{\text{reakciósebesség, ha nem lenne transzport ellenállás}}$$

A nevező tehát az ugyanannyi enzimnek oldott állapotban biztosított reakciósebességét jelenti.

Az észlelt sebesség adott S_0 mellett akkor lenne maximális, ha $S = S_0$, azaz éppen a nevező által megfogalmazott esetben, így az effektivitástényező

$$\eta = \frac{\frac{x}{\kappa+x}}{\frac{1}{\kappa+1}} = \frac{(\kappa+1)}{\left(\frac{\kappa}{x}+1\right)} \quad (2.44)$$

Mivel az x mindig kisebb egynél (kivéve éppen a nem transzportlimitált határesetet), így az effektivitástényező is egynél kisebb szám, és a tömegátadásnak reakciót lassító növekvő hatása az η csökkenését vonja maga után.

Ha a Da -szám közelít a zérushoz, azaz lassú az enzimes reakció sebessége a szubsztráttranszport sebességéhez képest, akkor $\eta \approx 1$ és a reakciósebesség a M–M-egyenlet szerinti. Nyilvánvalóan egy rögzített enzimmal működő reaktor esetében ez a legkedvezőbb eset, hiszen nincs anyagátadási ellenállás. Ezt az állapotot olyan reaktorokban lehet közelíteni, ahol igen intenzív a keverés, és ennek következtében a folyadék áramlása az enzimet tartalmazó szemcsék körül. Ekkor ui. nagy lesz a κ_s

anyagátadási tényező és kisebb a Da-szám. Ugyanakkor azt is figyelembe kell venni, hogy a túl nagy mechanikai mozgás csökkentheti ugyan a diffúziós határreteget és így a transzport ellenállást, de mechanikailag roncsolhatja a hordozót, és egyszersmind az annak a felületén rögzített enzimfehérjék nyírás okozta aktivitásvesztéséhez is hozzájárulhat.

Ha a $Da \gg 1$, vagyis ha $V_{\max} \gg k_s a S_0$, azaz a rendszerben a transzport határozza meg a reakció lehetséges sebességét, akkor

$$\eta = \frac{1 + \kappa}{Da} \quad \text{és} \quad V = k_s a S_0.$$

Ekkor ugyanis a gyors felhasználás miatt $S=0$ az enzímrészeszke felületén (mindig az!), és a reakció csak olyan sebességgel folyhat, amilyen sebességgel a szubsztrátmolekulák az enzimmolekulákhoz diffundálnak.

2.7.2.2. Belső anyagátadási ellenállás hatása az enzimreakcióra

Ha az enzim valamilyen részeszke belsejében van rögzítve (kopolimerizációval, mikrobezárással stb.), akkor a részeszken belüli szubsztráttranszport befolyásolja az enzim reakció sebességét. Ahhoz, hogy ezt kinetikailag modellezni tudjunk, tekintsük az alábbi egyszerűsített képet:

1. A részeszkek belsejében mindenütt van enzim, azaz homogén eloszlásban mindenhol lehet enzim reakció (vegyük észre itt az egyszerűsítést!).
2. A részeszken belüli anyagtranszport a pórusokban molekuláris diffúzióval megy végbe. E diffúzió természetesen gátolt a szabad folyadékfázisban történő diffúzióhoz képest. E gátlás kvantitatív jellemzésére használjuk az effektív diffúziós állandót, amely

$$D_s = D_{s0} \frac{\varepsilon_p K_p}{\tau K_r}, \quad (2.45)$$

ahol

D_s az effektív diffúziós állandó – a szubsztrát diffúziós állandója a mátrixban,

D_{s0} a szabad folyadékfázisban mérhető diffuzivitás,

ε_p a részeszkeporozitás: a részeszken belüli szabad térfogat aránya a teljes térfogathoz,

τ a pórusok „kacsaringósságának” mértéke: annak a mérőszáma, hogy a diffúzió iránya a csatornák, illetve pórusok irányváltozásai miatt pontról pontra változhat (s ezáltal is csökken a diffúzió tényleges sebessége). (τ értelmezése megérthető a 2.66. ábra alapján.)

K_p/K_r a diffúziógátlás mértéke: a diffúzió miatt (is) gátolt, hogy a pórusok átmérője megközelítheti a diffundáló szubsztrátmolekula átmérőjét, azaz molekulák (és a pórusfal molekulái) közötti kölcsönhatások is fellépnek.

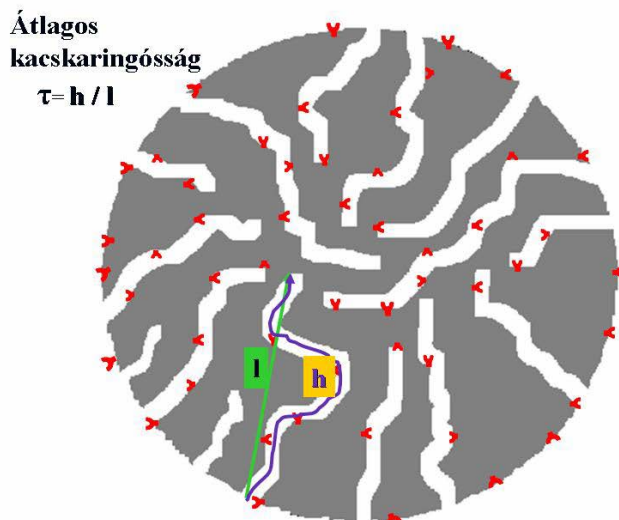
A ε_p porozitás kísérletesen meghatározható az adott hordozóra, a τ 1,4_7 közötti értékeket vesz fel, a K_p/K_r -re pedig a következő kifejezést adják meg közelítésként:

$$\frac{K_p}{K_r} \cong \left(1 - \frac{r_s}{r_p}\right)^4 \quad (2.46)$$

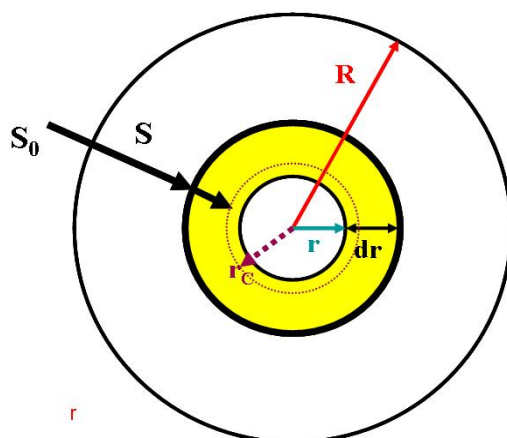
ahol r_s a szubsztrátra és r_p a pórusra jellemző úgynevezett ekvivalens sugár.

Végül további feltételezéseink még, hogy

3. a részeszke külső felületén nincs további diffúziós határreteg, és
4. a részeszke gömbszimmetrikus.



2.66. ábra: Gélbe rögzített enzim. A kacsaringósság definiálása.



2.67. ábra: Belső anyagátadási modell

Ha az 2.67. ábrán látható képet tekintjük, felírható egy anyagmérleg-egyenlet a részecske r és $r+dr$ sugarú szelvényei által meghatározott gömbhéjra

$$\text{BE} \quad \text{Ki} \quad \text{átalakulás} \quad \text{változás} \quad (2.47)$$

$$\frac{dS}{dt} = \left(D_s \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right) \Big|_{r+dr} - \left(D_s \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right) \Big|_r + \text{reakció} = \text{változás a gömbhéjban}$$

Állandósult állapotban $dS/dt=0$, azaz a gömbhéjba ugyanannyi szubsztrát diffundál be, mint amennyi a reakcióban átalakul, tehát nincs akkumuláció, s ekkor a fenti egyenlet egyszerűsödik:

$$\left| D_s 4\pi \cdot r^2 \frac{dS}{dr} \right|_{r+dr} - \left| D_s 4\pi \cdot r^2 \frac{dS}{dr} \right|_r = (4\pi \cdot r^2 dr) V \quad (2.48)$$

Osszuk el ezt $4\pi \cdot dr$ -rel, és alakítsuk át:

$$\frac{D_s \left(r^2 \frac{dS}{dr} \Big|_{r+dr} - r^2 \frac{dS}{dr} \Big|_r \right)}{dr} = r^2 V \quad (2.49)$$

Ha vesszük a (2.49) $dr \rightarrow 0$ határértékét, a bal oldal nem más, mint

$$D_s \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dS}{dr} \right) = r^2 V, \quad (2.50)$$

amely viszont (2.51)-et adja, ha elvégezzük a deriválást:

$$D_s \left(2r \frac{dS}{dr} + r^2 \frac{d^2 S}{dr^2} \right) = r^2 V \quad (2.51)$$

Ez végeredményben a következő differenciálegyenlettel egyenlő:

$$D_s \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) = V, \quad (2.52)$$

amely bizonyos feltételek mellett megoldható.⁸

Tekintsük először azt az esetet, amikor az enzimes átalakulást **nulladrendűnek** tételezhetjük fel a szubsztrátra nézve, vagyis

$$V = k_0, \quad \text{ha } S > 0.$$

Ez annak a helyzetnek felel meg, amikor a Michaelis–Menten-kinetika szerint $K_m \ll S$, vagyis $k_0 = V_{\max}$. Ekkor tehát (2.52)

$$\left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) - \frac{k_0}{D_s} = 0 \quad (2.53)$$

alakúvá válik. A megoldáshoz felveendő határfeltételek a következők:

$$\begin{aligned} S &\rightarrow 0, & \text{ha } r &\rightarrow 0 & (\text{ez a részecske közepe}) \\ S &= S_0, & \text{ha } r &= R & (\text{ez a részecske felülete}) \end{aligned}$$

Ahol S_0 az ábra értelmezése szerint a szubsztrátkoncentráció a folyadék főtömegében, és ugyanígy a részecske felületén is (azaz itt a külső anyagátadással nem foglalkozunk). Ezt a másodrendű, változó együtthatójú differenciálegyenletet helyettesítéssel oldhatjuk meg. A megoldáshoz vezessük be az $\alpha = rS$ helyettesítést, ekkor (2.53) új formája az alábbi lesz:

$$\frac{d^2 \alpha}{dr^2} = \frac{k_0}{D_s} r \quad (2.54)$$

Ezt kétszer határozatlanul integrálva, a megoldás a következő:

$$\alpha = \frac{1}{6} \frac{k_0}{D_s} r^3 + C_1 r + C_2 \quad (2.55)$$

Ebben C_1 és C_2 integrációs állandók. Visszaírva az S -et, a (2.55) egyenlet (2.56) formáját nyerjük:

⁸ Jegyezzük meg, hogy ez a (2.52) alakú differenciálegyenlet nemcsak a rögzített enzimek belső anyagátadására, hanem egy sor fontos egyéb biotechnológiai jelenség leírására is alkalmas, mint például a sejtekbe/sejtekből történő diffúzív anyagtranszport, gombapelletek tápanyagfelvétele, általában a szilárd részecskékbe, illetve azokból irányuló anyagátadás leírására.

$$S = \frac{1}{6} \frac{k_o}{D_s} r^2 + C_1 + \frac{C_2}{r} \quad (2.56)$$

Mivel ha $r = 0$, akkor S is nullává válik, $C_2 = 0$ kell hogy legyen. A másik peremfeltételből pedig C_1 kiszámítható:

$$C_1 = S_o - \frac{1}{6} \frac{k_o}{D_s} R^2 \quad (2.57)$$

Így végül a nulladrendű enzimreakció feltételezésével a megoldás:

$$\frac{S}{S_o} = \frac{1}{6} \frac{k_o R^2}{S_o D_s} \left(\frac{r^2}{R^2} - 1 \right) + 1 \quad (2.58)$$

A (2.58) egyenletből meg lehet határozni az úgynevezett *kritikus sugarat*, amelyen belül a szubsztrát- koncentráció zérus, azaz azt a részecskesugarat, amelyen belül a részecskében az adott anyagátadási viszonyok mellett már nincs enzimreakció (amelyen belülre nem jut szubsztrát). Ekkor (2.58) nullává válik. Ez a feltétel egy másodfokú egyenletet szolgáltat, s ennek megoldása a kritikus sugárra a következő kifejezést adja:

$$\frac{R_c}{R} = \sqrt{1 - \frac{6S_o D_s}{k_o R^2}} \quad (2.59)$$

A tényleges teljes reakciósebesség tehát, amely most már az $R - R_c$ vastagságú gömbhéjban nulladrendű reakció esetén érvényes, a következő:

$$\frac{4}{3} \pi (R^3 - R_c^3) k_o \quad (2.60)$$

Ha nem lenne diffúziós transzport limitáció, akkor a reakciósebesség

$$\frac{4}{3} \pi R^3 k_o \quad (2.61)$$

lenne (ami a részecske méretét jelentő „üres” térrészt jelenti). Így meghatározhatjuk az effektivitástényezőt (64) és (65) hányadosaként:

$$\eta = \frac{\text{észlelt reakciósebesség}}{\text{reakciósebesség, ha nem lenne transzport ellenállás}}$$

$$\eta = 1 - \left(\frac{R_c}{R} \right)^3 = 1 - \left(1 - \frac{6D_s S_o}{k_o R^2} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (2.62)$$

Látható, hogy az effektivitástényező D_s és S_o növekedtével nő, és annál kisebb lesz, minél nagyobb a részecskeméret, illetve a k_o értéke.

Elsőrendű kinetikát feltételezve, ami a Michaelis–Menten-kinetika szerint akkor igaz, ha $S \ll K_m$, vagyis ha a $V = k \cdot S$ jó közelítés. E sebességi kifejezést a (2.52) egyenletbe helyettesítve, és bevezetve az $S' = S/S_o$ dimenziómentes szubsztrát-koncentráció-változót és az $r' = r/R$ dimenziómentes normált rádiust, a következővé válik differenciálegyenletünk:

$$\frac{d^2 S'}{dr'^2} + \frac{2}{r'} \frac{dS'}{dr'} - 9\Phi^2 S' \quad (2.63)$$

Ebben a $\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k}{D_s}}$ az úgynevezett **THIELE-modulus**, amely a reakciósebességnek a diffúziósebességre vonatkozó mérőszáma (és amely természetesen dimenziómentes). A (2.63) egyenlet peremfeltételeit

$$S' \rightarrow 0, \text{ ha } r' \rightarrow 0$$

és

$$S' = 1, \text{ ha } r' = 1$$

figyelembe véve kaphatjuk meg az a $S'(r')$ függvényt. A megoldáshoz itt is alkalmazzuk a $\alpha' = r' S'$ helyettesítést, amely szerint (2.63) a

$$\frac{d^2 \alpha'}{dr'^2} - 9\Phi^2 \alpha' = 0 \quad (2.64)$$

alakú lesz és a megoldás pedig a (69) vagy (70) formát szolgáltatja:

$$\alpha' = C_1 \cosh 3\Phi r' + C_2 \sinh 3\Phi r' \quad (2.65)$$

$$S' = \frac{1}{r'} (C_1 \cosh 3\Phi r' + C_2 \sinh 3\Phi r') \quad (2.66)$$

Mivel S' tart a nullához, ha r' tart a zérushoz, így $C_1 = 0$ integrációs állandót kell választanunk, és a másik peremfeltételből C_2 könnyen adódik:

$$C_2 = \frac{1}{\sinh 3\Phi} \quad (2.67)$$

és

$$S' = \frac{\sinh 3\Phi r'}{r' \sinh 3\Phi}$$

a megoldás végső alakja.

Ez azt mutatja, hogy elsőrendű reakció esetén hogyan változik a dimenziómentes szubsztrát-koncentráció a behatolási úthossz (részecskesugár) függvényében. A 2.68. ábrán láthatjuk a megoldás függvényképét különböző Thiele-modulusok esetében. Kis Φ -k esetén a görbe lapos, azaz a diffúzió gyorsabb mint a reakció, a részecske belsejében a szubsztrát egyenletesen oszlik el, míg ha például $\Phi=5$, akkor a görbe meredek: a diffúzió lassúbb, mint a reakció, a reakció főként a részecske felületéhez közel eső gömbhéjban megy végbe. E görbe szerint itt a teljes sugárnak csak a külső 40%-a mérvadó, beljebb egyáltalán nem folyik reakció, az ott rögzített enzim molekulák nem tudnak részt venni az átalakításban.

Elsőrendű enzimes reakció esetén az effektivitás faktor

$$\eta = \frac{3\Phi \coth 3\Phi - 1}{3\Phi^2}. \quad (2.68)$$

Ha az általános **Michaelis–Menten-kinetika** szerint írjuk fel a reakciósebességet, akkor

$$\frac{d^2 S'}{dr'^2} + \frac{2}{r'} \frac{dS'}{dr'} - 9\Phi^2 \frac{S'}{1 + \beta S'} = 0 \quad (2.69)$$

ahol $\beta = S_0/K_m$ és a Thiele-modulus az előzőektől egy kissé különbözően van definiálva:

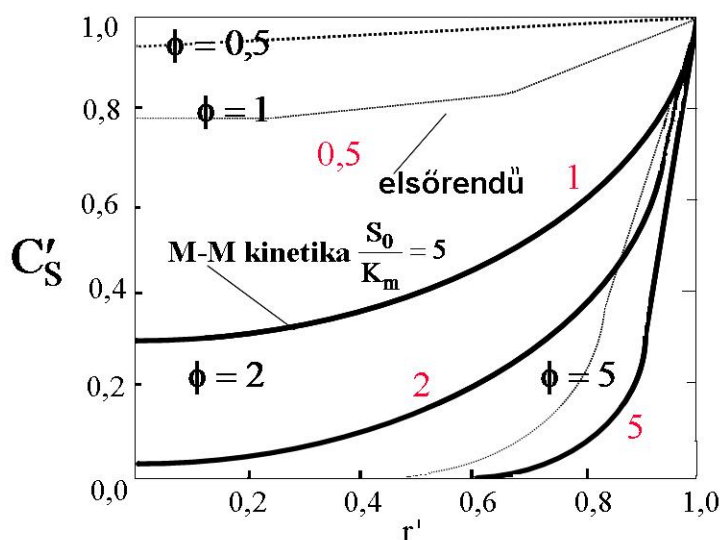
$$\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{V_{\max}}{D_s K_m}} \quad (2.70)$$

A (2.69) megoldásával nem foglalkozunk (szokásos eszközeinkkel ez a nemlineáris differenciálegyenlet nem is oldható meg), helyette a 2.68. ábrán egy-egy numerikus megoldás görbéjét tüntettük fel.

Az eddigiekből világos, hogy a rögzített enzimes rendszerek viselkedésének leírásában (illetve magában a viselkedésben) jelentős szerepe van a tényleges diffuzivitásnak, D_S -nek. Ennek meghatározására különböző elméleti és gyakorlati módszereket dolgoztak ki. Egy ilyen módszerrel mért néhány effektív diffúziós állandó látható az alábbi táblázatban (csupán abból a célból, hogy a nagyságrendekkel tisztában legyünk).

2.5. táblázat: Effektív diffúziós állandók gélekben

szubsztrát	S koncentráció %	hordozó	hőmérséklet °C	D_S m ² /s
glükóz	2	Ca-alginát	25	$6,1 \cdot 10^{-10}$
etanol	2	Ca-alginát	25	$1,0 \cdot 10^{-9}$
szaharóz	3,8	zselatin	25	$2,09 \cdot 10^{-10}$
szaharóz	7,6	zselatin	25	$1,35 \cdot 10^{-10}$
L-triptofán	2	Ca-alginát	30	$6,67 \cdot 10^{-10}$



2.68. ábra: Belső anyagátadás hatása: S koncentráció profiljának alakulása részecskében

2.8. Az enzimek alkalmazási területei és néhány enzimtechnológiai alapfogalom

2.8.1. Enzimek felhasználása általában

Az enzimeket a mindennapi élet, a tudomány és technológia megannyi területén alkalmazzuk, és ez a felhasználás rendkívül dinamikusan nő a legkülönbözőbb területeken. Minden lehetőségnek, megvalósult és potenciális alkalmazásnak a számbavétele jelentősen meghaladná tárgyalásunk kereteit, ezért nem törekedve a teljességre, az alábbiakban néhány kiragadott, de fontos szempont szerint mutatjuk be a különböző alkalmazási területeket egy-egy összefoglaló táblázatban. Megjegyezzük, hogy a felsorolt enzimmegvalósítások némelyike vissza fog köszönni a 3. fejezetben, amelyben alapfolyamati szempontból tárgyaljuk a mikrobiális és enzimes biokonverziókat, biotranszformációkat.

Az enzimek egy részét **közvetlenül** alkalmazzuk, azaz mintegy végtermékként kerülnek felhasználásra, erre vonatkozó példákat sorolunk fel a következőkben.

2.6. táblázat: Enzimek, amelyeket végtermékként, közvetlenül alkalmazunk

Felhasználási terület	Enzim
Mosószer	proteázok, lipázok, cellulázok
Takarmányok	β -glükanáz, celluláz, fitáz, xylanáz, lipáz
Orvosi alkalmazások/gyógyszerek	proteázok, lipázok, amilázok, β -laktamázok, L-aszparagináz, hyaluronidáz, lizozim, kollagenáz, sztreptokináz... (lásd 2.10. táblázatot is)
Analitika és diagnosztika	Egy sor enzim nyer felhasználást. (lásd 2.8.2. fejezetet is)

Egy sor iparágban használnak enzimeket mint segédanyagokat, amelyek tehát nem jelennek meg közvetlenül a „termékben”, de a technológia folyamán felhasználásuk elengedhetetlen. Ilyeneket sorjáz a 2.7. táblázat.

2.7. táblázat: Segédanyagként felhasznált enzimek

Felhasználási terület	Enzim
Textilipar	amilázok, hemicelluláz, pektinázok
Bőripar	proteázok
Papíripar	hemicelluláz, amilázok, lakkáz
Cukoripar	dextranáz, invertáz, dextránszaharáz, α -galaktozidáz...
Keményítőipar	(izo)amilázok, amiloglukozidáz, glukóz izomeráz, ciklodextrin-glukano-transzferáz, xilanáz...

Az élelmiszeripar is nagy enzimfelhasználó, egy sor élelmiszer-ipari termék hozzáadott enzimek hatására nyeri el felhasználási formáját és minőségét. Az élelmiszer-ipari enzimfelhasználást vázlatosan tekinti át a 2.8. táblázat.

2.8. táblázat: Élelmiszeriparban felhasznált enzimek

Felhasználási terület	Enzim
Tejipar	proteázok, β -galaktozidáz, lizozim, lipázok, észterázok, papain, rennin, glukózoxidáz, kataláz...
Sőripar	amilázok, tannáz, β -glükanáz, proteáz, xilanáz...
Borászat, gyümöcsléipar	pektinázok, naringináz, celluláz, amiláz,...
Italcélú alkoholipar	amilázok, amiloglukozidáz....
Húsipar, halfeldolgozás	proteázok, papain, glukózoxidáz,..
Sütőipar	amilázok, pentozanázok, xylanáz, foszfolipáz, lipoxigenáz, proteáz
Zsír- és olajipar	foszfolipáz, észterázok
Kávé, tea, kakaó...	pektináz, proteáz, glükanáz, tannáz....

Ma már a környezetvédelmi technológiákban is terjed az enzimes eljárások alkalmazása, ezekre láthatunk példákat a következő, 2.9. táblázatban.

2.9. táblázat: Néhány, mikroba eredetű enzim alkalmazása a környezetvédelemben

Enzim	Az enzimet termelő mikroorganizmus	A biokatalitikus lépés
	Baktériumok	
dehalogenáz	<i>Pseudomonas</i> sp	diklórmétán lebontása
benzol-di-oxigenáz	<i>Pseudomonas putida</i>	benzol és egyéb aromások lebontása
kollagenáz	<i>Streptomyces</i> sp.	kollagén hidrolízise
néhány enzim	<i>Arthrobacter</i> , <i>Rhodococcus</i>	detoxifikálás/lebontás
	Gombák	
cianid-hidratáz	<i>Stemphylium loti</i>	cianid detoxifikálás
tannin acilhidroláz	<i>Penicillium</i> sp.	tanninok hidrolízise
fitáz	<i>Aspergillus ficuum</i>	fitin hidrolízise
kitináz	Nempatogén gombatörzsek	kitin hidrolízise
keratináz		keratin hidrolízise
celluláz, xilanáz	<i>Hypocrea</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	Cellulóz hidrolízise/degradációja
hemicelluláz, pectináz	<i>Chaetomium</i> sp., <i>Humicola</i> sp.	szalma, egyéb növényi maradvány, papír
lakkáz, peroxidáz, citokróm P450	Farontó gombák	lignin, színyanyagok, aromások lebontása

Terjedőben vannak az enzimes technológiák a kémiai iparokban is. Az úgynevezett fehér biotechnológia jelentős része enzimes eljárásokra épül, ilyeneket sorol fel a 2.10. táblázat, és ilyenekkel találkozhatunk részletesebben a következő alapfolyamati fejezetben is. A táblázatból látható, hogy a termelési volumenek már ma is jelentősek az ilyen enzimes technológiák esetében.

2.10. táblázat: Mikroba eredetű enzimek alkalmazása a kémiában, vegyiparban

Reakciótípus	Enzim	termék	Termelési volumen 2000-ben, t/év
Hidrolízis	Nitril-hidratáz	akrilamid	$100 \cdot 10^3$
	Penicillin-aciláz	6-amino-penicillánsav	$10 \cdot 10^3$
Reszolválás	Hidantoináz	4-hidroxi-D-fenil-glicin	1200
Oxidáció	D-Szorbit- dehidrogenáz	L-szorbóz	$80 \cdot 10^3$
Hidroxilezés	Niacin hidroxiláz	6-hidroxi-nikotinsav	20
Redukció	β -Ketoreduktáz	(R)-karnitin	300
C–C-kötés létrehozása	Piruvát dekarboxiláz	(R)-fenil-acetil-karbinol	500
Szintézis	Aszpartát-ammónia-liáz	L-aszparaginsav	400
	Fumaráz	(L-DOPA) L-almasav	500
Peptidszintézis	Termolizin	α -aszpartám	$10 \cdot 10^3$
Glikozil transzfer	Ciklodextrin-glucano--transzferáz (CGT-ase)	β -ciklodextrin	$10 \cdot 10^3$

Igen nagy és fontos csoportját alkotják az enzimek felhasználásának a terápiás célokra alkalmazott enzimek. Nagyon vázlatosan, kiemelve néhányat, ilyeneket mutatunk be az alábbi, 2.11 táblázatban.

2.11. táblázat: Néhány, terápiás célokra alkalmazott enzim és enzimmészítmény

Enzim neve	Enzimforrás	Gyógyszernév	Mi ellen? Mire?
urát oxidáz	<i>Aspergillus flavus</i>	Uricozyme	köszvény, hiperurikémia
lipáz	<i>Rhizopus arrhizus</i>		emésztést elősegítő készítmények
Pankreatin: pankreász enzimek keveréke: tripszin, kimotripszin, lipáz, α -amiláz)	Sertés pankreász	Cotazym, Kreon, Nutrizym, Pankreon, Panzytrat...	emésztést elősegítő készítmények
β -amiláz	<i>Aspergillus oryzae</i>		emésztést elősegítő
β -galaktozidáz (Lactase)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Lactaid, Lactrase, SureLac	laktóz intolerancia
hialuronidáz	Borjú here, rDNS termék	Hylase, Vitrase	szívinfarktus
urokináz	humán vizelet vagy humán vese- sejttenyészet	Abbokinase, Actosolv, Alphakinase, Rheothromb	akut szívizom- infarktus
VIII véralvadás faktor	rekombináns CHO sejtek	Recombinate, Bioclata	hemofília A
Szöveti plazminogén aktivátor	rekombináns CHO sejttenyészet	Activase, Actilyse	akut szívizom- infarktus; akut tüdőembólia; iszkémiás sztrók
Dezoxi-ribonukleáz	rekombináns CHO sejttenyészet	Pulmozyme	krónikus obstruktív tüdőbaj

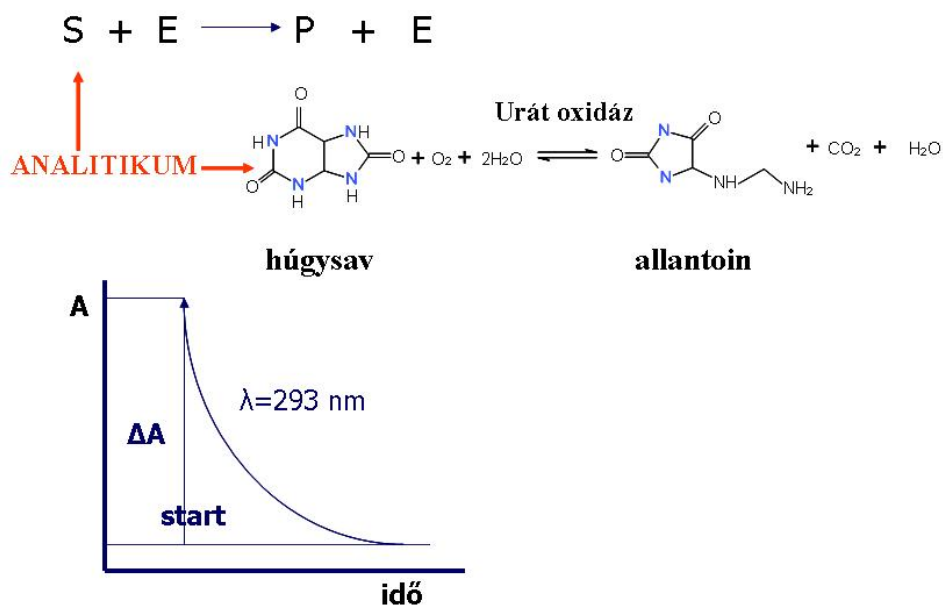
2.8.2. Enzimek felhasználása analitikai célokra

Az enzimek analitikai célra történő felhasználása megkülönböztetendő az enzimanalitikától, ugyanis utóbbi esetben magának az enzimnek a mennyiségét, aktivitását mérjük, míg előbbi esetben az enzim segítségével tudunk anyagmennyiségeket meghatározni. Ebben az alfejezetben csak erről beszélünk, hiszen az aktivitásmérés alapjaival az enzimkinetika kapcsán megismertük.

Analitikai célra az enzimek a következőképpen alkalmazhatók:

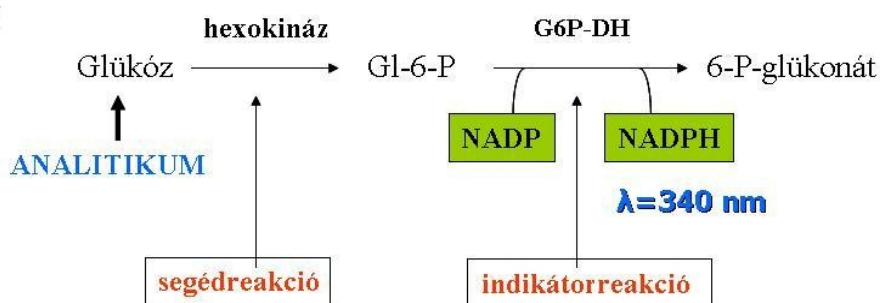
- Amikor az analitikum az enzim reakció szubsztrátja.
- Amikor az enzimet valamely analitikai meghatározás során csupán markerként alkalmazzuk (immunanalitika).
- Amikor a reakció inhibitora az analitikum.
- Amikor az enzim enzimelektrodok, bioszenzorok felépítésében vesz részt.

Szubsztrátnak mint analitikumnak a meghatározása során az enzim reakciót végpontjáig, azaz teljesen le kell játszani, és ekkor, ha az elfogyó szubsztrát vagy a keletkező termék valamilyen mérhető változást okoz (például színváltozást, spektrumváltozást, pH-változást stb.), akkor ezekből a változásokból következtetünk az analitikum mennyiségére. Ennek lényegét a húgysav-allantoin átalakuláson mutatjuk be. A reakció során a húgysavat mint szubsztrátot mérjük az urát oxidáz enzim segítségével. A diagnosztikai jelentőségű eljárás lényegét a 2.69. ábra mutatja be. A mérés alapja az, hogy a reakció során képződő allantoin nem nyel el 293 nm-en, így a mérés során jelentkező abszorbanciacsökkenésből (a fajlagos abszorbancia ismeretében) az S, azaz a húgysav mennyisége, koncentrációja kiszámítható.



2.69. ábra: Szubsztrátmeghatározás végpontig futtatott enzim reakcióval

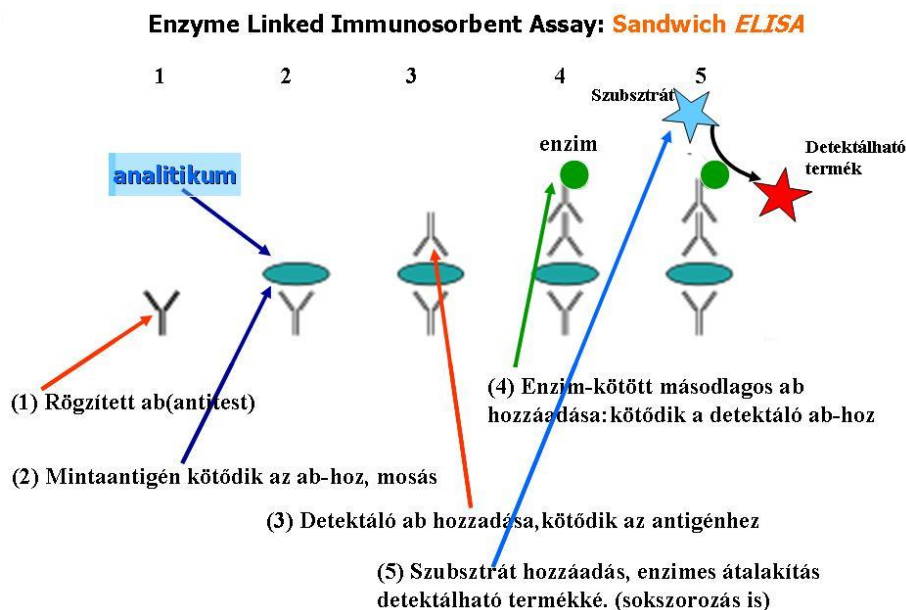
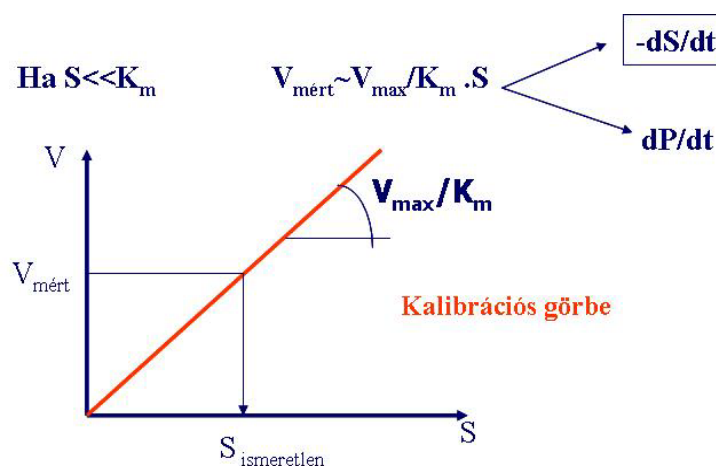
Amikor nincs közvetlenül mérhető változás a reakció során, megoldás, ha a főreakcióhoz (az ábrán segédreakció: hiszen ennek segítségével mérjük a glükózt) egy további indikátorreakciót kapcsolunk. Erre példát szolgáltat a 2.70. ábra, amelyen a glükóznak hexokináz enzimmel történő meghatározását vázoltuk fel. Ez a reakció nem jár mérhető változással, ezért a képződött G6P-ot egy további reakcióban egy további enzimmel, a foszfo-glükonát-dehidrogenázzal 6-P-glükonáttá oxidáljuk. Utóbbi reakciót a NADP kosubsztrát redukálódása NADPH-vá teszi mérhetővé, mivel a redukált koenzimnek jellegzetes elnyelési maximuma van 340 nm-en (ez a jellemző mérési módszer minden NADH képződéses reakció esetén!).



2.70. ábra: Szubsztrátmeghatározás indikátorreakció segítségével

Kifejezetten markerként alkalmazzák az enzimeket az immunanalitikai meghatározásokban. Ezt csupán egy szedvics [ELISA](#) eljárás sémáján keresztül mutatjuk be a 2.71. ábrán, ilyen eljárásokkal más tárgyak keretében találkozhatunk részletesen.

Az enzimkinetika ismeretében megállapíthatjuk, hogy kinetikai mérés közvetlenül csak akkor használható S mint analitikum meghatározására, ha $S \ll K_m$, azaz, ha a M–M-hiperbola kezdeti lineáris szakaszán vagyunk. Ekkor kalibrációs görbe ismeretében reakciósebesség-méréssel ismeretlen S koncentráció meghatározható (lásd 2.72. ábra). Ilyen módszereket elsősorban automatikus analízatorok felhasználása esetén (pl. FIA, flow injection analysis) alkalmazznak.

2.71. ábra: Enzimefelhasználás indikátorként ELISA eljárásban

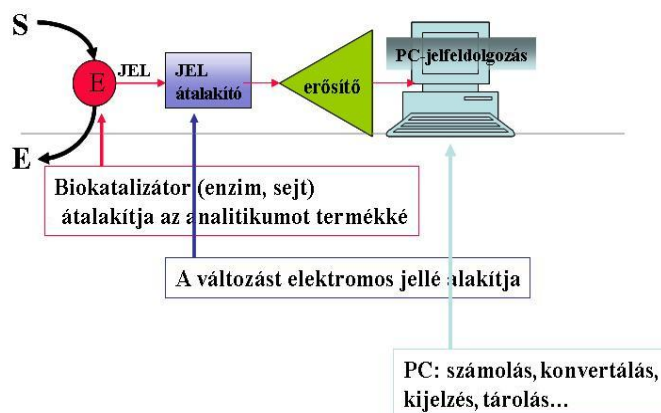
2.72. ábra: Szubsztrátmeghatározás kinetikai mérés alapján

Ellenkező esetben, azaz, ha $S \gg K_m$, csak inhibitor vagy aktivátor mint analitikumok koncentráció-meghatározása lehetséges, ha az enzim reakció reciprok sebessége arányos az inhibitor vagy aktivátor koncentrációjával, azaz a Dixon-ábrázolás lineáris. Ilyen módszereket alkalmaznak például a növényvédőszeres esetében vagy a diagnosztikában enziminhibitorok (pl. heparin) meghatározására.

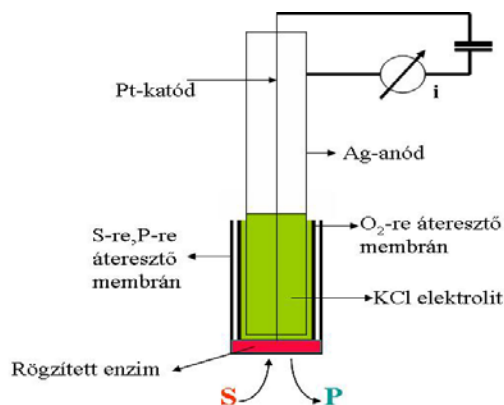
Enzimelektrodok, bioszenzorok esetében rögzített enzimeket vagy teljes sejteket alkalmaznak. A bioszenzorok általános felépítését szemlélteti a 2.73. ábra. Az enzimelektrodok amperometriás vagy potenciometriás elven működnek. Egy amperometriás elven működő glükózelektrodot mutat be a 2.74. ábra. Itt tulajdonképpen egy oldott oxigén mérő elektrod membránfelületére van felhordva egy gélben rögzített glükózoxidáz enzim (és kataláz!) és ezt a rögzített enzimet is egy membrán határolja, amely a meghatározandó szubsztrátra, a glükózra és a termék glükonsavra is áteresztő. A reakció során csökken a gélben az oldott oxigén koncentrációja, és ezt a csökkenést detektálja az oxigénelektrod (lásd a [4.8.3.1. Oldott oxigén mérése](#) c. fejezetet).

Potenciometriás elven működő enzimelektrodot szemléltet a 2.75. ábra, amelynél a mérőelektrod egy pH-üvegelektrod, itt az üveggömbre van felhordva a gélben rögzített enzim. Ilyen enzimelektrod mindazon esetekben alkalmazható, amikor az enzim reakciót sztöhiometrikus H^+ -ionkoncentráció-változás kíséri. Ez közvetlen protonképződéssel járó vagy pl. NH_3 felszabadulással járó reakciókat is jelenthet. Néhány példát szemléltet az ábra.

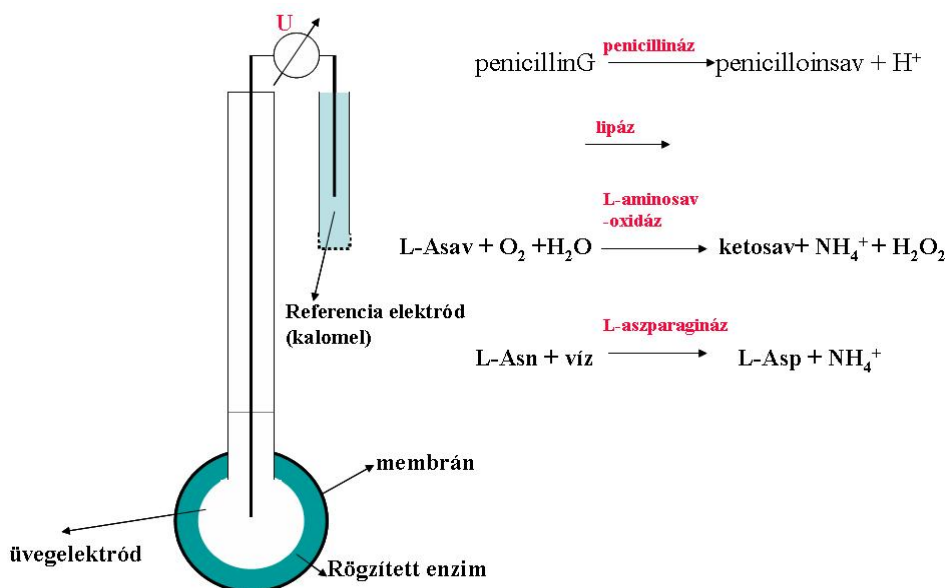
Mindkét típus esetében tehát az enzimes reakciót egy segédelektóddal kötik össze. Ma már olyan esetekben, amikor az enzimes reakció során elektronátmenet történik (NAD-, FAD-mediált reakciók), lehetőség van arra is, hogy ezt az elektronátadást közvetlenül mérhető jellé alakítsák. Ilyen sokat láthatunk a 2.76. ábrán.



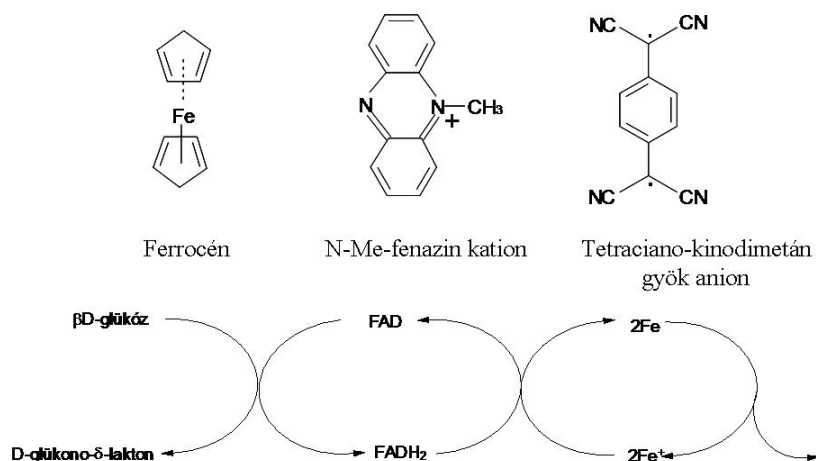
2.73. ábra: Bioszenzorok felépítése



2.74. ábra: Glükózelektrod felépítése



2.75. ábra: Potenciometrikus enzimelektrodok felépítése

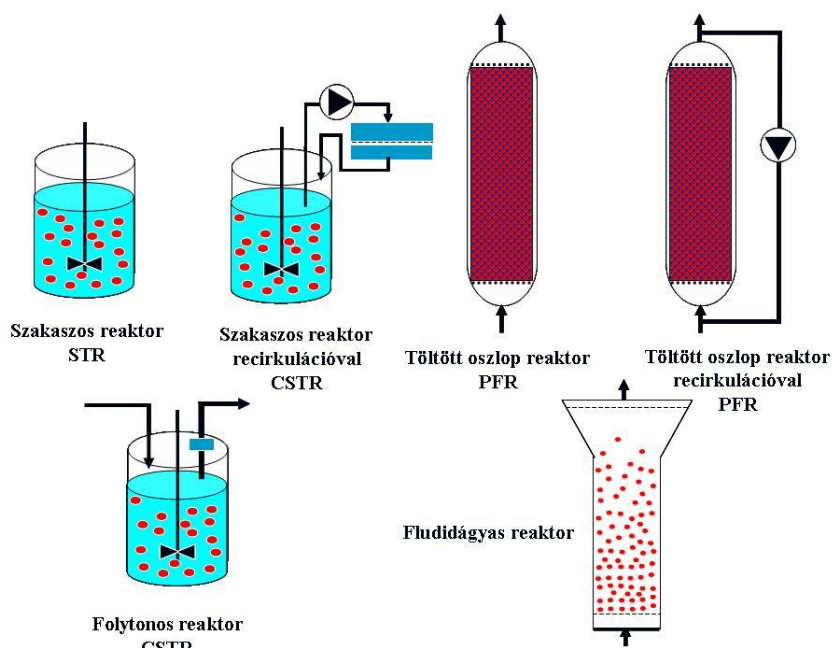


2.76. ábra: Elektronátadó sók

Ma már egy sor, főképpen az orvosi diagnosztikában fontos meghatározást enzimelektrodákkal (is) végeznek, pl.: glükóz (vércukor), alkohol (véralkohol), koleszterin, zsírok, peptidek stb.

2.8.3. Néhány fontosabb enzimechnológiai alafogalom

Az enzimes technológiák során különböző reaktorokat használnak fel, ezek szakaszos vagy folytonos működésűek lehetnek. Néhány jellegzetes és fontosabb enzimes reaktor sematikus ábráját a 2.77. ábrán mutatjuk be.



2.77. ábra: Enzimes reaktorok

Az enzimekben történő átalakulások fontos jellemzői és egyben a legfontosabb enzimechnológiai alafogalmak a **konverzió** és a **hozam**. Ezek definíció szerint a következők:

Konverzió: átalakult mólok száma/ kiindulási mólok száma

$$X_S = \frac{n_{S_0} - n_S}{n_{S_0}} \quad (2.71)$$

Hozam = yield: szintetizált mólok száma/ kiindulási mólok száma

$$\eta_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{S_0}} \left(\frac{v_S}{v_P} \right) \quad (2.72)$$

ahol n_P termék mólszáma a reakció végén
 n_{P_0} termék mólszáma a reakció elején
 n_{S_0} szubsztrát mólszáma a reakció elején
 v_S a szubsztrát sztöhiometriai faktora (a reakcióban hány mól vesz részt)
 v_P a termék sztöhiometriai faktora (a reakcióban hány mól képződik).

Fontos jellemzője az enzim reakciónak az is, hogy a konvertált molekulák milyen mértékben alakulnak a kívánt termékmolekulákká, ez a **szelektivitás**, amelyet a következőképpen definiálunk:

Szelektivitás: szintetizált mólok száma / konvertált mólok száma

$$\sigma_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{S_0} - n_S} \left(\frac{v_S}{v_P} \right) \quad (2.73)$$

Egy enzim szelektivitása természetesen annál jobb, minél közelebb van e szám az egységhez. Minél távolabb van egytől, annál több melléktermék, illetve szennyezés jelenik meg a reakcióban.

A bevezetett három fogalom között nem nehéz felfedezni az összefüggést, azaz

$$\eta = \sigma_P \cdot X_S \quad (2.74)$$

Gyakran az enzim technológiák során azt használják ki, hogy az enzimek sztereospecifitással is rendelkeznek. Ekkor fontos jellemzője az átalakulásnak az **enantiomer felesleg**. Ez definíciószerűen a két enantiomer koncentrációja különbségének viszonya azok összegéhez, azaz azt méri, hogy egy adott enantiomer az egészhez képest mennyire van túlsúlyban, feleslegben, vagyis végső soron a termék adott enantiomerre vonatkozó „tisztaságát” adja meg:

$$ee_R = \frac{n_R - n_S}{n_R + n_S} \quad (2.75)$$

A képletben ee_R az R konformációra vonatkozó enantiomer felesleg, n_R és n_S sorrendben az R és S konformációjú termék mólszáma. (2.75) természetesen ee_S -re is felírható.

Egy enzim **sztereoszelektivitása** pedig az S- és az R-enantiomer átalakítási (képződési) sebességének hányadosa egy racém keverékből. Ez a sebességhányados a következőképpen számítható ki az előbbieken definiált enantiomer feleslegekből:

$$E = \frac{v_S}{v_R} = \frac{\ln \left(\frac{1 - ee_S}{1 + \frac{ee_S}{ee_P}} \right)}{\ln \left(\frac{1 + ee_S}{1 + \frac{ee_S}{ee_P}} \right)} \quad (2.76)$$

Ez az egyenlet az S képződésére vonatkozóan adja meg a sztereoszelektivitást, természetesen az indexek cseréjével ez R-re is felírható.

2.9. Allosztérikus enzimek

2.9.1. *Bevezetés*

Az enzimek hatásának szabályozásában, a metabolikus regulációban enzim- és génszinten többféle szabályozási mechanizmus érvényesül:

- A sebesség csökken, amikor a termék koncentrációja nő, ez a termék-inhibíció.
- Sebességfüggés a S-koncentrációtól: S-V összefüggés, S-inhibíció.
- Genetikai kontroll: indukció, represszió.
- Az enzimek kovalens módosítása: az enzim pl. foszforilezés után lesz aktív, vagy fordítva.
- Zymogének, izozymek és modulátorfehérjék szerepe.
- Allosztérikus vielkedés, effektorok működése.

E hatások közül e helyütt az allosztériával foglalkozunk. Vannak allosztérikus fehérjék, mint a hemoglobin, amelyek a klasszikus definíció értelmében⁹ nem enzimek, de az allosztéria megértésében ezek vizsgálata vitt leginkább előre, ezért a továbbiakban nemcsak az allosztérikus enzimekre vonatkoznak megállapításaink, hanem minden allosztérikus fehérjére. Előjáróban néhány fogalmat definiálunk, illetve tisztázunk.

Az allosztéria szó jelentése: allos = más, egyéb; sztérikus = tér-, térbeli; az elnevezés arra utal, hogy valamilyen (az allosztérikus) hatás valahol (az enzimen) másutt hat.

Allosztérikus fehérje: olyan fehérje, amely két vagy több topológiailag különböző kötőhelyet tartalmaz, és ezek funkcionális kölcsönhatásban vannak egymással. Azaz legalább két hely van különböző pozícióban, amelyek képesek ligandumokat (S, I...) megkötni. Egy ligandum megkötése az egyik helyen módosítja a többi helyet. Az allosztérikus fehérjék jó része enzim, de mint láttuk, nem kizárólag.

Kooperativitás

A kooperativitás a fehérje kismolekula kötésére vonatkozó affinitásának módosítása egy előzőleg megkötött másik kismolekula által.

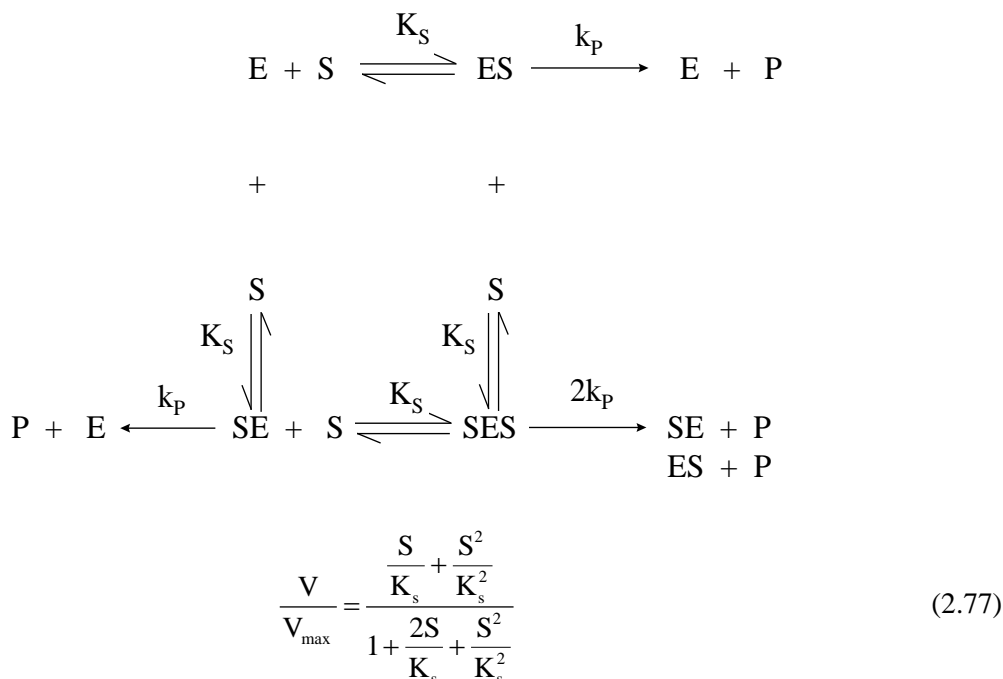
Az ezt jellemző kötési állandó olyan, mint K_s , illetve K_i , amelyek disszociációs konstansok és a kötés erősségét mutatják(!). A kooperativitás vagy **pozitív**, vagy **negatív**, előbbi, ha egy molekula megkötése elősegíti a *másik molekula megkötését*, azaz csökkenti a kötési állandót.

A megkötött két ligandum lehet kémiai azonos (pl. mindkettő S), ez a **homotróp** hatás, vagy különböző (pl. inhibitor és S, vagy aktivátor és S) ez a **heterotróp** kooperativitás.

Több (sok, de legalább kettő) enzimalegységből felépülő oligomer, azaz negyedleges szerkezettel is rendelkező enzimről beszélünk, amely több szubsztrátumátalakító aktív hellyel rendelkezik. Az ilyen enzimek a *több kötőhelyes enzimek*, és az úgynevezett *allosztérikus enzimek*. Az allosztérikus enzimek tulajdonságainak, kinetikájának megtárgyalása előtt foglalkozzunk először általánosságban a több kötőhelyes enzimekkel.

Az első esetre tekintünk egy egyszerű példát, amikor az enzim dimer, mindkét komponensének egy aktív centruma van, és az egyik aktív centrumhoz történő szubsztrátkötés nincs hatással a másik szubsztrát kötődésére. Ennek egyszerűsített mechanizmusa az alábbi:

⁹ Ezért ma többen vitatják azt a definíciót, amely *reakcióhoz* köti az enzimfogalmat.



Vegyük észre, hogy itt a számlálóban két tag van, mivel kétféle komplexből is lesz termék. A nevező azt a tényt mutatja, hogy háromféle enzim van jelen: az E szabad enzim, az egyszeres S-kötéssel rendelkező és a kétszeres S-kötéssel rendelkező komplex. A kettes szorzó a nevezőben arra utal, hogy valójában kétféle egyszeres kötésű komplex van, de ezek azonosan viselkednek.

Általánosan, ha egy olyan enzimet vizsgálunk, amelynek n aktív helye van, amelyek *azonosak és egymás S-kötését nem befolyásolják*, akkor a kinetikai egyenlet a következő alakú lesz:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s} \left(1 + \frac{S}{K_s}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{S}{K_s}\right)^n} = \frac{S}{K_s + S} \quad (2.78)$$

A (2.78) egyenlet azt mutatja, hogy ugyanolyan összefüggést kaptunk, mint egy egyszerű, egy kötőhelyes enzim reakciója esetén, azaz nem lehet tudni egy adott esetben, hogy egy X mennyiségű és n aktív helyet tartalmazó enzimmel van-e dolgunk, vagy n -szer annyi enzimünk van (nX), de csak egy aktív hellyel rendelkezik minden molekula.

Más a helyzet az igazi allosztérikus enzimek esetében. Ezeknél a szubsztrát kötése hat a másik (harmadik, negyedik stb.) szubsztrát kötésére. A két aktívhelyes, legegyszerűbb esetben ezt a hatást az $SE \rightleftharpoons SES$, illetve $ES \rightleftharpoons SES$ átalakulás K_s egyensúlyi állandójának a szorzófaktorral való módosításával vehetjük figyelembe, ahol ha $a < 1$, akkor az egyik S a másik kötődését elősegíti, azaz nő az affinitás, ekkor a kooperativitás pozitív, viszont ha $a > 1$, akkor a kooperativitás negatív. A sebességi egyenlet a következő:

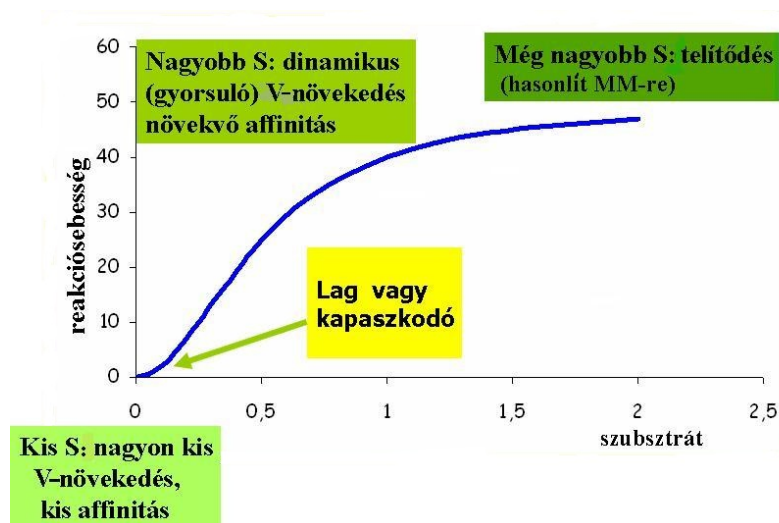
$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s} + \frac{S^2}{K_s^2}}{1 + \frac{2S}{K_s} + \frac{S^2}{aK_s^2}} \quad (2.79)$$

Láthatóan az a koefficiens miatt ez nem redukálódik az egyszerű Michaelis–Menten-alakra.

Ebből már következtethetünk arra, hogy ezek az enzimek nem lesznek leírhatóak az egyszerű Michaelis–Menten-kinetikával, V-S görbájuk nem egy derékszögű hiperbola.

2.9.2. Az allosztérikus enzimek tulajdonságai

Az allosztérikus enzimek szigmoid kinetikát mutatnak, azaz a V-S görbéjük a 2.78. ábrán látható alakú.



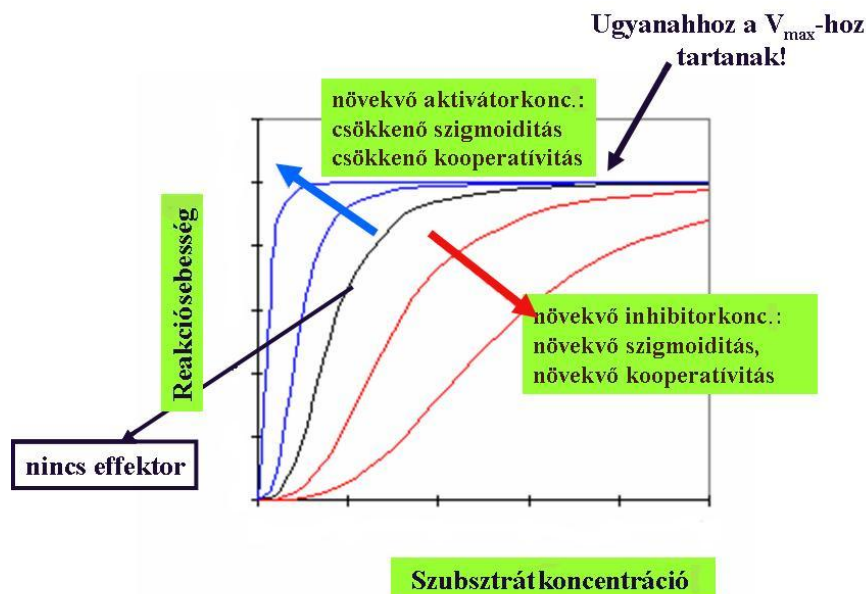
2.78. ábra: Allosztérikus enzim sebesség-szubsztrátkoncentráció görbéje

Alapvető különbség tehát a M–M-kinetikától, hogy a görbe elején van egy „lábazat vagy kapaszkodó”, ahol a S változása csak nagyon kis mértékben növeli a sebességet, nagyobb szubsztrátkoncentrációknál a változás kifejezettebb, és még tovább növekedő S-koncentrációknál nagyon hasonló lesz a M–M-görbéhez. Az ilyen görbe **pozitív kooperativitást** jelent. Kis S-nél csak kevés aktív hely kötött szubsztrátot, és ezeknek kicsi az affinitása, ezért a S hozzáadása csak csekély mértékben növeli a V-t. De ahogy egyre több és több S kötődik, ez növeli a S-kötő képességet, azaz nő a görbe meredeksége. Még nagyobb S-koncentrációknál azonban a M–M-hez hasonlóan a S-telítés válik dominálónak.

Kérdés, hogy vajon a S-V görbe mindig szigmoid-e egy allosztérikus enzim esetében? A válasz **nem**, bár általánosan elterjedt nézet az ellenkezője. Például kétszubsztrátos enzimeknél (lásd a [2.5. Többszubsztrátos reakciók](#) c. fejezetet), amelyeknél mindkét S-ra külön-külön fel lehet rajzolni egy S-V görbét, az az egyikre nézve szigmoid lehet (azaz pozitív kooperativitás van), a másikra nézve pedig hiperbolikus lehet (azaz nincs kooperativitás), pedig ebben az esetben nyilvánvalóan csak egy allosztérikus enzimről lehet szó.

2.9.3. Effektorok hatása az allosztérikus enzimekre

Az allosztérikus inhibitoroknak és aktivátoroknak a hatásai nyomatékossítják az alloenzimek fő szerepét, ugyanis az enzimműködésű reakciók ezek által történő sebességbefolyásolása az *anyagcsere-utak szabályozásának egyik legfontosabb enzimszintű lehetősége*. A következő 2.79. ábra azt mutatja, hogy hogyan változtatják meg az aktivátorok, illetve az inhibitorok a kinetikai görbét abban az esetben, ha az enzim pozitív S-kooperativitással rendelkezik. A középső görbe a tipikus szigmoid **+koop alloenzim** görbéje. Az, hogy az inhibitor minden S-koncentrációnál csökkenti, az aktivátor pedig növeli a reakciósebességet, nem nagy csoda (hiszen ettől aktivátor vagy inhibitor), de az már figyelemre méltó, hogy míg a növekvő inhibitor-koncentráció növeli a szigmoiditást, addig a növekvő aktivátorkoncentráció egyre inkább a hiperbolikus viselkedés felé tolja el a kinetikát!



2.79. ábra: Effektorok hatása az alloenzimre

Ez azt jelenti, hogy egy allosztérikus inhibitor növeli a S-kooperativitást, míg egy allosztérikus aktivátor csökkenti azt.

Az is látszik, hogy az összes görbe ugyanoda tart, azaz V_{\max} azonos, itt tehát csak a látszólagos K_m változik: ezeket K-rendszereknek nevezik. ((Bizonyos enzimeknél a V_{\max} (is) változik, ezek a V-rendszerek)).

Érdekes hatása van az ismert denaturáló kémiai ágenseknek az allosztérikus enzimekre. Ha gyenge ilyen hatásnak teszünk ki egy alloenzimet, gyakran veszítenek allosztérikus tulajdonságukból (a S-kooperativitásból) miközben megtartják katalitikus aktivitásukat. Ez is azt mutatja, hogy az enzim térszerkezetének van vitális szerepe a működésükben.

Fontos tulajdonsága az allosztérikus enzimeknek, hogy van negyedleges szerkezetük, azaz polimer enzimek: különálló alegységekből (subunit), fehérjeláncokból állnak, amelyek egymáshoz gyenge kölcsönhatásokkal (H-híd, hidrofób kölcsönhatás) kapcsolódnak. Egy allosztérikus enzimnek egy sor aktív helye van, a legegyszerűbb esetben minden alegységen egy, amelyek *mindegyike hordozza az enzimet jellemző katalitikus hatást*. Ezeknek az alegységi aktív helyeknek a kölcsönhatása jelenti a S-kooperativitást. Vagyis egy tipikus alloenzim esetében egy S-molekulának az egyik alegység aktív helyéhez kötődése olyan konformációváltozást okoz, amely megnöveli a másik alegység aktív helyének S-kötő képességét – ez a pozitív kooperativitás.

Mivel az alegységek csak gyenge kötésekkel vannak egymáshoz csatolva, ezért könnyen leválnak egymásról, illetve újra egyesülnek egymással. Ennek eredményeképpen egy alloenzimoldatban gyakran egyensúlyt mutat a komplett enzim és az alegységek között.

Komplex enzimek esetében átmeneti formák is lehetségesek ezen határesetek között, amelyek esetében a komplett enzimmél gyengébben összekötött alegységkombinációk is létezhetnek. Lehet, hogy ekkor pl. az egyszerű egyedülálló alegység katalitikusan nem is aktív. A legkisebb katalitikusan már aktív struktúrát **PROTOMER**-nek nevezzük. Az előbbi komplex egyensúly a teljes enzim, a különböző komplexek, az alegységek között nagymértékben befolyásolható különböző ligandumokkal (maga a S vagy effektorok, vagy a reakció terméke).

2.9.4. Hill-egyenlet és a szigmoid görbék

Ha az enzimnek n ekvivalens aktív helye van, és az úgynevezett *kölcsönhatási* vagy *kooperativitási állandók*, a, b, c, \dots stb. igen kicsik, azaz az enzim igazán csak akkor aktív, ha valamennyi kötőhelyét elfoglalták a szubsztrátmolekulák, akkor a kinetikai egyenletben a szubsztrát n -edik hatványát tartalmazó tag fog dominálni (= az $n-1$, $n-2$ stb. szubsztrátot kötött enzim aktivitása elhanyagolható). A (2.79) egyenlet általános alakja:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{S^n}{K' + S^n} \quad (2.80)$$

Ez az úgynevezett **Hill-egyenlet**, olyan allosztérikus enzimek viselkedésének leírására, amelyekben n a molekulánkénti aktív helyek száma, és

$$K' = K_{0,5}^n = K_s (a^{n-1} b^{n-2} c^{n-3} \dots z^1), \quad (2.81)$$

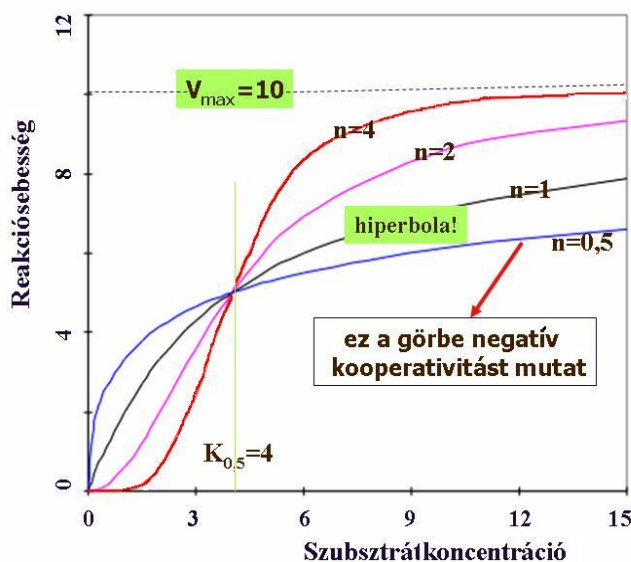
ami tehát a komplex disszociációs állandón kívül magába foglalja az a,b,c... z kooperativitási állandókat is. Jegyezzük meg, hogy ez a K' nem a $V_{\max}/2$ -höz tartozó szubsztrátkoncentrációt jelenti, hanem annak az n -edik hatványát (ezért is kétféleképpen szokták az egyenletet felírni). Így igazak az alábbi kapcsolatok is:

$$S_{1/2} = K_{0,5} = \sqrt[n]{K'} \quad \text{vagy} \quad n \cdot \lg S_{1/2} = n \cdot \lg K_{0,5} = \lg K'$$

A Hill-egyenletet tehát a következő két formában szoktuk felírni:

$$V = \frac{V_{\max} S^n}{K' + S^n} = \frac{V_{\max} S^n}{K_{0,5}^n + S^n} \quad (2.82)$$

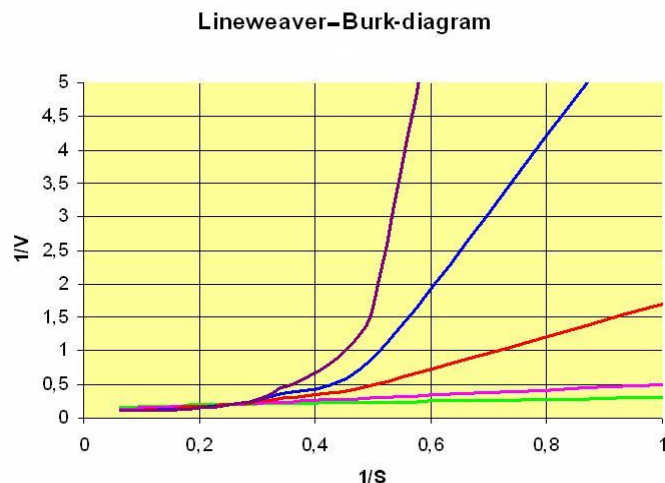
Utóbbi formában a $K_{0,5}$ valóban a félmaximumhoz tartozó S -koncentrációt jelenti.



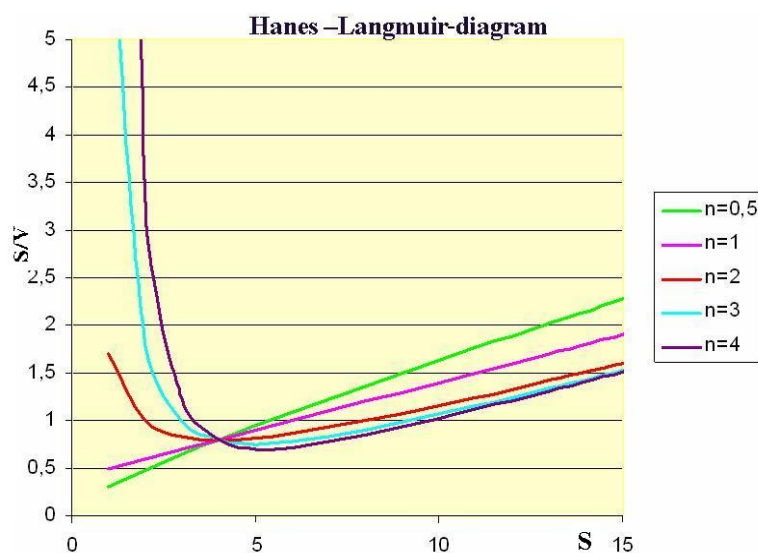
2.80. ábra: A Hill-koefficiens hatása az alloenzimek kinetikájára

A Hill-koefficiens n a szubsztrátkooperativitás mértéke. Ha $n=1$, az egyenletből látszik, hogy az át megy a $M-M$ -egyenletbe, azaz az allosztéria, a S kooperativitás eltűnik. (l. az alábbi görbe $n=1$ -nél hiperbolikus!). Ha n értéke nagyobb mint egy, nő a S -kooperativitás, azaz a görbék egyre inkább szigmoidok, amint az alábbi ábra mutatja.

A linearizált sebességi görbék, mint a L-B és Hanes-görbék nagyon eltérnek a hiperbolikus $M-M$ -enzimek görbétől, azaz nem egyenesek!



2.81. ábra: Lineweaver–Burk-ábrázolás alloenzimek esetén

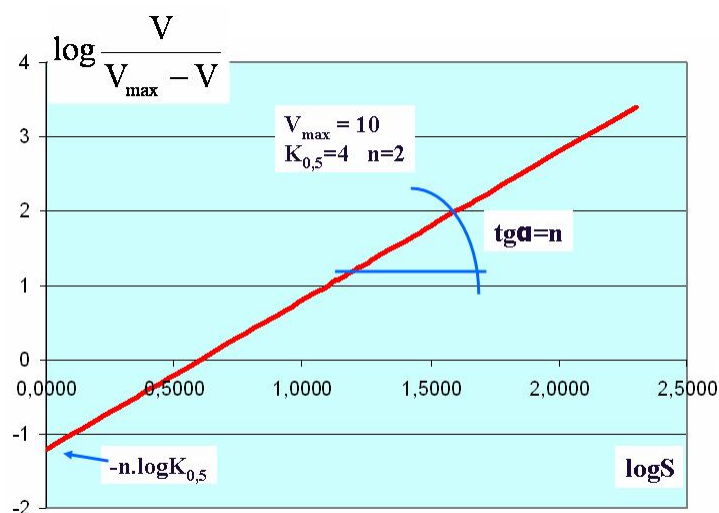


2.82. ábra: Hanes–Langmuir-ábrázolás alloenzimek esetén

Ezek az ábrázolások tehát nem alkalmasak a kinetikai paraméterek meghatározására. Ebben az esetben is ismerünk azonban egy jellegzetes linearizációs ábrázolásmódot, a Hill-egyenlet transzformálásával:

$$V = \frac{V_{\max} S^n}{K' + S^n} = \frac{V_{\max} S^n}{K_{0,5}^n + S^n} \text{ átrendezve: } \frac{V}{V_{\max} - V} = \frac{S^n}{K_{0,5}^n} \text{ majd logaritmálva } \lg \frac{V}{V_{\max} - V} = n \lg S - n \lg K_{0,5}.$$

Ez utóbbi alakot ábrázolhatjuk, és ekkor a 2.83. ábrát nyerjük.



2.83. ábra: A Hill-egyenlet logaritmikus ábrázolása

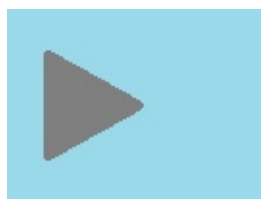
Tudni kell, hogy a nagyon kis és a nagyon nagy S -nél eltérés van az egyenestől, a két szélső tartományban jobb oldalon lefelé, a bal oldalon pedig felfelé elhajlik a görbe.

A Hill-ábrázolás egyik fő nehézsége, hogy szükséges hozzá a V_{\max} -ot ismerni. Sajnos, mint láttuk, a linearizációs módszerek nem adnak egyenest, így alkalmatlanok V_{\max} meghatározására. (Egyébként, ha nem S , hanem S^n lenne, amit ábrázolnánk, akkor a linearizált görbék itt is egyenesek lennének, de ehhez meg az n -t kellene ismerni.)

Ezért a követhető eljárás egy iteráció. Valamelyik linearizációs módszerrel meghatározunk egy durva becslést V_{\max} -ra. Ennek segítségével a Hill-görbéből kaphatunk egy n -t, majd ismétljük meg pl. a L-B-ábrázolást, de most már S^n -t alkalmazva, ez ad egy jobb V_{\max} -ot, és így tovább, amíg a tetszőleges pontosságot elérjük.

Másik lehetőség (ma már nyilván ez lehet a célravezetőbb!) egy nem lineáris regresszió számítása a Hill-egyenlet illesztésére.

A Hill-egyenlet tulajdonságait, a kooperaritás hatását, az egyenlet illesztését kísérleti pontokhoz tanulmányozhatjuk a 2.6. szimuláción.



2.6. szimuláció: Alloenzimek

2.9.5. A kooperativitás előnyei

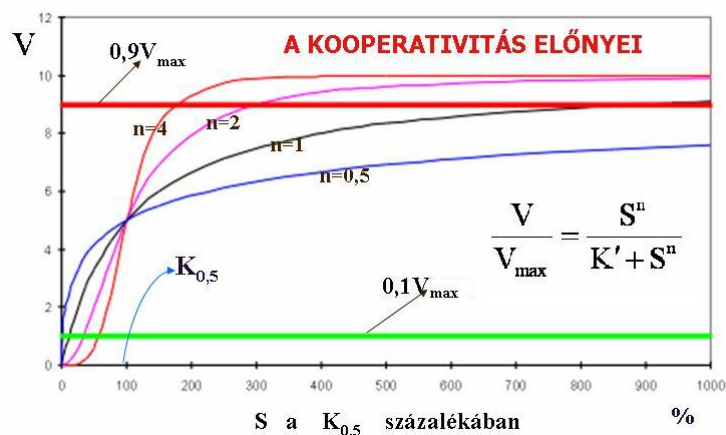
Noha nincs minden allostérikus enzim esetében S -kooperativitás, de a legtöbb esetben van, azaz kell hogy legyen valamiféle metabolikus előnye annak, ha egy enzim rendelkezik pozitív kooperativitással. Míg az allostérikus inhibitorok és aktivátorok szerepe, fontossága teljesen természetes, ha a metabolikus folyamatokra gondolunk, addig a S -kooperativitás nem ilyen egyszerűen megérthető.

Tekintsük meg az alábbi ábrát, és nézzük a hiperbolikus görbét először: igen nagy S -koncentráció-változás kell ahhoz, hogy a V_{\max} 10%-áról 90%-ra növekedjék a sebesség, 81-szeres növekedés szükséges a szubsztrátkoncentrációban, ha 9-szeres növekedést akarunk a sebességben. Ugyanakkor pl. $n=4$ esetében ugyanerre csak 3-szoros S -koncentráció-növekedésre van szükség.

Még jobban látszik ez, ha negatív a kooperativitás, hiszen az $n=0,5$ esetében 6561-szeresre kell növelni a S -koncentrációt ahhoz, hogy a sebesség a 10-ről 90%-ra növekedjék! (Ez egyébként hasznos

is lehet, pl. kosubsztrát esetén. Ez azért izgalmas, mert „függetlenül” a koncentrációjától egy közel állandó reakciósebességet tud biztosítani).

A pozitív kooperativitás azt jelenti tehát, hogy a reakciósebesség sokkal érzékenyebb a S-koncentráció-változásra, mint egy Michelis–Menten-kinetikát követő enzim esetében várható.



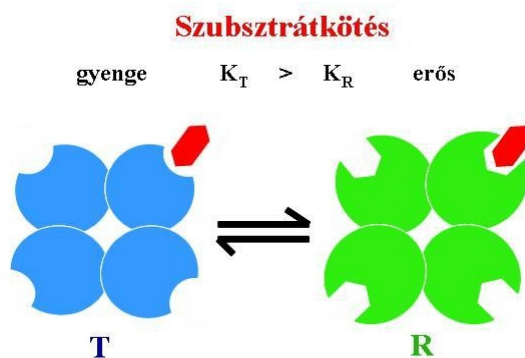
2.84. ábra: A kooperativitás metabolikus előnye

2.9.6. Az allostéria mechanizmusa

Két modellt dolgoztak ki az allostéria mechanizmusának magyarázatára, az egyik az 1965-ben MONOD, WYMAN és CHANGEUX által kidolgozott **szimmetriamodell (MWC)**, más néven **concerted hipotézis**, a másik pedig az 1966-ban publikált KOSHLAND, NÉMETHY és FILMER nevéhez fűződő **szekvenciális hipotézis (KNF)**.

Szimmetriamodell (concerted hipotézis)

Ez a modell egyszerűen és elegánsan magyarázza az allostérikus enzimek pozitív S-kooperativitását és az allostérikus effektorok hatását. Eszerint egy allostérikus fehérje alegységekből áll, amelyek két különböző konformációban létezhetnek: relaxált – R, illetve feszült, azaz T (tense) állapotban. Az alegységek egy adott enzimmél olyan kapcsolatban vannak egymással, hogy vagy mindegyik R, vagy mindegyik T konformációjú. Oldatban a két állapot között egyensúly alakul ki a 2.85. ábra szerint.



2.85. ábra: $T \rightarrow R$ átmenet a szimmetriamodell szerint

A modell feltételezi, hogy oldatban, S és effektorok távollétében (azaz nincs ligandum) az egyensúly nagymértékben balra van eltolva, azaz közel az összes enzim T konformációjú.

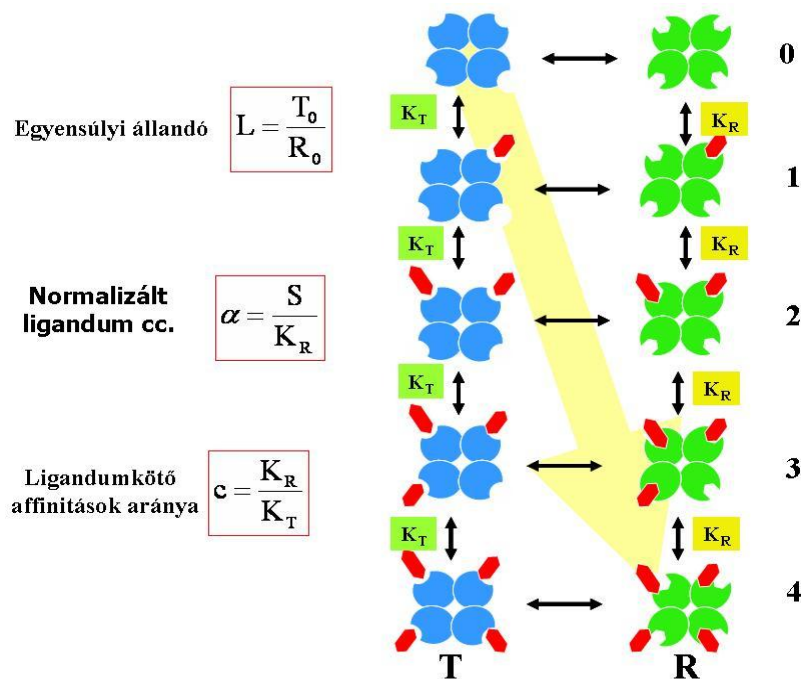
A két állapotban az aktív helyek térszerkezete olyan, hogy az R konformációnak nagyobb az affinitása a szubsztráthoz, mint a T-nek (ami nem jelenti, hogy a T ne tudna szubsztrátot kötni, csak kevésbé erősen).

Ha egy kis mennyiségű S kerül a rendszerbe, az tehát nagyobb valószínűséggel R-hez fog kötődni. Ekkor azonban az előbbi egyensúly eltolódik jobbra, hiszen elvontunk egy R-t a rendszerből. Következésképpen az R konfigurációjú enzimek mennyisége T rovására nőni fog. Ugyanakkor a nagyobb S-affinitás miatt ez a folyamat továbbmegy, azaz egyre több lesz az R, azaz a nagyobb S-kötő képesség, míg végül valamennyi T át nem alakul R-ré. Ez a folyamat a következő ábrán jól követhető, és a sátrózott sáv jelöli ki a kooperativitás hatására bekövetkező változási irányt. A ligandumkötött enzimek koncentrációjának az összeshez való arányát az ún. Adair-egyenlet adja meg, a 2.86. ábra értelmezése szerint.

$$\frac{\text{protomer cc. liganddal}}{\text{összes protomer cc}} = Y = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + L\alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + \alpha)^n} \quad (2.83)$$

Az Adair-egyenlet homotróp alloenzimekre vonatkozik, és n a kötőhelyek számát jelenti.

Az effektorok hatását illetően megállapíthatjuk, hogy egy aktivátor inkább az R állapothoz kötődik, míg egy inhibitor pedig a T konformációhoz: a hatás az egyensúly eltolásán keresztül a fentiekhez hasonló, azaz az aktivátor elősegíti, az inhibitor gátolja a S kötődését, előbbi esetben csökkentve a S-kooperativitást(!), utóbbiban pedig növelve azt. Nagy mennyiségű aktivátor úgy tolja el az egyensúlyt, hogy közel minden enzimmolekula R konformációjú lesz, azaz nincs további kooperativitás, a V-S görbe hiperbolává válik. **Inhibitor** esetében a dolog fordított: az egyensúly balra tolódik, nagyobb mennyiségű szubsztrát kell ugyanolyan kooperatív változás eléréséhez, a szigmoiditás tehát nő.



2.86. ábra: Monod–Wyman–Changeux-modell

KNF szekvenciális hipotézis

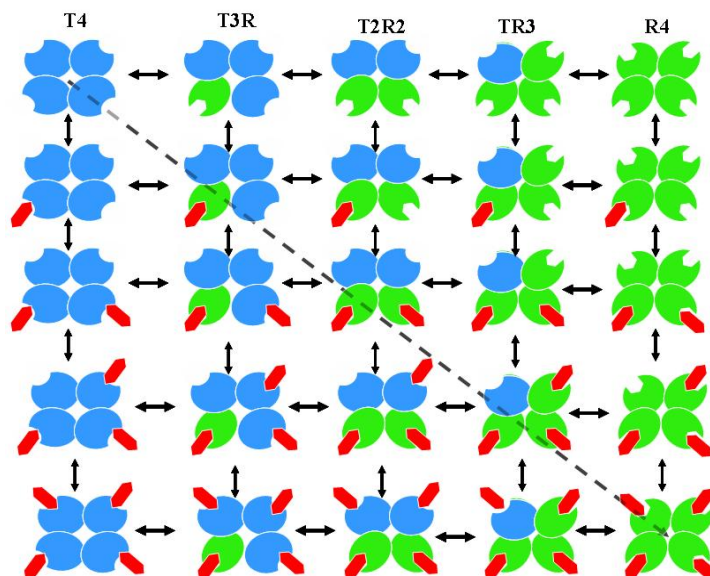
Az előzőekkel szemben e modell értelmében egy komplett enzimen belül az egyes alegységek nem azonosak, azaz T és R vegyesen is előfordulhat. Itt is egyensúly van oldatban a következő 2.87. ábrának megfelelően

2.87. ábra: $T \rightarrow R$ átmenetek a szekvenciális modell szerint

A hipotézis szerint a S nagyon direkt hatást gyakorol az enzim konformációjára. S távollétében gyakorlatilag az összes enzim T formában van jelen, és ennek igen kicsiny az affinitása a szubsztráthoz. Ha egy T alegység szubsztrátot köt (ha még oly kis affinitással is), akkor az *indukált illeszkedés* értelmében az az alegység átalakul R állapotúvá. Most már egy alegység R, a többi alegység T konformációjú, de az alegységek közötti kölcsönhatás miatt a többi is inkább az R felé tendál átalakulni. Ez az átalakulás akár a S-kötés előtt, akár azzal egyidejűleg végbemehet.

Az egyensúly jobbra tolódik, ha akár csak egy szubsztrátot már megkötött „eddig-csupa-T” létrejött. A 2.88. ábrán mutatott mechanizmusban itt is a nyíl jelenti a legvalószínűbb átalakulási irányt.

Aktivátor hatása ugyanolyan, mintha S kötődne, azaz elősegíti a jobb S-kötést (noha persze az a protein másik kötőhelyére kapcsolódik) míg az inhibitorhatást úgy kell elképzelni, hogy még rigidebbé teszi a T alakot, azaz megnehezíti az R-ré konformálódás folyamatát.

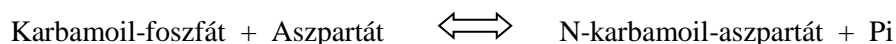


2.88. ábra: Koshland–Némethy–Filmer-modell

A negatív S-kooperativitás ritka, de előfordul, ezt a M–W–C-modell nem képes megmagyarázni, míg az utóbbi igen. Ez azt sugallja, hogy az utóbbi jobb modell, de ennek az ellenkezőjére is vannak bizonyítékok. Ugyanakkor van annak is bizonyítéka, mintha a két modell valamiféle vegyülete lenne, igaz pl. ez a helyzet a **hemoglobin** esetében.

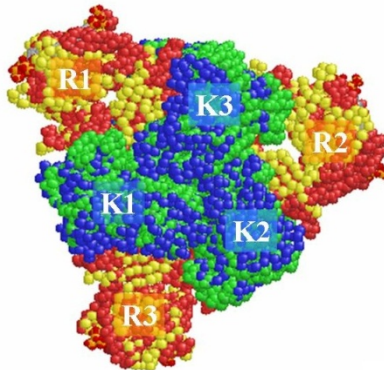
2.9.7. Az allostéria példái

Egy rendkívül komplex allostérikus enzim az aszpartát transzkarbamoiláz (ATCáz) (=karbamoiltranszferáz), amely a pirimidin-bioszintézisban játszik jelentős szerepet, és a következő reakciót katalizálja:



Az *E. coli*-ből izolált ilyen enzim nem kevesebb mint 12 alegységből épül fel. Két katalitikus komponense van, amelyek mindegyike 3 azonos alegységből áll. Ezenkívül három regulációs komponense van, amelyek mindegyike további két alegységből épül fel (2.88. ábra).

A komplex enzim **pozitív homotróp kooperativitást**, allosztériát mutat mindkét megkötendő szubsztrát tekintetében. Az **ATP heterotróp aktivátor**, míg a **CTP ugyancsak heterotróp inhibitoroként** viselkedik. A katalitikus és regulátor komponensek elválaszthatóak egymástól, a katalitikus magában is enzimeként viselkedik, azaz katalizálja a reakciót, de nem allosztérikus: nem mutat S-kooperativitást. A regulátor egységek természetesen nem katalizálnak, de inhibitor (CTP), illetve aktivátor (ATP) megkötésére képesek.



2.89. ábra: ATCáz negyedleges szerkezete

Az enzim szerkezete a <http://www.pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1ROB&bionumber=1> webhelyen megtalálható.

Másik példaként a (klasszikus definíció értelmében) nem enzimatulajdonságú hemoglobinnak a viselkedését érdemes tanulmányozni.

A hemoglobin a mioglobinnal együtt az emlősök O_2 -ellátásában, előbbi az oxigén felvételében és a szövetekbe szállításában és leadásában, utóbbi pedig az izomban az O_2 raktározásában/leadásában játszik szerepet. A Hb allosztérikus, míg a mioglobin nem allosztérikus enzim.

A hemoglobin szerkezetét két ekvivalens α és ugyancsak két β lánc építi fel, amelyek mindegyikében O_2 -kötő **hem**-csoport található. Az oxigénkötés mechanizmusát magyarázó, az allosztéria mibenlétét megvilágító két ismertett modell éppen a hemoglobinnal kapcsolatban vezették be. Egy animáción (2.9. animáció) mutatjuk be a hemoglobinnak a tárgyalt szimmetriamodell szerinti allosztérikus viselkedését. Valójában a két modell valamiféle egyesítése írja le leghitelesebben a hemoglobin allosztérikus viselkedését.¹⁰



2.9. animáció: Szimmetriamodell – oxigén

A hemoglobin nemcsak az oxigént, de a CO_2 -ot és a H^+ -t is szállítja: ezek szövetekben keletkezett mennyiségének mintegy 20%-át a Hb szállítja, előbbi a tüdőbe, utóbbi a vesébe juttatja. E szállításon kívül ráadásul ezek *heterotróp effektorok* is az oxigén kötődésére nézve: **amikor a CO_2 , illetve H^+ koncentrációja relatíve magas a szövetben, akkor kötődésük a Hb-hoz annak T állapotát segíti elő, azaz affinitása az O_2 -hez kisebb lesz, oxigént ad le a szövetben (épp erre van ilyenkor**

¹⁰ Részletek a Biokémia tankönyvekben, pl. Voet és Voet: Biochemistry, J. Wiley and Sons, Inc, 1995.

szükség). A tüdőben viszont, ahol a CO₂-tenzió kisebb (csökken), CO₂-leadás történik a Hb-ből. Ez nemcsak csökkenti a CO₂ és a H⁺ koncentrációját, de el is tolja a Hb konformációját R irányba, ami nagyobb affinitású állapot az O₂-re nézve, azaz a tüdőben az oxigénmegkötés erős lesz. Ez az ún. Bohr-effektus, a CO₂ és a H⁺ pedig negatív effektorok.

Mindkettő máshova kötődik a fehérjén: a H⁺ a His146 aminosavhoz, azaz a β alegység C-terminálisához kötődik, és ez a kötődés egy a T állapotot stabilizáló sóhidat hoz létre. Ezzel szemben a CO₂ pedig az N-terminális aminos csoportjához kötődik valamennyi alegységen, és egy karbamino-származékot hoz létre [R-NH₂ + CO₂ ↔ R-NH-COO⁻], azaz negatív töltés alakul ki a N-terminálison, ami újabb sóhidakat tud létrehozni, s így ugyancsak stabilizálja a T konformációt.

Összefoglalásként és szerzett tudásunk ellenőrzéseképpen tekintsük meg a 2.10. interaktív animációt.



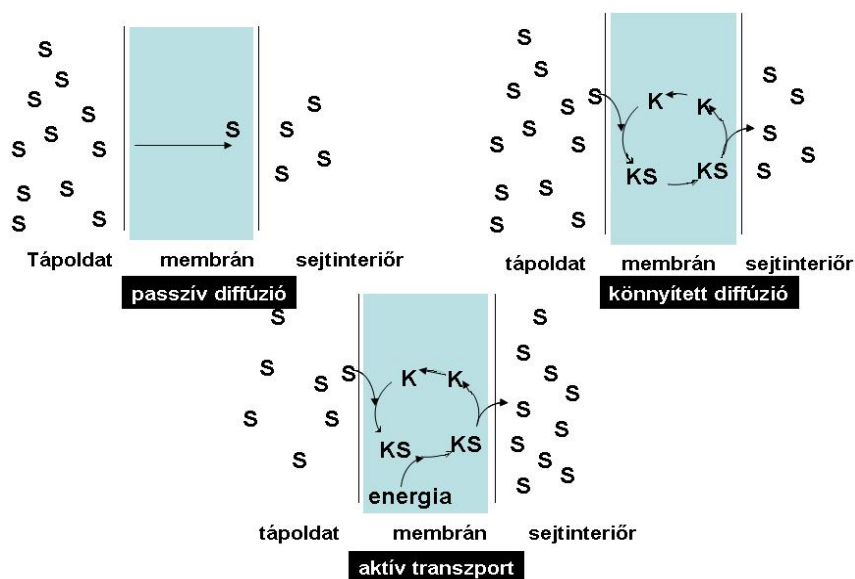
2.10. animáció: Önellenőrzés: allosztérikus enzimek

2.10. Transzportfolyamatok kinetikája

Ionoknak és töltéssel nem rendelkező molekuláknak a szabályozott átvitele a sejtekbe, és ugyanígy az anyagcseretermékeknek a sejtekből a környezetbe irányuló transzportja alapvető fontosságú a sejtműködés szempontjából.

A transzportfolyamatok biztosítják a sejtek számára a környezettel megvalósuló anyagcsere-folyamatok lehetőségét: a tápanyagok felvételét és az anyagcsere termékeinek a leadását. E folyamatok tartják fenn a sejttösszetételt, a kiegyensúlyozott belső ozmotikus viszonyokat, sejten belüli pH-értékeket a különböző kompartmentekben, a transzport szabályozza a sejtek térfogatát, és így tovább.

A sejtekbe irányuló anyagtranszportnak alapvetően három fő lehetősége ismert, a passzív diffúzió és a szintén passzív hordozós vagy könnyített (facilitált) transzport, amely esetekben a transzport-folyamat iránya megegyezik a koncentrációgradiens irányával, és végül az aktív transzport és a csoportátvitel, amelynél az anyagáram koncentrációgradiens ellenében is történhet. E folyamatokat összefoglalóan és sematikus szemlélteti a 2.89. ábra.



2.90. ábra: A transzportfolyamatok fajtái

Összefoglalóan a transzport fajtái a következők:

1. Passzív diffúzió – nem igényel energiát
2. (Passzív) könnyített diffúzió: fehérjekatalizált és nem igényel energiát
3. Aktív transzport: fehérjekatalizált és energiát igényel
 - direkt v. primer aktív transzport (pumpa)
 - indirekt v. másodlagos aktív transzport (kotranszport)

Az alábbi táblázat néhány szubsztrát- és metabolittermék baktériumok és gombasejtekbe/-ből történő transzportjának megvalósulási módját mutatja. Láthatóan a két mikrobacsoportba a legtöbb anyag hasonlóképpen transzportálódik, a cukrok kivételével, amelyek a baktériumokba aktív, míg a gombákba passzív transzporttal kerülnek be.

2.12. táblázat: Szubsztrátok és termékek transzportja sejtekbe, sejtekből

Vegyület	Baktériumok	Gombák
aminosavak	aktív transzport (AT)	AT
glükóz	AT (foszfotranszferáz és permeáz)	könnyített diffúzió és AT
laktóz	AT foszfotranszferáz és permeáz)	könnyített diffúzió és AT
glicerin	diffúzió és könnyített diffúzió	diffúzió és könnyített diffúzió
etanol	diffúzió	diffúzió
tejsav	AT és diffúzió	diffúzió
ecetsav	diffúzió	diffúzió
szén-dioxid	diffúzió	diffúzió
oxigén	diffúzió	diffúzió
víz	diffúzió	diffúzió

2.10.1. Passzív diffúzió

A sejteket körülölelő citoplazmamembrán és a sejten belüli membránszerkezetek (mitokondrium, endoplazmatikus retikulum, Golgi-készülék, vakuolumok) mind megannyi transzportgátat jelentenek a különböző molekulák számára, elsősorban lipid-kettősréteg szerkezetük miatt. E lipid-kettősrétegek viszonylag könnyen átjárhatók a töltéssel nem rendelkező molekulák számára, míg az ionok, illetve egyéb töltéssel rendelkező molekulák transzportja a lipidmembránon keresztül igen lassú, gyakorlatilag zérus sebességű.

Azt találták, hogy közelítőleg lineáris összefüggés van a különböző molekulák membránon keresztül történő transzportját jellemző *permeabilitási koefficiens* és az adott anyagnak a lipidben és vízben mérhető megoszlási hányadosa, illetve oldhatósága között. A membránra vonatkoztatott megoszlási hányados

$$K^* = \frac{c_m}{c_{\text{víz}}}, \quad (2.84)$$

amelyben az \underline{m} index a membránra utal. A permeabilitási koefficiens a következőképpen számítható:

$$P = \frac{DK^*}{x}, \quad (2.85)$$

ahol D az adott anyag membránban mérhető diffúziós állandója (cm^2/s),
 x a membrán vastagsága (cm).

A P permeabilitást gyakran alkalmazzák a tömegátadás számítására. Néhány értéket Collander (1949) *Chara ceratophylla* növényi sejteire mért értékeiből a következő táblázat tartalmaz.

2.13. táblázat: Molekulák permeabilitásioefficiensei és megoszlási hányadosai.
A megoszlási hányadosokat olivaolajban mérték (Nielsen–Villadsen: Bioreaction Engineering Principles, Table2.3)

Vegyület	Permeabilitási koefficiens(P) cm.s ⁻¹	Megoszlási hányados (K*)
szén-dioxid	0,45	
bikarbonát	5,0·10 ⁻⁷	
víz	6,6·10 ⁻⁴	
karbamid	2,8·10 ⁻⁷	1,51·10 ⁻⁴
metanol	2,5·10 ⁻⁴	
etanol	1,4·10 ⁻⁴	
etándiol	1,7·10 ⁻⁵	4,9·10 ⁻⁴
1,2-propándiol		1,71·10 ⁻³
1,4-butándiol		2,1·10 ⁻³
hangyasav		1,51·10 ⁻²
ecetsav		3,0·10 ⁻²
propionsav		1,51·10 ⁻¹
vajsav		4,4·10 ⁻¹
acetamid	1,4·10 ⁻⁵	8,3·10 ⁻⁴
formamid	2,01·10 ⁻⁵	7,6·10 ⁻⁴
laktamid	1,5·10 ⁻⁶	
butiramid	5,0·10 ⁻⁵	
glükóz	5,0·10 ⁻⁸	
glicerin	2,0·10 ⁻⁷	7,0·10 ⁻⁵

Kísérleti adatok hiányában szokták az alábbi egyenletet is alkalmazni P becslésére:

$$P\sqrt{M} = 0,028K_{\text{olaj}}^* \quad (2.86)$$

Ebben az egyenletben az olaj itt is olivaolajat jelent, és M az adott anyag móltömege.

Diffúzív anyagtranszportot feltételezve a membránon átmenő anyagáram a következőképpen írható fel a Fick I. törvény szerint:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{AP}{V}(c_e - c_i) = \frac{ADK^*}{V_X}(c_e - c_i) \quad (2.87)$$

Ahol c_i és c_e sorrendben a belső és a sejten kívüli koncentráció (interiőr, exteriőr)

A a sejt CM-ral határolt külső felülete (cm²)

V a sejtterfogat (cm³), azaz A/V a sejtek fajlagos felülete (cm⁻¹)

P a permeabilitási koefficiens (cm s⁻¹)

A differenciálegyenlet megoldása a változók szétválasztásával lehetséges, feltételezve, hogy a sejten kívüli c_e állandó (ami megtehető, hiszen pl. a tápközeg egy végtelen nagy forrás az egy sejthez képest):

$$\ln \frac{c_e - c_{i0}}{c_e - c_i} = \frac{AP}{V} t \quad (2.88a)$$

vagy

$$c_i = c_e \left(1 - e^{-\frac{AP}{V} t} \right) + c_{i0} e^{-\frac{AP}{V} t} \quad (2.88b)$$

Ha a kezdeti feltétel $c_{i0} = 0$, akkor ez az egyenlet egyszerűsödik:

$$c_i = c_e \left(1 - e^{-\frac{AP}{V}t} \right), \quad (2.89)$$

ami azt mutatja, hogy az egyszerű diffúzív transzportnál a végtelen időben elérhető egyensúlyi állapotban a külső és a belső koncentráció egyenlővé válik.

A P permeabilitási állandó és a megoszlási hányados közötti fenti összefüggést tulajdonképpen úgy kapjuk, ha a (2.87) egyenletet membránban végbemenő diffúziójára írjuk fel (szemben az eredő, membránon keresztül történő diffúzióval) és feltételezzük, hogy a külső vizes fázis és a membrán, valamint a belső vizes fázis és a membrán között megoszlási egyensúly van. Ezt megtehetjük, mert a sebességmeghatározó lépés a membránban történő anyagátadás.

A sejtinteriőrbe került szubsztrátmolekulák az anyagcserefolyamatok mentén enzimikus reakciókban továbbalakulnak intermedierekké. Ha a fenti képletben ezt is figyelembe vesszük, feltételezve, hogy az első ilyen reakciót egy egyszerű $M-M$ -kinetikát követő enzim katalizálja, akkor a sejt belüli szubsztrátkoncentráció változását a következőképpen írhatjuk fel:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{AP}{V}(c_e - c_i) - \frac{V_{\max}c_i}{K_s + c_i} \quad (2.90)$$

Állandósult állapotban (azaz, ha a bejövő anyag ugyanakkora sebességgel alakul át, mint amekkorával transzportálódik, és ez – lássuk be – az egyetlen lehetséges helyzet!), akkor ez az egyenlet c_i -re megoldható.

$$c_i = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}, \quad (2.91)$$

amelyben $a = PA/V$ $b = (PAK_s)/V + V_{\max} - c_e PA/V$ és $c = -(PAK_s c_e)/V$.

Egy sor anyag esetében a passzív diffúzió a jellemző transzportfolyamat. A víz, a molekuláris oxigén, a szén-dioxid, a szerves savak, és alkoholok ilyen módon jutnak be a sejtekbe, és ugyancsak így kerül a sejtekbe a legtöbb zsírolószerekben jól oldódó anyag.

A szerves savak disszociált formájukban gyakorlatilag oldhatatlanok a citoplazmamembránban, így koncentrációjukat a (2.89) és (2.90) egyenletben, azaz c_e -t és c_i -t ki kell cserélni a nem disszociált, ezért az átadásra egyedül képes formájuk koncentrációira:

$$c_{j\text{nemdisszoc}} = \left(K_A 10^{pH_j} + 1 \right)^{-1} \cdot c_i \quad j = e \text{ vagy } i \quad (2.92)$$

amelyben K_A az adott szerves sav disszociációs állandója, pH_j pedig az adott közeg pH -ja.

Mivel ez a pH a sejtben kívül és azon belül nem azonos (vagyis lehet, hogy sejtben belül kevésbé disszociált a sav), ezért még az is előfordulhat, hogy $c_i = c_e$ esetben is lesz a sejt belsejébe irányuló diffúzió. Ugyanakkor, mivel a membránba belépő nem disszociált forma eltolja a külső disszociációs egyensúlyt, így idővel minden savmolekula átjuthat a membránon (illetve a hajtóerő megszűntéig folytatódhat a transzport). Ennek az a következménye, hogy az egész előző disszociációra vonatkozó gondolatmenet „eldobható”.

A passzív diffúzív anyagtranszport hajtóereje a kémiai potenciál különbsége, amely az átmenő anyag koncentrációkülönbségében jelentkezik. E szabadenergiaváltozás

$$\Delta G = RT \ln \frac{c_i}{c_e}. \quad (2.93)$$

A transzport a nagyobb koncentráció felől a kisebb irányába történik.

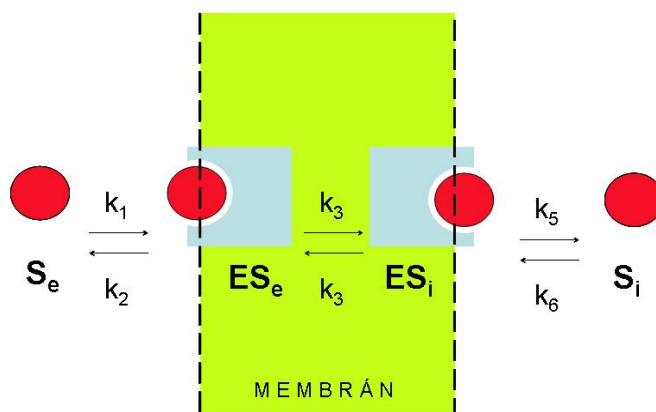
Láttuk, hogy az ionok és a töltéssel rendelkező molekulák nem tudnak átjutni a lipidmembránokon. Zsírban kevésbé oldódó anyagok, más szóval hidrofíl molekulák szintén nagy diffúziós gáttal szembesülnek, ezekre nézve a sejt membránjai gyakorlatilag impermeábilisek.

A szabadon nem diffundáló anyagok transzportját a természet más mechanizmusokkal, úgynevezett könnyített diffúzióval vagy más néven hordozós transzporttal, illetve az úgynevezett aktív transzporttal oldotta meg.

2.10.2. Könnyített diffúzió (hordozós transzport)

A könnyített vagy hordozós transzport olyan anyagátviteli mechanizmus, amelyben egy transzmembrán fehérje (emlékezzünk a fiziológiában tanultakra: ezeknek két fajtája van: a *karrierek* és a *csatornafehérjék*) a membrán külső oldalán felveszi, megköti az átviendő molekulát, majd a membrán belső oldalán leadja azt. A karrierek esetén az enzimnek nem kell helyváltoztatással mozognia a membránban, az anyagfelvételt és -leadást a fehérjekonformáció változása váltja ki, illetve követi. Mivel mind a külső, mind a belső membránoldalon létezik a karrier-célvegyület kapcsolat, így a folyamat végső soron reverzibilis, és eredő irányát a koncentrációgradiens határozza meg. Azaz a könnyített diffúzió is csak a nagyobb koncentráció felől a kisebb irányába képes működni. Látszólag olyan a folyamat, mintha a membrán belsejében diffúzió történnék és a diffúziós állandó jelentősen megnövekednék az így átszállított anyagra (=az enzim gyorsítja az átviteli „reakciót”). Mivel itt nem történik kémiai átalakulás a molekulán, ezért a karriereket nem is szoktuk az enzimfehérjékkel együtt tárgyalni, noha enzimként viselkednek, így kinetikájuk is enzimkinetika.

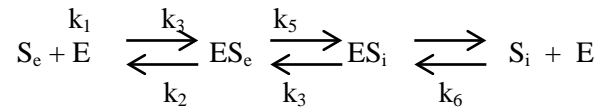
A könnyített diffúzió a tipikus átviteli folyamat a gombák esetében, ritkábban fordul elő a baktériumoknál. Az *E. coli* sejtjei például kizárólag a glicerint veszik fel könnyített diffúzióval. A gombáknál a legfontosabb ilyen módon átadott vegyületek: a glükóz és az egyéb szénhidrátok.



2.91. ábra: A könnyített diffúzió kinetikai sémája

Logikus, hogy a könnyített diffúzió kinetikája telítési jelenséget mutat, hiszen a membránban lévő karrier fehérjéknek véges szubsztrátkötő helyük van, csak akkor léphet szubsztrátmolekula a membránba, ha van a fehérjén szabad kötőhely. A 2.91. ábra jelöléseit alkalmazva, legyen a szabad karrier koncentrációja E , a külső térben a felveendő molekuláké S_e és ugyanez a sejten belül S_i . Tételezzük fel, hogy a karrier szimmetrikus, azaz $k_1 = k_6$ és $k_2 = k_5$, azaz a szubsztrát felvétele és a leadása is ugyanolyan sebességgel mehet mindkét oldalán a membránnak. Tételezzük fel továbbá, hogy a ligandum asszociációja a fehérjével és disszociációja arról sokkal gyorsabb, mint a membránon belüli átadás (ami nem egy valódi diffúzió, hanem pl. a karrier elfordulása vagy egyéb konformáció változása a szubsztrát felvétele és leadása hatására).

A szubsztrát felvétel és -leadás egyensúlyát a komplexek disszociációs állandóival lehet jellemezni: $K_s = k_2/k_1 = k_5/k_6$



Az egyensúlyok $k_1 \cdot S_e \cdot E = k_2 \cdot ES_e$ és $k_5 \cdot ES_i = k_6 \cdot S_i \cdot E$

A teljes anyagátadási fluxus $J = k_3 (ES_e - ES_i)$. Ebben az egyenletben vettük figyelembe azt, hogy a karrier-szubsztrát komplexek egymásba is átalakulhatnak, azaz ez a reakció is reverzibilis és ugyanaz a sebességi állandója mindkét irányban.

Figyelembe véve, hogy a karrier fehérje három állapotban lehet jelen, azaz az alábbi mérleg-egyenletet

$$ET = ESe + ESi + E = (Se/KS + Si / KS + 1)E, \quad (2.94)$$

a szabad karrier koncentrációja kifejezhető:

$$E = \frac{E_T K_S}{K_S + S_e + S_i} \quad (2.95)$$

Ezt a fluxust leíró egyenletbe helyettesítve a következő összefüggést kapjuk a transzportra:

$$J = \frac{k_3 E_T}{K_S + S_e + S_i} (S_e - S_i) = J_{\max} \frac{(S_e - S_i)}{K_S + S_e + S_i} \quad (2.96)$$

Vegyük észre, hogy ez tulajdonképpen két Michaelis–Menten-típusú összefüggés különbsége, amelyben $k_3 E_T = J_{\max}$ a legnagyobb lehetséges fluxust jelenti, azaz ha minden karrier szubsztrátkötött. Ez a transzportfajta is telítési jelenséget mutat tehát, és a zárójeles kifejezés előjele adja meg, hogy az anyagáram a sejtbe vagy a sejtől történik-e.

Ha a könnyített diffúziót katalizáló transzportfehérjék egy molekulát visznek át a membránon a fenti kinetika szerint, akkor *uniporter* fehérjéről beszélünk. Vannak azonban olyanok is, amelyek egyidejűleg egy másik anyagot is szállítanak, ezek a *kapcsolt transzporterek*, amelyet *szinport* esetén a transzportált és a kotranszportált molekulákat egyirányba, *antiport* esetén pedig ellenkező irányba szállítják.

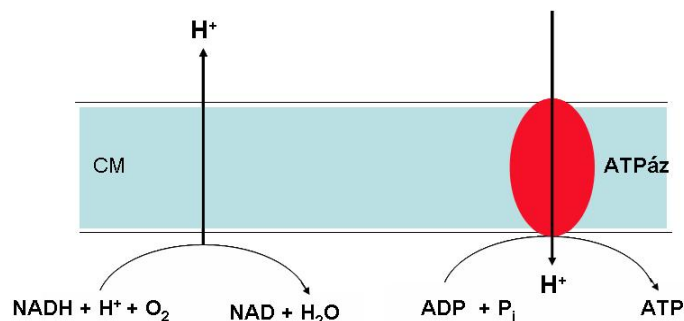
Ezek a kategóriák mind a könnyített, mind az aktív transzport esetén léteznek, míg a könnyített transzport egy másik típusát jelentik a *csatornafehérjék*, amelyek csak passzív transzportot eredményeznek. Ezek működnek bizonyos ionoknak a membránokon keresztül történő átvitelében. Ha egy ion a külső térből bekerül a csatornafehérjébe, a csatorna „nyílása” bezár, és nem engedi meg újabb ion bekerülését a kialakuló elektrosztatikus taszítás miatt. Csak ha a belső oldalon az ion elhagyja a csatornát, akkor képes az egy újabb ion befogadására. Ez így teljesen hasonló az egyéb karrier működéshez, azaz ez is telítési jelenséget mutat, és kinetikája megegyezik a fentivel.

2.10.3. Aktív transzport

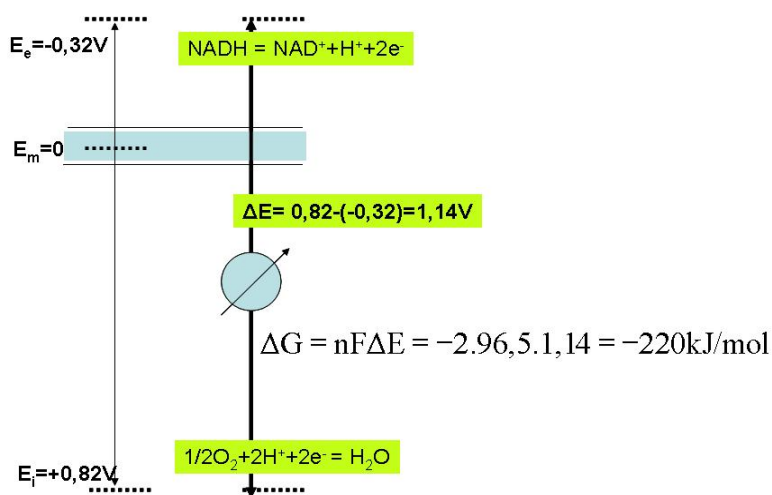
A **primer aktív transzport** fontos példája az oxidatív foszforilezés során történő protonátvitel.

Prokariótákban a protonok az extracelluláris térbe pumpálódnak ki a citoplazmamembránon keresztül, míg eukarióták esetében – mivel az oxidatív foszforilezés reakciói a mitokondriumban lokalizálódnak – a protonok a belső membránon át a külső és belső membrán közötti intramitokondriális térbe transzportálódnak. Mindkét esetben a NADH oxidációja során felszabaduló szabadenergia adja a hajtóerőt. A protonoknak a membránon történő kilépése a belső térből egy elektrokémiai potenciálkülönbséget hoz létre a belső és a külső tér között, ami avval jár, hogy ha a protonokat visszashállítjuk a belső térbe, akkor energia nyerhető. A protonok befelé irányuló átvitelét egy ATPáz mediálja, amely egyébként az $ADP \rightarrow ATP$ átalakulást is katalizálja (2.92 ábra). A protontranszport reverzibilis, azaz az ATPáz kifelé is képes a protonok szállítására ATP felhasználásával, ami tehát szintén egy primer aktív transzport folyamat. Az ATP-áz valójában egy F_0F_1 típusú proton ATP-áz v ATP szintáz, és elhelyezkedése a membránban speciális: F_1 része a cito-

plazmába nyúlik, míg F_0 része a membránhoz rögzül. (lásd biokémia és fiziológia tanulmányokat, kemoozmotikus elmélet). Az egész egy galvánelemhez hasonlítható a 2.93 ábra szerint. Ezen elektronátmenet ΔG -je a hajtóereje a protonpumpának, illetve az együttjáró ATP- képződésnek.

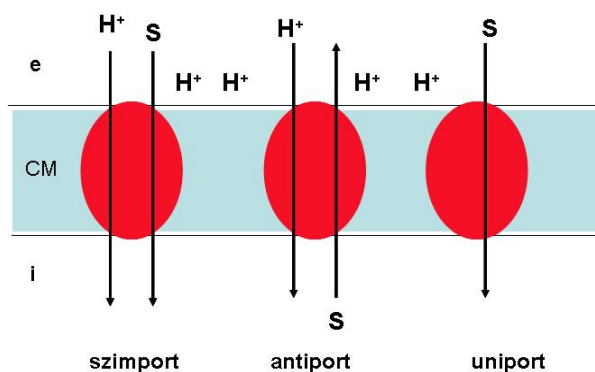


2.92. ábra: Proton aktív transzport és légzési lánc (kemiozmotikus elmélet)



2.93. ábra: A légzési lánc „galváneleme”

A **másodlagos aktív transzport** egy másik anyagnak a koncentrációgradiens irányába történő transzportját használja fel hajtóerőként. Ha a két anyag azonos irányba halad, akkor **szimport**ról, ha ellenkező irányba, akkor **antiport**ról beszélünk, míg ha ionok transzportjának elektrokémiai potenciál a hajtóereje, akkor **uniport** a folyamat neve. Gyakran a szekunder aktív transzport együtt jár a CM-on keresztül kialakuló pH-gradiens kialakulásával, és hogy a sejten belüli pH (az adott kompartmentben!) állandó maradjon, a fent említett ATP-áz által mediált protonpumpának kell működnie. Minthogy így végül is energia használódik fel, a teljes együttes transzport aktív transzportnak minősül.



2.94. ábra: A szekunder aktív transzport fajtái

A szekunder aktív transzportra példa a mikroorganizmusok cukorfelvétele az ún. permeáz emzimekkel, amikor is a cukor protonszimporttal jut a sejtek belsejébe. Ilyen, igen jól ismert transzportrendszer a laktóz diszaharidnak *E. coli*-ba történő transzportja a laktóz permeázzal, ahol 1:1 átvitt laktóz:bepumpált proton arányt találtak. Más cukrok, ill. mikrobák esetén a sztöchiometria nem ilyen szigorú.

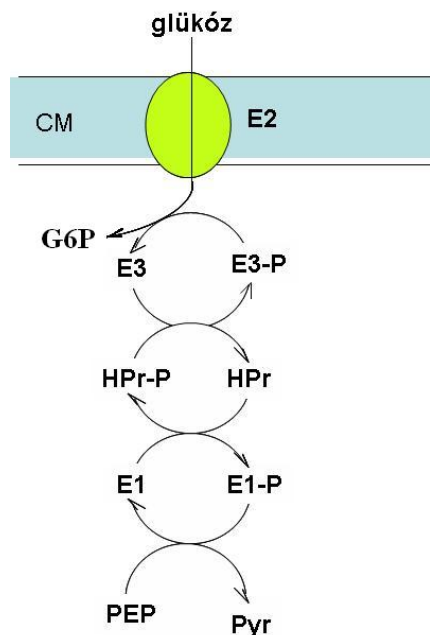
Az aktív transzport harmadik fajtája a **csoport-transzlokáció, amelynek** jellegzetessége az, hogy a folyamat az átvitt anyagnak a transzporttal együtt járó enzimes átalakulásával történik. Erre a legismertebb példa a foszfortranszferáz rendszer, amelyet sok baktérium használ a különböző cukrok felvételére.

Ilyen rendszer megtalálható mind a Gram+ mind a Gram⁻ baktériumokban, elsősorban azokban, amelyek az EMP utat használják hexóz katabolizmusuk számára. A rendszert legalább négyféle citoplazmás, illetve membránkötött enzim építi fel, amelyekből három mind foszforilált, mind nem foszforilált állapotban létezhet.

A 2.95. ábrán látható E1 (amely pl. *E. coli*-ban egy 9600 Dalton-móltömegű fehérje) és egy hőstabilis fehérje, a HPr (heat-stable protein) valamennyi cukor transzportja esetében azonos, tehát nem szubsztrátspecifikusak. A PEP nagy energiájú foszfátsoportját az E1 veszi át, azaz először ez foszforileződik, majd e foszforilezett E1-P foszforilezi a HPr-t. A további részt vevő enzimek szubsztrátspecifikusak, azaz mindegyik transzportálandó hexóz esetében más és más enzimek vesznek részt a folyamatban.

A foszforilált E3-P foszfátsoportja foszforilezi a membránkötött karrier protein, E2 által a citoplazmamembrán belső oldalára „szállított” cukrot, pl. a glükózt. Az ily módon nyert G6P-ban tehát a transzportba befektetett energia konzerválódik, így ez az aktív glükóztranszport energetikailag kedvezőbb, mint a könnyített transzportja a glükóznak (ui. ehhez nem kell koncentrációgradiens!). Ez a foszfortranszferáz rendszer igen nagy szubsztrátfelvételi sebességet tud biztosítani a más cukorfelvételi rendszerekkel szemben. Ez magyarázza, hogy miért éppen a fermentatív baktériumok domináns cukorátviteli rendszere ez: mivel csak az EMP során nyernek (anaerob módon) energiát, lényegesen nagyobb cukorfluxusra van szükségük, mint aerob társaiknak. Megjegyezzük, hogy pl. a glükózra specifikus E3-nak regulációs szerepe is van a glükóznak a preferálásában más cukrok felvételével szemben.

A szigorúan aerob baktériumoknál (pl. *Azotobacter*) nincs foszfortranszferáz rendszer, ugyanígy az élesztőknél és a fonális gombáknál sem ez a cukortranszport módja.



2.95. ábra: Specifikus glükóztranszport foszfortranszferáz rendszerrel

3. BIOKONVERZIÓK, BIOTRANSZFORMÁCIÓK

A mikroorganizmusok (valamint a mesterségesen tenyésztett növényi és állati sejtek, szövetek) bioszintetikus aktivitásukat technológiai célra két különböző módon fejthetik ki, amint azt az 1.22. ábrán összefoglaltuk. **De novo szintézisek:** megfelelő tápoldatban elszaporítva a mikroorganizmusok anyagcseréjük során az egyszerű tápanyagok felhasználásával a legváltozatosabb intra- és extracelluláris anyagcseretermékeket képesek előállítani. E kategóriába sorolhatók az úgynevezett fermentációs eljárások: a legegyszerűbb primer anyagcseretermékek előállításától a bonyolultabb szekunder anyagcseretermékeken át a modern géntechnikai eljárásokkal előállított sejtekkel operáló fermentációs eljárásokig. Ezekben az esetekben a sejtek teljes biokémiai potenciálját használjuk ki, a sejtek mintegy a növekedés/szaporodás „melléktermékeként” állítják elő a számunkra hasznos terméket. A másik esetben ezzel szemben a nem szaporodó sejtek vagy azok részei, alkalmasint csak egy-egy sejtől kipreparált enzim *mintegy katalizátorként* alakítanak át egy jól definiált vegyületet egy másikká. Ez a **biotranszformáció** vagy **biokonverzió**.

E fejezetben az utóbbi típusú, főként mikroorganizmusok vagy enzimeik által katalizált átalakításokkal foglalkozunk, zömmel olyanokkal, amelyeknek van vagy lehet ipari jelentőségük is. A két kategória között van természetesen olyan is, amely mindkét definíció jellemzőit tartalmazza, de egyiknek sem felel meg teljes mértékben (lásd pl. a szorbózfermentációt, amely *de novo* fermentáció, ugyanakkor gyakorlatilag egy biokonverzió is).

Az utóbbi évtizedekben hallatlanul megnőtt a biotranszformációk jelentősége, mivel sok előnnyel rendelkeznek a tisztán szerves kémiai szintézisekkel szemben, illetve rájöttek arra, hogy a mikrobiológiai, illetve enzimes transzformációk egy új eszköztárat jelentenek a szerves kémikusok kezében. Egy 2000-ben készült felmérés szerint legalább 130 ipari biotranszformációs eljárás ismert.¹¹

A biotranszformációk gyakorlatilag lefedik a legfontosabb reakciótípusokat („majdnem mindent meg lehet csinálni” mikrobákkal vagy enzimeikkel), erről összefoglaló képet nyújt a 3.1. táblázat.

3.1. táblázat: Mikrobákkal és enzimeikkel végezhető kémiai átalakítások

REAKCIÓTÍPUS	ENZIMCSOPORT	REAKCIÓK
Oxidációk és redukciók	EC 1.	hidroxilálás, dehidroxilezés, epoxidálás, C-C kötés hidrogénezése és dehidrogénezése, alkoholok, aldehidek oxidációja, alkil-, karboxialkil-, ketoalkil- láncok oxidatív lebontása, szubsztituensek oxidatív eltávolítása, oxidatív dezaminálás, oxidatív gyűrűfelnyitás, szerves savak, aldehidek, ketonok redukciója, heterofunkciós csoportok redukálása, szubsztituensek reduktív eliminálása
Hidrolízis	EC 3.	észterek, aminok, amidok, laktonok, éterek, laktámok hidrolízise
Izomerizáció	EC 5.	kettős kötés és oxigéntartalmú csoport áthelyezés, racemizálás, intramolekuláris átrendeződés
Kondenzáció	EC 2. EC 4.	dehidratálás, O- és N-acilezés, glikozilezés, észterezés, laktonizáció, aminálás
Új kötés létrehozása	EC 6.	C-C-, C-O-, C-P-, C-N-kötések kialakítása

¹¹ A. J. J. Straathof et al.:The production of fine chemicals by biotransformations, Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13 548.

A biotranszformációk az enzimes reakciók általános tulajdonságaival jellemezhetők:

Szubsztrát- és reakcióspecifitás: a katalitikus aktivitás rendszerint csak egy meghatározott szubsztrátra és reakció típusra korlátozódik, ami azt jelenti, hogy mellékreakciók általában nincsenek (legalábbis ha egy enzim van csak jelen).

Régióspecifitás: a szubsztrátmolekulának rendszerint egy meghatározott helyén történik az enzimes támadás (lásd később pl. a Bertrand-szabályt).

Sztereospecifitás: Az enzim aktív centruma aszimmetrikus környezetet biztosít a szubsztrát-kapcsolódáshoz, ami lehetővé teszi számára az enantiomerek felismerését, azaz egy adott enzim csak az adott enantiomer átalakítását végzi el (pl. aszimmetrikus hidrolízis), vagy új királis centrum létrehozása esetén csak az egyik enantiomer fog keletkezni (aszimmetrikus szintézis).

A *kirotechnológia* a szerves kémikusoknak optikailag aktív tiszta enantiomerek előállítására felhasználható eszköztárának egyike, mintegy kiegészítője a természetből történő tiszta enantiomer izolálásának (pl. a *de novo* aminosav fermentációnak). Ma a gyógyszeriparban alkalmazott biotranszformációk esetén a termék végső jellemző [enantiomerfeleslege](#) rendszerint eléri a (ee_R vagy ee_S) 99–99,9 értéket.

A biokonverziókat, biotranszformációkat **enyhe reakciókörülmények** jellemzik. Az aktiválási energiát az enzim nagymértékben csökkenti (ez az enzimhatás alapja), így a reakció viszonylag alacsony hőmérsékleten (az esetek többségében 40 °C alatt) is nagy sebességgel megy végbe. Ugyanakkor az optimális pH is a semleges, enyhén savas vagy enyhén lúgos tartományba esik. Következésképpen még labilis, könnyen bomló molekulák reakciói is levezethetők.

A biotranszformációk több mint felét *proteázokkal, észterázokkal és lipázokkal* hajtják végre, aminek egyrészt az az oka, hogy ezek a legkönnyebben hozzáférhető olcsó, iparilag előállított enzimek, másrészt nincs kofaktorigényük. Utóbbi igen nagy előny, hiszen a oxidációs/redukciós biotranszformációk esetén rendszerint NADH ill. NADPH mint kofaktorok szerepelnek, az új kötések létrehozása pedig ATP-felhasználással jár együtt és ezeknek a regenerálásáról is gondoskodni kell. Noha ez – mint látni fogjuk – megvalósítható, mégis ez az oka annak, hogy az oxidációs redukciós átalakítások zömét ma még teljes sejtes (fermentációs, illetve nyugvó sejtes) körülmények között végzik. Ugyanígy az oxigén- illetve hidroxilcsoport bevitelle hasonló okokból főképp teljes sejtes rendszerekben megy végbe.

A biotranszformációk végrehajtásakor az átalakítást végző enzim lehet a sejt része vagy kinyert tisztított enzim is. Eszerint a következő, technikai kivétel és bonyolultság, valamint nem utolsó sorban költségek tekintetében eltérő rendszereket használnak:

Biotranszformáció növekedő sejtekkel: Ez tulajdonképpen speciális fermentációs technika, ahol az átalakítandó szubsztrát igen nagy része konvertálódik terméké, miközben a mikrobatömeg is növekedik. Ilyenek az ecetgyártás, szorbózfermentáció, glükonsav-fermentáció stb.

Konverzió nyugvó sejtekkel: Ekkor növekedés nincs, a közeg vagy hiányos tápoldat (például nem tartalmaz nitrogénforrást) vagy csak egy puffer. Ily módon például a szorbit→szorbóz átalakítás is elvégezhető. Speciális esetnek tekinthető az, amikor gomba-konidiospórákkal végeznek transzformációkat (szteroidok, zsírsavak, trigliceridek átalakítása): néha éppen a konídiumok csírázása közben aktiválódnak, szintetizálódnak azok az enzimek, amelyek a kívánt átalakítást katalizálják. (2000-ben az ipari biotranszformációknak mintegy 20%-át hajtották végre növekvő sejtekkel, illetve nyugvó sejtekkel)

Biokonverziók rögzített sejtekkel: Példaként az almasav előállítását említjük fumársavból karragénban rögzített *Brevibacterium*mal, vagy a kortizonnak alginátban rögzített *Arthrobacter simplex* sejtekkel való átalakítását prednizolonná. Ez a módszer is működhet szaporodó és nyugvó sejtekkel is. (12%)

Biotranszformációk tisztított enzimekkel vizes rendszerben, akár oldott, akár rögzített enzimekkel. Ez a klasszikus enzimes technológiák esete. (Oldott enzimekkel 20%, míg rögzítettekkel szintén 20%-a az eljárásoknak)

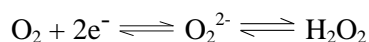
Biotranszformációk fázisrendszerekben enzimekkel Egymással nem elegyedő többfázisú vizes rendszerekben történik ilyenkor a biokonverzió, s a fázisrendszer a szubsztrát „adagolását”, illetve a termék elválasztását teszi lehetővé integrált rendszerben.

Biotranszformációk szerves fázisban A szerves fázisú biokonverziót ma már előszeretettel alkalmazzák, mivel sokszor a szerves fázisban kedvező irányba változik a reakció egyensúlyi állandója. Erről a legutóbbi időkig azt tartották, hogy valójában a szerves fázisban is nagy szerepe van az akárcsak még oly csekély mértékben jelen lévő víznek (hiszen klasszikus enzimvilágképünk azt tanítja, hogy az enzimek vizes fázisban működnek), mára viszont bebizonyosodott, hogy teljesen vízmentes közegben is működhetnek enzimek. Ekkor nagy valószínűséggel jelentősen megváltoznak az enzim katalitikus tulajdonságai: régió- és sztereospecifitása és az ezekből következő szelektivitások.

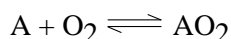
3.1. Oxidációs/Redukciós biotranszformációk

Biológiai oxidációkban az O_2 mint végső elektronakceptor működhet vagy közvetlenül belép a szerves molekulába. Az oxigénnel reagálni képes enzimek három csoportjának van ipari jelentősége:

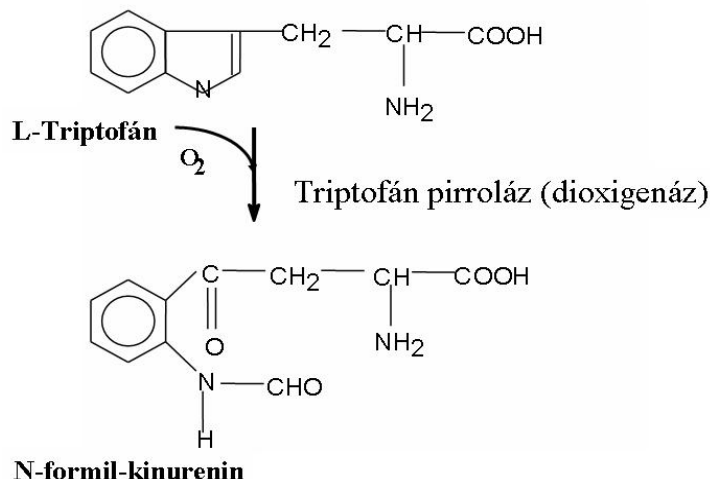
EC 1.1.3. Oxidázok vagy elektrontranszferázok (például glükóz-oxidáz), a katalizált reakció a következő:



EC 1.13. Dioxigenázok vagy oxigéntranszferázok (például triptofán-pirroláz):

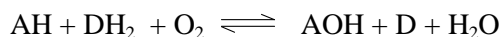


A dioxigenázoknak elsősorban az oxidációs gyűrűfelnyitási reakcióknál van jelentőségük (pl. a triptofán→N-formil-kinurenin triptofán-pirroláz által katalizált reakciónál, amely a Trp-lebontás és egyszersmind a NAD-szintézis első lépése).



3.1. ábra: Triptofán pirroláz reakciója

EC 1.13. Monooxigenázok vagy hidroxilázok (például szteroid hidroxilázok):



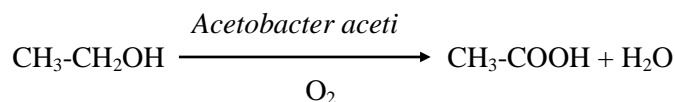
Ennél az oxidációnál egy koreduktáns (DH_2) anyagra is szükség van, ami általában a redukált NADP-koenzim szokott lenni.

EC 1.1.1. Dehidrogenázok Ezek az enzimek nem reagálnak közvetlenül az oxigénnel, az oxidációt (redukciót) a NAD, illetve NADH (vagy FAD, FADH)-koszubsztrátok redukciója, illetve oxidációja kíséri. Valójában H-eltávolításról van szó, amely hidrogén elektronja az aerobok terminális

oxidációja során regenerálódik élő sejtek esetében, enzimes folyamatoknál pedig külön kapcsolt reakcióval kell gondoskodni a koenzim regenerálásáról.

3.1.1. Primer alkoholok oxidációja

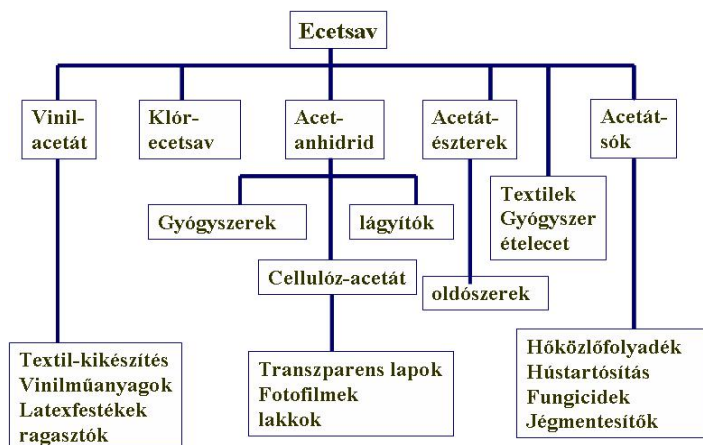
A nagyszámú átalakítási lehetőség közül itt csak az **etanol** konverzióját említjük meg ecetsavvá. Bizonyos baktériumok, az ún. ecetsav-baktériumok (*Acetobacterek*) az etanolt ecetsavvá képesek oxidálni:



Az *Acetobacter*-félék két csoportba sorolhatók: az első csoportba tartozó baktériumtörzsek (pl. az *Acetobacter peroxydans*) a képződött ecetsavat túloxidálják CO₂-dá és vízzé. A másik csoport tagjai erre a túloxidációra nem képesek, illetve ez a folyamat elhanyagolhatóan lassú, így ezen baktériumokkal az etanolt jó konverziós határfokkal lehet ecetsavvá oxidálni. Ez a reakció az alapja az ipari, (mikro)biológiai ecetsavgyártásának.

Az ecetsav előállításának története az ókorba nyúlik vissza. A levegőn hagyott bor felületén hártya képződik és megecetesedik. Ezt a „bioecetet” kellően hígítva vízzel az ókorban üdítőitalként használták. A 14. századi ún. orléans-i eljárásban fakádakat alkalmaztak (sőt ma is alkalmaznak), amelyeket borral töltöttek meg. Ennek felületén alakult ki a biotranszformációt végző baktériumhártya. Az eljárás természetesen igen lassú, de igen ízletes ecetet szolgáltat. A 19. század elején alakult ki az ún. generátor (vagy német, vagy gyors) eljárás, amelynél a biokonverziót végző baktériumok egy oszlopban porózus hordozóhoz tapadnak (bükkforgácshoz), és ezen csurgatják keresztül az alkoholt (felhígított állapotban), illetve alulról átfúvatással levegőztetik. Napjainkban még mindig sokfelé használják ezt a módszert ecetgyártásra, ugyanakkor folyamatosan szorul ki és terjed el helyette a [szubmerz eljárás](#). Mindezekkel a módszerekkel az ún. bioecet készül, amely azonban ma csak körülbelül a teljes ecetgyártási kapacitás 10%-át teszi ki, bár vannak országok, ahol élelmiszer célra kizárólag bioecet használható.

A mikroorganizmustörzsek az optimális oxidációhoz nagymennyiségű oxigént igényelnek. Ha ez nincs jelen a közegben megfelelő mennyiségben, akkor a sejtek a nagy etanol- és ecetsavkoncentráció miatt elpusztulnak. Például 5% összkoncentráció mellett a levegőztetés megszűnése után két perccel a baktériumok 34%-a elpusztul; ha az összkoncentráció 12%, akkor ugyanez az elhalási arány 10–20 másodperc alatt bekövetkezik. Ezért nem dolgoznak az ecetsavüzemek nagy szubsztrát-koncentrációval, ezt az úgynevezett [rátáplálós szakaszos \(fed batch\)](#) tenyésztési módszerrel érik el, és ezért ügyelnek az ilyen üzemben a folyamatos oxigénellátásra fokozott mértékben! A modern szubmerz eljárásokkal ilyen technika alkalmazásával akár 19-20% ecetsav végtiter is elérhető, miközben az alkoholkoncentráció sohasem megy 2-3% fölé, és az eljárás [produktivitása](#) meghaladhatja a 10-11 g/m³h értéket is.

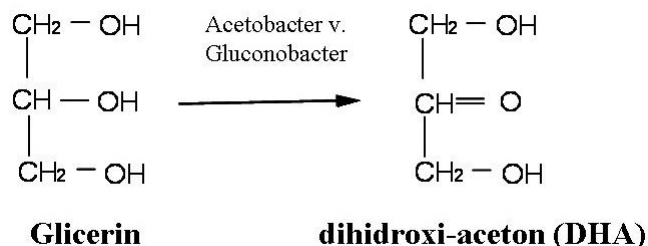


3.2. ábra: Az ecetsav mint a fehér biotechnológia platform vegyülete

Ma az ecetsavról mint a fehér biotechnológia egyik lehetséges C2-alapanyagáról, mint [platformalkotó vegyületről](#) beszélnek, mivel egy sor kémiai anyag állítható elő belőle a 3.2. ábra tanúsága szerint.

3.1.2. Szekunder alkoholok oxidációja

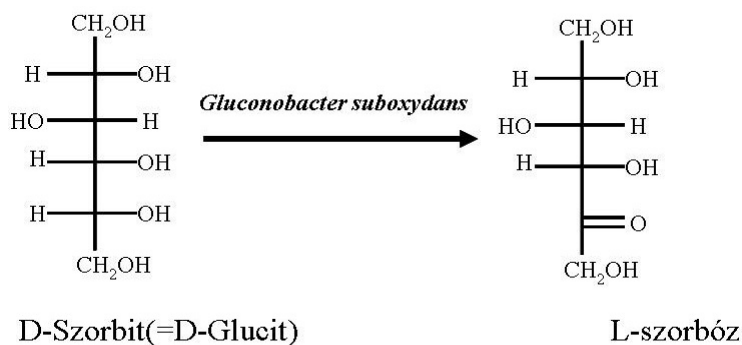
Gluconobacter suboxydans (régebbi neve *Acetobacter suboxydans*) a glicerint jó konverziós hatásokkal (95-96%) dihidroxi-acetonná (DHA) oxidálja szubmerz körülmények között. A DHA-t a kozmetikai ipar alkalmazza bőrbarnító szerként. Oxigénben dúsított levegő befúvatásával a fermentációs időt 33 órára sikerült rövidíteni *Gluconobacter melanogenus* törzs és 10%-os glicerindat esetén.



3.3. ábra: Glicerin oxidációja

Ugyancsak *Gluconobacter suboxydans* törzsszel lehet szorbitból szorbózt termelni. **Bertrand** már 1904-ben megállapította a *Gluconobacter*-félék specifikusságát a polialkoholok oxidációjánál. Eszerint ezek a baktériumok csak olyan szekunder hidroxilcsoportot képesek oxidálni, amelynek szomszédságában 2 cisz helyzetű alkoholos OH található. Ez volt az első világos megfogalmazása a biokémiai oxidációk szigorú specifikusságának, ezen belül is azok régióspecifikusságának.

A szorbit-szorbóz átalakításnak elsősorban a C-vitamin előállítása szempontjából van jelentősége.



3.4. ábra: Szorbit oxidációja

Reichstein 1934-ben hozta nyilvánosságra a szintetikus aszkorbinsav, a C-vitamin előállítási módját, amelyben az L-szorbóz az egyik közbenső termék. A Reichstein-szintézis során, amelynek sémáját a 3.4. és 3.5. ábra mutatja, a kiindulási anyag a D-glükóz, amelyet katalitikus hidrogénezéssel redukálnak szorbittá. Valójában a modern eljárásokban a valódi alapanyag egy enzimes (α -amiláz és glükóamiláz) hidrolízissel elbontott keményítőszörp, amelynek mintegy 98%-a glükóz (lásd a 3.7. alfejezetben a keményítő hidrolízisét). A következő lépés a D-szorbit régióspecifikus, tehát a Bertrand-szabálynak megfelelő dehidrogénezése, oxidációja L-szorbózzá. Ezt az átalakítást *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter* (vagy *Gluconobacter*) *suboxydans* törzsek képesek elvégezni.

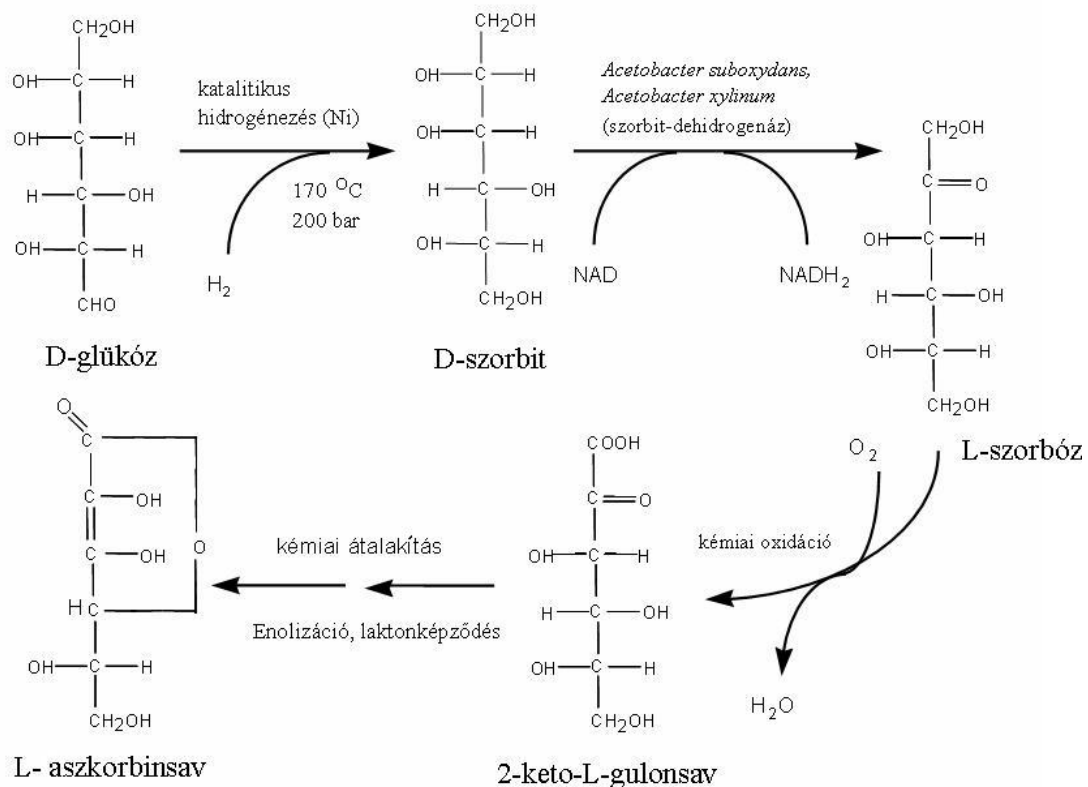
A fermentációhoz olyan törzseket alkalmaznak, amelyeket hozzászoktattak a közeg Ni-tartalmához, mivel a glükóz-szorbit redukciót Raney-nikkel katalizátorral végzik, és a mikrobák többsége érzékeny eme nehézfém jelenlétére.

A szorbózfermentációt az úgynevezett *rátáplálásos technológiával* (fed batch) végzik, 10–20% szorbitot és 0,1-0,5% nitrogénforrást (élesztőkivonatot és/vagy kukoricalekvárt) tartalmazó tápoldatot oltanak be a megfelelő *Acetobacter* törzs 5–10%-nyi oltóanyagával, majd 24 órás intenzív aerob szubmerz tenyésztés során a szorbitkoncentrációt rátáplálással úgy változtatják, hogy a fermentáció végére összesen mintegy 33–35% szorbit kerüljön a reaktorba. Olyan eljárás is ismert, ahol a szorbitvégtiter akár 50% -ra is felmehet. A 30–35 °C-on végzett fermentáció hatásfoka igen jó, 95% felett is lehet (nagyon kis mennyiségben D-fruktóz és 5-keto-D-fruktóz is megjelenik a fermentáléban).

E magas konverziót az teszi lehetővé (mint minden ilyen típusú mikrobiális oxidációnál!), hogy a mikrobák az energiát ebből az oxidációból fedezik. Egy-egy molekula oxidációjakor két H-atom kerül koenzimre, majd a légzési láncban regenerálódik ATP-termelés közben. Ez az ATP-nyereség a mikroba szempontjából az egész folyamat „értelme”. Új sejtanyag előállításához szinte nem is használja a mikroorganizmus a biokonvertálandó szubsztrátot, erre a célra az adagolt élesztőkivonatot vagy kukoricalekvár szolgál (lásd a [4.2.1. alfejezetet](#) is).

Iparilag is gazdaságos folytonos szorbózfermentációs technológiákat is kidolgoztak, valamint az *Acetobacter* nem szaporodó (tehát például N-mentes tápközegben tartott) sejtjei (ez az ún. „nyugvósejtes” fermentáció), illetve hordozóhoz rögzített szaporodó vagy nem szaporodó sejtjei is alkalmasak a szorbit oxidációjára.

A C-vitamin-gyártás további lépései az 3.5. ábrán követhetők.



3.5. ábra: A C-vitamin Reichstein-féle szintézise

Az L-szorbózt *Gluconobacter melanogenus* szaporodó vagy akár nyugvó sejtjei is képesek L-szorbózzá oxidálni, utóbbit viszont a *Pseudomonas putida* 80%-os konverzióval oxidálja tovább 2-keto-L-gulonsavvá. Ezen intermedierig tehát egyéb alternatív, pl. a 3.6. ábrán látható reakcióúton is eljuthatunk. Ugyanakkor más, főképpen mikrobiológiai átalakításokat felhasználó úton is eljuthatunk a 2-keto-L-gulonsavig, pl. az 3.7. ábrán látható módon. Ekkor a kiindulási anyag szintén D-glükóz, de már az első lépést is fermentációval végzik el: ugyanaz az *Acetobacter suboxydans* glükonsavvá képes oxidálni a D-glükózt, majd a glükonsavat 5-keto-glükonsavvá tovább oxidálja (a következő alfejezetben erről részletesebben szólnunk). Ez a fermentáció 25 °C-on 90%-os konverzióval hajtható

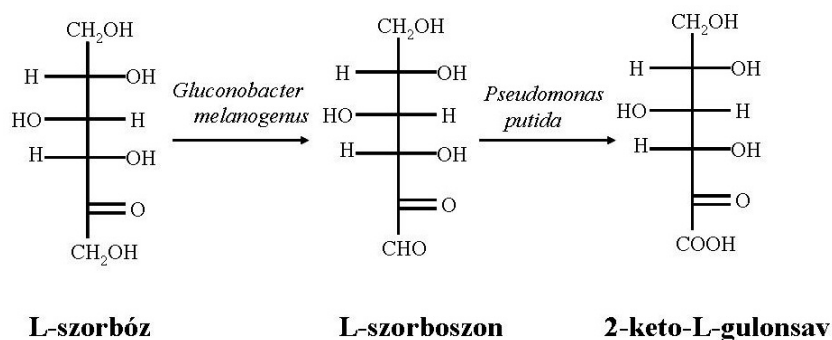
végre úgy, hogy a keletkező savat folyamatosan lekötik a tápoldatba adagolt kalcium-karbonáttal. A képződött Ca-5-keto-glükonátot katalitikusan hidrogénezik. Ekkor a Ca-D-glükonát és a Ca-L-gulonát 1:1 arányú elegye (lám, a nemenzimes átalakítások nem sztereoszelektívek!) keletkezik, amely keverékből csak az utóbbit lehet *Xanthomonas translucens*-szel 2-keto-L-gulonsavvá oxidálni.

Innen a további eljárás azonos, a 2-keto-L-gulonsavat többlépéses kémiai átalakítással, úgynevezett enolizációval alakítják át aszkorbinsavvá.

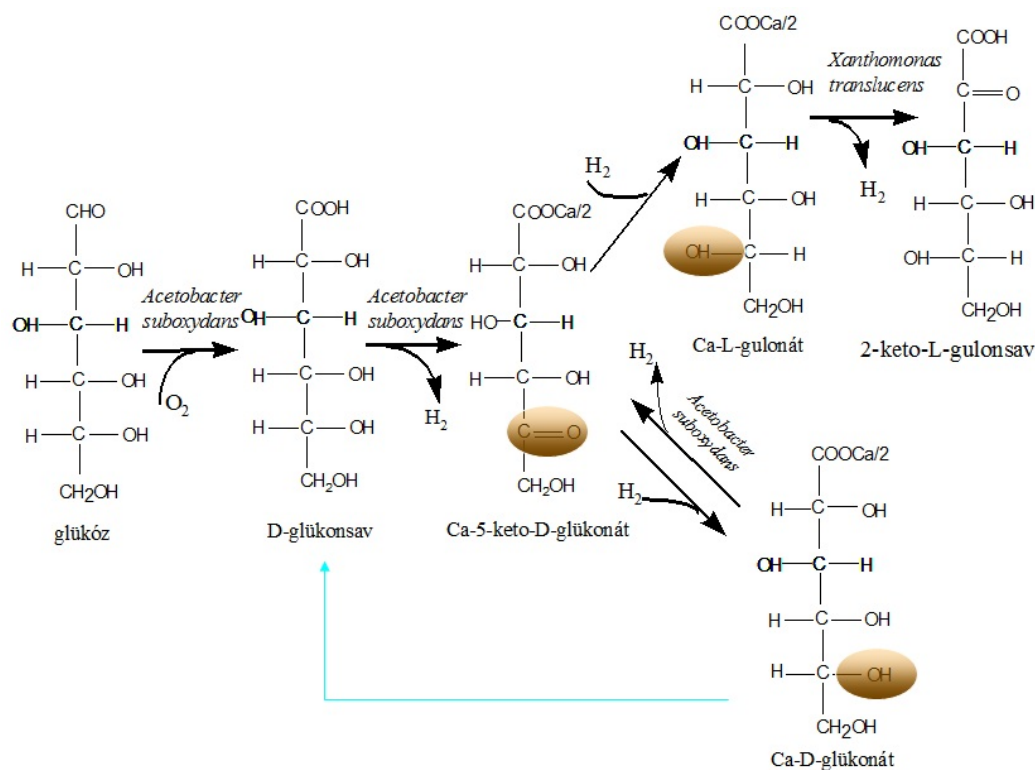
Ma a világ C-vitamin gyártásának, amely mintegy 100–120 ezer tonna/év, több mint 80%-a Kínában valósul meg a klasszikus (itt első helyen megemlített) módszer egy változatával. A kínai gyártáson kívüli ismert nagy gyártók még a BASF/TAKEDA, a DSM és a Merck.

A C-vitamin előállításának technológiáját javító törekvések arra irányulnak, hogy a glükózból (vagy galaktózból) egy fermentációs lépésben *de novo* állítsák elő a C-vitaint. Erre genetikailag módosított *S. cerevisiae* törzsek bizonyultak alkalmasnak.

Megjegyezzük, hogy az aszkorbinsav *de novo* fermentációval növényi sejtekkel is előállítható, legalábbis laboratóriumi szinten előállították, *Rosa rugosa* növényi sejtekkel 1-2%-os glükóz-, fruktóz- vagy galaktóztartalmú tápoldatokon.



3.6. ábra: Alternatív 2-keto-L-gulonsav előállítás A



3.7. ábra: Alternatív 2-keto-L-gulonsav előállítás B

3.1.3. Redukáló cukrok oxidációja

Az aldózok közül a glükóz oxidációjának van ipari jelentősége. Noha glükózból glükonsavat kémiai módszerekkel is lehet nyerni (hipokloritos vagy elektrokémiai oxidációval), mégis az ipari gyakorlatban a mikrobiológiai módszert alkalmazzák. A glükózt számos mikroorganizmus (*Aspergillus niger*, *Gluconobacter suboxydans*, *Pseudomonas ovalis* stb.) képes glükonsavvá oxidálni. Az *Aspergillus*ok a glükóz→glükonsav átalakítást a glükóz-oxidáz enzimjükkel végzik, amely enzim tulajdonképpen nem igazi oxidáz, hanem egy flavoprotein-dehidrogenáz. A reakciónál a levegő oxigénje a hidrogénakceptor, pontosabban az elektronakceptor. A reakciónál képződő toxikus hatású hidrogén-peroxidot a sejt kataláza azonnal vízzé bontja le.

Az ipari fermentációt szubmerz körülmények között végzik, rendszerint *Aspergillus niger* törzsszel. Az oxidáció során képződő glükonsavat semlegesíteni kell, pl. CaCO_3 -adagolással, mert különben a pH-változás leállítja a folyamatot.

Bizonyos gyárak *félfolytonos fermentációs* eljárással (lásd [4.4.6.2. Félfolytonos fermentáció](#) c. alfejezetet) 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 ismételhető.) Más üzemekben a penészmicéliumot kiszűrik, és ezt használják fel újra és újra a glükóz→glükonsav transzformációhoz. (Ebben az esetben valódi transzformációról, és nem növekedéssel kapcsolatos fermentációról van szó.)

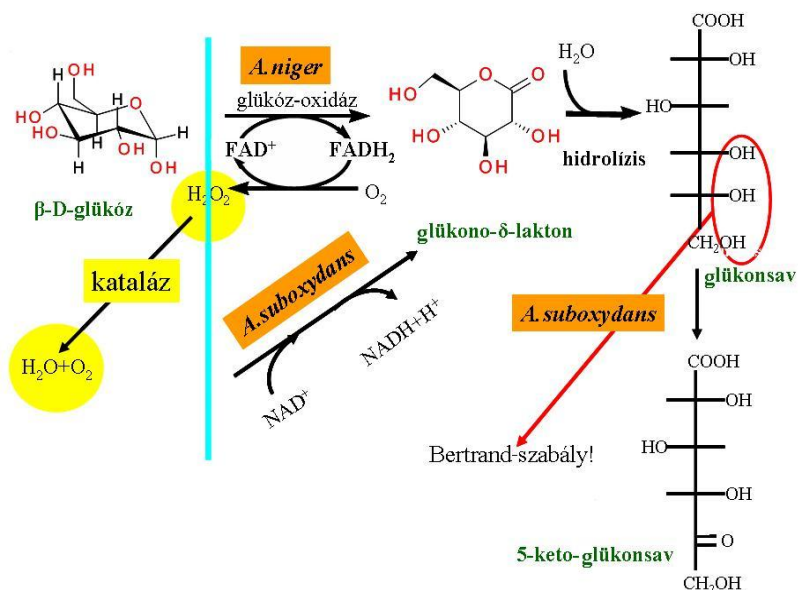
Ha a glükóz oxidációját *Gluconobacter suboxydans* baktériummal végzik, akkor az átalakítást NAD-függő dehidrogenáz enzimek végzik, és a képződött glükonsav – a Bertrand-szabálynak megfelelően – tovább oxidálódik 5-keto-glükonsavvá. A konzekutív reakció második lépését a reakció körülményeinek szabályozásával vissza lehet szorítani (semleges pH, 37 °C), ill. elő lehet segíteni (savanyú pH, 25–30 °C, CaCO_3 -adagolás az 5-keto-Ca-glükonát ugyanis csaknem oldhatatlan, így az egyensúly erősen jobbra tolódik).

Az osztrák Vogelbush cég *Acetobacter methanolicus* baktériumot használ a glükonsav-fermentációhoz egy meglehetősen különös technológia mentén. Először metanol C/en forráson folytonos kemosztát fermentációval (lásd a [4.5. fejezetet](#)) elszaporítják a mikroorganizmust, majd az összegyűjtött sejtömegeggyel egy külön bioreaktorban nagy glükózkoncentrációt fenntartva biokonverziót végeznek a glükóz-glükonsav átalakításra. A nagy glükózkoncentráció és a nagy sejtömeg (mint katalizátor) igen intenzív levegőztetést igényel, amit az ún. Vb-IZ reaktorral képesek biztosítani (lásd a [4.6. fejezetet](#) és a [4.123. ábrát](#)).

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 ún. „elektrodeionizálási” művelettel, amelyet az enzimes reaktorba integrálnak, és amellyel folyamatosan eltávolítják a rendszerből a terméket.

A glükóz-oxidáz enzimet (EC 1.1.3.4.) nagy szubsztrátfajlagossága alkalmassá teszi a glükóz enzimes meghatározására. Glükóz-oxidáz enzimelektrodokat is forgalomba hoztak (lásd [2.8. alfejezet](#), [2.74. ábra](#)). Az enzimet nemcsak analitikai célra használják, hanem a biológiai anyagokban lévő glükóz, ill. lezárt palackok oxigéntartalmának eltávolítására is. Magát a glükonsavat a gyógyszeripar, ill. a gyógyászat kis toxicitása miatt szívesen és általánosan alkalmazza, elsősorban Fe, Cu, Ca és egyéb elemnyomok szervezetbe való bevitelénél. Nagyobb mennyiségű glükonsavat, ill. glükono- δ -laktont használ fel a tisztítószeripar (üvegek és fémtárgyak tisztítására) és a műanyagipar. A glükono- δ -laktont a húsiparban páclevek pH-jának beállítására is alkalmazzák, valamint sütőporok acidulánsaként, ugyanis lassan hidrolizál glükonsavvá, ezáltal lassú CO_2 -fejlődést, azaz jó térszaktialakulást eredményez.

A kristályos glükonsav előállítása nehéz, ezért a savat 50%-os koncentrátum formájában hozzák forgalomba. Oldatban a sav- és a laktonforma egyensúlyban van. A δ -lakton a keverékből könnyen kikristályosítható.

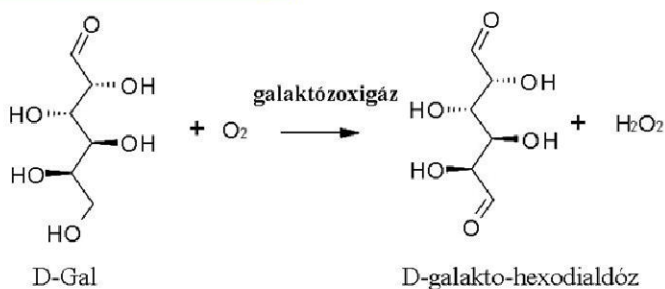


3.8. ábra: Glükonsav-fermentáció

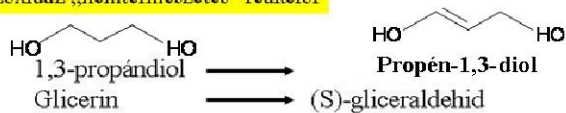
Néha az enzimek szubsztrátspecifikussága furcsa kivételeket mutat. Például azt vették észre, hogy a glükóz-oxidáz enzim képes bizonyos aromás vegyületek redukciójára is (ha glükóz is jelen van), pl. a benzokinonnak hidrokinonná történő redukciójára. Itt azonban valójában arról van szó, hogy az enzim továbbra is a glükózt dehidrogénezi, viszont az elektronakceptor molekuláris oxigént helyettesíti az aromás vegyület.

Igen érdekesen viselkedik a galaktóz-oxidáz enzim (EC 1.1.3.9.), amelynek „természetes” reakciója a D-Gal redukáló cukor átalakítása oxigén jelenlétében D-galaktó-hexodialdózzá (lásd 3.9. ábra). Nem az oxocsoportot oxidálja tehát karboxillá, hanem a primer hidroxilcsoportot aldehiddé. Ráadásul egy sor nem cukorszerű alkoholt is képes oxidálni.

A galaktózoxidáz „természetes” reakciója



A galaktózoxidáz „nemtermészetes” reakciói

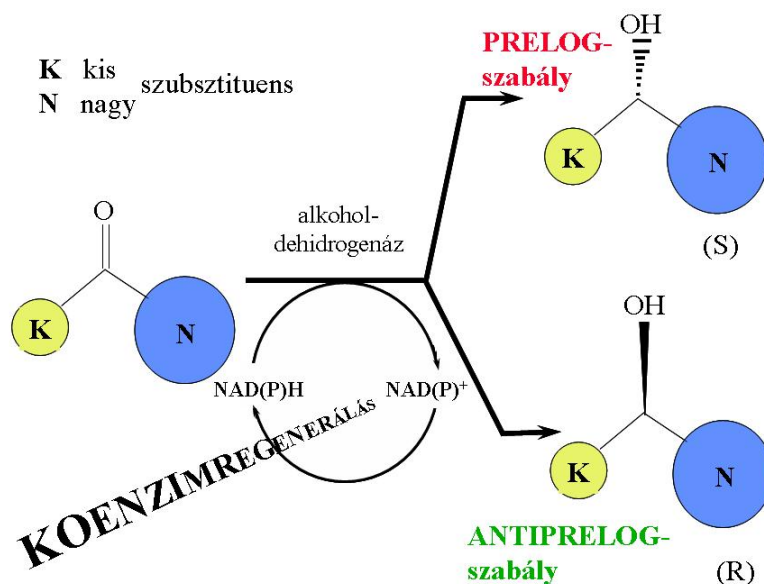


3.9. ábra: Galaktózoxidáz reakciói

3.1.4. Egyéb enzimes és mikrobiális oxidációs/redukciós átalakítások

Ketonoknak NAD(P)H-függő dehidrogenázok által történő redukálása során egy sztereokémiai szempontból jelentős tény, hogy csupán az egyik királis vegyület képződik, az esetek nagy többségében az úgynevezett **Prelog-szabálynak** megfelelően. Ez azt jelenti, hogy ha a 3.10. ábra szerint tekint-

jük a ketont, az úgy fog alkoholos hidroxilcsoporttá alakulni hidridion felvételével a koenzimről, hogy a nagy szubsztituens a jobb oldalán, a kis szubsztituens pedig a bal oldalán legyen a hidroxilcsoportnak.

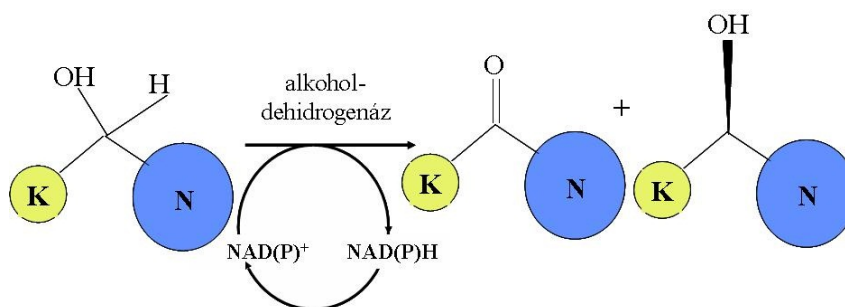


3.10. ábra: Enantioszelektív redukció (Prelog-szabály)

Sokáig szinte kizárólag olyan dehidrogenázokat találtak (például a lómájból származó alkohol-dehidrogenáz és a *Thermobacterium brockii* alkohol-dehidrogenáza is ilyen), amelyek követik a Prelog-szabályt. Találtak azonban olyan enzimeket is, amelyek az anti-Prelog-szabályt követik, azaz éppen a fordított orientációjú tiszta, optikailag aktív szekunder alkoholt állítják elő. Vagyis ma már a szerves kémikus igénye szerint mód van a Prelog- vagy az anti-Prelog-szabály szerint képződő tetszőleges optikai izomér szekunder alkohol ketonból történő előállítására.

Az ábrán utalunk a szükséges koenzim-regenerálási lépésre is, erről részletesebben a [3.9. fejezetben](#) szólnunk.

Meg kell jegyezni, hogy pl. a lómáj-alkohol-dehidrogenázt nemcsak ketonredukcióra, hanem királis alkoholok enantiospecifikus oxidációjára is felhasználják, mégpedig racém alkoholkeverék [kinetikus rezolválására](#), amint a 3.11. ábra mutatja. Ekkor a racém keverékből csak az (S) forma oxidálódik és visszamarad a haszontermék (R)-alkohol.



3.11. ábra: Enantiospecifikus oxidáció

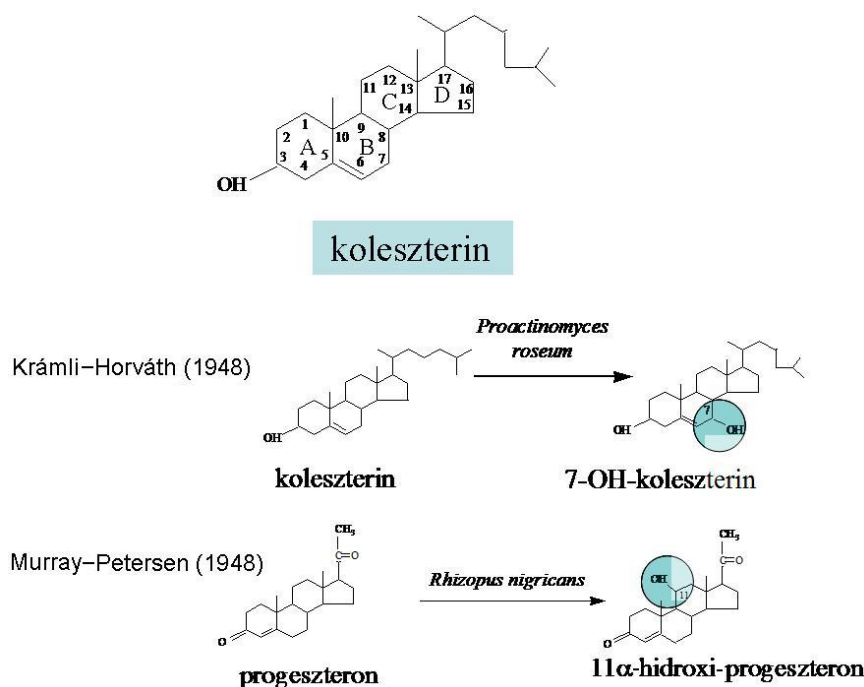
A cukron, például glükózon anaerob módon tenyésztett pékélesztőt (*Saccharomyces cerevisiae*) nagyon régen és széleskörűen alkalmazzák a szerves kémikusok enantioszelektív redukciók végrehajtására biokatalizátorként. Ennek az az oka, hogy különösebb fermentációs szakértelem nélkül alkalmazható, boltban préselt élesztő formájában beszerezhető, természetesen nem patogén és szinte azonnal felhasználható. Rövid híg kénsavas „aktiválás” után glükóztartalmú pufferben levegőztetés nélkül (azaz anaerob körülmények között) elvégezhető a redukciók nagy [sztereoszelektivitással](#). További előny a szerves kémiai átalakítások során, hogy mind vizes közegben, mind szerves közegben

felszuszpendált élesztősejtek alkalmasak a biokonverzióra. Példaként említjük az etil-aceto-ecetsav redukcióját hexánban *Saccharomyces cerevisiae* montmorilloniton rögzített sejtjeivel etil-(S)-(+)-3-hidroxi-butanoáttá $e_{\text{S}} \geq 99\%$ enantiomer felesleg mellett.

3.2. Szteroid vegyületek biotranszformációja

A következőkben bemutatott átalakulások zöme is oxidációs/redukciós átalakulás, mégis önálló alfejezetet érdemelnek nagyon nagy gyógyászati jelentőségük miatt.

Sok szteroidvegyületet – különösen hormonhatásuk következtében – gyógyszerként alkalmaznak. A természetben található szteroidok átalakítása során mikroorganizmusokkal, illetve azokból nyert enzimekkel egy sor olyan transzformációt lehet elvégezni, amelyek szerves szintetikus módszerekkel egyáltalán nem vagy csak igen bonyolultan lennének elvégezhetőek.



3.12. ábra: Az első és az első iparilag jelentős szteroidátalakítás

3.2. táblázat: Szteroidok mikrobiális transzformációinak reakciótípusai

Reakciótípus	Biotranszformáció
oxidáció	szekunder alkohol oxidációja ketonná primer OH-csoport bevitele oldalláncra szekunder OH-csoport bevitele a szteroidvázra tercier OH-csoport rávitele a szteroidmagra A-gyűrű 1,2 és 4,5 helyzetű dehidrogénezése A-gyűrű aromássá tétele metilén-csoport ketocsoporttá oxidálása a pregnán oldallánc eltávolítása ketonná oxidációval C17 helyen a pregnán oldallánc eltávolítás C17-nél, és D-gyűrű felnyitás tesztololakton-képzéssel szteroid oldallánc eltávolítása és karboxilcsoporttá alakítása pregnán oldallánc (C17) eltávolítása és szekunder alkohollá alakítása epoxidképzés dekarboxilezés

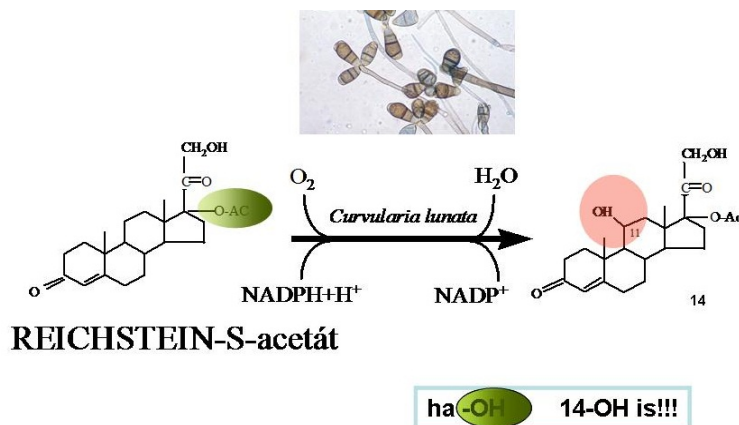
redukció	ketonredukció szekunder alkohollá aldehidredukció primer alkohollá az A-gyűrű 1,2 helyén kettős kötés hidrogénezése az A gyűrű 4,5 és a B-gyűrű 5,6 kettős kötéseinek hidrogénezése szekunder alkohol eliminálása
hidrolízis	szteroidészterek elszappanosítása acetilezés
észterezés	

A 3.2. táblázat vázlatosan összefoglalja a legfontosabb szteroidátalakítási lehetőségeket a biokonverziós reakció típusa szempontjából, a 3.3. táblázatban pedig iparilag jelentős ilyen átalakításokat mutatunk be.

Az első mikrobiológiai szteroidoxidáció 1948-ban két magyar kutató, Krámlí és Horváth nevéhez fűződik, ők a *Proactinomyces roseum* fonalas baktérium segítségével koleszterint alakítottak át 7-hidroxi-koleszterinné. Sajnos kevés figyelmet szenteltek ennek az eredménynek, és noha mások is értek el eredményeket mikrobás, illetve enzimés szteroidátalakítással, az igazi áttörést az első iparilag is jelentős transzformáció jelentette. Az Upjohn Co. kutatói, Murray és Peterson *Rhizopus arrhizus*-szal progeszteront 90% feletti konverzióval alakítottak át 11 α -OH-progeszteronná.

Ennek az átalakításnak forradalmasító hatása volt, ugyanis a 11-es szénatomon történő hidroxilezésnek az a jelentősége, hogy az összes szteroidalapú gyulladásgátló, illetve gyulladáscsökkentő szerek ilyen helyzetű OH-csoportot tartalmaznak. Ezzel az egyszerű reakcióval sok biológiailag értékes vegyület, gyógyszer részleges illetve totálszintézisének komplikált lépéseit lehetett egyszerűsíteni.

Egy lehetséges hidrokortizon-előállítást mutat a következő 3.13. ábra reakciója, amelyet a *Curvularia lunata* katalizál. Ha az átalakítás alapanyagául a REICHSTEIN-S vegyületet választjuk, akkor a 11-es helyzetben hidroxilezett főterméken kívül 14-es helyzetben hidroxilezett melléktermék is keletkezik. Ha a kiindulási anyag a REICHSTEIN-S 17-acetil származéka, akkor csak a 11-es helyen hidroxilezett termék keletkezik. A 17-acetoxycsoport ugyanis sztérikusan módosítja a 14-es szénatom közvetlen környezetét, az átalakításért felelős enzim „nem fér oda”. Ez jó példa az enzimek és egyben a mikrobiológiai transzformációk úgynevezett régióspecifikusságára.

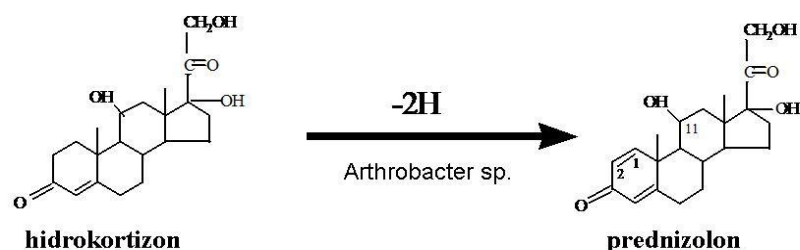


3.13. ábra: Régióspecifikus hidroxilezés

További és más típusú oxidációs példaként álljon itt még a kettős kötés létrehozását jelentő dehidrogénezés is. Ennek első leírása is KRÁMLI és HORVÁTH nevéhez fűződik. Nagy jelentőségű a szteroidváz 1,2 kettőskötésének létrehozása, ugyanis így a hidrokortizonból kedvezőbb biológiai hatású prednizolon állítható elő (nagyobb gyulladáscsökkentő hatás és kisebb sóretenció jellemzi ezt a vegyületet).

KRÁMLI–HORVÁTH

Dehidrogénezés: oxidáció



3.14. ábra: Dehidrogénezés, kettős kötés kialakítása a szteránvázon

A szteroidátalakításokkal kapcsolatban vezették be az ún. „pseudokristály-fermentációt”. A szubsztrátok és a termékek vizes közegben mérhető oldhatósága ugyanis igen csekély, jóval kisebb, mint a kiindulási anyag koncentrációja a tápoldatban, ami 0,05–0,1% között van. A mikrobák természetesen csak az oldott anyagokat képesek átalakítani, azaz, amint a szubsztrát átalakulása előrehalad a szintén rosszul oldódó terméké, a szubsztrát fokozatosan megy oldatba és alakul át, és eközben a termék pedig fokozatosan kiválik a fermentléből. Így látszólag egy kristályos szubsztrát egy kristályos terméké alakul át.

A gyulladásgátló anyagokon kívül a szteroidkészítményeknek egy sor egyéb gyógyszeripari felhasználása is van: férfi és női nemi hormonok, fogamzásgátlók, anabolikumok, rákellenes szerek, altatók stb. készülnek belőlük. Ehhez több ezer tonna alapanyagra van szükség, amelynek jó része növényi (szitoszterin dioszgenin, szolaszodin stb.), kisebb része állati (koleszterin stb.) eredetű. Ma a szteroidgyógyszerek alapvázának 65%-át a szójaolajgyártás során keletkező szitoszterinből állítják elő. Ebből a szitoszterinből az oldallánc mikrobiális lebontásával készítik azokat az intermediereket, amelyekből végül is a hatóanyagok készülnek (enzimes, kémiai és/vagy mikrobiológiai átalakításokkal).

3.3. táblázat: Néhány kereskedelmileg jelentős szteroidátalakítás

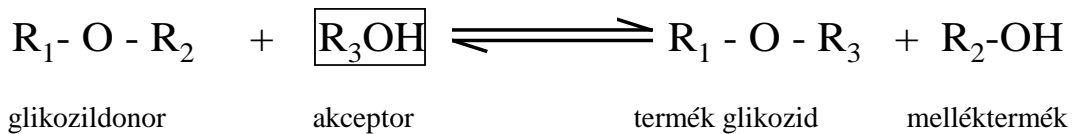
REAKCIÓ	SZUBSZTRÁT	TERMÉK	MIKROORGANIZMUS
11 α -hidroxilálás	progeszteron	11 α -hidroxi-progeszteron	<i>Rhizopus nigricans</i>
11 β -hidroxilálás	Reichstein-S	hidrokortizon	<i>Curvularia lunata</i>
16 α -hidroxilálás	9 α -fluoro-kortizol	9 α -fluoro-16 α -hidroxi-kortizol (triamcinolon)	<i>Streptomyces roseochromogenus</i>
1-dehidrogénezés	hidrokortizon diéndiol	prednizolon triéndiol	<i>Arthrobacter simplex</i> <i>Septomyxa affinis</i>
1-dehidrogénezés, oldallánclebontás, D-gyűrű expanzió	progeszteron	1-dehidro-tesztololakton (tesztolakton)	<i>Cylindrocarpon radicolola</i>
Oldallánc-eltávolítás	β -szitoszterin	androsztadién-dion és/vagy androsztén-dion	<i>Mycobacterium</i> sp.

3.3. Transzglykozilezés

A transzglykozilezéses reakciókat egy sor iparilag jelentős eljárásban alkalmazzák, amelyek során elsősorban mikrobiális poliszaharidokat állítanak elő, amelyek széles körű alkalmazását jó hidrokolloid, illetve gélképző tulajdonságaiknak köszönhetik. Vagy *de novo* fermentációk során történnek ilyen átalakítások, vagy izolált enzimek segítségével végzik azokat. A csoportátviteli reakciók katalízisét az EC 2-es csoport, a *transzferázok* enzimei végzik, ennek 4. alcsoportja a

glikoziltranszferázok együttese, amelyek közül a hexozil- és a pentoziltranszferázok érdemelnek itt említést (EC 2.4.1.x. és 2.4.2.x.).

A glikoziltranszferázok katalizálta reakciók általánosított sémája a következő:



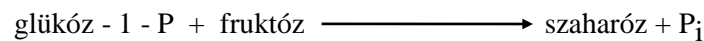
Hexoziltranszferázok esetében a *glikozildonor lehet*: aktivált hexóz, pl. UDP- vagy GDP-glükóz, hexóz-foszfát, di-, tri-... poliszaharid, illetve ezeknek aktivált (pl. UDP- vagy GDP-aktivált) változatai.

Akceptor lehet: alkohol, mono-, di-... poliszaharid.

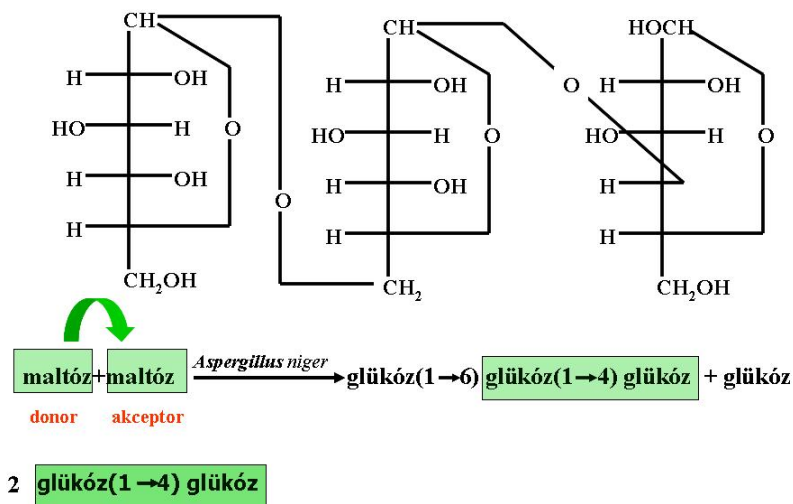
Termék lehet: glikozid, di-, tri-... poliszaharid.

Mind a donorok, mind az akceptorok lehetnek helyettesített szénhidrátszármazékok is (hexózamin, metil-származékok stb.).

Az első transzglykózilezési reakció, amelyet leírtak, a szaharóz képződése volt egy *Pseudomonas* baktérium speciesz jelenlétében:



Ez alapján a reakció alapján feltételezték, hogy a sikeres transzglykózilezési reakcióhoz szükséges a nagy energiatartalmú foszfátkötés jelenléte. Később kimutatták, hogy ez nem elengedhetetlen, illetve enzimfüggő, és pl. az *Aspergillus niger* maltózból transzglykózilálással a 3.15. ábra szerint egy triszaharidot képez anélkül, hogy a donor „aktiválása” szükséges lenne. Ez az enzimsoport tehát kétféle módon működik, egyeseknél csak aktivált donor jelenlétében megy végbe a transzglykózilezés, másoknál erre nincsen szükség.



3.15. ábra: Maltóz transzglykózilezése maltózzal

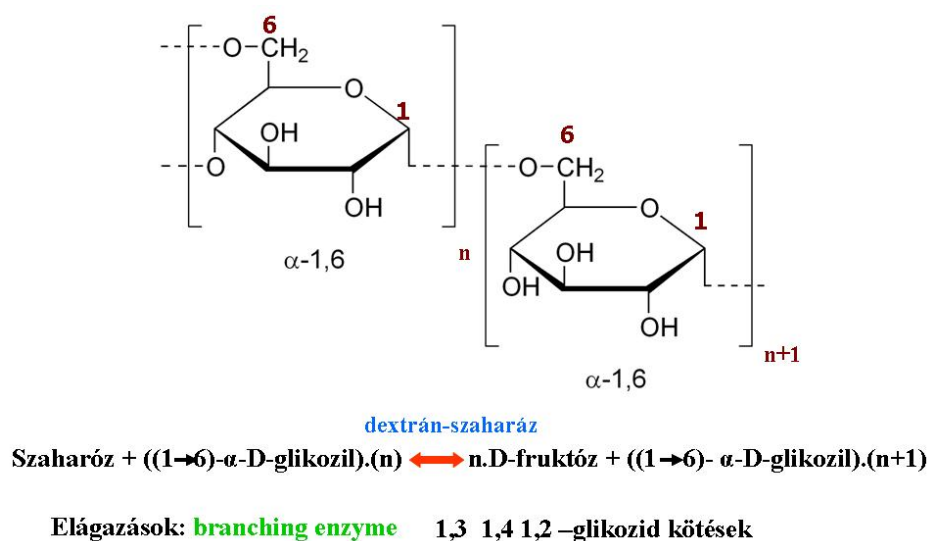
A fentiekhez hasonló transzglykózilezési reakciókkal egyszerűen lehet glikozidkötéseket létrehozni, és így különböző di-, tri- és magasabb polimerizációs fokú oligoszaharidokat előállítani.

A mikrobiológiai transzglykózilezési reakciók termékei közül a mikrobiológiai eredetű poliszaharidoknak van ipari jelentősége. A mikrobiális poliszaharidokat két csoportba sorolják. Az egyik csoport az ún. *kapszuláris poliszaharidok* csoportja. Ennek tagjai iparilag nem különösebben érdekesek, a mikrobák egy része intracelluláris szintézissel egy sor sejtfalkomponenst, tok- és kapszapolimert, sejtet burkoló nyálkákat szintetizál, ezek az ún. CPS-ek (capsule polysaccharides). A másik csoporthoz tartozó polimerek ipari jelentősége nagy, extracellulárisak, amelyek vagy a sejtben

de novo fermentációval (végső szintézishelyük a sejtmembránon van, ahonnan kikerülnek a közegbe), vagy a sejten kívüli enzimes biotranszformációkkal állíthatók elő. Ezek az ún *exopoliszaharidok* vagy *EPS*-ek.

Az 1940-es évek elejétől gyártják iparilag a dextránt, először kifejezetten vérplazmapótló és -hígító anyagként (ne felejtsük el, hogy ezek a 2. világháború éveit!). Nagyszámú mikroorganizmus képes növekedése során extracelluláris dextrán szintézisre. A **dextrán** olyan elágazó láncú glükózpóliimer (más szóval *glükán* homopolimer), amely a lineáris láncban **α -1,6-**, az elágazásokban **α -1,4-** és **α -1,3** és **α -1,2-**glikozidkötéseket tartalmaz.

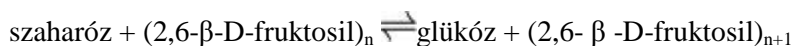
A dextrán ipari termelésénél csaknem kizárólag **heterofermentatív** tejsavbaktériumokat használnak (főként *Leuconostoc mesenteroides* törzset). A dextránszintézis menete a következő: a transz-glikozilezésnél az akceptormolekula szaharóz és a donormolekula is szaharóz, a transz-glikozilezési reakciót pedig a dextránszaharáz enzim (hivatalos neve: dextransucrase vagy 1,6- α -D-glucan 6- α -D-glucosyltransferase, [EC 2.4.1.5](#)) katalizálja (3.16. ábra).



3.16. ábra: Dextránszintézis

A képződött dextránmolekula egyik végén (az elején) egy szaharózegység van, és ehhez kapcsolódnak a donor szaharózmolekulákból származó glükózegységek. A szaharóz fruktóz része melléktermékként halmozódik fel. A transz-glikozilezést nem előzi meg hidrolízis – amely a kötési energia elvesztését jelentené – hanem a polimerizációnál a glükóZRész transz-glikozilezési mechanizmussal adódik át az akceptormolekulára az enzim-donor-akceptor **ternér komplex**ben. A transz-glikozilezés után a fruktóz (az aglükonrész) az enzimkomplexről leválik. A nyers dextrán a fermentléből alkohollal kicsapható, ezután az oldatban visszamaradó fruktózt is ki lehet nyerni. A polimer lineáris hosszabbodásáért a *dextrán-szaharáz* enzim felelős, az elágazást egy másik enzim segíti elő (branching enzyme). Az elágazások gyakoriságát (tehát a képződött dextrán jellegét) a két enzim aktivitásának aránya szabja meg, amelyet viszont a reakciókörülményekkel (pH, °C stb.) lehet elsősorban befolyásolni. A dextránt klinikai célra (utólagos hidrolízissel kisebb móltömegű frakciókat létrehozva) vérplazmapótlóként és hígítóként használják, de jelentős a dextrán azért is, mivel az ipari gélszűrők előállításának egyik legfontosabb alapanyaga. A svéd Pharmacia cég 1959-ben alkotta meg dextránból keresztkötésekkel a Sephadex márkanevű termékcsaládot, amelyet molekulaszűrőként, illetve ioncserélők hordozó polimerjeként azóta is alkalmazunk.

A dextránszaharáz enzimhez hasonlóan működik a levánszaharáz enzim (levansucrase ([EC 2.4.1.10](#): Sucrose 6-fructosyltransferase)), amely a következő reakciót katalizálja:

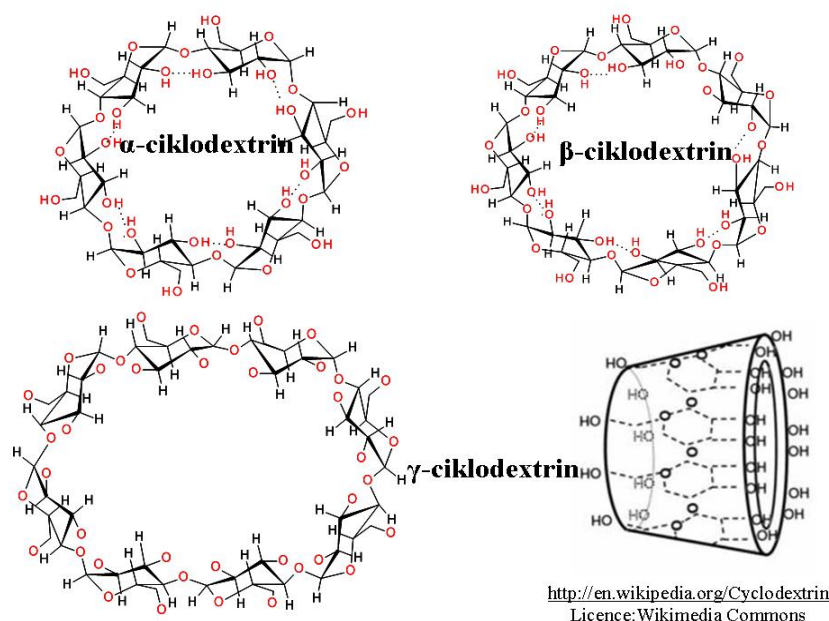


Az enzimet *Bacillus* és *Aerobacter* törzsekkel állítják elő, a képződő levánt az élelmiszeripar és a festékipar használja fel.

Szintén nagy ipari jelentőségű enzim eljárás a ciklodextrineknek az előállítására. A ciklodextrinek nem redukáló, kristályos, vízoldható ciklikus oligoszaharidok: 6, 7 vagy 8 glükózegységből állnak (azaz szintén homooligomerek). Ugyancsak egy transzferáz enzim végzi előállításukat transzglykozilációval, az ún. CGTáz ([EC 2.4.1.19](#): cyclodextrin glucanotransferase) enzim, amely az α -1,4 glikozilkötéseket tartalmazó glükánláncokra hat, azaz keményítőtől, vagyis amilózból, amilopektinből, valamint glikogénből képes ciklodextrineket előállítani. Iparilag keményítőtől indulnak ki, amelyet α -amilázzal elfolyósítanak, majd a 8–10%-os elfolyósított oldathoz szakaszos kevert reaktorban hozzáadják az oldott CGTáz enzimet 55 °C-on, 5,8–6.0 pH-n. A termék egy keverék, amely változó arányban tartalmazza az α - (pl. egy japán eljárásnál 22%), a β - (11%) és a γ -ciklodextrint (5%). Az α - és β -ciklodextrint adszorpciós oszlopon kötik meg szelektíve (pl. előbbi sztearinsavval, utóbbi pedig ciklohexán-propánamid-n-kapronsavval aktivált kitozángyöngyökön köthető meg szelektív módon). Az elválasztásnál a vízoldhatóságbeli különbségeket is kihasználják.

A felhasznált transzferáz enzimet különböző mikroorganizmusokkal is lehet termeltetni, pl. *Bacillus circulans*-szal.

A ciklodextrinek felhasználását különleges szerkezetüknek köszönhetik. A 3.17. ábrán látható, hogy gyűrűs szerkezetük olyan, hogy annak külső felülete inkább hidrofil (ez lehetővé teszi vízben való oldódásukat), míg belső felületük inkább hidrofób, ami különböző vendégmolekulák befogadását és komplexálását teszi lehetővé. Ilyen vendégmolekulák lehetnek különböző aromások, alkoholok, halidok, zsírsavak, észterek stb. E tulajdonságuk alapján használja őket az élelmiszeripar íz- és aromakomponensek megtartására, a gyógyszeripar hatóanyagok felvételére és lassú leadására, a szennyvíztisztításban, illetve a bioremediációban vízben rosszul oldódó és nehezen lebomló, elsősorban aromás szénhidrogén(származékok) vízben való diszpergálásának javítására.



3.17. ábra: Ciklodextrinek szerkezete

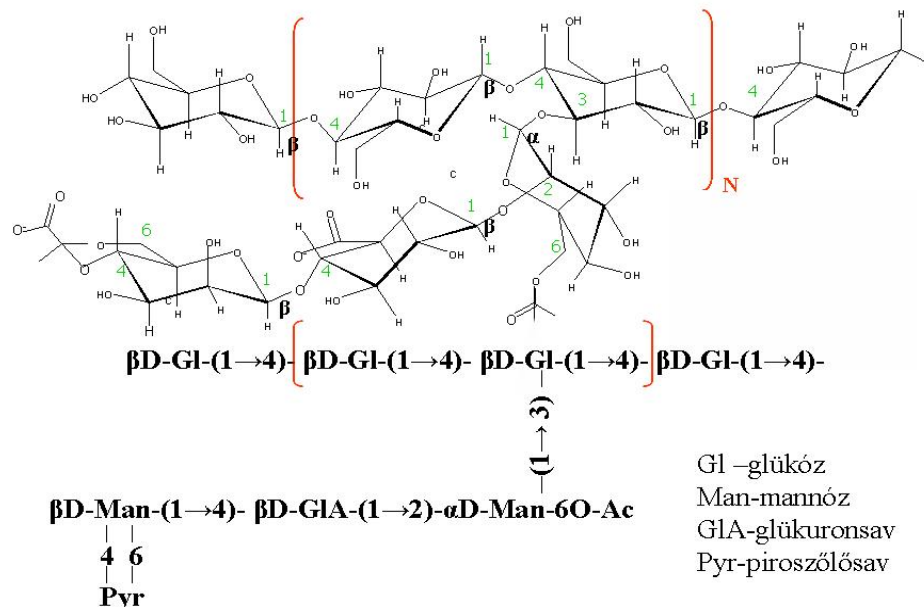
Alapvetően $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidkötésű glükózegységekből épül fel a *xantán* mikrobiális poliszaharid, amelyben azonban helyettesített mannóz- és piroszőlősav egységek is vannak, illetve az oldalláncban glükuronsav található, ezáltal a polimer elektrosztatikus töltéssel rendelkező anionos polielektrolit. Szerkezetét a 3.18. ábrán láthatjuk. A xantán nagy móltömegű polimer, móltömege 10^6 Dalton vagy nagyobb. A mannózegységeknek átlagosan a 30%-a acetilezett. A Pyr és Ac egységeknek a száma törzsfüggő, és függ a tenyésztési körülményektől is. A xantánt leginkább a *Xanthomonas campestris*

Gram⁻ baktériummal állítják elő aerob fermentációval. A fermentlébe kiválasztott poliszaharid a fermentlevet [nemnewtoni](#), pszeudoplasztikus, illetve Bingham-plasztikus viselkedésűvé teszi, emiatt az oxigén-, illetve hőátadás megfelelő biztosítása gondot okoz (lásd [4.5.7. Fermentlevék reológiai viselkedése](#) alfejezetet). Bioszintézise a citoplazmamembránon történik, egy abban lehorgonyzott foszforilált lipidhez kötődik az első glükózegység, mégpedig UDP-glükózaktivált glikozildonorral történő transzglykozilezéssel. A további glükózbeépülésekhez is az UDP-glükóz a glikozildonor, míg a mannóz beépüléséhez szintén transzglykozilezéssel a GDP-mannóz mint aktivált glikozildonor szolgáltatja a mannózt. Ebben az esetben tehát a transzglykozilezést olyan enzimek katalizálják, amelyeknek a működéséhez aktivált donor szükséges.

A xantán a legnagyobb volumenben előállított mikrobiális poliszaharid. Nagy mennyiségben használja az élelmiszeripar szuszpenziók stabilizálására, állományjavítóként, gélesítő és viszkozitást növelő ágensként. Alkalmazza a festékipar is vizes festékek stabilizálására és a festés közbeni megfolyás csökkentésére. Nagy felhasználója az olajipar is, ahol az olajfúrófejek hűtésére, illetve a fúrás során keletkező kőzettörmeléknek a furatokból történő eltávolítására használják.¹²

Megjegyezzük, hogy a többi jelentős mikrobiális exopoliszaharid szintézise a xantánéhoz hasonlít, és ebből a szempontból a fenti dextrans-, illetve levánszintézis és az oligoszaharid ciklodextrinek a kivételek.

A fentiekén kívül egy sor egyéb mikrobiális poliszaharidot is gyártanak, ezeket a 3.4. táblázatban foglaljuk össze.



3.18. ábra: Xantán szerkezete

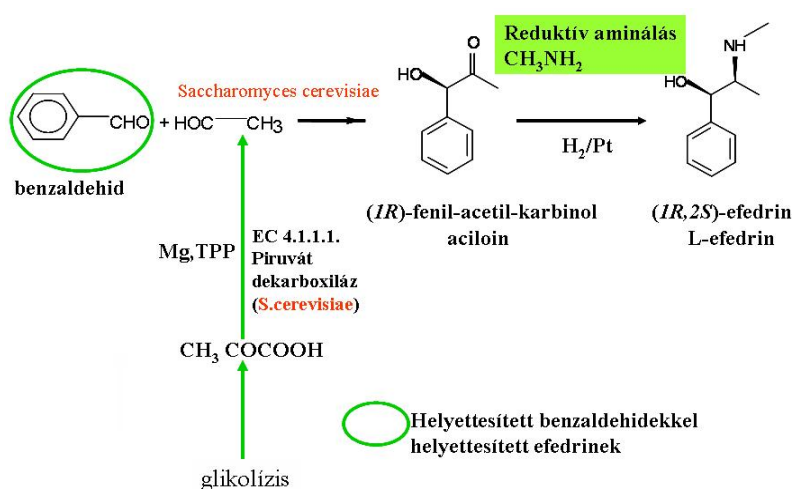
¹² A fúrófej forgó csőre van felszerelve de átmérője nagyobb a csőnél, amelyen keresztül lenyomják a hűtő, kenő és szuszpenzió stabilizáló xantán tartalmú keveréket. Így a fúráskor keletkező törmelék elkeveredve a folyadékkal a nagyobb átmérőjű külső „csövön” felfelé tud áramolni.

3.4. táblázat: Egyéb fontosabb mikrobális poliszaharidok

Poliszaharid	Mikroorganizmus	Szerkezet	Felhasználás
cellulóz	Acetobacter	lineáris β -(1 \rightarrow 4)-glükán	mikrofibrilláris élelmi rostként
kurdlán	Agrobacterium <i>Alcaligenes faecalis</i>	lineáris β -(1 \rightarrow 3)-glükán	
pullulán	<i>Aureobasidium pullulans</i>	lineáris 2* α -(1 \rightarrow 4), 1* α -(1 \rightarrow 6)-glükán	erős rost- és filmképző (celofánhelyettesítő)
szkleroglükán	<i>Sclerotium rolfai</i> , <i>Sc. glucanicum</i>	lineáris β -(1 \rightarrow 3)-glükán β -(1 \rightarrow 6) elágazásokkal	festékipar
gellán	<i>Pseudomonas elodea</i>	Lineáris heteropoliszaharid ¹³ - β D-Gl-(1 \rightarrow 4)- β D-GlcA- (1 \rightarrow 4)- β D-Gl-(1 \rightarrow 4)- - α D-Rha-(1 \rightarrow 3)	agar és karragén helyettesítő élelmiszeradalék
alginát	<i>Macrocystis pyrifera</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	6* β D-MannA-(1 \rightarrow 4)- -6* β D-GlcA-(1 \rightarrow 4)	Főleg az alga eredetűt használják: enzimrögzítés, élelmiszerek

3.4. Kondenzáció, addíció, csoporteltávolítás (liázok reakciói)

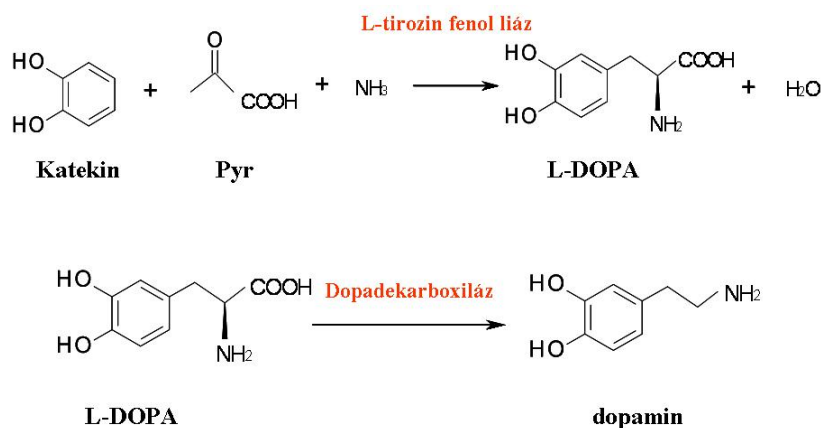
A pékélesztő szerves szintézisekben történő, sokszínű felhasználásának szép példája az aciloin-szintézis. Ha a glükózon, anaerob körülmények között szaporodó pékélesztő-tenyészethez lassú ütemben benzaldehidet adagolunk, akkor fenil-acetil-karbinol képződik. A biokondenzáció mechanizmusa a következő: a tápoldatban lévő glükózt a *Saccharomyces cerevisiae* glikolitikus enzimrendszerével lebontja acetaldehidig. Az átalakulásban kulcsszerepet játszik az EC 4.1.1.1.: *Piruvát dekarboxiláz* enzime az élesztőnek. A glikolízis során képződő nascens acetaldehid a benzaldehyddel kondenzál, és mintegy 80%-os konverzióval aciloint képez. A fenil-acetil-karbinol képződését a piroszőlősav adagolása elősegíti. Az izolált **aciloin** redukzív metilaminálással könnyen konvertálható L-efedrinné. Az eljárás már 1921 óta ismert, ma is alkalmazzák, főleg Indiában. Az efedrin hatékony szimpatikusideg-izgatószer, használják az asztma kezelésében. Ha az adagolt benzaldehid szubsztituált, akkor efedrinszármazékot kapunk. Maga az efedrin további szintézisek alapanyaga lehet, mert pl. a tüdőrák ellenes gyógyszer taxol oldalláncának is az építőköve.



3.19. ábra: Aciloinkondenzáció

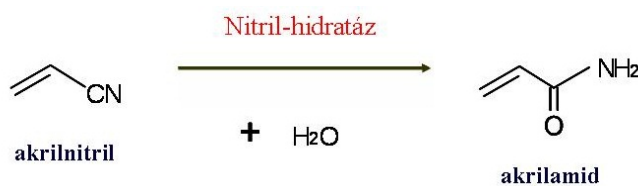
¹³ Az első glükóz egységen O-acetil és gliceril csoport is van

Gyógyászatilag jelentős vegyület az L-DOPA (dihidroxi-fenilalanin), amit katechinnek piroszölősav és ammónia jelenlétében történő enzimes átalakításával lehet előállítani. Az átalakító enzim az *L-tirozin-fenol-liáz* (EC 4.1.99.2.), amely tulajdonképpen fiziológiásan a tirozin dezaminálását végző enzim, de itt reverz irányban használják, azaz -NH₂-csoport sztereospecifikus bevitelére, miközben új C–C-kötés is létrejön a benzolgyűrű és a piruvát -CH₃-csoportja kapcsolódásával (3.20. ábra). Az enzimforrás az *Erwinia herbicola*, amelynek pufferben felfuszpendált sejtjeit használják a biokonverzióhoz. A képződött DOPA a dopadecarboxiláz enzimmel alakul át dopaminná. Utóbbi, illetve receptorainak hiánya az agyban okozója a Parkinson-kórnak. Valójában a DOPA a decarboxilázzal együtt a gyógyszer, mivel a dopamin nem tud a vérből az agyba jutni, így a „helyszínen” kell képződnie. Hogy ez ne még az agyon kívül történjék, egy enziminhibitort is adagolnak, amely megakadályozza a DOPA-dopamin átalakulást a vérben.



3.20. ábra: DOPA enzimes előállítása katekinből

Az akrilnitril-akrilamid átalakulást rézkatalizátor segítségével végezték nagyon sokáig, ma azonban gyakorlatilag az enzimes módszer kizárólagos. Japánban (Mitsubishi Rayon) már 1985 óta ilyen eljárással készül a műanyag-ipari monomerként, koagulátorként (pl. szennyvíztisztításban), talajkondicionáló szerként és papírgyártási adalékanyagként alkalmazott akrilamid. Az akrilnitril átalakítását a nitrilhidratáz enzim (EC 4.2.1.84. nitrile hidro-lyase) katalizálja, amelyet *Rhodococcus rhodochrous* törzsszel végzett fermentációval állítanak elő, és az ipari átalakításban az immobilizált teljes sejtet alkalmazzák.



3.21. ábra: Akrilamid előállítása

A mikroba kétféle enzimet termel, egy 4-5 (130 000 Dalton) és egy 18–20 alegységből (520 000 Dalton) álló (tehát negyedleges szerkezettel is rendelkező) oligomer proteint. Utóbbi kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezik (pH-stabilitása nagyobb, hőstabilitása magasabb: 50 °C, bár az optimális hőmérséklete alacsonyabb: 35 °C). A reakciót egyébként nem az enzim optimális hőmérsékletén végzik, hanem annál alacsonyabban, 10 °C alatt, lecsökkentendő az akrilamid polimerizációra való hajlamát.

A szintén japán Nitto cég a folyamatot rátáplálásos szakaszos reaktorban végzi 2 x10⁶ U/liter enzimaktivitás és 80 kg/m³h produktivitás mellett. A 99,9%-os konverzió után szűréssel eltávolítják a rögzített sejtet, majd színtelenítéssel tisztítják a terméket.

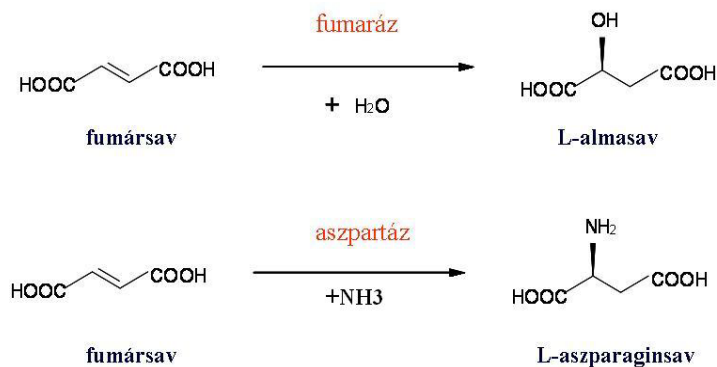
Ma a világban több 100 000 t/év enzimes eljárással termelt akrilamidot állítanak elő a nitrilhidratáz enzimmel. Az enzimes eljárás minden szempontból szembeszökő előnyeit a kémiai katalízissal szemben jól mutatja a 3.5. táblázat.

3.5. táblázat: Az enzimes és kémiai eljárás összehasonlítása

	Kémiai eljárás	Enzimes eljárás
Reakció hőmérséklete	70 °C	0–15 °C
Konverzió	70–80%	99,9%
Töményítés a feldolgozásnál	szükséges	nem szükséges
Energiaigény (gőz, elektomos)	1,9 MJ/kg	0,4 MJ/kg
CO ₂ -termelés	1,5 kg CO ₂ /kg	0,3 kg CO ₂ /kg

A **fumársav** kettős kötése hajlamossá teszi a vegyületet addíciós reakciókra. Két iparilag jelentős enzimes biokonverziót említünk meg ezzel kapcsolatban (3.22. ábra). Az egyik a *Corynebacterium glutamicum* vagy *Brevibacterium flavum* sejtjeivel végzett átalakítás, amelyet a *fumaráz* enzim (EC 4.2.1.2. (S)-malate hydrolyase, fumarát hidratáz) katalizál L-almasavvá. Ez egy sztereoselektív víz-addíció, amely kizárólag L-almasavat termel. Az egyensúlyi keverékben 85% almasav és 15% fumársav lenne, de eltolják az almasav irányába a következő módon: szubsztrátként a kb 1%-nyi oldhatósággal rendelkező Ca-fumarátot alkalmazzák, ami a szintén 1% körüli oldhatósággal rendelkező Ca-maláttá alakul, így képződése során kicsapódik az oldatból, és az egyensúly eltolódik a képződés irányába. (Ezt a módszert slurry biokonverciónak nevezik, hasonlít ez az eljárás a szteroidoknál megismert pseudokristály-fermentációra.)

A másik iparilag jelentős fumársav-biokonverzió az aszparaginsav előállítás az *L-aszpartát-ammónia-liáz* (EC 4.3.1.1., aszpartáz) enzim segítségével. Ez az egyik iparilag is alkalmazott L-aszparaginsav előállítási módszer (pl. a Kyowa Hakko Kogyo-nál) Az *E. coli*-ből származó enzimet kinyerés után rögzítve használják, a *Brevibacterium flavum* esetében a rögzített teljes sejtet alkalmazzák katalizátorként. Ismertek szakaszos reaktorban és folytonos dugóáramú reaktorban megvalósított folyamatok is., a jellemző konverzió itt is 99% feletti. Az aszparaginsav a mesterséges édesítőszer, az aszpartám (lásd e fejezet végén) előállításának egyik szubsztrátja.



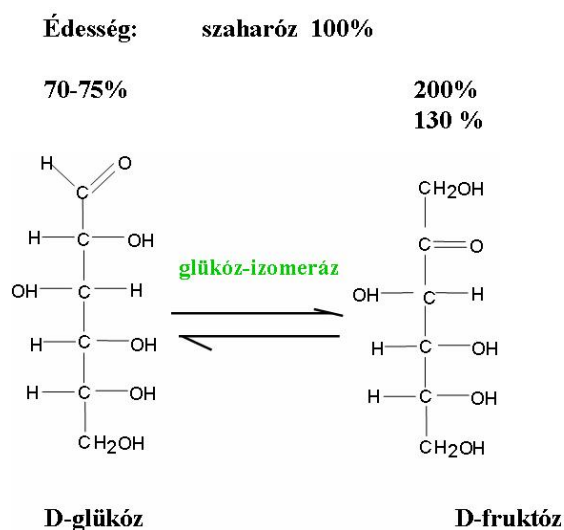
3.22. ábra: Fumársav-átalakítások

3.5. Izomerizálás

Az enzimek EC szerinti 5. csoportja az *izomerázok* csoportja, amelyeknek ipari szempontból több jelentős képviselője is van. Az egyik ilyen csoport az EC 5.1.x.x racemázok csoportja. A kinetikus rezolválások során ugyanis, amikor az egyik enantiomerre van csak szükségünk, a másik vagy alkalikus kezeléssel (pl. hidrolízissel), vagy racemáz enzim segítségével alakítható át ismét racém - keverékké.

A másik iparilag jelentős izomerizációs reakció a glükóznak fruktózzá történő átalakítása, ami az egyik legnagyobb volumenben végrehajtott ipari enzimes eljárás. A fruktóz ugyanis édesebb, mint a glükóz (utóbbi édessége csak mintegy 70–75%-a a szaharózenak, míg a fruktóz kétszer olyan édes,

mint a szaharóz), továbbá a fruktóz lassabban szívódik fel, és így [glikémiás indexe](#) kisebb a glükóznál, azaz nem emeli olyan gyorsan a vércukorszintet, így módon a keményítőtől előállított kisebb élvezeti értékű glükózt nagyobb élvezeti értékű és egészségesebb cukorra lehet átalakítani. Az eljárás fontosságát mutatja, hogy ma több mint 8 millió tonna glükózt alakítanak át így módon a világban.



3.23. ábra: Glükóz-fruktóz átalakítás

A 3.23. ábra szerinti átalakulás molekulán belüli átrendeződés, **izomerizáció**, amelynek során az aldohexóz glükózból egyensúlyra vezető reakcióban ketohexóz fruktóz képződik. Ezt az átalakítást egy sor enzim képes katalizálni:

- **Glükóz-foszfát-izomeráz** ([EC 5.3.1.9](#), *D-glucose-6-phosphate-ketol-isomerase*), amely enzimet *Escherichia intermedia*, *Aerobacter aerogenes*, *Aerobacter cloaceae* mikrobák képesek előállítani. Az ilyen eredetű enzimek azonban arsenátot (és természetesen foszforilezett glükózt) igényelnek az átalakítási reakcióhoz aktivátorként, ezért ipari (élelmiszeripari) célra nem alkalmasak.
- **Glükóz-izomeráz** ([EC 5.3.1.18](#), *D-glucose-ketol-isomerase*), amelyet egy sor heterofermentatív tejsavbaktérium képes termelni, de alacsony működési hőfok optimuma miatt nem alkalmazzák a gyakorlatban.
- Az iparban egyedül alkalmazott ilyen enzim a **D-xylóz-izomeráz** ([EC 5.3.1.5](#), *D-xylose-ketol-isomerase*), amelynek az ipari felhasználást lehetővé tevő előnyös tulajdonságai a következők:
 - alacsony pH-optimuma van, amely fontos a mellékreakciók elkerülése szempontjából (pszikóz képződése nagy pH-n),
 - nagy a fajlagos aktivitása (azaz kis fehérjetartalom nagy katalitikus aktivitást hordoz),
 - a nagy hőmérsékleti optimum (80 °C) a reaktorok befertőződésének elkerülése miatt jelentős.

Ilyen enzimet sok mikroorganizmus termel xylózzal történt **indukció** hatására, például *Bacillus coagulans* (NOVO cég evvel termel), az *Arthrobacter* sp. (ICI), az *Actinoplanes missouriensis* (GIST-BROCADES), és a *Streptomyces olivaceus* (Miles-Laboratories).

Ipari célra az enzimet nem nyerik ki a sejtekből, hanem a tenyésztés és az azt követő sejthomogenizálás (=sejtfeltárás!) után a sejteket keresztkötés-létesítéssel rögzítik, és az így létrejött ún. whole-cell glükóz-izomeráz készítményt (pl egy ilyen ipari készítmény neve SWEETZYME) porlaszva szárított enzimpor, fagyasztva szárított enzimpelyhek vagy extrudált enzimirudacsok formájában használják fel. Az immobilizált teljes sejteket mind szakaszos üzemű, mind fixágyas töltőtároló-reaktorokban felhasználhatják a konverzióra.

A glükóz-izomeráz enzim optimális működéséhez Mg^{2+} és Co^{2+} fémionokra van szükség, ugyanakkor például a Ca^{2+} ionok mérgezik, ezért az alapanyag glükózoldatot, amelyet a keményítő

enzimes hidrolízisével állítanak elő, ioncserével kalciummentesíteni kell $1 \text{ mg/dm}^3 \text{ Ca}^{2+}$ koncentráció érték alá. A terméket nem kell izolálási/tisztítási eljárásnak alávetni, maga az enzimes átalakulás egyensúlyi keveréke a termék izocukor, izoszörp, amely mintegy 70-71% sz.a. tartalmú, és amelyben 42% a fruktóz és 53% a glükóz. Egyes források szerint az egyensúlyi összetétel 42:51:7, utóbbi a glükóz és fruktóz mellett képződő egyéb cukrokat, illetve oligoszaharidokat jelent. Ma már ioncserés eljárással akár 90% fruktóztartalmú szörpök is előállíthatók, ezek az ún. HFS (high fructose syrup) termékek.

Magyarországon 1978–82 között Szabadegyházán 4 milliárd forintos beruházással egy évi 140 000 tonna kapacitású kukoricafeldolgozó üzem létesült. Ennek a modern kombinátnak, amely hajaz a mostanában elterjedőben lévő ún. [biofinomítók](#)ra, azaz a kukorica minden alkotóját nagy hozzáadott értékű terméké alakította át, a termelési spektruma a következő volt:

folyékony cukor	49 500 t sz.a./év
finomított szesz	200 000 absz. hl/év
kukoricacsíra	10 000 t/év
glutén	6300 t/év
takarmány	30.000 t/év

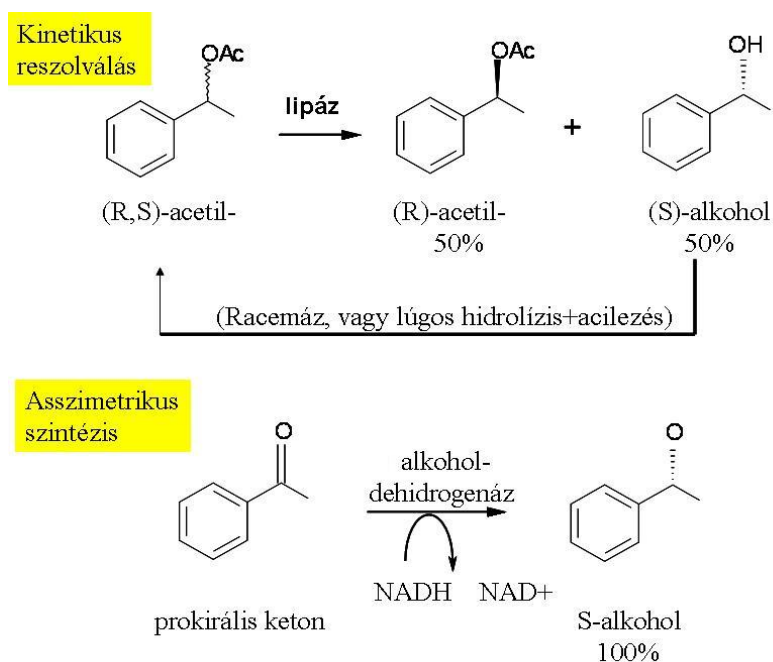
Érdeemes megjegyezni, hogy ez volt az első folyékonycukor-üzem Európában. Ma is működik ez az üzem Hungrana Kft. névvel, és amellet, hogy *kizárólag nem génkezelt magyar kukoricát* dolgoz fel (több mint egymillió t/év), a glükóz, a különböző glükózsörpök és izocukrok mellett a legnagyobb hazai bioetanol-előállító is egyben.

3.6. Reszolválás

Egy kívánt optikai izomer előállítására két út kínálkozik: az ún. [kinetikus részolválás](#), illetve az [aszimmetrikus szintézis](#).

Előbbi esetben (lásd a 3.24. ábrát) egy racém keveréket enzimesen alakítanak át az egyik kívánt enantiomerré. Ekkor természetesen csak a racém keverék 50%-a alakítható át a kívánt terméké, ami a nemkívánt 50% racemizálásával visszavezethető a folyamatba, és így végül 100%-os átalakítás érhető el. Az aszimmetrikus szintézis esetén prokirális vegyületből indulunk ki, amelyet enzimesen 100%-ban lehet átalakítani a kívánt optikai izomerré.

A részolválásnak iparilag különösen az *aminosav-kémiában* van jelentősége, ill. e helyen az általános problémakörből főként ezzel a kérdéssel foglalkozunk.



3.24. ábra: A részolválás általános lehetőségei

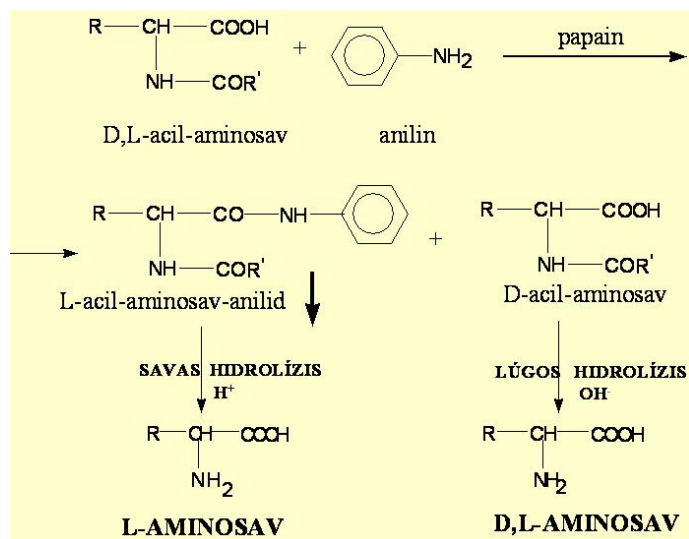
Láthatjuk már ebből az ábrából is, hogy a resolválás művelete során különböző csoportokba tartozó enzimek használhatók fel, hidrolázok (amelyek ipari felhasználásáról a következő fejezetben szólnunk részletesen), például lipázok, acilázok, illetve fehérjebontó enzimek. De az ábrán egy oxidoreduktáz példát is láthatunk. Fontos tehát megjegyeznünk, hogy a resolválás esetében nem egy homogén EC csoport enzimeinek felhasználásáról van szó.

3.6.1. Aminosavak resolválása

Az iparilag termelt aminosavakat főként táplálkozásra (élelmiszerként és takarmányként), valamint gyógyszeralapanyagként használják fel. Ezeket a területeken csak a természetes L-forma hasznosul. A szintetikus módszerek viszont racém-, D-, L-aminosavat eredményeznek, így a racémaminosavak resolválása kiemelt jelentőségű.

A D-, L-aminosavak szétválasztásának leggyakrabban alkalmazott módszere az enzimés resolválás. Az ipari gyakorlatban az enzimés, sztereospecifikus resolválásnak két módszere terjedt el: az **aszimmetrikus szintézis** és az **aszimmetrikus hidrolízis** módszere. Ezeket az enzimés resolválási módszereket alkalmazzák az i-leucin, lizin, metionin, fenilalanin, triptofán és a valin ipari előállításánál.

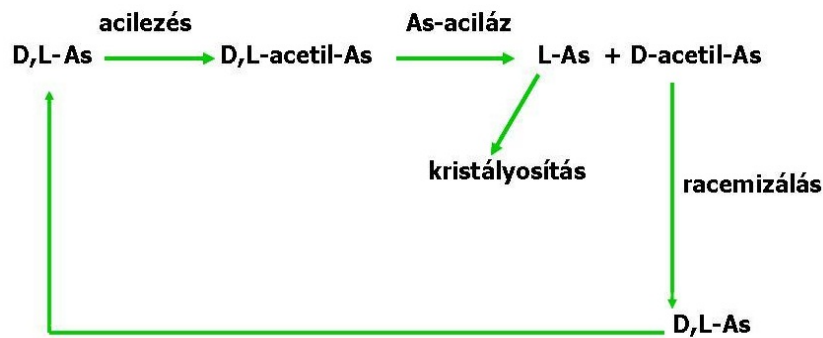
Az aminosavaknak az **aszimmetrikus szintézise** speciális, eltér a 3.24. ábrán bemutatottól. Ebben az esetben is racém aminosav acilszármazékából indulnak ki, amelyet anilinnal és papain-enzimmal ([Papaya hydrolase EC 3.4.22.2](#), régebben 3.4.4.10.) inkubálnak, ekkor acil-L-aminosav-anilid képződik, amely az oldatból kicsapódik¹⁴. A nem reagált acil-D-aminosav az anyalúgban oldatban marad. A kristályos acil-L-aminosav-anilidből savas hidrolízissel szabad L-aminosav nyerhető (azaz itt is megvalósulhat a 100%-os konverzió).



3.25. ábra: Aszimmetrikus aminosav-szintézis

Az **aszimmetrikus hidrolízises** módszerek közül az ipari gyakorlatban a D-, L-aminosavak acil-származékainak specifikus enzimés hidrolízise terjedt el, ami egy kinetikus resolválás. A racém aminosavból először N-acilszármazékot állítanak elő, majd az acil-D,L-aminosavat aszimmetrikusan hidrolizálják amino-aciláz enzimmal (EC [3.5.1.14](#)). A reakció során szabad L-aminosav képződik. Az acil-D-módosulatot az enzim nem képes megtámadni. A két vegyületet ioncserés kromatográfiával vagy szerves oldószeres extrakcióval könnyen el tudják választani egymástól.

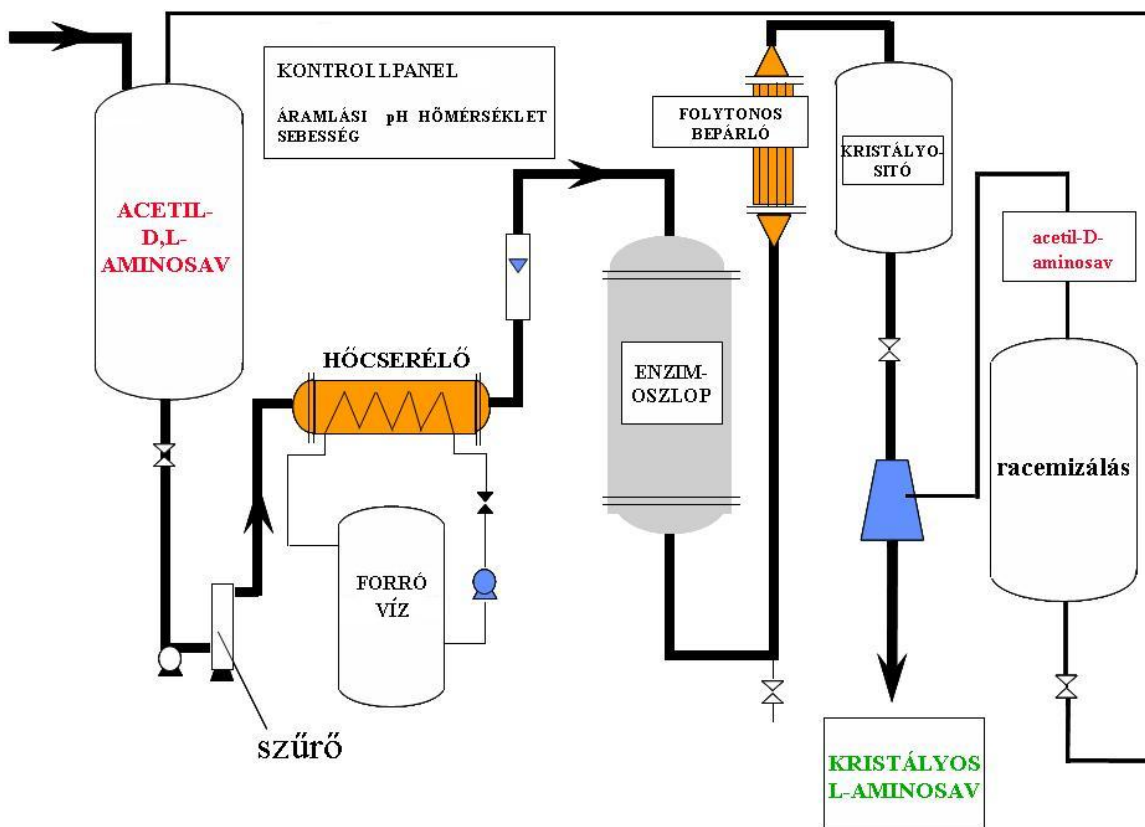
¹⁴ Ez az átalakítás egy fehérjehidrolizáló enzimnek a „természetestől” eltérő irányban, szintézisre történő felhasználása, azaz peptidkötés létrehozása, amire a továbbiakban egyéb példákat is fogunk látni. Ilyen értelemben ez a resolválási módszer logikusan inkább a következő, hidrolízissel foglalkozó fejezetbe tartozna.



3.26. ábra: Aminosav kinetikus reszolválása

Az acilszármazékok közül leggyakrabban az acetilszármazékokat alkalmazzák. Enzimforrásként különböző penészek, elsősorban *Aspergillus* és *Penicillium* speciesek jöhetnek számításba. A penészekből származó aminos-aciláz enzim széles szubsztrátspektrumú, azaz különböző alifás és aromás aminosavaknál használható. A reszolválást vagy szakaszos eljárással oldható enzimmal végzik, vagy immobilizált acilázzal. Ez utóbbi folytonosan is üzemeltethető. Az acetyl-D,L-aminosav DEAE-Shephadex-acilázzal töltött oszlopon áramlik át bizonyos áramlási sebességgel. Az oszlopon való áthaladás során az aszimmetrikus hidrolízis végbemegy. Az enzim az oszlopban nagyon stabil és hosszú ideig használható. A folytonos reszolválás hatékonysága (termelt aminosav-/enzimmennyiség) így sokkal nagyobb, mint a szakaszos eljárásé, ezenkívül a folyamat tökéletesen automatizálható.

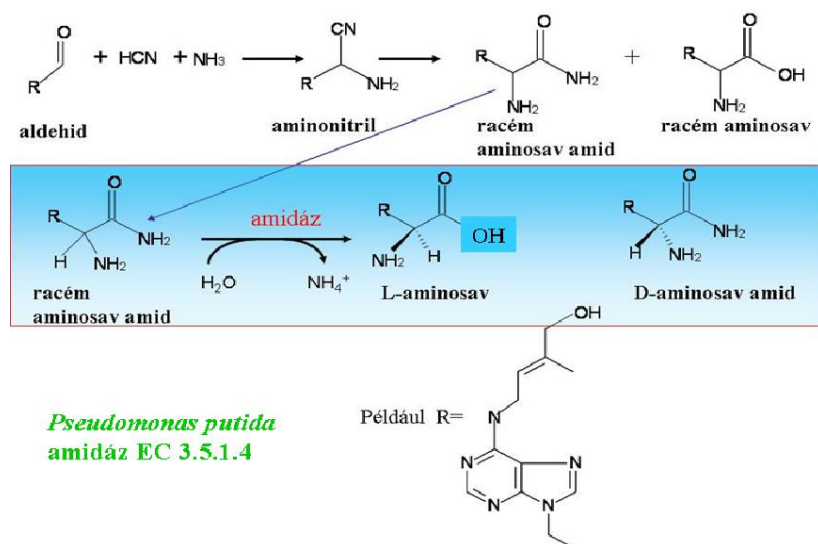
A reszolválásnál a kívánt L-módosulat mellett kb. azonos mennyiségű acetyl-D-aminosav mint melléktermék is képződik. Ezt az „értéktelen” módosulatot racemizálással L-formává alakíthatjuk (pl. lúgos kezeléssel vagy racemáz enzimmal) és a folyamatba visszavezethetjük. Így egy hatékony ipari eljárásnál a D-, L-aminosav szintézise, az optikai reszolválás és a racemizálás szerves technológiai egységet képez. (lásd a 3.27. ábrán bemutatott folyamatábrát).



3.27. ábra: Az aszimmetrikus hidrolízis folyamatábrája

A természetben nem előforduló, de gyógyszeripari intermediereként széleskörűen felhasznált alfa helyettesített aminosavaknak a reszolválására a *Pseudomonas putida* által termelt **amidáz** enzimet találták alkalmasnak a DSM¹⁵ kutatói. Az enzim (EC 3.5.1.4. amidase, acylamidase) nagyon sokféle helyettesített aminosav amidot képes sztereospecifikusan hidrolizálni, a lényeg az, hogy az alfa C-atomon az aminocsoport mellett egy H is legyen.

Maguk a reszolválandó helyettesített racém aminosavkeverékek aminonitrilek hidrolízisével állíthatók elő. A 3.28. ábrán a folyamat lépései, bennük az enzim reszolválási lépés követhető, valamint látható, hogy igen nagy szubsztituens esetében is működik a reszolválás.



3.28. ábra: Nem természetes L-aminosavak előállítása

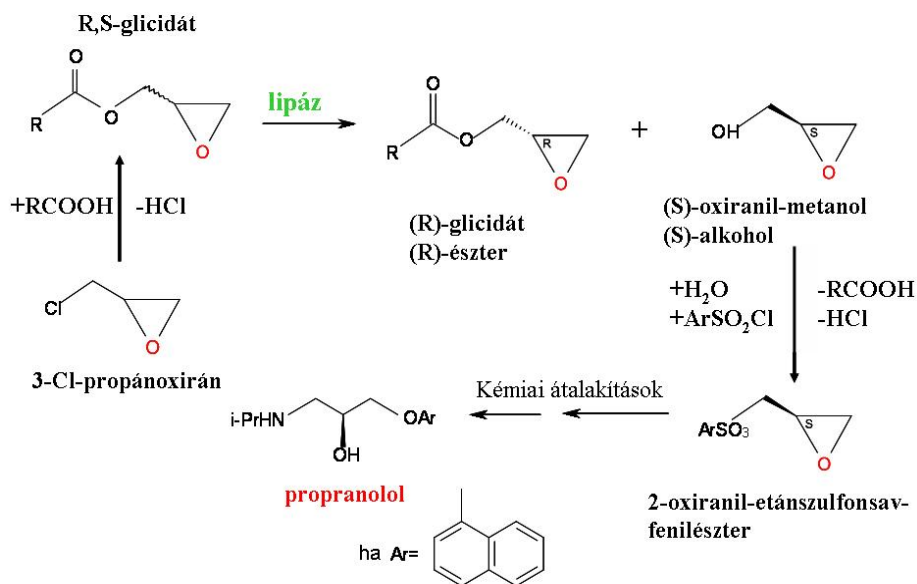
3.6.2. Reszolválás lipáz enzimekkel

Jellemző manapság szerves molekulák sztereoselektív előállítása során a lipáz enzimek, enzimkészítmények egyre növekvő mértékű, szinte rutinszerű felhasználása. A lipáz enzimeket sok forrásból beszerezhetjük, leggyakrabban a sertés pankréasz lipázát, illetve bizonyos mikrobák (pl. *Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea* stb.) enzimeit használják fel. Ez az enzim is a hidrolázok csoportjába tartozik: EC 3.1.1.3. Triacylglycerol lipase vagy egyszerűen lipáz.

A 3.29. ábrán egy ilyen gyógyszeripari szempontból fontos átalakítást, a szívgyógyászatban nélkülözhetetlen ún. bétablokkolók egyikének a holland DSM által követett eljárását láthatjuk. Az eljárás alapanyaga a prokirális 3-Cl-propán-oxirán, amelyet előbb egy racém glicidáttá alakítanak, amit enzimesen reszolválnak lipázzal a kívánt sztereoizomer (S)-oxiranil-metanollá. Ez az alapvegyülete a további, most már szintetikus lépéseknek, amelyek a bétablokkoló végtermékhez vezetnek. A kinetikus racemizálási kulcslépés során visszamaradó (R)-észter racemizálható és visszavezethető a reszolválási lépésbe.

Ilyen és hasonló lipázkatalizálta sztereoselektív észterhidrolízisek tömegét alkalmazzák ma már a különböző gyógyszerlaborok és -gyárak optikailag tiszta intermedierek és végtermékek előállítására.

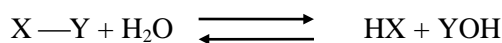
¹⁵ Dutch State Mines az eredeti cégnév.



3.29. ábra: Lipázkatalizálta aszimmetrikus hidrolízis

3.7. Hidrolízis

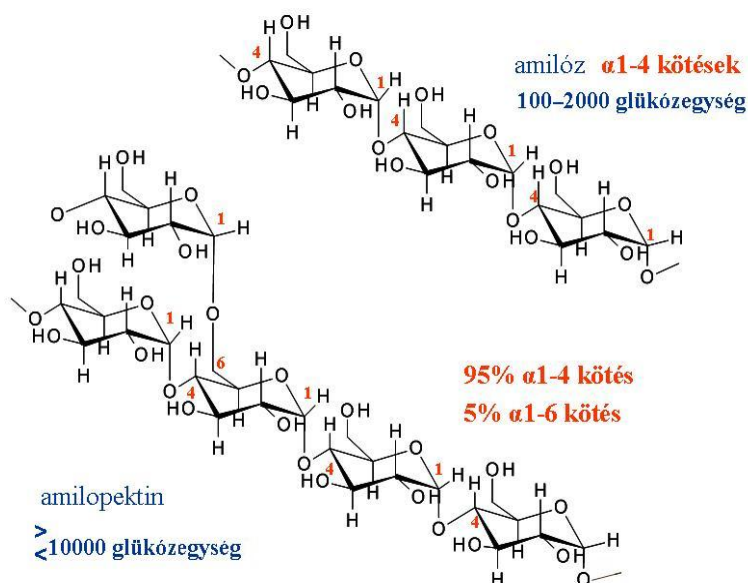
A biokémiai enzimes hidrolízist a *hidrolázok* katalizálják. Ezek az EC 3. csoport enzimei, amelyek egyikével-másikával már az eddigiekben is találkoztunk. A hidrolázok nagyszámú enzimcsoportja (észterázok, glikozidázok, proteázok, lipázok, acilázok stb.) mindegyikének közös jellemzője, hogy a szubsztrátból vízfelvétellel képződnek a termékek:



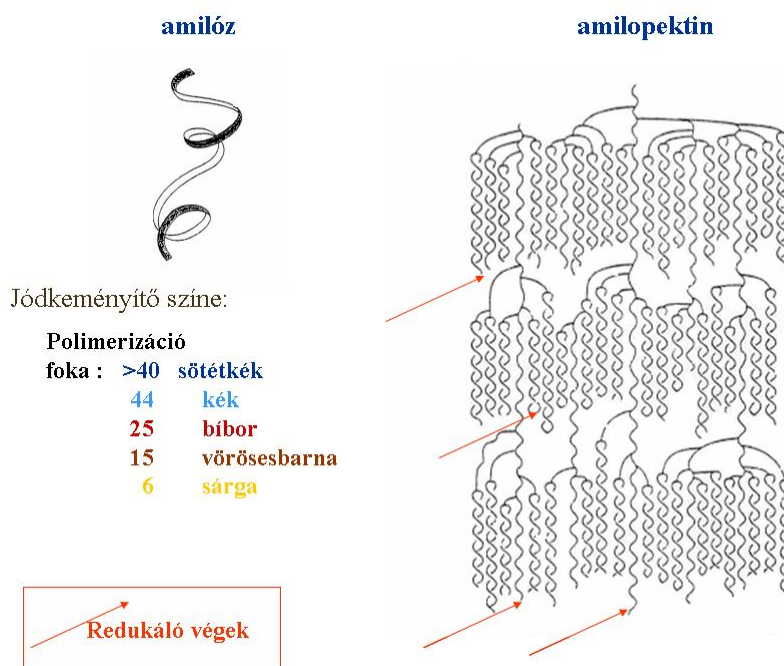
A ¹⁸O-val jelzett vízzel végzett hidrolízisreakció fontos szerepet játszik a hidrolízis mechanizmusának vizsgálatában. A fenti reakcióban a víz OH-ja a szubsztrát Y-komponenséhez kapcsolódott. Elméletileg az OH az X-komponenshez is kötődhet. A két lehetőséget reakciómechanizmus szempontjából meg kell különböztetnünk. A továbbiakban ipari szempontból jelentős hidrolízises átalakításokat tekintünk át részletesebben a teljesség igénye nélkül, kiemelve a legfontosabbakat, illetve a valamilyen szempont szerint jelentőseket. A következőkben szereplő hidrolízisek ennél részletesebb tárgyalása a biomérnöki kurrikulum egyéb tárgyaiban szerepel (technológia tárgyak, enzimológia).

3.7.1. A keményítő enzimes hidrolízise

A keményítő, a felépítésében részt vevő glükózmonomerek tekintetében *homopolimer*, a glükozidkötések különbözősége révén azonban két eltérő szerkezetű polimert jelent. Az egyik az **amilóz**, amely α-1,4-glükozidkötésekkel összekapcsolt láncpolimer, amelyben az egy molekulát alkotó glükózegységek száma – a polimerizációs fok – 100–2000 között változik. A másik keményítőkomponens az **amilopektin**, amely mintegy 95% α-1,4-kötés mellett mintegy 5% elágazó, α-1,6-kötést is tartalmaz. Az egy elágazásra jutó glükózegységek száma átlagosan tehát 20, polimerizációs foka pedig több 10 000 is lehet. A keményítők két frakciójának elsődleges felépítését a 3.30. ábra szemlélteti. A különböző növényekben képződő keményítőszemcsék – amelyeket ipari módszerekkel kinyernek – különböző arányban tartalmazzák az amilózt és az amilopektint. Az amilóz helikális szerkezetét és az amilopektin fürtös (klaszteres) elágazásokat tartalmazó szerkezetét tanulmányozhatjuk a 3.31. ábrán, míg a növényi keményítőszemcse felépítését (felépülését a növekedés során) szemlélteti a 3.32. ábra.

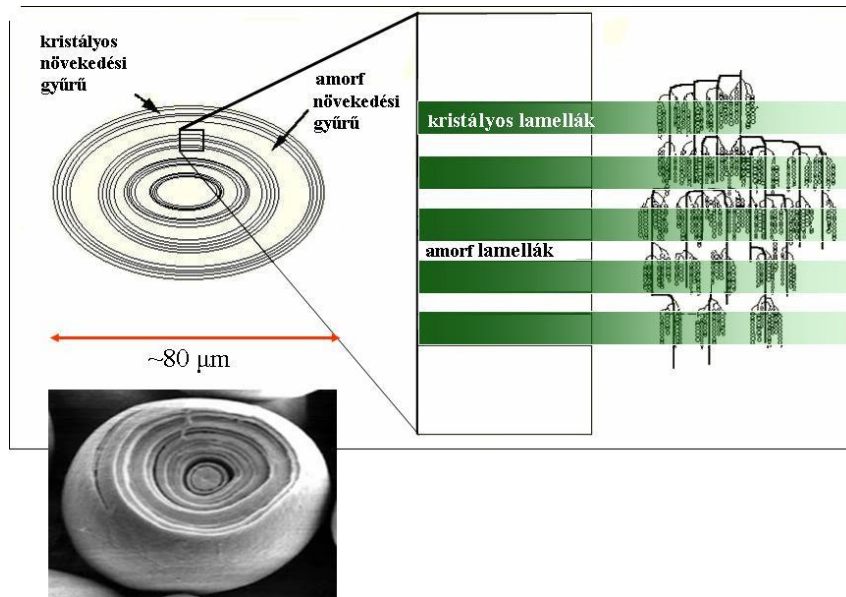


3.30. ábra: Az amilóz és amilopektin szerkezete



3.31. ábra: Az amilóz hélice és az amilopektin klasztere

A keményítő enzim hidrolízise játszódik le a növényi magvak csírázásánál, a magasabbrendű élőlényekben az emésztésnél, egyes mikroorganizmusok tápanyagfelvételénél stb. A kötés hasítása minden esetben a C_1 -O atomok között történik, amit szintén ^{18}O izotóppal bizonyítottak. A hidrolízisnél a felvett vízmolekula OH-csoportja tehát a C_1 glikozidos szénatomhoz, míg H része az O atomhoz kapcsolódik. Az OH-csoport kapcsolódása sztereospecifikus, egyik esetben a C_1 atomon α -, más esetben β -konfigurációjú kapcsolódás jön létre. Ebből a szempontból csoportosítva a keményítőt bontó ún. *amilolitikus enzimeket*, vannak **α -amilázok**, amelyek α -konfigurációjú lineáris és elágazó *dextrin*eket képeznek a keményítő α -1,4-es kötéseinek hasítása révén.



3.32. ábra: Egy növényi keményítőszemcse felépítése

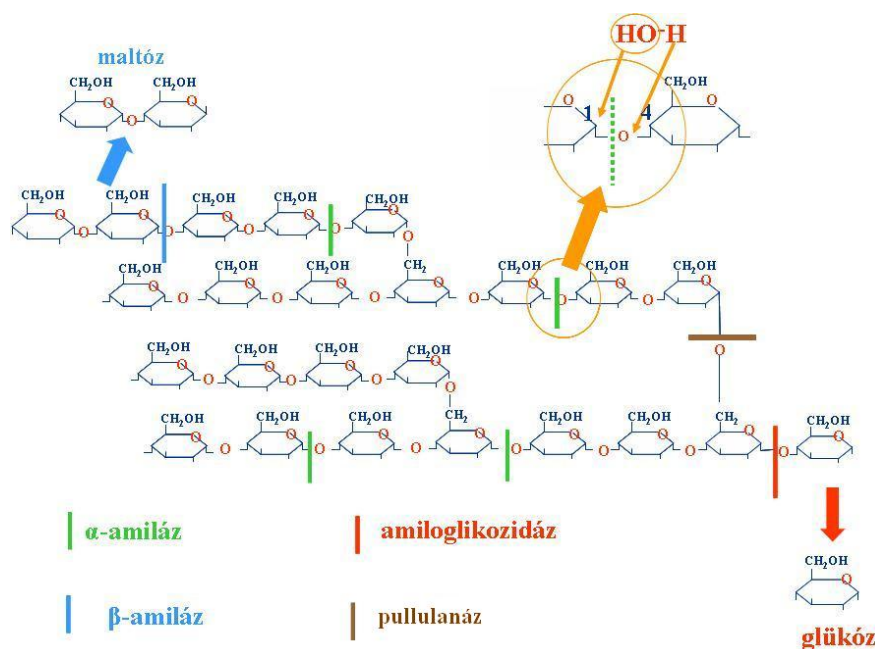
Az α -amiláz ([EC 3.2.1.1.: alpha-amylase](#)) extracelluláris és általában induktív enzim, amely a keményítőt statisztikusan támadja meg (tehát *endoenzim*), és így a reakció eredménye kettő, három és nagyobb polimerizációs fokú dextrinek. Az α -amilázokat sok gomba- és baktériumfaj képes termelni. Ezek egymástól keményítőfolyósító és/vagy -elcukrosító hatásban, továbbá pH- és hőmérséklet-optimumban, valamint stabilitásban különböznek. A legtöbb α -amiláz stabilizátorként kalciumot igényel működése során. A kereskedelmi forgalomba kerülő α -amiláz-készítmények gyártásánál *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* törzseket és újabban termotabil *Thermomonospora* törzseket használnak.

A **β -amilázok** β -konfigurációjú maltózokat képeznek szintén az α -1,4-es kötések hasítása révén. Ezek az enzimek exoamilázok, azaz a láncvégről, mégpedig a nemredukáló láncvégről kezdenek bontani. A β -amilázok ([EC 3.2.1.2.: beta-amylase](#)) jórészt növényi (maláta) eredetűek, de mikroorganizmusok is képesek ilyen enzimeket szintetizálni. A bakteriális β -amilázok hőmérséklet-optimuma nagy, ami igen jelentős technológiai előnyt biztosít számunkra (sokkal nagyobb a maltózképződési sebesség!), továbbá nem igényelnek kalciumot a stabilizálásukhoz és aktivitásukhoz.

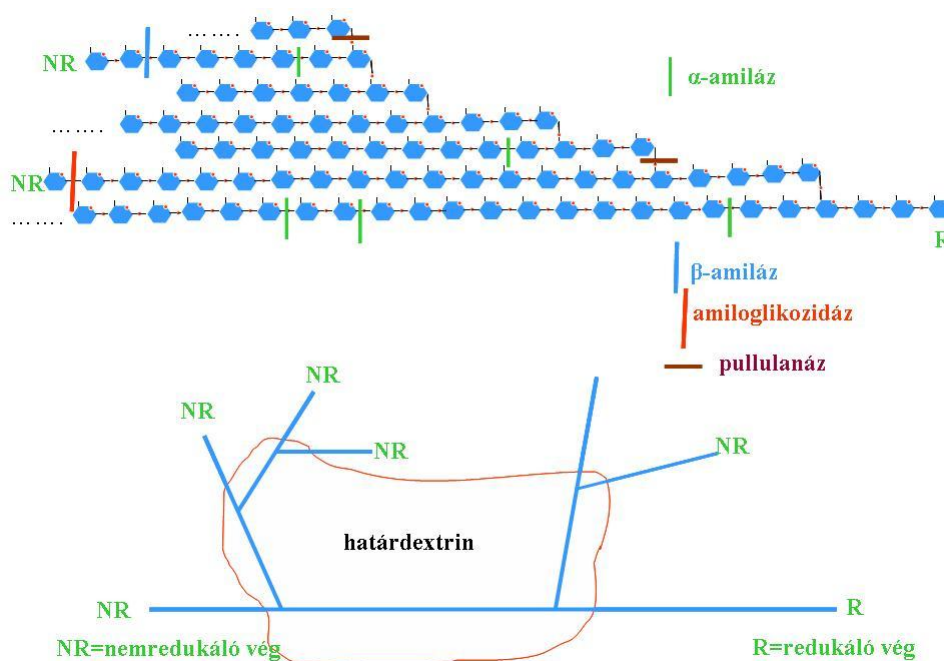
A **glükó-amilázok** – vagy γ -amilázok, illetve amiloglikozidázok – ([EC 3.2.1.3. – glucan 1,4-alpha-glucosidase](#)) β -konfigurációjú glükózegységeket hasítanak le, és így a teljes keményítőmolekulát glükózzá képesek hidrolizálni (*exoenzimek*). A maltózt csak nagyon lassan bontják, és nem támadják, illetve csak igen lassan az elágazó láncok 1,6-kötéseit, ezért a glükó-amilázoknak kitett keményítő hasítási termékei a következők: glükóz, maltóz és határdextrinek keverékei. Az enzim előállítására különböző *Aspergillus* és *Rhizopus* törzseket használnak.

A keményítőt bontó enzimek negyedik csoportja, a **pullulanázok**, ill. izoamilázok az amilopektin elágazó oldalláncait, α -1,6-kötéseit képesek hasítani.

A négy enzim(csoport) keményítőt bontását, a képződő termékeket és a határdextrin kialakulását a 3.33. és a 3.34. ábrán követhetjük.



3.33. ábra: A keményítőtomboló enzimek működése



3.34. ábra: Keményítőtombítás és határdextrin kialakulása

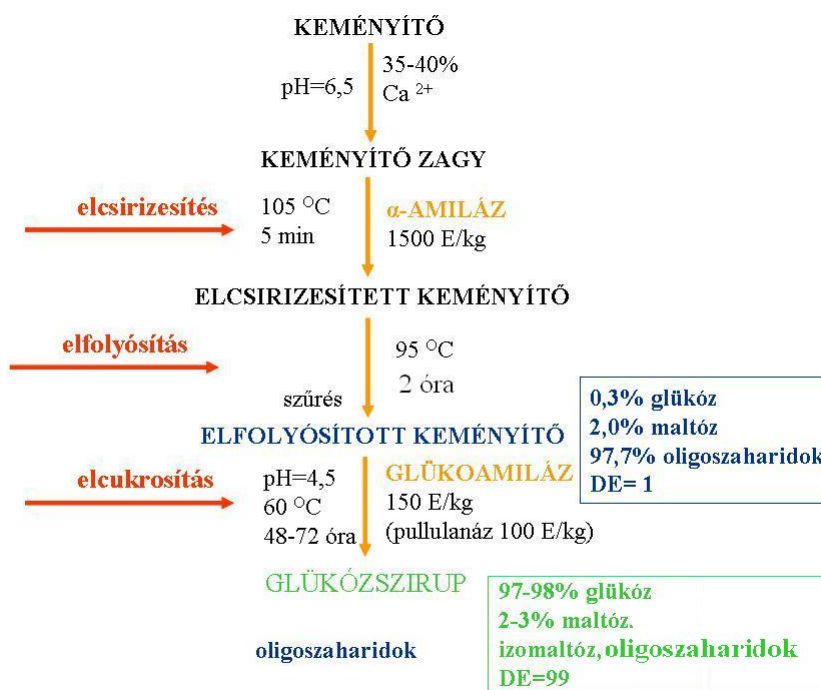
Az ábrából nyilvánvaló, hogy az exoenzimek (beta-amiláz, glükoamiláz és pullulanáz) a nemredukáló végéről kezdik a bontását a keményítőmolekulának, valamint, hogy a bontás előrehaladtával nő redukálócsoportok száma, minden egyes glikozidkötés hidrolízisével eggyel, így a lebontás előrehaladását jól jelző mérőszám az ún. glükózegyenérték (dextróegyenérték).

$$DE = 100 * \left(\frac{\text{elbontott glikozidkötések száma}}{\text{kezdetben jelenvolt összes glikozidkötések száma}} \right) =$$

$$= 100 * \left(\frac{\text{redukálócukor, glükózban kifejezve}}{\text{teljes szénhidrátmennyiség}} \right)$$

A keményítőhidrolizátumok, így a maltóz- vagy a glükóztartalmú szirupok (az elcukrosítás után) és a glükóz-fruktóz szirupok (az izomerizálás után) az élelmiszeriparban nagy szerepet játszanak mint adalékok. Az édes-, az üdítőital-, a sütő-, a konzerv- és a mélyhűtőiparban alkalmazzák ezeket nagy mennyiségben.

A keményítő hidrolizátumok előállításának menete vázlatosan a következő (lásd 3.35. ábra): A vízoldhatatlan keményítőt szuszpenziót készítenek, amelyet 105 °C-ra melegítenek fel. Ekkor az α -amiláz egy részét is hozzáadják, azaz már a csirizesedés közben elkezd kifejteni hatását az enzim. Ez a művelet igen rövid ideig tart (5 perc), ezután a zagyot visszahűtik 95 °C-ra, és hozzáadják az enzim másik részét is. Az elfolyósítást Ca^{2+} ionok jelenlétében végzik mintegy 2 óra hosszat. Ez a művelet az elfolyósítás, a csirizesedés közben nagy viszkozitásúvá vált keményítőzagy ugyanis az enzim hatására elveszti nagy viszkozitását, elfolyósodik. Az elfolyósított keményítőoldatot rendszerint szűrés után pH=4,5-en és 60 °C-on cukrosítják el glükooamiláz enzimmel. Ezen elcukrosítási művelet során, amely technológiáfüggően 48–72 óra hosszat is eltarthat, esetenként pullulanáz (izoamiláz) enzimet is adnak az oldathoz. Az enzimek specifitása és az átalakítás körülményei meghatározzák a végtermék összetételét. A keményítő hidrolízisével, a glükózsirup és a kristályos glükóz előállításával a technológia tárgyak bőségesen és részletesen foglalkoznak.



3.35. ábra: A keményítő ipari lebontása glükózzá

Az elcukrosítás pontos körülményeinek és az annak során felhasznált enzimeknek, enzimkeverékeknek a függvényében különböző bontásfokú glükózsörpök, illetve a glükóz mellett maltózt vagy főleg maltózt (ekkor maltózsörpről beszélünk) tartalmazó, különböző édességű sörpök állíthatók elő az édesipar, cukrászati ipar igényeinek megfelelően.

Az említetteken kívül a keményítő hidrolízisének még egy sor iparágban, például a sör- és szesziparban, valamint a textiliparban az irtelenítésnél, illetve a papíriparban van jelentősége.

3.7.2. A cellulóz hidrolízise

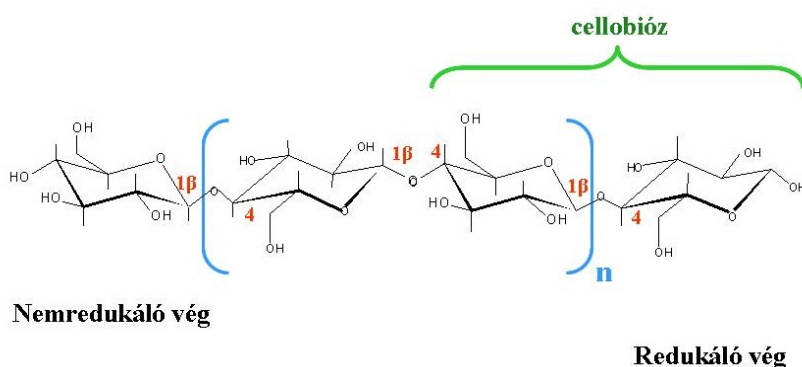
A cellulóz, hasonlóan a keményítőhöz, szintén glükóz homopolimer, de az egyes glükózegységek között nem α -, hanem β -glikozidos kötések vannak elágazások nélkül, így a cellulóz egy lineáris β -(1→4)-glükán. A szerkezet egy részletét a 3.36. ábrán láthatjuk. A cellulóz a növényi sejtek sejtfalának fő komponense. Lineáris molekulálcái a növények rostjaiban bonyolult szerkezetű kompozitot alkotnak a hemicellulózokkal (5- és 6-szénatomos heteropoliszaharidok) és a ligninnel (aromás szerkezetű polimerek). A rostok felépítésének tárgyalása kívül esik tematikánkon, az olvasó

közelítő benyomást kaphat például az itt hivatkozott Nature-cikk¹⁶ igen informatív grafikájából. (<http://www.nature.com/nature/journal/v454/n7206/images/nature07190-f2.2.jpg>)

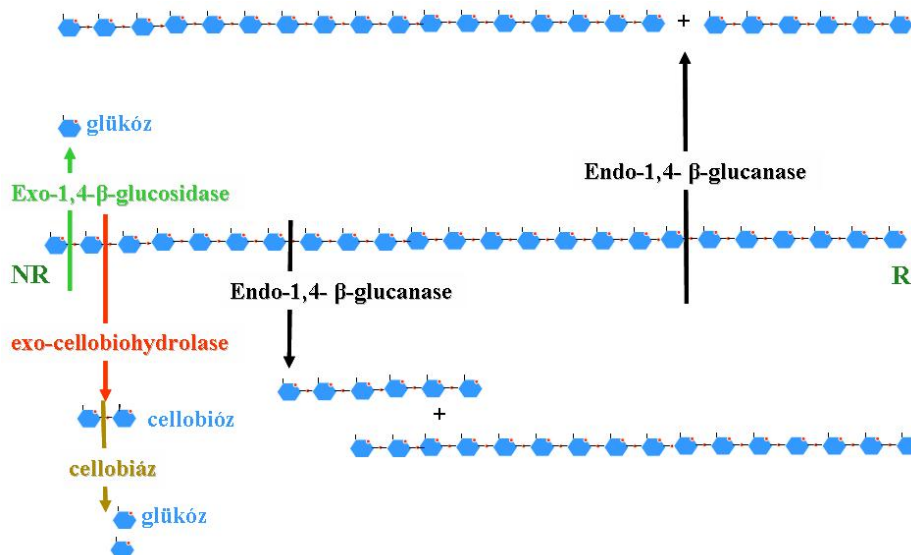
Tekintve, hogy a cellulóz az évente a természetben (erdők, mezőgazdaság stb.) újratermelődő biomassza legnagyobb része, ezért perspektivikusan mind a kémiai iparnak, mind az energiaszektorban már ma is potenciális, de leginkább a jövőben a legfontosabbá váló alapanyaga. Ezért érdemes röviden áttekinteni, hogy enzim lebontásában milyen enzimszisztéma vesz részt. Ahhoz ugyanis, hogy az említett kémiai és energia-alapanyag szerepét betölthesse, le kell bontani a felépítő glükózegységekre, amely azután a további kémiai átalakításoknak kiinduló anyaga lehet (pl bioetanol).

A cellulóz enzim lebontásában – hasonlóan a keményítőéhez – egy több enzimből álló komplex vesz részt. Egy sor mikroorganizmus képes ilyen enzimek előállítására, ezek között legelterjedtebben alkalmazott a *Trichoderma reesei*. Ennek cellulóz készítményei három enzim keverékét tartalmazzák:

Az egyik eleme a komplexnek a cellulóz (EC 3.2.1.4.: endo-1,4- β -glucanase, **Endoglucanase**), amely tehát egy a poliszaharidlánc mentén statisztikusan bontó **endoenzim**, amely kisebb oligoszaharidokra bontja szubsztrátumát.



3.36. ábra: A cellulóz homopolimer szerkezete



3.37. ábra: A cellulózbontó enzimek működése

¹⁶ Genomics of cellulosic biofuels Edward M. Rubin *Nature* 454, 841-845(14 August 2008)
doi:10.1038/nature07190

A másik eleme a komplexnek a **glükán 1,4- β -glükózidáz** (EC [3.2.1.74.](#): exo-1,4- β -glucosidase), amely **exoenzim** és a láncvégről szukcesszíve glükózmolekulákat hasít le.

A komplex harmadik eleme a **cellulóz 1,4- β -cellobiozidáz** (EC [3.2.1.91.](#): exo-cellobiohydrolase vagy 1,4-beta-cellobiohydrolase). Ez az enzim a lánc nemredukáló végéről cellobioz egységeket hasít le. Végül a cellobioz hidrolízisét két glükózzá a **cellobiáz** enzim (EC [3.2.1.21.](#): Beta-glucosidase) katalizálja. A cellulózbontás sematikus összefoglalása látható a 3.37. ábrán.

E helyütt csak a közvetlenül a cellulózmolekulát bontó enzimeket említettük meg. Tudni kell, hogy a növények lignocellulózaiban található hemicellulózok, illetve lignin bontásában részt vevő, meg a ragasztóanyagként szereplő pektint bontó enzimek is részt vesznek a lignocellulóz-struktúrák fel-, illetve lebontásában.

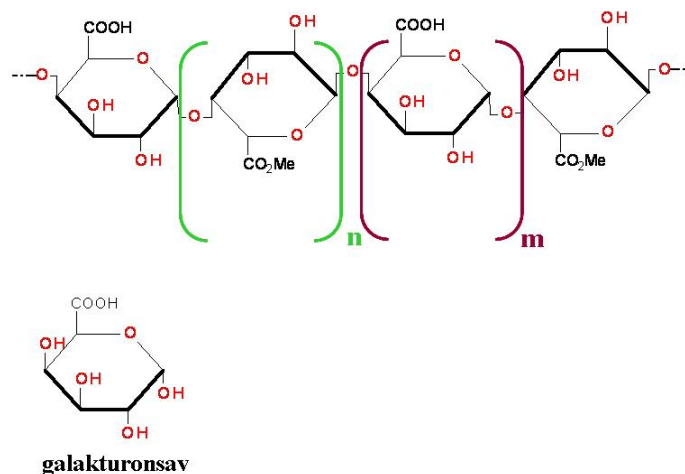
3.7.3. A pektin enzimes hidrolízise

A pektin a növényvilágban majd olyan elterjedt poliszaharid, mint a cellulóz és a keményítő. Heteropoliszaharid, amelynek a felépítésében a fő komponens a galakturonsav és annak metilésztere, ritkábban amidja, amelyek homooligomer régiókban, illetve szukcesszív módon követik egymást az alapláncban, amint a 3.38. és 3.39. ábrák mutatják. Ugyanakkor más monoszaharidok is részt vesznek a felépítésében (fajfüggően): ramnóz, galaktóz, arabinóz és xilóz. A ramnóz-molekulák beépülnek a lineáris alapláncba, míg a xilóz, illetve a galaktóz vagy az arabinóz elágazásokat képeznek (oldalláncok), amitől azonban az egész molekula lineáris jellege nem változik meg.

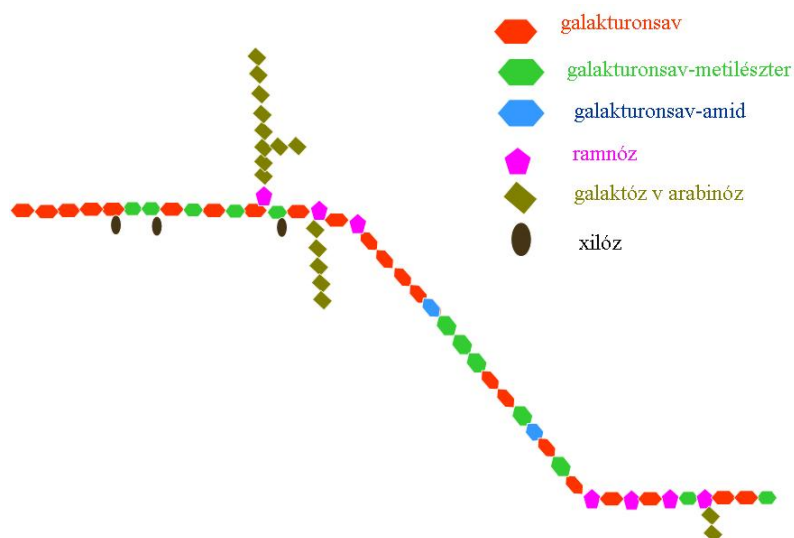
A különböző gyümölcsök tartalmazzák a legtöbb pektint változó mennyiségben. Ez a pektin a felelős a dzsemek gélszerkezetéért és a gyümölcslevek nehezen szűrhető kolloidális zavarosságáért.

A pektinek fő lánc bontásáért a pektináz vagy poligalakturonáz enzimek a felelősek. Ez is egy enzimkeverék, amely legalább három komponensből tevődik össze. Az egyes enzimkomponensek közös jellegzetessége, hogy a lineáris felépítésű pektinlánc glikozidkötéseit hidrolizálják. Eltérnek viszont a támadáspontban, vagy láncvégről hasítanak le egy-egy galakturonsav-egységet, ezek az exopoligalakturonázok (EC [3.2.1.67](#) **exopoligalacturonidase**), vagy a láncot statisztikusan támadják, ezek az endopoligalakturonázok (EC [3.2.1.15](#) **endopoligalacturonase**, amely az 1,4- α -D-galactosiduron-kötés statisztikus bontását végzi) és a **pectin lyase** (EC [4.2.2.10](#) vagy endo-pectin lyase), amely oligoszaharidokat szabadít fel, nemredukáló véggel.

A poligalakturonázok (pektinázok) mellett rendszerint jelen van a pektinészteráz is (EC [3.1.1.11](#) **pectinesterase** vagy pectin methylesterase), amely a pektin galakturonsav-metilészter csoportjait hidrolizálja metanolt hasítva le arról.



3.38. ábra: A pektin alappolimerének szerkezete



3.39. ábra: A teljes pektinlánc szerkezete

Pektinbontó enzimkomplexeket nagyon sok mikroorganizmus képes szintetizálni, így elsősorban penészek (*Aspergillus*- és *Penicillium*-félék) jó pektinázforrások. A termelt enzimek extracelluláris (sejten kívüli) természetűek, tehát tenyésztés után a fermentléből fehérjeizolálási módszerekkel preparálhatók. A pektinhidrolízisnek több ipari folyamatnál van jelentősége. Ha pektináz-preparátumot adunk gyümölcszúzalékhoz, akkor a léhozam 2–8%-kal növelhető. A léhozamnövekedés a nagy viszkozitású és lémegekötő-képességű pektin hidrolízisének tulajdonítható. A gyümölcsléipar az enzimpreparátumot ezenkívül gyümölcsléderítésre is felhasználja. Az enzimmel nem kezelt gyümölcslé zavaros és szűrhetetlen, mivel a gyümölcslé kolloidális anyagait (fehérjéket, rostanyagokat stb.) a pektin mint kiváló védőkolloid „oldatban” tartja. Ha a pektint enzimes úton lebontjuk, a védőkolloid hatása megszűnik, és a lé könnyen kristálytiszttá szűrhető. A pektinhidrolízisnek a felsoroltakon kívül a textiliparban is van jelentősége, a len és a kender áztatásánál. A len és kenderkórók feltárása mikrobiológiai kezeléssel, az áztatás során történik. A mikrobiológiai folyamat célja a külső hancsrostok maradéktalan elválasztása a belső farészektől. A hancsrészben cellulózban dús, rugalmas kötegeket, rostnyalábokat találunk, amelyeket egymással és a farésszel pektin (mint ragasztóanyag) köt össze. A kenderáztatásnál ez az intracelluláris pektinanyag feloldódik, és ezáltal a szálak szabaddá válnak. A kender és len növényen mindig van a talajból származó, pektinázt termelő *Bacillus macerans* és *Bacillus asterosporus*, amelyek a számukra kedvező életfeltételeket jelentő meleg (30–35 °C-os) áztatóvízben gyorsan elszaporodnak.

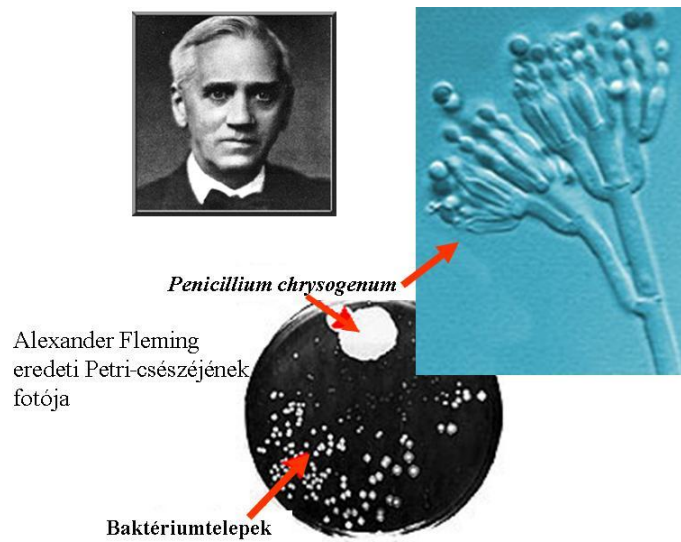
A kereskedelemben kapható, elsősorban gyümölcsléderítéshez használatos pektolitikus emzimek készítmények a fenti enzimeken kívül rendszerint hemicelluláz-keveréket is tartalmaznak, amelyekben xylan endo-1,3- β -xilozidáz (EC 3.2.1.32.), xylan 1,4- β -xilozidáz (EC 3.2.1.37.) és α -L-arabinofuranozidáz (EC 3.2.1.55.) enzimek vannak jelen.

3.7.4. A penicillin enzimes hidrolízise

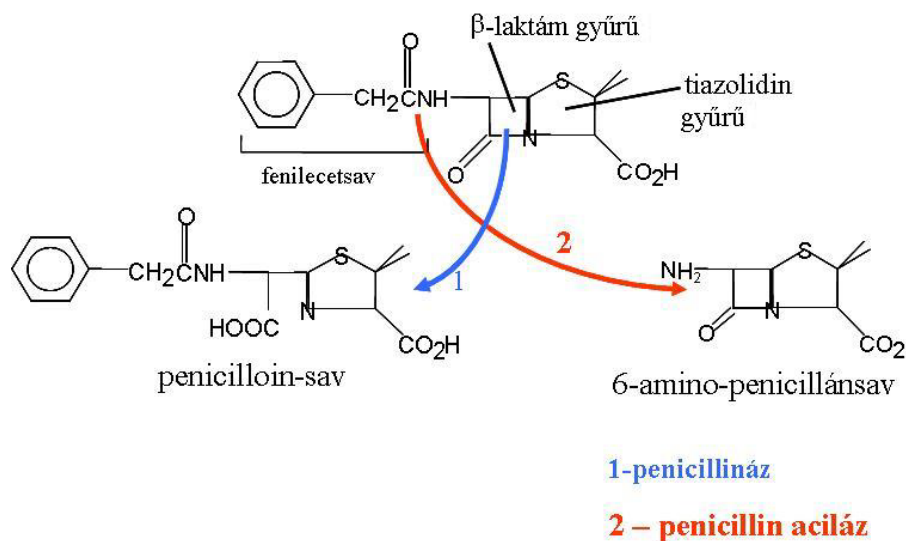
A *Penicillium chrysogenum* fermentációjával termelt **benzil-penicillin** (penicillin G) nevű antibiotikumot, amelyet Alexander Fleming véletlen mikrobiális fertőzés során fedezett fel 1928-ban (lásd a 3.40. ábrát), eredeti formájában csak korlátozott mértékben használják fel, legnagyobb részét egy enzimes technológiával átalakítják **6-amino-penicillán-savvá** (6-APA a rövidítése az angol 6-amino-penicillanic acid névből), amely azután az úgynevezett felszintetikus penicillinek családjának fő alapanyagát képezi.

A penicillin és rokona, a cefalosporin és felszintetikus származékaik az ún. β -laktám antibiotikumok csoportját alkotják, és baktériumok sejtfalának szintézise során a peptid keresztkötések létrejöttét gátolják, így módon a sejtszaporodás során csak sejtfa nélküli protoplasztok tudnak létrejönni, amelyek ozmotikusan kipukkadva elpusztulnak.

A penicillin szerkezete a 3.41. ábrán látható, amelyen feltüntettük a penicillin bomlását okozó két enzimnek a támadáspontját is. Míg a penicillin aciláz enzim a peptidkötést hasítja, így létrehozva a 6-APA vegyületet, amely a félszintetikus penicillinek kiindulási vegyülete, addig a penicillináz enzim a β -laktám gyűrű felhasításával antibiotikus hatással már nem rendelkező penicilloinsavat eredményez. Ez utóbbi enzimnek a jelenléte a penicillinrezisztens törzsekben okozza a rezisztenciát, azaz az antibiotikum lebomlik és így lesz hatástalan. Mivel a rezisztencia átadódhat egyik specieszről a másikra, ezért képes terjedni a baktériumfajok körében. Ez a jelenség és a hatásspektrum szélesítésének igénye (hogy ne csak Gram⁺, hanem Gram⁻ baktériumok ellen is legyen hatékony) teremtette meg az egyre változatosabb félszintetikus penicillinek előállításának igényét.

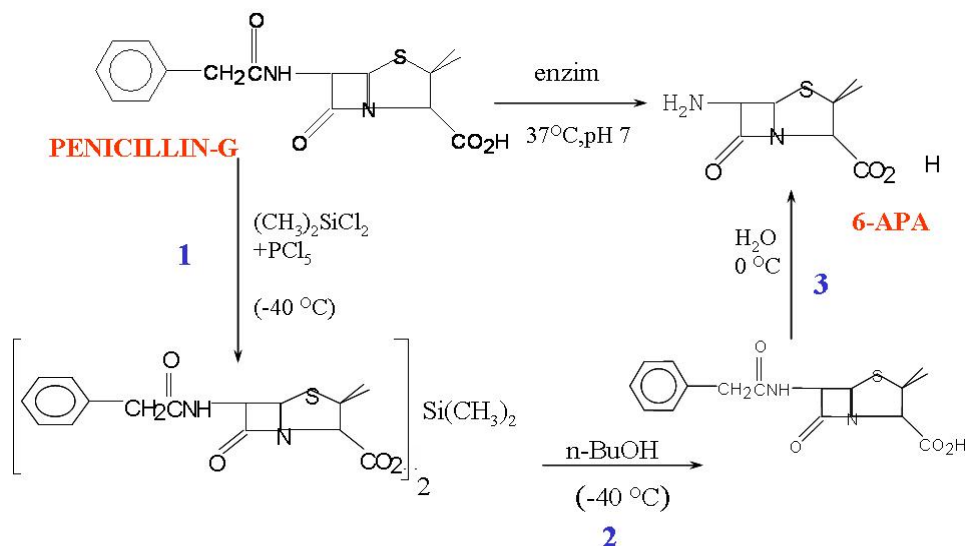


3.40. ábra: Fleming felfedezése: a penicillin



3.41. ábra: A penicillin-G szerkezete és lebontó enzimei

A benzil-penicillinnek 6-APA-vá alakítását kémiai módszerrel is el lehet végezni a 3.42. ábra tanúsága szerint, azonban igen alacsony hőmérséklet szükséges az átalakításhoz, illetve szigorúan vízmentes körülményeket kell fenntartani, így ez a szintetikus kémiai eljárás nem lehetett versenyképes a biokonverziót felhasználó eljárással.



3.42. ábra: APA-szintézis enzimesen és kémiai módszerrel

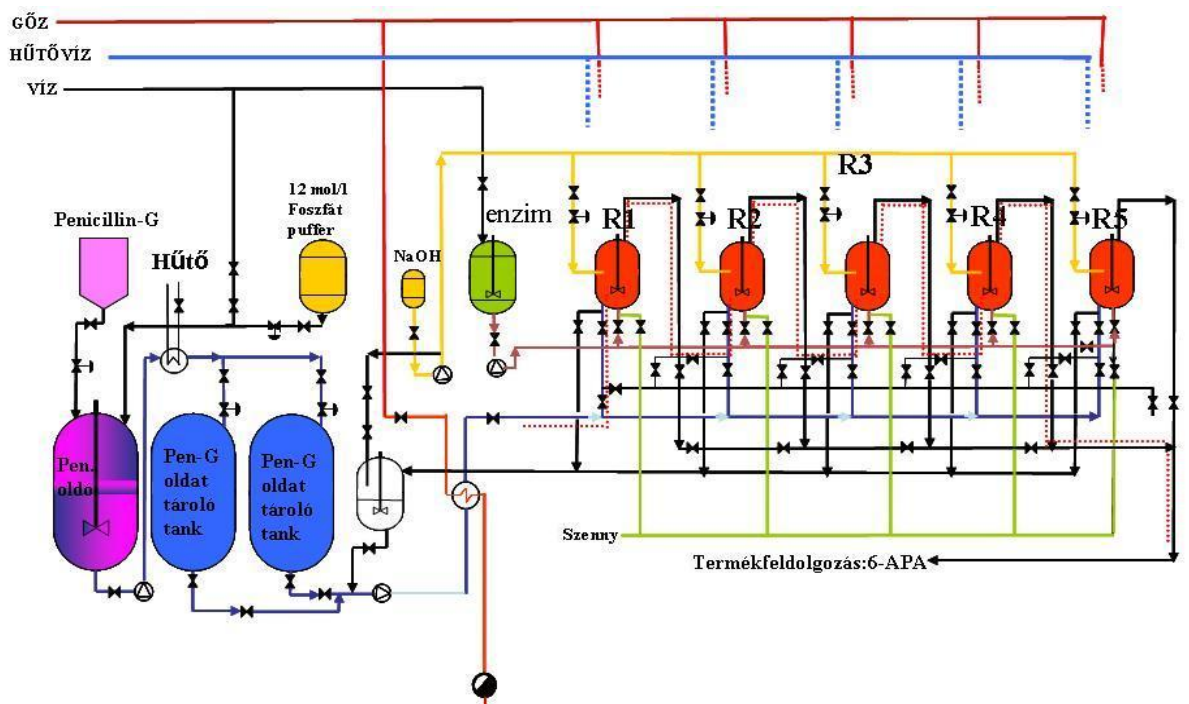
A biokonverzióhoz felhasznált *penicillin aciláz* (EC [3.5.1.11.](#)) enzimet (más néven penicillin-amidáz vagy penicillin-amido-hidroláz) más törzsek mellett például az *Escherichia coli* baktériummal állítják elő.

Az enzimet nagy hozamú *E. coli* szakaszos fermentációjával állítják elő. A sejteket centrifugálással választják el a fermentlétől, egy kisebb térfogatú pufferoldatban felfuszpendálják, majd nagy nyomású homogenizátorral feltárlják. Ezt kétlépeses kisózás követi: először a sejtörmelékeket és a nukleinsavakat csapják ki, majd az enzimet. Az újraoldott enzimet tovább tisztítják, majd a relatíve tiszta enzimet polimergolyókra immobilizálják (ma főleg az ún. EUPERGIT-re rögzítés történik). Ezeket az immobilizált enzimirészesceket kereskedelmi forgalomban meg lehet vásárolni, és eléggé stabilisak ahhoz, hogy ipari felhasználást nyerhessenek (néhány hónapos felezési idejük van).

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 PEN-G inhibitorai a reakciónak. Részletes számítások azt mutatták, hogy töltöttoszlop-reaktor használata lenne az optimális ebben az esetben. Amint azonban a reakció előrehalad, a pH csökken, hiszen savas karakterű karboxilsav (fenilecetsav) az egyik bomlástermék. A pH-csökkenés viszont a 6-APA termék bomlásához vezet, ezért pH-szabályozást kell megvalósítani. A pH-szabályozás azonban töltött oszlopban nem lehetséges a nem pillanatszerű ingrediens elkeveredés miatt.

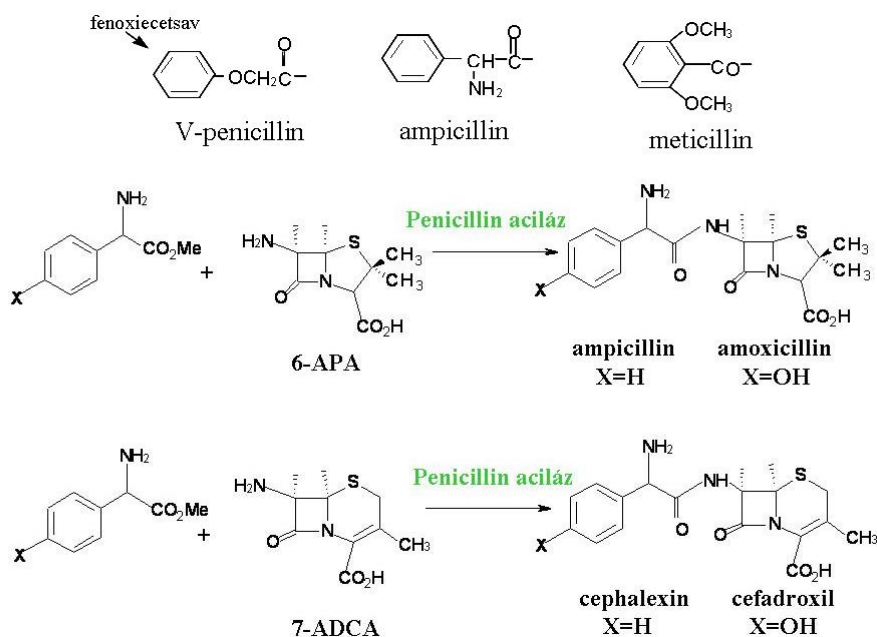
Ezért a klasszikus, ún. Toyo Ozo (japán cég)-eljárás során recirkulációs reaktorokat használnak. 18 darab, rögzített enzimmal töltött oszlop van párhuzamosan(!) kötve, amelyeken folyamatosan áramlik a 18 felé osztott penicillin-térfogatáram. Az oszlopkról lejövő egyesített térfogatáram pedig egy kevert tartályreaktorba kerül, ahol a pH korrigálása megvalósítható. A cirkulációt addig végzik, amíg a kellő konverziót el nem éri. A 30 literes oszlopreaktorokkal és 6000 l/óra térfogatárammal működő rendszerben egy konverziós ciklus ideje 3 óra, és az oszlopok élettartama mintegy 300 óra. Az eljárás $33 \text{ kg/m}^3\text{h}$ produktivitással és mintegy 86%-os hozammal jellemezhető.

Egy másik eljárás során felhasználták az alapvető reaktortechnikai tapasztalatokat, hogy a kívánatos oszlopszerű működés és a pH-szabályozás is megvalósulhasson. Hogy a keveredés is jó legyen és a plug-flow üzemmódot is megközelítsék, 4 sorba kötött CSTR-rel oldják meg a problémát. Így több mint 95%-os PEN-G konverziót sikerül elérni. Ez a négy sorba kötött reaktor optimális. Kevesebb jelentősen rontaná a konverziót, öt pedig alig növeli azt, ugyanakkor a nagy 6-APA-koncentráció erős végtermék-inhibíció okozza (és természetesen a beruházási és üzemeltetési költségek is megnövekednének). Az eljárás elvi folyamatábrája a 3.43. ábrán követhető, egy pontozott piros vonallal követhető a penicillinoldat útja a sorba(!) kötött oszlopon keresztül. A folyamatábra viszonylag bonyolult, de gondoljuk meg, hogy a valóság ennél még sokkal komplikáltabb, hiszen ezen az ábrán nem tüntettük fel a szabályozóköröket, a hűtési és fűtési köröket csak jeleztük, illetve a készülékek ürítésének, mosásának (CIP) eljárása sincs feltüntetve.



3.43. ábra: Folytonos APA-előállítás folyamatábrája

Mindkét eljárás esetében a reaktorokból távozó reakcióelegyből a pH izoelektromos pontra állításával kicsapják a 6-APA-t, majd szűrés és mosás után szárítják.



3.44. ábra: Néhány félszintetikus penicillin- és cefalosporin-származék

A penicillin-acilázt nemcsak a PEN-G lebontására, hanem szintézisre is fel lehet használni: félszintetikus antibiotikumokat, így ampicillint, amoxycillint állítanak elő segítségével, acil-donorként fenil-glicint, illetve p-OH-fenil-glicint alkalmazva, amikor is peptidkötés jön létre ezek és a 6-APA között. E reakciók az enzim „eredeti funkciójának” megfordításai (lásd még az aszpartám előállítását is), és bizonyítják a hidrolitikus enzimeknek a szerves szintézisekben potenciálisan betölthető nagy szerepét. A 3.44. ábrán néhány félszintetikus penicillinszármazékot tüntettünk fel, valamint néhány

félszintetikus cefalosporin-származékot is, hiszen amint fentebb már említettük, a Cefalosporin-G és Cefalosporin-C ugyancsak β -laktám antibiotikum-származékait (7-ACA: 7-amino-cefalosporánsav és 7-ADCA: 7-amino-deacetoxi-cefalosporánsav) ugyanevvel az enzimmal és hasonló technológiák felhasználásával állítják elő.

3.7.5. A tejcukor hidrolízise

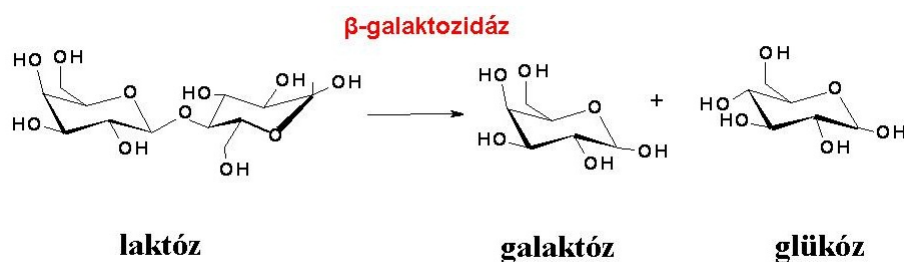
A 3.45. ábrán látható szerkezetű diszaharid tejcukor a tehéntejben mintegy 4,7%-ban található, és ugyancsak lényeges összetevője a sajtgyártáskor keletkező savónak. Emésztése során a **β -galaktozidáz** vagy **laktáz** enzim (Exo-(1 \rightarrow 4)-beta-D-galactanase, lactase **EC 3.2.1.23.**) bontja le glükózra és galaktózra, és így hasznosul. Míg a csecsemők toleránsak, azaz rendelkeznek laktózbontó képességgel, addig a felnőtt lakosság körében nagy népegészségügyi problémát okoz az ún. laktóztolerancia. A kínaiak 90, a fekete amerikaiak 73%-a nem rendelkezik laktázzal, azaz intoleráns, miközben a fehér amerikaiak 99%-a és a svédek 84%-a toleráns a laktózzal szemben. A bontatlan laktózt a vastagbél anaerob flórája gázfejlődés közben erjeszti, ráadásul a laktóz gátolja a vízfelszívódást is a vastagbélben, ezért az intolerancia esetén fogyasztott tej és tejcukortartalmú egyéb termék úgynevezett expozív diarréát, azaz hasmenéssel együttjáró puffadást okoz.

E népbetegség kezelésére egyrészt laktáztartalmú enzimek készítményeket alkalmaznak, másrészt laktózmentes tejet és tejkészítményeket gyártanak a tej laktáz enzimmal történő kezelésével.

A laktáz enzimmal kezelt tej lényegesen édesebb, mint a natív, hiszen a laktóz édessége a szaharózenak csupán 20%-a, míg a hidrolíziskor keletkező glükózé 70% és a galaktózé 58%. Ez a tény a laktózhidrolízis további felhasználását is indokolja: fagyaltkészítmények és különböző natúr és ízesített sűrített tejkészítmények előállításakor is alkalmazzák. Utóbbiaknál kedvező, hogy így a készítmény cukortartalma nehezebben is kristályosodik ki.

Magát az enzimet többféle mikroorganizmus fermentációjával állítják elő, ekkor más-más optimális tulajdonságú enzimek készítményeket nyernek.

A tejipari élesztő *Kluyveromyces fragilis* (*K. marxianus* var. *marxianus*) által termelt enzim pH-ja 6,5–7,0 optimumú, míg az *Aspergillus oryzae* pH 4,5–6,0, az *A. niger* pedig pH 3,0–4,0 közötti optimummal rendelkező enzimet állít elő. Ezek a β -galaktozidáz készítmények rögzített formában kaphatók a kereskedelemben. E készítmények nemcsak a pH-optimum értékeiben, hanem fémion-igényük (mint kofaktor), illetve fémek által okozott inhibíciójuk tekintetében is különböznek egymástól, abban azonban egyformák, hogy mindegyikre inhíbeálólólag hat a termék galaktóz.



3.45. ábra: A laktóz hidrolízise

3.8. Foszforilezés

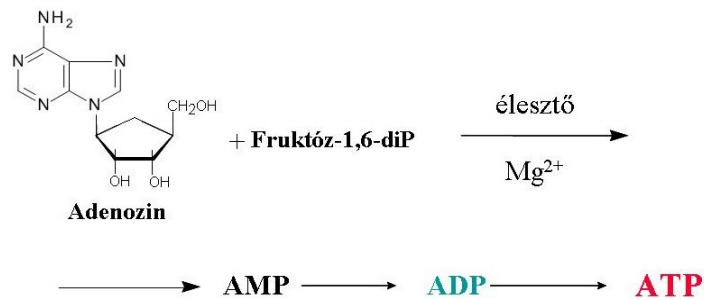
A biokémiai foszforilezéses reakciónak gyakorlati, ipari felhasználását az adenzin-trifoszfát (ATP) és adenzin-difoszfát (ADP) vegyületek előállításával mutatjuk be. Az ATP és ADP fontos biokémiai preparátumok (számos *in vitro* és *in vivo* biokémiai átalakítás energiadonor és foszfátdonor vegyületei), de az ATP-t szívgyógyszerként is alkalmazzák. Az ATP és ADP nagy tömegű előállítására az élesztő glikolízises enzimszisztémát lehet felhasználni, rendszerint egyszerű, boltban megvásárolható préselt péklesztő vagy autolizált élesztő formájában. A reakciókörülmények és a szubsztrát alkalmas megválasztásával az élesztő segítségével, jó kitermeléssel lehet ATP-t vagy ADP-t nyerni.

Ezt az eljárást elvi jelentősége miatt mutatjuk be, azt demonstrálendő, hogy egyszerű technológiai eszközökkel hogyan lehet egy élő sejt anyagcsereútját a számunkra kedvező irányba befolyásolni és

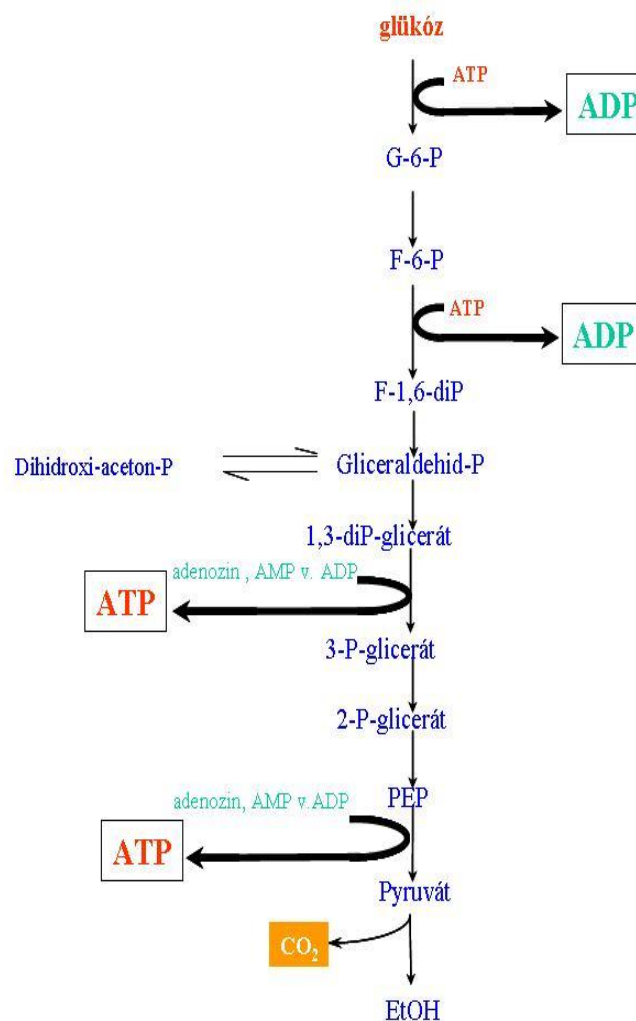
termelési céllal felhasználni. Megjegyzendő, hogy több helyütt ma is ezt vagy hasonló eljárásokat alkalmaznak e két kulcsvegyület előállítására, de megjegyezve, hogy egyéb, direkt fermentációs, illetve többenzimes koenzim-regenerálásos eljárások is léteznek ma már.

3.8.1. ATP-szintézis

ATP-t korábban szintetikus úton állítottak elő, ill. lóizomból izolálták. Ma korszerű és gazdaságos a biokémiai konverzió. A biokémiai konverziónál adenzinből és fruktóz-1,6-difoszfátból indulnak ki. A két szubsztrátból az élesztő glikolízises enzimrendszere ATP-t szintetizál (3.46. ábra).



3.46. ábra: ATP-előállítás adenzinből élesztővel



3.47. ábra: A glikolízis vázlatos lépései az ATP-termelő és -fogyasztó lépésekkel

A 3.47. ábrából az előállítás alapkonceptiója világosan kitűnik. A glikolízis sémájában látható, hogy az ATP-fogyasztó lépések a fruktóz-1,6-difoszfát előtt vannak. Ha tehát az élesztőhöz a fenti két vegyületet adjuk, akkor az az adenzint foszforilezi, és belőle AMP, ADP, majd ATP képződik. Mivel a rendszerben nincs glükóz – ami a képződött ATP-t felhasználhatná –, így a reakció során nagy mennyiségű ATP halmozódik fel. Ezt az eljárást Kínában ma immobilizált élesztősejtekkel végzik 300 literes reaktorban, évi 25 t élesztő felhasználásával, mintegy 5 t ATP-t előállítva.

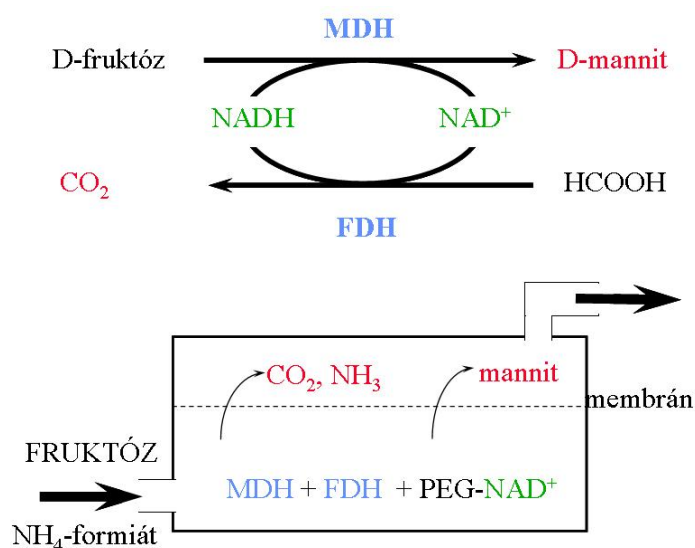
3.8.2. ADP-szintézis

Az ADP előállításánál a 3.47. ábrán látható glikolízis első lépéseit hagyjuk lezajlani azáltal, hogy *nagy mennyiségű élesztőt, ATP-t és glükózt* reagáltatunk rövid ideig. A rövid reakcióidő azt eredményezi, hogy a glikolízis során döntően a glükóz és később a fruktóz-6-foszfát foszforileződik, és így a rendszerbe adagolt ATP ADP-vé alakul, amely vegyület savazás után (amikor is az enzimek inaktiválódnak és a reakció megáll) könnyen izolálható.

3.9. Koenzim-regenerálással egybekötött vegyes biotranszformációk

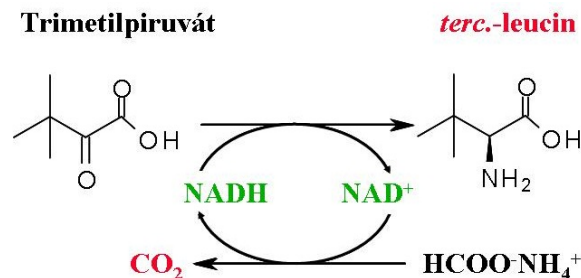
A legtöbb oxido-redukciós enzim átalakítási reakciónál NAD, ill. NADP koenzimre van szükség, amelyek folyamatos regenerálásáról gondoskodni kell. A koenzimek regenerálásához lehet enzimeket vagy mikroorganizmusokat is használni. Utóbbira láttunk már példákat a 3.1. alfejezetben. A szaporodó mikrobákkal végzett koenzimigényes biotranszformációk esetén ugyanis a mikrobák gondoskodnak a kosubsztrátok állandó regenerálásáról. Más a helyzet a tisztán enzim reakció-rendszerek esetén, ekkor nekünk kell gondoskodni a drága kosubsztrátok regenerálásáról. Könnyen lehet a regenerálást elvégezni, ha két olyan oxidációs és redukciós enzimet alkalmaznak, amelyeknek azonos a koenzim része, akkor ui. a koenzim regenerálódik a két kapcsolt (oxidációs és redukciós) reakcióban. A koenzim-regenerálást négy, alapvetően különböző konjugált rendszerben lehet végezni.

a) A kapcsolt rendszer csak egy terméket eredményez. Erre jó példa az élesztőből származó mannit-dehidrogenáz (MDH [EC 1.1.1.255.](#)) és a *Candida boidinii*-ből izolált *formiát-dehidrogenáz* (FDH, [EC 1.2.1.2.](#)) együttes alkalmazása. A reakció kivitelezéséhez folytonos enzim membrán-reaktort használnak (3.48. ábra). A membrán átengedi a kis molekulatömegű mannitot, és természetesen a gázhalmazállapotú CO_2 -t is, míg az enzimeket és a polietilén-glikolhoz (PEG) kötött NAD-koenzimet visszatartja a rendszerben. A NAD a nem funkciós adenin részével kapcsolódik a PEG-polimerhez, míg a funkciós nikotinsav szabadon marad, így hatását ki tudja fejteni, sztérikus gátlás nélkül részt tud venni a reakcióban.



3.48. ábra: Egy termékes kapcsolt rendszer: mannit előállítása

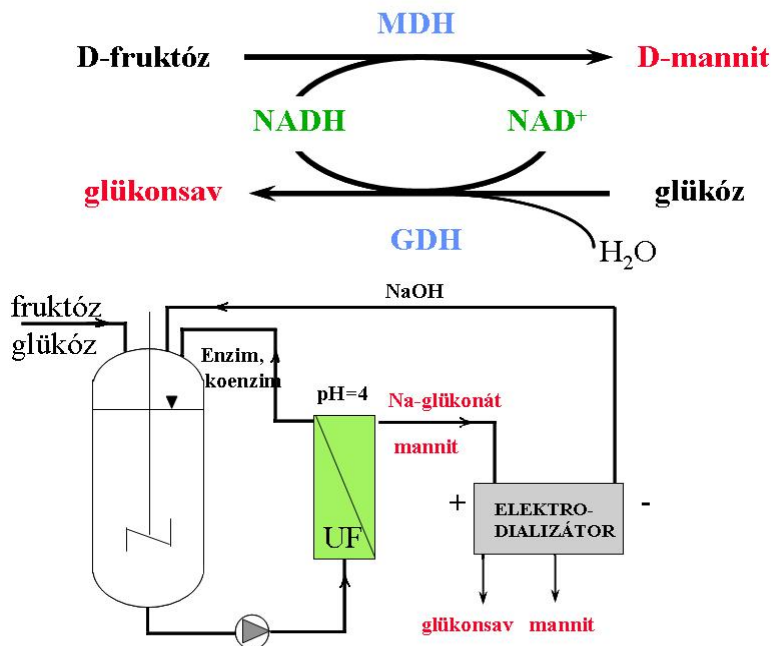
Hasonló eljárást alkalmaz a Degussa cég tercier leucin előállítására a 4.49. ábrán látható módon. A *Bacillus sphaericus* L-leucin-NAD oxidoreduktáz (EC 1.4.1.9.) enzimét használják oldott állapotban membránreaktorban trimetil-piroszölősavból kiinduló eljárásukban (ez is egy kiretechnológiai eljárás, ui. a prokirális ketonból egy királis aminosav képződik). A kosubsztrát regenerálási reakciójának egyensúlyi állandója igen nagy ($K=15000$), így gyakorlatilag irreverzibilis, és a szén-dioxid pedig könnyen eltávolítható a reaktorból.



3.49. ábra: Egy termékes kapcsolt rendszer: tercier leucin előállítása

b) A szimultán működő két oxidációs és reduktációs rendszer két terméket eredményez. A glükóz izomerizációjával kapott glükóz- és fruktózoldatot két enzimmel, mannit-dehidrogenázzal (MDH) és *Aspergillus niger*-ből származó glükóz-dehidrogenáz (GDH) enzimmal hozzák össze, amikor is a glükóz oxidációs és a fruktóz reduktációs folyamat önfenntartó körfolyamatként viselkedik. Ebben a rendszerben a koenzim visszatartásáról úgy gondoskodnak, hogy az enzimreaktorhoz egy ultraszűrő membránmodult kapcsolnak, amely negatív töltésű (funkciós csoport -HSO_3^-) membránt tartalmaz.

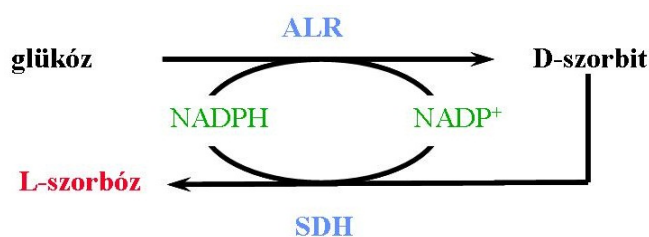
A membrán (pH = 4-en) visszatartja a koenzimot, és az ilyen környezetben negatív töltéssel rendelkező enzimeket is, illetve megakadályozza a felülethez való kapcsolódásukat (nem tömődik el a membránfelület!). A membránon átdiffundáló termékek (mannit és Na-glükonát) (3.50. ábra.) bipoláris membránt tartalmazó elektrodializátorba kerülnek, ahol is a három cellában a glükonsav, a mannit és a NaOH elválnak és külön-külön elvezethetők.



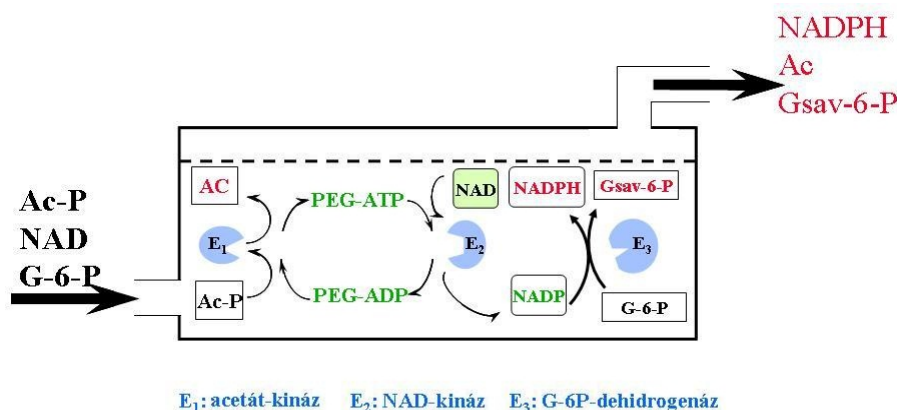
3.50. ábra: Kapcsolt rendszer két termékkel glükonsav és mannit előállítására

c) Regenerálás konszekutív (egymást követő) reakcióval (3.51. ábra), ahol az első reakció terméke a második szubsztrátja. Ebben a rendszerben a glükóz először az aldóz-reduktáz ([EC 1.1.1.21. aldehyde reductase](#), ALD) enzim hatására szorbittá alakul (redukció), majd ezt az intermediert a szorbit-dehidrogenáz ([EC 1.1.1.14. L-itol 2-dehydrogenase](#), SDH)¹⁷ szorbózzá oxidálja. A reakcióban szereplő NADP-koenzim sokkal drágább, mint a NAD. Mivel a membránreaktorban mindig van bizonyos koenzimvesztés, ezért fontos volt a drága NADP előállításának megoldása.

Az olcsó NAD-ot sikerült gazdaságosan a 3.52. ábrán sematikus módon bemutatott folytonos membránreaktor-rendszerben NADPH-vá alakítani. A membrán a nagy molekulatömegű enzimeket és a PEG-hez kötött ATP-t (ill. ADP-t) visszatartja, míg a kis molekulákat (NADPH, ecetsav, glükonsav-6-P) átengedi. Az acetyl-foszfátból az acetát-kináz ([EC 2.7.2.1. acetate kinase](#)) (E₁) enzim a foszfátot átviszi a PEG-hez kötött ADP-re, és az így képződő ATP foszforilezi a jelen lévő NAD-molekulát a NAD-kináz enzim ([EC 2.7.1.23 NAD⁺ kinase](#)) (E₂) segítségével. A NADP-t a harmadik enzim (E₃), a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz ([EC 1.1.1.49. glucose-6-phosphate dehydrogenase](#)) redukálja NADPH-vá. A folytonos enzimreaktorból távozó oldatból a NADPH ioncserés kromatográfiával izolálható. Ezzel a rendszerrel 34g NADPH/dm³ h produktivitás érhető el. A NADPH-t nemcsak az említett célra lehet felhasználni, hanem más területen is (biokémiai reakcióknál, az orvosi diagnosztikában stb.)



3.51. ábra: Koenzim-regenerálás konszekutív reakcióval: szorbóz előállítása



3.52. ábra: NADPH előállítása többszörös koenzim-regenerálással

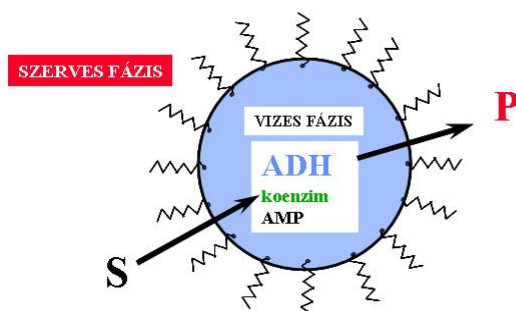
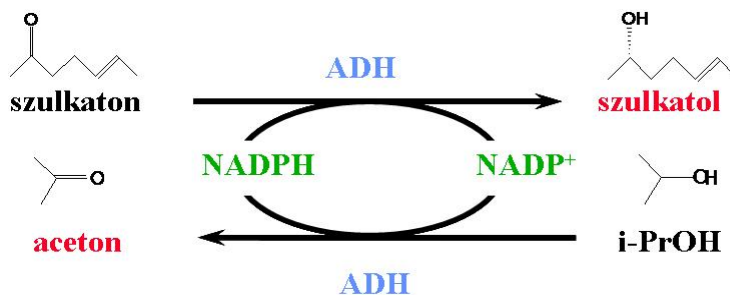
d) Regenerálás egy enzimmel, két szubsztráttal. Az eddig ismertetett rendszerekben két enzim és egy közös koenzim szerepelt (kétenzimes eljárás). A negyedik féle regeneráló rendszerben **egy enzim van csak, de két eltérő szubsztrát** (kétszubsztrátos megközelítés) (3.53. ábra).

Ezt a típust a szulkatonnak (2-metil-2-hepten-6-on) a vízben nagyon rosszul oldódó szulkatollá (2-metil-2-hepten-6-ol) történő sztereospecifikus átalakításán mutatjuk be. A ketonnak alkohollá történő redukciója során képződő oxidált NADP⁺ koenzimet egy másik szubsztrát, az *i*-propanol képes ugyanannak az enzimnek, az alkohol-dehidrogenáz enzimnek a közreműködésével redukálni.

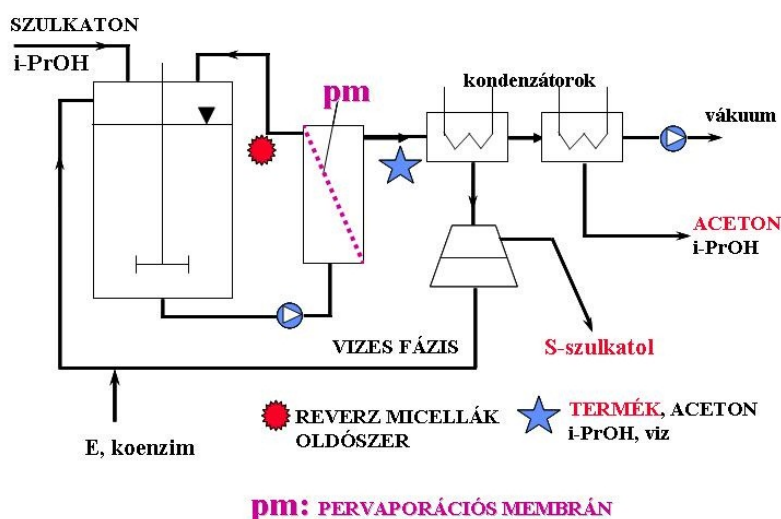
A felső reakció pH=7,3-nál gyakorlatilag irreverzibilis. A szulkaton és a szulkatol is hidrofób tulajdonságú, és így oldhatóságuk vízben igen kicsi (0,4%). Ezért ennél a reakciónál kétfázisú ún.

¹⁷ Ezek az eltérő nevek szinonimák az enzimek elnevezésére

reverz micella rendszerrel dolgoznak. A szerves oldószer (amelyben a szubsztrát és a termék is oldódik) körülveszi a vizes fázist képviselő micellákat, amelyeket felületaktív anyag stabilizál. A vizes fázisban van az enzim, a kofaktor, valamint a stabilizátorként és aktivátorként szereplő AMP. A 3.54. ábra foglalja össze a teljes technológiai folyamatot. A keverős reaktorban a reverz micella rendszerben játszódik le a reakció és a kofaktor-regenerálás. A reaktorhoz csatlakozik egy **pervaporációs** membránmodul. A reverz micellák és az alkalmazott szerves oldószer nem képes áthatolni a pervaporációs membránon, míg a szulkatol, az aceton, az *i*-propanol és a víz kismértékben igen. A membránmodul után kapcsolt első kondenzátorban a szulkatol és a víz kondenzálódik, míg a másodikban az aceton és az *i*-propanol. Az első kondenzátum egy elválasztóba (ülepítőbe) kerül, ahol a szulkatol és a víz elválik egymástól. A vizes fázist (szükség szerint enzimmel és kofaktorról kiegészítve) visszavezetik a rendszerbe.



3.53. ábra: Kétszubsztrátos koenzim-regenerálással megvalósított sztereospecifikus biotranszformáció



3.54. ábra: A szulkatol-előállítás megvalósításának sémája

A fentiekben ismertetett kofaktor-regenerálás és a kofaktort visszatartó konstrukciók, megoldások lehetővé tették, hogy a koenzim-dependens eljárásoknál ma már a koenzim ára nem korlátozó tényező.

Mindazonáltal csak akkor gazdaságos egy ilyen eljárás, ha mondjuk 1 €g körüli NADH-ár esetén a regenerálás jobb, mint 99%, és a teljes turnover szám 1000–10 000 között mozog. Valójában az alkalmazott enzimek árán és hatékonyságán múlik, hogy ésszerű-e ilyen típusú biotranszformációkban gondolkodni.

A fentiekben vázoltak csak példák, ma már számtalan ilyen eljárást alkalmaznak, és a lehetőségek száma szinte korlátlan.

3.10. Peptidek biotranszformációja, peptidszintézis

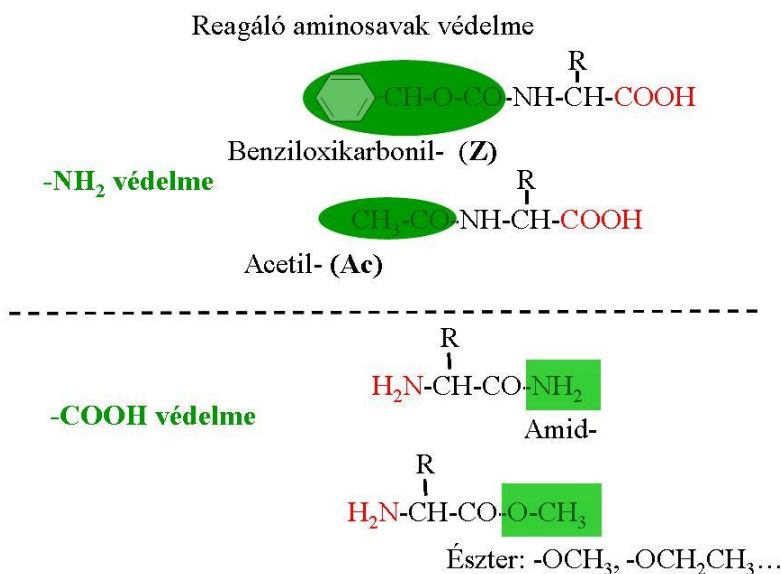
Már 1901-ben publikálták, hogy a **proteázok (peptidázok)** képesek a peptidkötés létrehozására is. Ez egy egyszerű enzimes reakció esetében természetesen ma már magától értetődő, hiszen tudjuk, hogy az enzimek reverzibilis reakciókat katalizálnak, ugyanakkor egy polimerlebontó enzim esetében nyilván nem várható, hogy ugyanaz az enzim fel is építse a polimert, azonban egy bontott vagy létrehozott kötés, jelen esetben a peptidkötés (savamidkötés) tekintetében megvalósul a reverzibilitás. A peptidázok, illetve proteázok esetében ha azt akarjuk, hogy új peptidkötést hozzon az enzim létre, termodinamikai és enzimkinetikai megfontolásokat kell tennünk.

BONTÁSIHELY-SPECIFIKUS PROTEINÁZOK

Tripszin* (EC 3.4.21.4)	Arg/Lys \downarrow Y _{as}
Szubtilizin* (EC 3.4.21.62)	Trp/Tyr/Phe/Leu \downarrow Y _{as}
Elasztáz* (EC 3.4.21.36)	Ala/Ser \downarrow Y _{as}
Termolizin (EC 3.4.24.27)	X _{as} \downarrow Leu/Phe
Pepszin (EC 3.4.23.15)	Phe/Tyr/Leu \downarrow Trp/Phe/Tyr

*szerin proteázok
 Y_{as}=bármelyik aminosav, -észter vagy -amid
 X_{as}=bármelyik aminosav

3.55. ábra: Proteinázok támadáspont-specifitása



3.56. ábra: A peptidszintézisben reagáló aminosavak védelme

A legkülönfélébb proteináz enzimek vehetnek részt peptidek szintézisében, ezeket bontási specificitásuk alapján különböztetik meg egymástól. A 3.55. ábrán összefoglaltuk az iparilag jelentős, szintézisre is felhasznált fehérjebontó enzimeket, megmutatva a bontott kötésre vonatkozó specificitásukat. Mivel peptidszintézisnél két aminosav között jön létre peptidkötés, így a kívánt peptid mellett nem kívánt melléktermékek is létrejöhetnek. Azért, hogy ezt elkerüljék, a karboxil-, illetve aminocsoportot védőcsoportokkal látják el. Ennek a szokásos módozatai láthatóak a 3.56. ábrán: az egyik reagáló aminosav aminocsoportját benziloxikarbonil (Z-vel jelölik)-csoporttal vagy acetilcsoporttal védik, míg a másik aminosav karboxilcsoportját amidálják (az aminosav amidját állítják elő, ezzel egyenértékű pl. egy dipeptid is) vagy az etil- vagy metilészterét használják fel. Az amidálás és észterezés abból a szempontból is kedvező, hogy mintegy aktiválják az aminosavakat, azaz növelik a reakció kinetikai állandóját.

A peptidszintézis **egyensúlyi** (más szóval termodinamikai) **kontroll** alatt állhat vagy ún. **kinetikai kontroll** vezérléssel.

Az **egyensúlyi kontroll** esetében, amikor a reakció csak egy egyensúlyi keveréket eredményez, a szintézis irányában felírt reakció egyensúlyi állandóját kell növelni valamilyen módon, például pH-változtatással, vagy nem vizes közeg alkalmazásával, vagy egyszerűen úgy, hogy a védett aminosav és partnere olyan peptidterméket hoz létre, amely kicsapódik a reakcióközegekből, ily módon tolvá el az egyensúlyt. Kimutatták pl., hogy az egyensúlyi állandót a peptidkötés létrehozásának irányába befolyásolni lehet a közeg alkalmas megválasztásával és annak pH-jával. Így vízben oldódó oldószerekkel, mint dimetilszulfoxid, dimetilformamid, trietilén-glikol a karbobenzoxi-triptofánnak és a glicinnek a kondenzációra számított egyensúlyi állandóját 20-szorosra lehetett növelni az egyszerű vizes reakció-elegyenben mérthez képest tripszin enzim esetében. Ugyanebbe az irányba hatott a pH-nak 9,5-ről 6,5-re való csökkentése. A peptidkötés létrehozását továbbá elő lehet segíteni a nukleofil szabad aminosav mint reakciópartner koncentrációjának növelésével. Ezeket a lehetőségeket foglalja össze az 3.57. ábra.

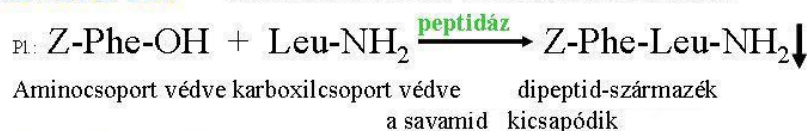
Egyensúlyi kontroll

$$\text{Egyensúlyi állandó } K_{eq} = \frac{[\text{R}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}']_{\text{peptid}}}{[\text{R}-\text{COOH}] [\text{H}_2\text{N}-\text{R}']}$$

1.Aminosav 2.amin(osav)

Egyensúly eltolásának lehetőségei

***KICSAPÁS** Oldhatalan peptidek, védőcsoportok hatása is.



***KÉTFÁZISÚ RENDSZER**

2-5% H₂O szerves oldószervesben: a disszociáció visszaszorul

***VIZES RENDSZERBEN** : dimetil-formamid, -szulfoxid,
trietilénglikol

***pH-eltolás:** 9,5 → 6,5 20xK_{eq} Z-Trp + gly $\xrightarrow{\text{tripszin}}$ Z-Trp-Gly

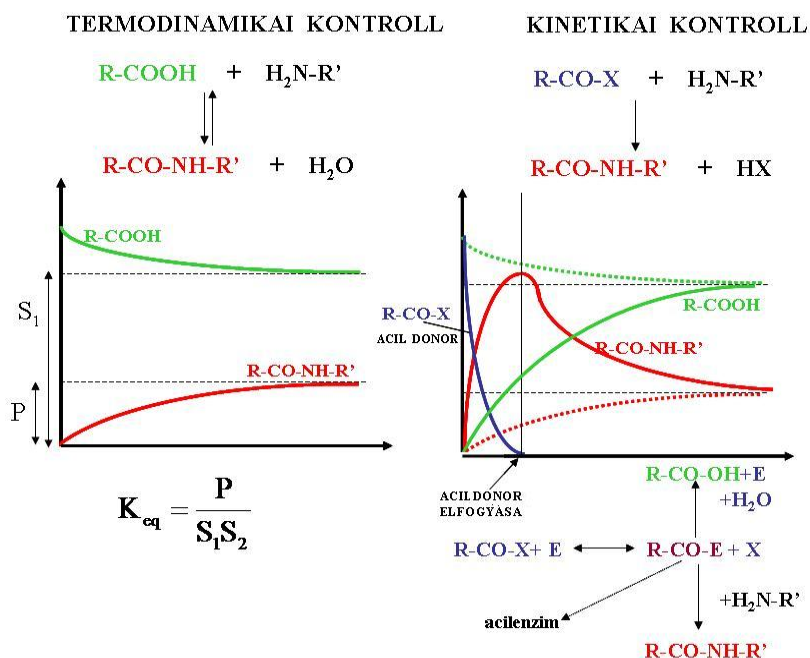
***Aminosavak koncentrációnövelése**

3.57. ábra: Termodinamikai kontroll és az egyensúlyi állandó növelésének módozatai

A **kinetikai kontroll** esetén nem várják meg, amíg az egyensúly beáll, hanem a 3.58. ábrán látható módon a maximális átalakulásnál állítják le a reakciót. Ez a módszer tehát gondos reakciókinetikai elemzést igényel. Kinetikai kontrollra azok az enzimek alkalmasak, amelyek stabil **acil-enzim**

komplexeket hoznak létre, ilyenek a **szerinproteázok**. Ekkor a reakció egy aktivált karboxilcsoportot tartalmazó aminosavval indul (észter vagy amid), ez hozza létre az acil-enzimet, amely azután egy másik aminosav aminocsoportjával reagál és létrehozza a kívánt peptidet, vagy vízzel reagálva a hidrolízis irányába hat. E kettőt kell elválasztani egymástól a maximumpont helyes megválasztásával, ami egybeesik az acildonor elfogyásával a reakcióelegyből.

A peptidkötés létrehozását mint alapfolyamatot a kis molekulatömegű aszpartámnak ipari szempontból is jelentős előállítási példáján mutatjuk be.



3.58. ábra: Termodinamikai és kinetikai kontroll összehasonlítása

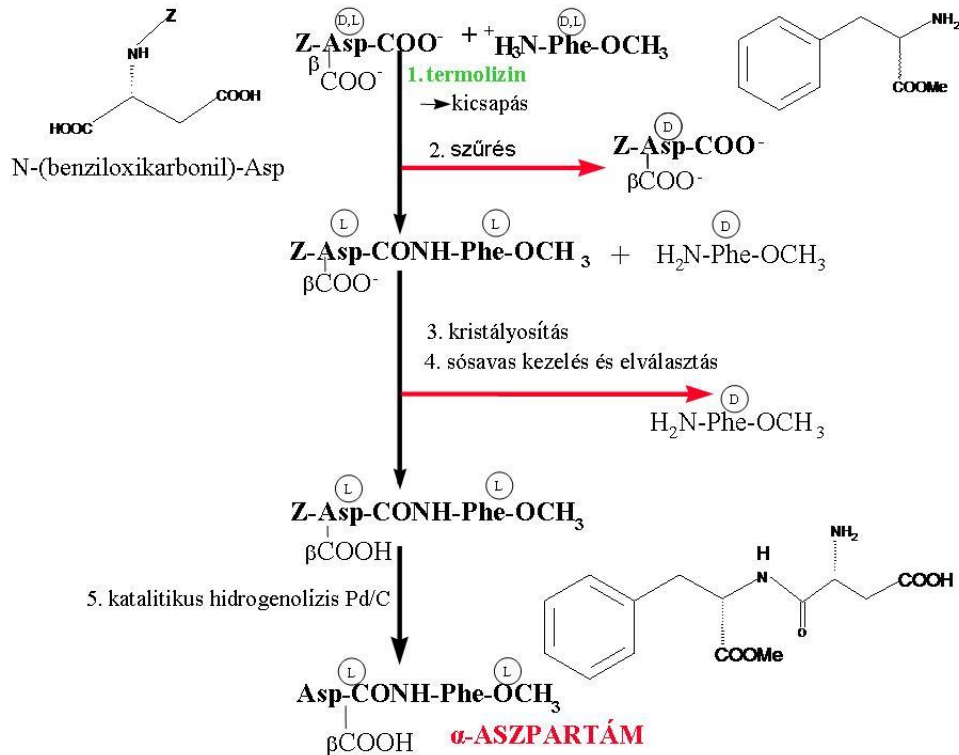
Az **α -L-aszpartil-L-fenilalanin-metilészter** véletlenül fedezték fel¹⁸. Kiderült, hogy 100–200-szor édesebb, mint a répacukor. Ennek az aszpartámnak az előállításánál racém alapanyagokból: D,L-aszparaginsavból (amelynek aminocsoportja acilezéssel védett) és D,L-fenilalaninből (vagy L-formából) indulnak ki. A szintézis sémája a 3.59. ábrán látható. Az enzimes lépést **termolizin** proteináz enzim katalizálja. Ez nem szerin-proteáz, így a reakció termodinamikai (egyensúlyi) kontroll alatt megy. Az egyik reagáló partner az N-(benziloxikarbonil)-Asp, a másik pedig a Phe-metilészter. A képződő termék, az N-(benziloxikarbonil)-aszparagil-fenilalanin-metilészter kicsapódik a reakcióelegyből, és ily módon tolódik el az egyensúly a szintézis irányába. Az eljárás további lépései arra irányulnak, hogy a nem reagált D-formákat eltávolítsák a reakcióelegyből, és végül a védő-csoport hidrogenolízissel történő lehasítása eredményezi a kívánt α -aszpartámot. Hogy az enzimvesztést minimalizálják, vagy adszorpciós módszerrel, vagy kovalens kötéssel hordozóhoz rögzítik az enzimet, de ismertek oldott enzimmel operáló eljárások is.

Ebben az esetben az egyensúlyi állandó növelésére a szerves fázisban történő reakciót is kihasználták, kifejlesztettek ugyanis olyan eljárást is, amelynek során a reagáló partnereket a szerves, butanolos fázisban oldják fel, majd intenzív kevertetéssel a reakció egy vizes/szerves kétfázisú emulzióban történik meg. Az emulziót ülepítik, ekkor a két fázis elválk, a termék a szerves fázisba

¹⁸ Az aszpartámot 1965-ben fedezte fel J.Schlatter (a Searle kutatója), 1981-ben engedélyezte az FDA, 1992 óta, amikor a NUTRASWEET®-re bejelentett USA szabadalom lejárt, szabadon gyártható. A szaharóznál 100-200-szor édesebb anyag alacsony kalóriatartalma (17 kJ/g) és ma az egyik legelterjedtebb mesterséges édesítőszer. Lebomlása során a szervezetben aszparaginsav és fenilalanin képződik, emiatt sokak szerint veszélytelen. Ellenzői szerint a metilészter bomlásakor keletkező metanol (és egyéb miatt) egészségre ártalmas. Ez a vita változó hevességgel ma is folyik, miközben pl. az USA üdítőitalainak több mint 80%-a tartalmazza.

extrahálódva elválasztható a vizes fázistól, amelyet visszacirkuláltatnak a reaktorba. Így 10%-ról 95%-ra sikerült emelni a konverziót.

Az aszpartámszintézis példa a régió- és az enantiomer-szelektivitásra is, hiszen egyrészt csak a szabad α -aminocsoport vesz részt a szintézisben, másrészt csak az L-formák között jön létre a peptidkötés. Ez fontos, mert csak az α -aszpartám édes, a β -sztereoizomer keserű ízű.¹⁹



3.59. ábra: Az aszpartámszintézis folyamata

Hasonló elven ma már egy sor biológiailag aktív peptidet elő tudnak állítani, például az enzimaktivátor és antioxidáns szerepet betöltő glutationt, a neurotranszmitter Leu- és Met-enkefalint, a peptidhormon angiotenzint és nem utolsósorban az inzulint. Mindezeket azonban már rDNS-technikák felhasználásával is előállítják vagy előállíthatóak.

3.6. táblázat: Néhány szintézissel előállított peptid

Peptid	Felhasználás
Glutation	enzimaktivátor, antioxidáns
Angiotenzin	hormon
Leu-enkefalin, Met-enkefalin (pentapeptid!)	opioid hatás
Vazopresszin	vese, vérnyomás
Dinorfin	opioid hatás
Kalcitonin	a szérum Ca ²⁺ szintjének csökkentése
Oxitocin	méhösszehúzó

¹⁹ Megjegyezzük, hogy ma már genetikailag módosított *E.coli*-val is állítanak elő az aszpartámot. A coli sejtek mintegy 150 aspartám ismétlődéséből álló polipeptidet szintetizálnak, ezt preparálják, majd enzimesen hidrolizálják a dipeptidé.

4. FERMENTÁCIÓS MŰVELETEK ÉS FOLYAMATOK

4.1. A mikrobák tenyésztésének alapösszefüggései

Ha egy mikrobasettet – az egyszerűség kedvéért tekintsünk egy baktériumsettet – olyan környezetbe helyezünk, amelyben minden számára szükséges tápanyag elegendően nagy koncentrációban van jelen, valamint az egyéb körülmények (pH, hőmérséklet, ozmotikus viszonyok) is megfelelőek számára, akkor a sejt elkezd növekedni és egy idő után osztódik is, azaz egy anyasejtből két azonos leánysejt keletkezik. Tekintsük meg az [4.1. animációt](#), amely egy kaccsal történő áoltással kezdődik Petri-csészén kifejlődött baktériumtelepről egy rázólabdikban lévő tápoldatra, amit 30 percenként (példánkban egy gyorsan szaporodó *Escherichia coli* sejtet tételezünk fel) követ egy osztódás. Az első generáció tehát kettő, a második, 60 perc elteltével $2^2=4$, a harmadik generáció megszületése 90 perccel az áoltás után $2^3=8$, a negyedik $2^4=16$, és így tovább az n-edik generációig, amely összesen 2^n darab leánysejtet eredményez.

Könnyen felírhatjuk tehát e binárisan osztódó baktérium szaporodásának matematikai törvényszerűségét:

n generáció után 1 sejtől 2^n sejt képződik,

n generáció után N_0 sejtől $N_0 \cdot 2^n$ sejt képződik.

Ez a binárisan osztódó sejtek exponenciális szaporodási törvénye, amely könnyen belátható módon a

$$\frac{dN}{dt} = v \cdot N \quad (4.1)$$

differenciálegyenletnek az

$$N = N_0 e^{vt} \quad (4.2)$$

alakú megoldása. Ebben a $v = \ln 2 / t_g$ ún. fajlagos szaporodási sebesség, a t_g pedig a kétszereződési idő.

A biomérnöki gyakorlatban sokkal inkább a sejtömeg növekedése érdekel bennünket, mint a sejtek szám szerinti gyarapodása, ezért a (4.1-4.2) egyenleteket, amelyek tulajdonképpen a Jaques Monod nevét viselő növekedési modell alapegyenletei, gyakrabban alkalmazzuk a következő formákban:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad (4.3)$$

$$x = x_0 e^{\mu t}$$

Ahol $\mu \equiv \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$ definíciószerűen az ún. fajlagos növekedési sebesség és x a mikrobakoncentráció sejt-szárazanyagban mérve és g/dm^3 vagy kg/m^3 egységben kifejezve. Ha a 4.3 egyenletnek megfelelően a sejt koncentrációt az idő függvényében ábrázoljuk, a 4.1. ábra szerinti végtelenbe tartó exponenciális növekedési görbét nyerjük. Ez nyilvánvalóan nem lehet a valóságos helyzet²⁰. Egy adott tápoldatmennyiségre történő oltás után, ha magára hagyjuk a rendszert, azaz a térfogata és a benne lévő szubsztrátumok mennyisége is meghatározott (ezt a továbbiakban szakaszos tenyésztésnek nevezzük), a valóságos növekedési görbe a 4.2. ábrán látható módon alakul. Kifejlődését az [animált](#)

²⁰ Ha egy kb. 20 perc generációs idejű *E. coli* minden korlát nélkül növekedhetne, akkor 43 h alatt $1,09 \times 10^{21} \text{ m}^3$ térfogatú sejtömeg születne, ami nagyobb, mint a Földünk térfogata, és ha még két óra hosszát szaporodhatna, akkor a tömege – azaz $6,6 \times 10^{21} \text{ t}$ – is nagyobb lenne, mint a Földé!

[görbével](#) (4.2. animáció)) is kövessük nyomon, valamint tekintsük meg a 4.1. videót, amely az *E. coli* szaporodását mikroszkóp alatt mutatja.



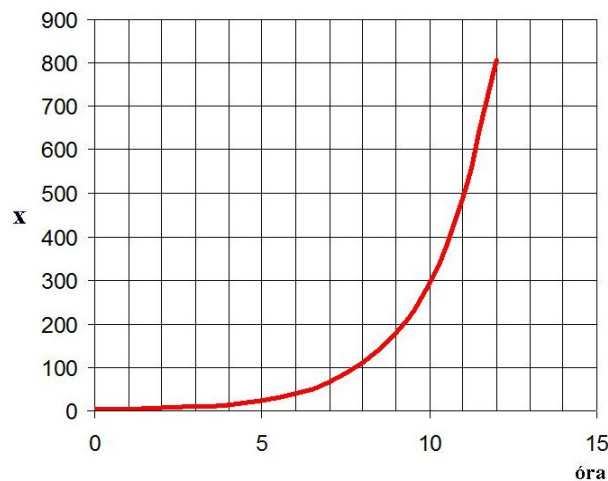
4.1. animáció: *E. coli* szaporodása – generációs idő



4.2. animáció: Növekedési görbe



4.1. videó: *E. coli* növekedése

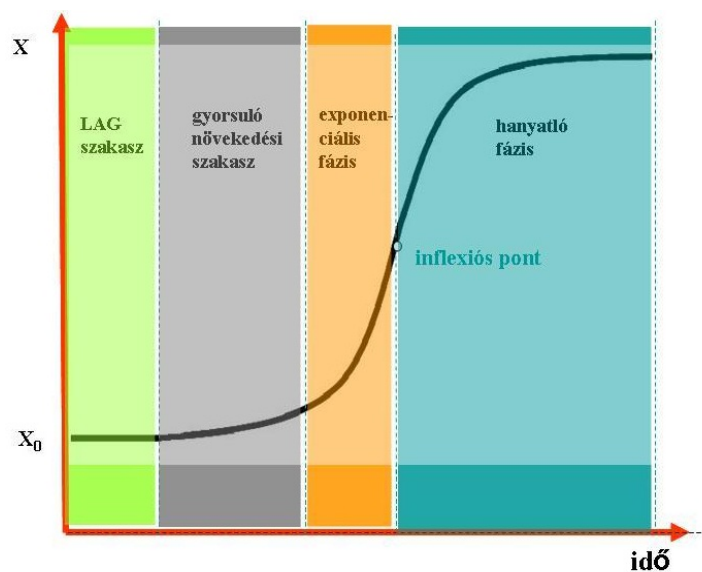


Exponenciális növekedés $X_0=2$ és $\mu=0,5$

4.1. ábra: Korlátlan exponenciális növekedési görbe

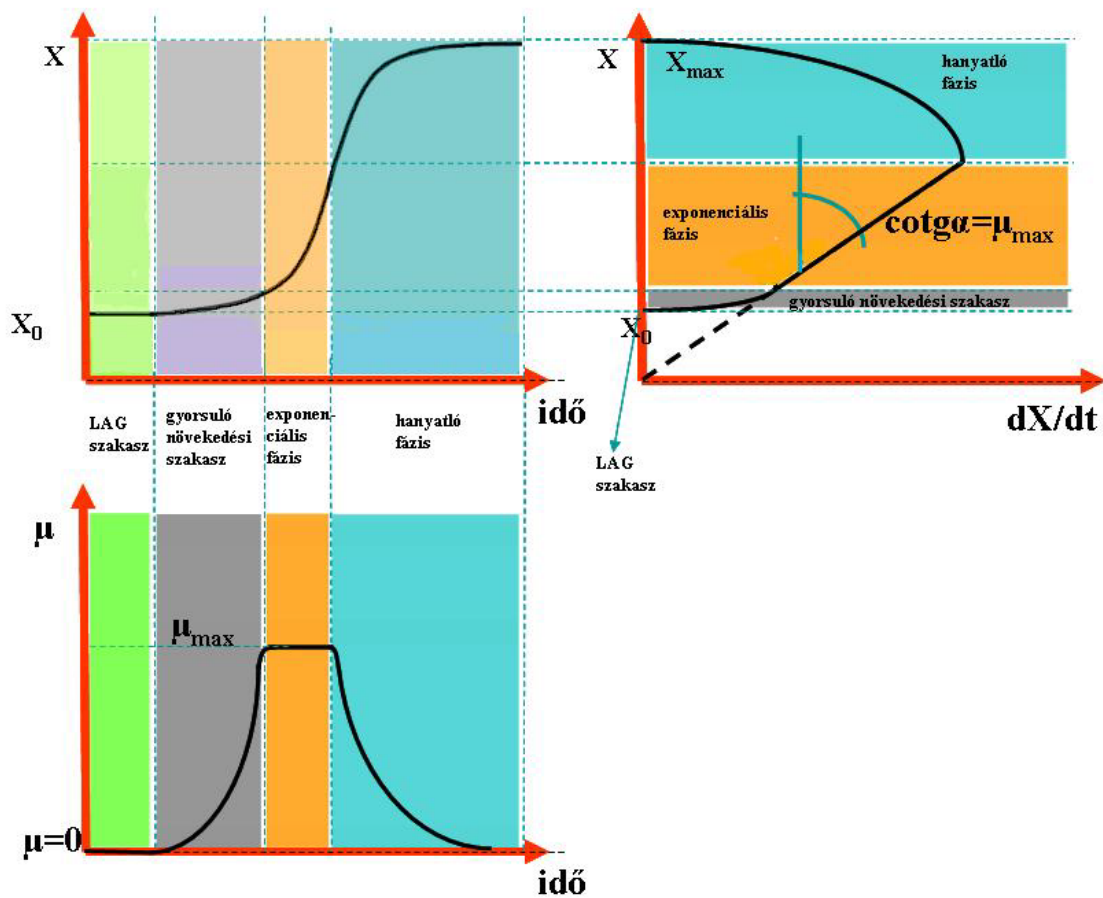
A növekedési görbe négy szakaszra osztható. Az első szakaszt *lappangási fázisnak* vagy lag szakasznak hívjuk. Ebben a mikrobajetek még nem növekednek, legalábbis számottevő, mérhető növekedés sem szám szerint, sem tömeg szerint nincsen. Ebben a periódusban a sejtek adaptálódnak az új környezethez. E szakasz értelmezése nem teljesen egységes. (Mivel értelmezése és főként leírása meghaladja lehetőségeinket, ezért tekintsük lag szakasznak azt, ahol növekedés nem észlelhető.) E szakaszban $\mu=0$. A lag periódust a *gyorsuló növekedés szakasza* követi, amely alatt az adaptáció folytatódik, de itt már észlelhető növekedés, méghozzá egyre gyorsuló ütemben. Nem minden sejt jut el azonban *egyidejűleg* oda, hogy maximális sebességgel szaporodjék, fokozatosan kapcsolódnak be a növekedésbe, így e szakaszban $0 < \mu < \mu_{\max}$. A következő, *exponenciális fázisban* (a gyakran használt, *logaritmikus fázis* kifejezés helytelen!) a teljes sejttömeg maximális intenzitással növekszik, $\mu = \mu_{\max}$.

A negyedik szakaszt *hanyatló fázisnak* nevezzük, itt ismét $0 < \mu < \mu_{\max}$ és tart a nullához.



4.2. ábra: Szakaszos fermentáció valódi növekedési görbéje

A 4.3. ábrán a szakaszos fermentáció növekedési görbéjét együtt láthatjuk a legjellemzőbb kinetikai ábrázolásokkal, illetve ennek animációs változatán (4.3. animáció) ezeken a fentiek jól követhetőek.

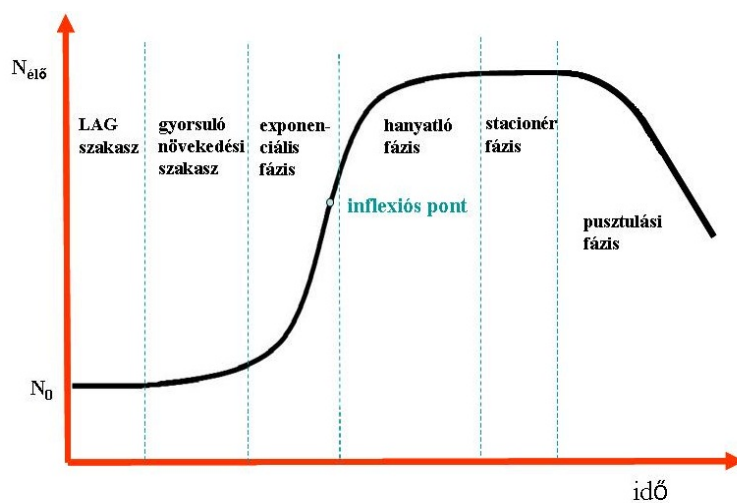


4.3. ábra: Szakaszos fermentáció növekedési görbéje és elsődleges kinetikai ábrái

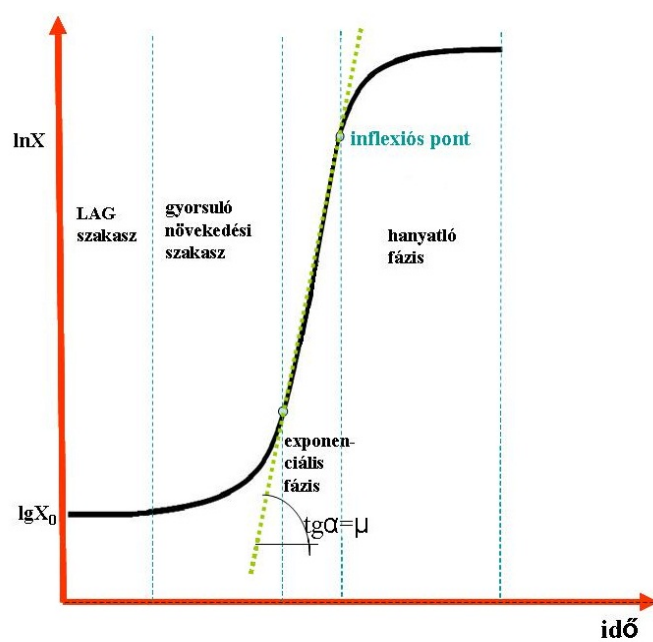


4.3. animáció: 3 növekedési görbe

Ha az élő sejtszám változását ábrázoljuk az időben, a 4.4. ábra szerinti lefutást kapjuk, itt a hanyatló fázis után egy stacionér fázis is megjelenik, amikor a szaporodás és az elhalás azonos mértékű, végül a következő fázisban – a pusztulási fázisban – a sejtek elhalása, lízise kerül fölénybe, az lesz meghatározó.



4.4. ábra: Az élő sejtszám változása a szakaszos tenyésztés során



4.5. ábra: A növekedési görbe féllogaritmikus ábrázolása

A 4.5. ábra is egy jellegzetes ábrázolását jelenti a növekedési görbének, ekkor a sejttömeg-koncentráció (esetleg a sejtszám) logaritmusát ábrázoljuk az idő függvényében. Ezen a görbén az exponenciális fázis egyenesként jelenik meg, ami magyarázza a *helytelen log fázis* kifejezést is. Jegyezzük meg, hogy ez az ábrázolás adja a legegyszerűbb meghatározási módját az exponenciális fázisban érvényes fajlagos növekedési sebességnek: az egyenes iránytangense az.

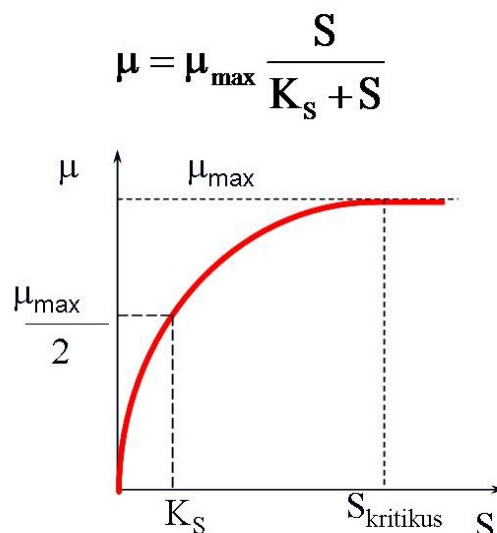
Tegyük fel a kérdést, hogy mi okozza a hanyatló fázis elkerülhetetlenségét. Ennek három oka is lehet. Elképzelhető, hogy a mikroba anyagcsereje során olyan metabolito(ka)t termel, amely gátlólag visszahat a növekedésére, mintegy önmérgezés következhet be. A másik ok lehet a sejtek rendelkezésére álló tér csökkenése. Elképzelhető olyan sűrű populáció, amelyben a sejtek mintegy összeérnek (természetesen nem szó szerint, hiszen egy vékony vízfilm mindenképpen kell hogy legyen közöttük), és ezáltal gátolják egymás növekedését (lásd később a crowding fogalmát is). A legfontosabb és leggyakrabban felmerülő ok azonban az úgynevezett szubsztrátlimitálás. Ez azt jelenti, hogy legalább egy tápoldatkomponensnek már nem elegendően nagy a koncentrációja ahhoz, hogy a mikroba maximális fajlagos növekedési sebességgel szaporodjék. A limitáló szubsztrát fogalmát Jaques Monod vezette be 1942-ben, amikor tejsavbaktériumok szaporodását vizsgálta. Megállapította, hogy a limitáló szubsztrát olyan függvény szerint befolyásolja a fajlagos növekedési sebességet, mint egy egyszerű enzimes reakció sebességét szubsztrátjának koncentrációja, azaz

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}, \quad (4.4)$$

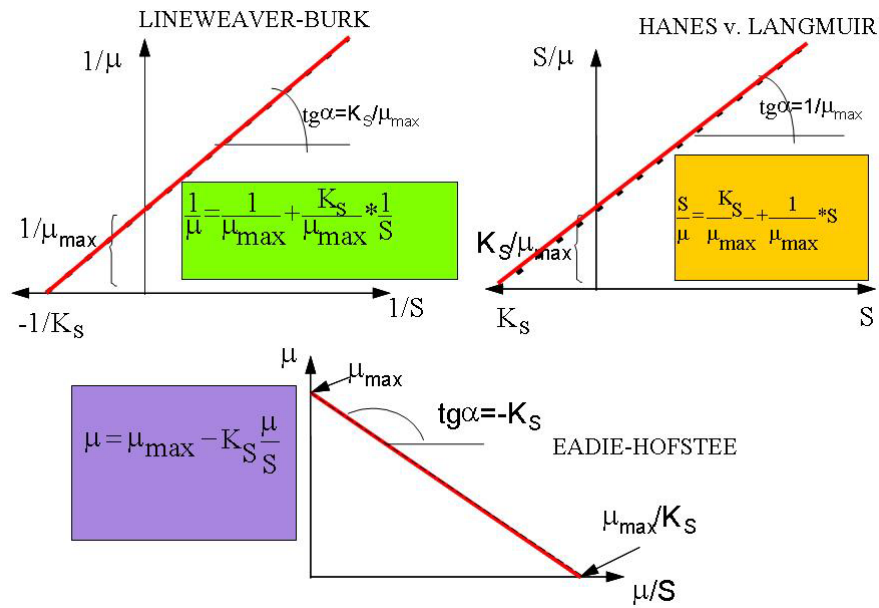
ahol μ_{\max} a maximális fajlagos növekedési sebesség (h^{-1}) és K_s az ún. szubsztráttelítési állandó.

Az egyenlet diszkussziója hasonló, mint amit az enzimkinetika esetében követtünk, kicsiny szubsztrát-koncentrációnál a hiperbola egyenesként viselkedik, K_s -nél sokkal nagyobb szubsztrát-koncentrációnál megközelíti a μ_{\max} értékét. Ezt a gyakorlatban létező (elméletileg természetesen nem létező) koncentrációt nevezzük *kritikus szubsztrát-koncentrációnak*.

A Monod-modell a szakaszos fermentációnak csak az exponenciális és hanyatló fázisát írja le, a két szakasz közötti határt a növekedési görbe inflexiós pontja jelöli ki. A modell két paraméterének meghatározási lehetőségét a 4.3. és a 4.7. ábrák grafikus módszerei teremtik meg, amelyek kedvezőtlen követelménye, hogy a nem mérhető növekedési és szubsztrátfelhasználási *sebességekre* is szükség van, s így a grafikus differenciálás nem kerülhető el (lásd a megoldást az általánosított logisztikus egyenlet felhasználásában).

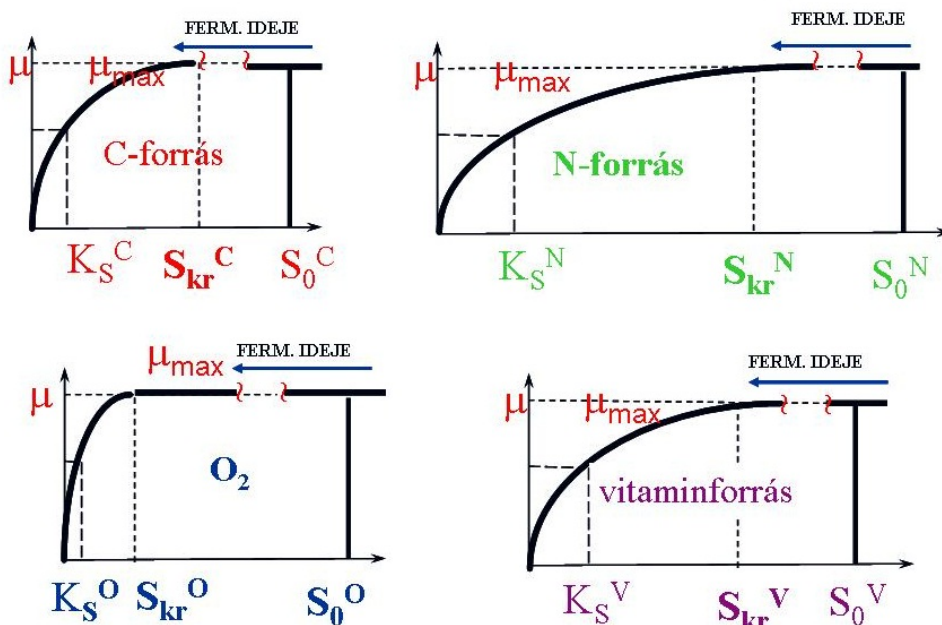


4.6. ábra: Monod-modell, a fajlagos növekedési sebesség függése a limitáló szubsztrát koncentrációjától

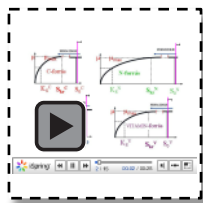


4.7. ábra: Monod-modell, a K_S és μ_{max} grafikus meghatározási lehetőségei

Fel kell tenni a kérdést, hogy a tápoldat sok összetevője közül melyik szubsztrát lesz a limitáló? Ennek megértéséhez tekintjük a 4.8. ábrát és a 4.4. animációt amelyeken azt láthatjuk, hogy például a C-forrás, a N-forrás, az oxigén és valamely vitamin összetevője a tápoldatnak külön-külön hogyan hatnak a fajlagos növekedési sebességre. Az egyes görbék alakja, valamint az, hogy hogyan, milyen sebességgel fogynak a szubsztrátok, az adott szubsztráttól, annak kiindulási koncentrációjától és az arra vonatkozó eredő hozamtól függ. Ezért a görbék alapján nem megmondható, hogy melyik szubsztrát lesz a limitáló. Csak annyit mondhatunk, hogy az a szubsztrát lesz az *első* limitáló szubsztrát, amelyiknek a koncentrációja először csökken a rá vonatkozó kritikus érték alá. Valamint, ahogy az idő előrehalad, úgy lehet második, harmadik stb. limitáló szubsztrát is (hatásuk leírását lásd később).



4.8. ábra: Melyik lesz a limitáló szubsztrát?



4.4. animáció: Melyik lesz a limitáló szubsztrát?

A növekedésre vonatkozó alapösszefüggések közül még egynek az értelmezése szükséges ahhoz, hogy a továbbiakkal tisztában lehessünk. Ez a már Monod által bevezetett hozam fogalom. Ez nem más, mint az egységnyi elfogyasztott szubsztrátra jutó sejttömeg-növekedés, definícószerűen bármelyik tápoldatkomponensre felírva:

$$Y_{x/S_i} = \frac{dx}{dS_i} \quad (4.5)$$

ahol Y_{x/S_i} az i -edik szubsztrátra vonatkozó eredő hozam.

A hozam tekinthető az előző definíció értelmében differenciálisan, tehát egy kicsiny tenyésztési idő alatti változások hányadosaként, de tekinthető integrálisan is, azaz

$$Y_{x/S_i} = \frac{\Delta x}{\Delta S_i}, \quad (4.6)$$

Ahol Y_{x/S_i} az i -edik tápoldatkomponensre vagy elemre vonatkoztatott eredő hozam, Δx a keletkezett új sejttömeg szárazanyagban kifejezve egy határozott idő, pl. egy óra vagy a teljes fermentáció ideje alatt, és ΔS_i a felhasznált tápoldatkomponens (elem) mennyisége ugyanennyi idő alatt.

Jegyezzük meg, hogy megkülönböztető indexelés nélkül az Y eredő hozam jelölés a limitáló szubsztrátra vonatkozik.

Monod még hozamkonstansnak nevezte ezt a fogalmat, de már 1959-ben Herbert rámutatott, hogy ez valójában nem egy állandó (lásd a [4.2. fejezetet](#)), ma egyszerűen eredő hozam a neve²¹. A hozamok szinte a legfontosabb jellemzői a fermentációs rendszernek, hiszen a tápoldat komponenseinek hasznosulását jelentik, és így gazdasági szempontból is jelentősek.

Foglalkozzunk ezek után részletesebben a mikroba tápanyagigényével, a tápoldatok összeállításának néhány szempontjával, és vizsgáljuk meg kvantitatíve a tápoldat komponenseinek hasznosulását.

4.2. Mikroorganizmusok tápanyagigénye, a tápanyagok hasznosulása a fermentáció során

4.2.1. Mikroorganizmusok tápanyagigénye, az alkalmazott tápoldattípusok és összetevőik

A fermentációs iparokban alkalmazott mikroorganizmusok termelőképesége alapvetően két tényezőtől függ: meghatározó szerepű a mikrobát jellemző genom, de ugyancsak döntő az a környezet, amelyben a mikroorganizmusokat tenyésztjük.

Úgy is fogalmazhatunk, hogy a mikroba igen nagy számú „lehetősége” közül (amely a genom által meghatározott), az adott környezetnek megfelelő véges számú „tulajdonság” fog manifesztálódni.

Adott mikrotörzs esetén tehát már a környezet az elsődleges meghatározó.

A környezet fogalmába értjük a tápoldatok minőségi és mennyiségi összetételét (beleértve az oldott oxigén szintjét is aerob fermentációk esetén) és az ún. környezeti paramétereket: pH, hőmérséklet,

²¹ Overall yield coefficient vagy true growth yield a szakirodalomban előforduló angol elnevezései.

redoxpotenciál-viszonyok stb. Csak a mikroba tevékenysége szempontjából kedvező környezet biztosíthat kedvező termelési szinteket. A „kedvező” környezet meghatározása igen sok tényező, bonyolult optimalizációs feladat, amelynek egyes elemeivel a következőkben foglalkozunk.

Egy fermentációs folyamat megtervezésének, optimalizálásának, megvalósításának egyik legfontosabb lépése a megfelelő növekedést és/vagy termékképződést biztosító táptalaj összeállítása.

A tápoldat-táptalaj funkciója a mikroba táplálkozási és környezeti igényeinek egyidejű kielégítése, de ezen túlmenően gazdasági szempontokat is figyelembe kell venni a tápoldat tervezése, optimalizálása során.

A mikroorganizmusokat tápanyagigényük szempontjából – és itt elsődlegesen a szénforrást és az energiaforrást vizsgáljuk – a 4.9. ábrán látható csoportokba sorolhatjuk.

		ENERGIAFORRÁS	
		KÉMIAI	FÉNY
SZÉNFORRÁS	SZERVES HETEROTRÓFOK	KEMO-ORGANOTRÓF Legtöbb baktérium, gomba... magasabbrendű állatok SZERVES ...glükóz...	FOTO-ORGANOTRÓF Bíbor (nem kén-)baktérium. Néhány eukarióta alga SZERVES ...glükóz... ELEKTRONDONOR
	SZÉN-DIOXID AUTOTRÓFOK	KEMO-LITOTRÓF H-, S-, Fe-baktériumok Denitrifikáló baktériumok SZERVETLEN en. forrás H_2S , S, $S_2O_3^{2-}$, H_2 , Fe(II), NH_4^+ , NO_2^-	FOTO-LITOTRÓF Zöld növények, Eukarióta algák (fényben) Kék/zöld algák Cianobaktériumok Fotoszintetizáló baktériumok SZERVETLEN H_2O , H_2S , S... ELEKTRONDONOR

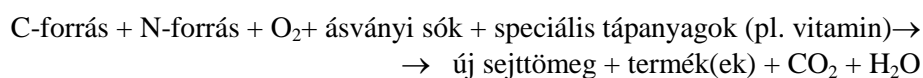
4.9. ábra: Mikrobacsoportok szénforrás- és energiaforrás-igény alapján

Táplálkozási igényük szerinti valamennyi csoportban található olyan mikrobákat, amelyek gazdasági szempontból fontosak, de a fermentációs iparok jelenleg leginkább a heterotróf csoportba tartozó mikroorganizmusokat alkalmazzák, amelyek tehát mind energia-, mind szénforrásuk tekintetében szerves anyagra szorulnak. Ez a megállapítás azonban nem kizáró, hiszen ismerünk olyan ipari eljárást, amely például eukarióta, fényhasznosító fotolitotróf organizmust alkalmaz (alga), de vannak olyan biobányászati eljárások is, amelyek során érceket kemolitotróf baktériumokkal lúgoznak ki (bacterial leaching).

A táptalajnak mindazon kémiai elemeket megfelelő, a mikroba anyagcsereje során hasznosítható (metabolizálható) formában és mennyiségben kell tartalmaznia, amelyek a mikroorganizmus testanyagainak felépítésében és a termék(ek) szintézisében részt vesznek.

A 4.1. táblázat néhány mikroba átlagos elemi összetételét mutatja be, míg a 4.2. táblázatban egy átlagos élesztő, illetve baktérium összetételét láthatjuk, a 4.3. táblázat pedig néhány fontos ipari fermentációs termék összetételét szemlélteti.

A táptalajtervezés első lépése a fermentációs folyamat sztöchiometriáján alapul: valamennyi szükséges elemet biztosítjuk, amely a kívánt termék és az új sejttömeg adott mennyiségében meg fog jelenni az alábbi formális egyenlet szerint:



E formális egyenlet alapján azonban csak a minimális tápanyagmennyiség állapítható meg, optimális fermentációs folyamathoz az nem feltétlenül elegendő (vö.: növekedés kinetikája, limitáló szubsztrát fogalma), illetve nemcsak a szükséges mennyiséget, hanem a folyamatok sebességére

gyakorolt hatást is figyelembe kell venni. E megállapítás elsősorban a C-forrás, N-forrás és oxigén esetén igaz, ásványi sók esetében a folyamat sztöchiometriája sokkal jobb közelítést ad.

4.1. táblázat: Néhány mikroorganizmus elemi összetétele

ÖSSZETÉTEL A SEJTSZÁRANYAGBAN					
MIKROORGANIZMUS	C	H	O	N	S
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45	6,8	30,6	30,6	n. a.
<i>Methylomonas methanolica</i>	45,9	7,2	nincs adat	14,0	2,6
<i>Penicillium chrysogenum</i>	43	6,9	35,0	8,0	nincs adat

4.2. táblázat: „Átlagos” baktérium és élesztő elemi összetétele

ELEM	% sz.a.-ban	% sz.a.-ban	Eredő hozam ²²
	ÉLESZTŐ	BAKTÉRIUM	
C	47	53	*
N	7,5	12	8–13
P (PO ₄ ³⁻ -ben számolva)	1,5	3,0	33–66
S	1,0	1,0	100
O	30,0	20,0	*
Mg	0,5	0,5	200
H	6,5	7,0	**
Hamu ²³	8,0	7,0	**

4.3. táblázat: Néhány fontosabb fermentációs termék elemi összetétele

<u>Antibiotikumok</u>		
Bacitracin		C ₆₆ H ₁₀₃ N ₁₇ O ₁₆ S
Cefalosporin		C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₈ S
Eritromicin		C ₃₇ H ₆₇ N ₁₃ O
PenicillinG		C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S
Streptomycin		C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂
<u>Szerves savak</u>		
Citromsav		C ₆ H ₈ O ₇
Glükonsav		C ₆ H ₁₂ O ₇
Tejsav		C ₃ H ₆ O ₃
<u>Oldószerek</u>		
Aceton		C ₃ H ₆ O
Butanol		C ₄ H ₁₀ O
Etanol		C ₂ H ₆ O
<u>Vitaminok, aminosavak</u>		
B ₁₂		C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P
Riboflavin		C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆
Glutaminsav		C ₅ H ₉ N ₁ O ₄
Lizin		C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂
Triptofán		C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂

²² * E hozamokról részletesen később szólunk.

** E hozam nem definiálható, mivel itt az összetétellel, nem pedig a valódi felhasználással történik összevetés.

²³ A hamu elemtartalma: P, Mg, Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Zn, Ca, K, Na.

A fenti formális sztöchiometriai egyenlet utal a speciális tápanyagigényekre is. Ilyenek lehetnek auxotróf mikrobák esetén azok az aminosavak, vagy egyéb vegyületek, amelyeket a mikroba nem képes szintetizálni, de életműködéséhez nélkülözhetetlenek vagy valamely vitamin és egyéb bioszanyag.

Az egyes tápoldat-komponensek, illetve az egyes elemek biztosítására a legkülönbözőbb megközelítéseket alkalmazzák.

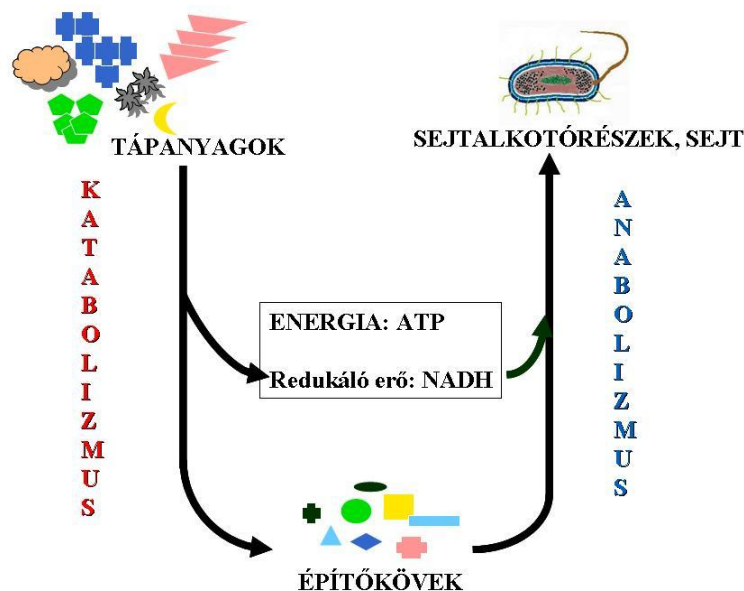
Különleges jelentősége van a víznek, hiszen a tápoldat egy vizes közeg, és az élő sejt úgyszintén maga is 70–90% vízből áll. A tápoldatok összeállításánál, elsősorban tömegtermékek (citromsav, ecetsav és hasonlók) előállításakor sokszor egyszerű csapvizet vagy desztillált vizet használnak fel, de igényesebb (pl. gyógyszeripari, rekombináns biotechnológiai, szövettenyésztési) eljárásoknál szigorúbb követelményeket kell kielégíteni: ionmentes víz, pirogénmentes víz, meghatározott maximum vezetőképességgel rendelkező víz, úgynevezett WFI²⁴ minőségű víz felhasználása is szükségessé válhat. Egy modern biotechnológiai üzemben a megfelelő minőségű víz előállítása ugyanolyan fontos és technológiai értelemben bonyolult feladat, mint maga a fermentáció.

A hidrogént mint elemet az archea hidrogénbaktériumok kivételével, amelyek a molekuláris hidrogén oxidációjából fedezik energiaszükségletüket, a legtöbb mikroorganizmus a C-/energiaforrás szerves molekulájából és a vízből fedezi.

Az oxigén speciális tápanyag, ezért vele egy külön fejezetben részletesen foglalkozunk (4.5. fejezet), itt annyit jegyezzünk meg, hogy az anaerobok a szubsztrátokban és a vízben lévő oxigént hasznosítják, míg az aerobok az atmoszférából származó molekuláris oxigént.

A nitrogénforrás nagyon sokféle lehet, ezek legfontosabbjait a későbbiekben érintjük, általában: NH_4^+ - és NO_3^- - sók vagy szerves N-tartalmú vegyületek, illetve természetes N-források formájában.

A szénforrás a legtöbb esetben az energiaforrás is (de nem szükségszerűen), és nagyon sokféle lehet: cukrok, alkoholok, egyszerű szerves savak, zsírok, olajok stb. Ezek lebontásával termelik meg a sejtek azokat az építőköveket, amelyekből saját makromolekuláikat, sejkomponenseiket fel tudják építeni.



4.10. ábra: A táplálékhasznosulás sémája

²⁴ Water for injection, azaz injekciók előállítására alkalmas gyógyszerminőségű víz.

A lebontás során energia termelődik, ez a felépítő reakciók (valamint a fenntartás) igényeit hivatott kielégíteni. A nagyon egyszerű sematikus 4.10. ábra világítja meg a viszonyokat. A C-forrás hasznosulásának kvantitatív viszonyairól a [4.2.2. alfejezetben](#) szólnunk.

A fermentációk során felhasznált táptalajok-tápcoldatok szintetikusak, félszintetikusak és természetes alapúak lehetnek, ezekre egy-egy példát láthatunk a következő táblázatokban.

4.4. táblázat: Fermentációs táptalajok

1. Szintetikus táptalaj

A megadott összetételű táptalaj 30 g/dm^3 *Candida utilis* élesztő előállítására alkalmas szakaszos tenyésztésben

		g/dm^3	hozam
C-forrás :	metanol	60	0,5
	vagy etanol	40	0,75
	vagy glükóz	60	0,5*
	vagy hexadekán	30	1,0**
N-forrás:	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12	
P-forrás	KH_2PO_4	1,3	
	MgSO_4	1,5	

Elemnyomok: Cu, Co, Fe, Ca, Zn, Mo, Mn 10^{-4} mol/dm^3 mennyiségben.

*jellemző érték szénhidrátokra (glükóz, keményítő, cellulóz stb.)

**jellemző érték telített szénhidrogénekre (n-paraffinok)

2. Félszintetikus táptalaj gomba eredetű proteáz termelésére

Kukoricakeményítő	30 g/dm^3
Kukoricalekvár	5
Szójaliszt	10
Kazein	12
Zselatin	5
Szeszmoslék por	5
KH_2PO_4	2,4
NaNO_3	1
NH_4Cl	1
FeSO_4	0,01

3. Természetes alapú táptalaj baktériumok eltartására

Húskivonat (BACTO BEEF EXTRACT)	10 g/dm^3
Pepton (BACTO PEPTONE)	10
Élesztőkivonat (BACTO YEAST EXTRACT)	5
NaCl	1
Agar	20

Laboratóriumi szinten, főként kutatási célra, előszeretettel alkalmazunk szintetikus táptalajokat, amelyekben tehát szervesen kívül csak egy szerves összetevő van, a szén-/energiaforrás. A termelési gyakorlatban viszont legtöbbször félszintetikus táptalajokat használnak fel. A harmadik példában látható, főként természetes eredetű komponenseket tartalmazó táptalajokat leginkább a mikrobák eltartása, előtenyésztése céljából alkalmazzuk.

A mikrobák és a különböző szövetek tenyésztésénél kezdetben „természetes” anyagokból, növényi és állati anyagok kivonataiból, élesztőkivonatból, húslevesből, tejből, tejsavóból és vérsavóból stb. készített tápcoldatokat (komplex tápcoldatokat) használtak. Ezek a tápcoldatok azért voltak kedveltek, mivel gyakorlatilag minden (vagy csaknem minden) organizmus számára megfelelő tápanyagokat tartalmaznak. Nagy hátrányuk azonban, hogy kémiaiilag nem jól definiáltak, összetételük

széles határok között ingadozhat (a tenyésztés vagy termesztés helyétől, az időtől és időjárástól, valamint egyéb tényezőktől függően). Jórészt azért törekedtek a kémiaiailag definiált, *szintetikus és félszintetikus* tápközegek megkonstruálására, hogy az állandó minőségű táptalajt biztosítani lehessen. Mindazonáltal az ipari gyakorlatban ma is sok természetes eredetű tápoldatkomponenst alkalmaznak.

A fermentációs ipar C- és energiaforrása általában valamilyen növényi eredetű szénhidrát. Tiszta *glükózt* vagy *szaharózt* a költségtényezők miatt ritkán használnak egyedüli szénforrásként, legtöbbször csak olyan folyamatokban, amelyek rendkívül pontos fermentációvezetést követelnek meg. A szaharózgyártás mellékterméke, a *melasz* a legolcsóbb szénforrások közé tartozik, és jellemzően a hagyományos erejedési iparokban: a szesz- és pékélesztőgyártásban alkalmazzák. A sűrűn folyós anyag mintegy 80% szárazanyag-tartalma kb. 50%-ban cukrokat, elsősorban szaharózt és amellet jelentős mennyiségű nitrogéntartalmú anyagot, vitaminokat és ásványi sókat, elemnyomokat is tartalmaz. A melasz összetételének esetenként jelentős változásai a termesztési területtől, az időjárástól és az egyes cukorgyárakban alkalmazott technológiák különbözőségéből adódnak. Egy jellemző melaszösszetételt mutat be a 4.5. táblázat.

4.5. táblázat: Répacukormelasz összetétele és néhány jellemzője
(Szolnoki Cukorgyár, 1993/94. évi kampány adatai)

<u>Szárazanyag-tartalom</u>	81%
Hamutartalom	11,9%
Viszkozitás	7644 cP
pH	8,16
Összes cukortartalom a szárazanyagban	46,9%
invert cukor	0,9%
raffinóz	1,24%
Összes N-tartalom	2,3%
asszimilálható N	0,87%
NO ₃	0,62%
Ecetsav	1,1%
K-tartalom	2,6%
Na-tartalom	0,7%
Ca-tartalom	0,7%
Biotin	0,0584 mg/kg

A kukorica alapú keményítőből történő glükóz gyártásakor a glükóz kikristályosítása után visszamaradó mellékterméket, illetve a különböző bontásfokú hidrolizátumokat ugyancsak széles körben és nagy mennyiségben használják C-/energiaforrás alapanyagaként.

A *malátakivonat*, a csíráztatott, majd elcukrosított árpa vizes kivonata kimondottan kedvező táptalaja számos élesztőnek, gombának és fonalas baktériumnak. Szárazanyagának szénhidráttartalma kb. 90–92 %, amely hexózekből (glükóz, fruktóz), diszaharidokból (maltóz, szaharóz), triszaharidokból (maltotrióz) és dextrinekből áll. Fehérjéket, peptideket, aminosavakat, purinokat, pirimidineket, valamint vitaminokat is tartalmaz. A malátakivonat tartalmú táptalajokat kíméletesen kell sterilizni. A savanyú pH-érték, a redukáló cukrok és az aminosavak együttes jelenléte ugyanis Maillard-reakcióhoz vezet. A barna kondenzációs termékek kialakulásával járó folyamatok során az aminosavak (mindenekelőtt a lizin) vagy a fehérjék aminosoportjai a redukáló cukrok karbonilsoportjaival reagálnak. Az így létrejött kötések a mikroorganizmusok már nem képesek megbontani. Ezért a karamellizálódás mellett a Maillard-reakció a fő oka annak, hogy a táptalajok a sterilizálás során károsodnak. Ennek következtében a fermentáció végtermék-kihozatala jelentősen csökkenhet.

A *keményítőt* és a *dextrint* az amiláz enzimet termelő törzsek szénforrásként közvetlenül is hasznosítják. Az utóbbi időben a keményítő az etanol-előállítás kiindulási anyagaként vált igen jelentőssé. Ma jellemző az ún. nagy volumenű fehér biotechnológiai eljárások zömére (tejsav, tejsav alapú PLA[politejsav], citromsav, glükonsav stb.) hogy kukoricából vagy kukoricakeményítőből (esetenként búzából) származó hidrolízistermékeket alkalmaznak szén-/energiaforrásként. Törekvés az

is, hogy az ilyen eljárásoknál egyrészt olyan mikrobákat alkalmazzanak, amelyek képesek maguk a keményítő bontására, vagy egyidejűleg történjék az enzimes keményítóbontás és maga a fermentáció (SSF, azaz simultaneous saccharification and fermentation).

A *szulfitlúg* a cellulózipar cukortartalmú mellékterméke. Szárazanyag-tartalma mintegy 9–13%, és elsősorban élesztők tenyésztésére használatos. A tülevelű fák feldolgozásakor visszamaradó szulfitlúgok mintegy 2–3% cukrot tartalmaznak, amiből kb. 80% hexóz (glükóz, mannóz, galaktóz), a többi pentóz (xilóz, arabinóz). A lombos fák feldolgozása során képződő szulfitlúgok elsősorban pentózokban gazdagok.

A *cellulóz* fermentációs alapanyagként történő felhasználása lehetőségének megteremtésén napjainkban nagyon intenzíven dolgoznak. A világban évenként újratermelődő cellulóz, illetve lignocellulóz komplex mennyisége mintegy 10^{11} tonna. Ebből igen nagy mennyiség hulladékként elvész (pl. szalma, kukoricaszár és -csutka, faforgács). A cellulózt nem lehet közvetlenül szénforrásként hasznosítani, először kémiai vagy enzimesen hidrolizálni kell. A világszerte hatalmas kutatási forrásokot emésztő lignocellulóz-bontási kérdéskör ma még korántsem megoldott, mind a genetikai törzsmódosítások, mind a technológiai fejlesztés területén még nagy előrelépések szükségesek és várhatóak, amíg a gazdaságos lignocellulóz-bontás a jövő fermentációs iparának (és evvel a kémiai és energiaiparnak is) a legnagyobb alapanyagforrása lesz.

A *növényi olajok* (szója-, gyapotmag- és pálmaolaj) főként mint kiegészítő anyagok jöhetnek szóba. Jellemzően az antibiotikum-iparban alkalmazznak olyan habzásgátló olajokat, amelyek egyszersmind C-forrásul is felhasználódnak.

Széntartalmát tekintve napjainkban a *metanol* még mindig az egyik legolcsóbb fermentációs alapanyag, de csak kevés baktérium és élesztő képes azt metabolizálni. Eddig a metanolt elsősorban a 20. század utolsó harmadában az *SCP* (egysejt fehérje=single cell protein) előállítására, továbbá a B₁₂-vitamin gyártás alapanyagaként használták. Ma már a metanol nem „divatos” C-forrás, de könnyen azzá lehet ismét, ha a nem petrokémiai alapú metanol-előállítás gazdaságosan lehetségessé válik (gondoljunk például a magyar Nobel-díjas Oláh György-féle újszerű metanolkémiaira).

A cellulóz, valamint a keményítő elcukrosítása és fermentációja révén keletkező *etanol* kielégítő mennyiségben áll rendelkezésre. Előnye, hogy sok mikroszervezet egyedüli szénforrásként is képes metabolizálni. Természetesen csak olyan esetekben érdemes C-/energiaforrásként felhasználni, amikor az etanol jelenlétének valamilyen plusz előnye van a cukorhoz képest (például oldószere valamely vízben rosszul oldódó tápoldat-komponensnek, prekürzornak).

A paraffin szénhidrogének közül elsősorban a C₁₂–C₁₈ lánchosszúságú *alkánokat* képesek bizonyos mikroorganizmusok metabolizálni. Az 1960-as évek elején az alkánokban a szénhidrátok alternatív anyagait látták. A megnövekedett olajárak, valamint a megújuló szénforrásigény miatt azonban az alkánok mint fermentációs alapanyagok napjainkban már nem jöhetnek szóba.

A mikroorganizmusok közül sok képes szerves, ill. egyszerű nitrogéntartalmú vegyületeket (ammóniát, ammóniumsókat, karbamidot) **N-forrásként** hasznosítani, míg mások növekedésükhöz szerves N-forrást igényelnek. Ipari léptékben használatos N-források lehetnek: szójadara, -liszt, kukoricalekvár, maláta, búzasikér, alkohol desztillációs maradék, valamint állati eredetű fehérjék, mint amilyen a halliszt, vér, húsgyári hulladék, ill. húshidrolizátum, valamint a tejsavó. Nagyon jól metabolizálható szerves nitrogénforrás a *kukoricalekvár*²⁵ amely a kukoricakeményítő-előállítás ún. nedves őrléses technológiájának a mellékterméke. Ez sok aminosavat (alanint, arginint, glutaminsavat, izoleucint, treonint, valint, fenil-alanint, metionint és cisztint), valamint vitaminokat is tartalmaz. A cukortartalom döntő többségét a tejsavbaktériumok az előállítás során tejsavvá alakítják. A kukoricalekvárral kapcsolatban is igazak a melasznál említettek a változó összetételre vonatkozóan. Egy jellemző kukoricalekvár-összetételt mutatunk be a 4.6. táblázatban.

Az *élesztőkivonat*²⁶ igen sok mikroorganizmus számára jó táptalaj. Az élesztőkivonatot főképpen pékélesztőből vagy *Candida* törzsekből állítják elő (50–55 °C-ra melegítve, autolízissel, vagy NaCl

²⁵ (az angolnyelvű irodalomban corn steep liquor, CSL)

²⁶ (az angolnyelvű irodalomban yeast extract, YE)

jelenlétében plazmolízissal, majd az így kapott feltárvány vizes extraktumának porlasztva szárításával): aminosavakat, peptideket, vízoldható vitaminokat és szénhidrátokat tartalmaz. Az élesztőben lévő glikogén és a trehalóz az előállítás folyamán glükózzá alakul. Az élesztőkivonat jellemzően teljes mértékben vízoldható.

A *peptonok*at (fehérje-hidrolizátumokat) igen sok mikroorganizmus képes hasznosítani. Ipari felhasználásukat jórészt az korlátozza, hogy drágák. A zselatinból származó pepton gazdag prolinban és hidroxiprolinban, de szinte egyáltalán nem tartalmaz kéntartalmú aminosavakat. A keratinból származó peptonban sok prolin és cisztein van, de a lizin hiányzik belőle. A növényi eredetű peptonok (szójapepton) sok szénhidrátot tartalmaznak. A hidrolízis módja – savas vagy enzimes – is befolyásolja a végtermék összetételét. Ma igen sokféle mikrobiológiai célra felhasználható pepton kapható a különböző gyártóktól: hús, tej – vagy növényi eredetben és a hidrolízisben különböznek, ennek következtében összetételük is igen különböző lehet. Lényeges tulajdonságuk, hogy teljes mértékben vízoldhatóak.

A *szójaliszt* lényegében őrölt szójamagpogácsa, amely az olaj kivonása után visszamaradó komplex tápanyag. A szójaliszt fehérjetartalma 50%, szénhidrátartalma mintegy 30%, a maradék anyagok közül fontos a zsír-, illetve a lecitintartalom (1, ill. 1,8%). A szójalisztet elsősorban az antibiotikum-fermentációkhoz használják, mert a viszonylag lassú metabolizálódás miatt nem okoz katabolit-repressziót.

4.6. táblázat: A kukoricalekvár összetétele

<u>Szárazanyag-tartalom</u>	50%
Fehérjetartalom	24%
Szénhidrát	5,8%
Zsírok	1%
Rosttartalom	1%
Hamutartalom	8,8%
Biotin	0,88 mg/kg
Piridoxin	19,36 mg/kg
Tiamin	0,88 mg/kg
Pantoténsav	74,8 mg/kg
riboflavin	5,5 mg/kg
Szabad aminosavak	4,9%
ezen belül	
arginin	0,4%
cisztein	0,5%
glicin	1,1%
hisztidin	0,3%
i-leucin	0,9%
leucin	0,1%
lizin	0,2%
metionin	0,5%
fenilalanin	0,3%
tirozin	0,1%
valin	0,5%

A különböző mikrobák *növekedésifaktor*-igénye ritka esetben kvantitatíve meghatározott. Van olyan mikroba, amelyik egyáltalán nem igényel ilyen vegyületeket, képes valamennyi fontos vitamint szintetizálni. Érdekes hatása van a biotinhoány a *Corynebacterium glutamicum*-ra: biotinhoány esetén a sejtmembrán permeabilitása megváltozik, a sejt nem képes a szintetizálódott glutaminsavat a sejtben tartani, az a fermentáléba diffundál. A vitaminokat szintetikus közegbe tiszta kémiai vegyület formájában adják, gyakran az élesztőkivonat egyben növekedésifaktor-forrásként is szolgál, mivel tiamint, riboflavint, piridoxint, pantoténsavat, niacint és biotint is tartalmaz.

Bizonyos fermentációk (citromsav, riboflavin) nagyon érzékenyek – rendszerint a természetes tápanyagokkal bevitt – fémekre, bizonyos elemnyomokra. A nagy termékhozam biztosítása érdekében ezeket a fémeket el kell a tápoldatból távolítani. Ez történhet kicsapással (foszfáttal, karbonáttal, ferrocianiddal), folyadékextrakcióval és adszorpcióval. Bizonyos esetekben elemnyomhiányt el lehet úgy is érni, hogy ha a fermentációs tápoldatba kelátképző vegyületet adnak.

Az elmondottakból talán kiviláglik, hogy a fermentációs ipar nyersanyagai csaknem 100%-ban az évenként megújuló növényvilágból származnak, ez ad ennek az iparágnak óriási perspektikus jelentőséget! A fokozatosan kimerülő szénhidrogénbázist képes ez az iparág az évenként megújuló szénhidrát- és fehérjeszubsztrát-bázissal kiváltani.

Üzemi léptékben a fermentációs tápoldatfejlesztésnél a gazdasági megfontolások döntőek. Olcsó végtermék esetén csak olcsó alapanyagok jöhetnek szóba, míg nagyértékű produktumnál a hozam elsődrendű fontosságú, ezért ezeknél (szteroidhormonoknál, monoklonális ellenanyagoknál) a nyersanyagok ára nem játszik olyan fontos szerepet.

A nagy termelési volument jelentő fermentációk esetén minél egyszerűbb tápoldat-összetételt alkalmaznak, elsősorban cukorforrást, amely rendszerint egy sor N-tartalmú anyagot is tartalmaz (pl. búza- vagy kukoricaliszt-hidrolizátum a C- és a fő N-forrás is egyben), és valamely szerves N-forrás-kiegészítőt, mint az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Az antibiotikumot termelő törzsek szaporításához általában komplexebb tápoldatokat alkalmaznak.

A kiemelkedő antibiotikum-titert produkáló törzsek törzsfelnevelésével párhuzamosan folyik az ezeknek legjobban megfelelő tápoldatkomponensek meghatározása. Minden új „szuperklón” optimális tápoldat-összetételét újra és újra meg kell határozni. Néha az új, fejlesztett törzsnek speciális igénye van (gondoljunk az auxotrófok speciális igényeire), amellyel a szülő törzs nem rendelkezett.

A komplex N-forrásokat a legtöbb antibiotikum-fermentációnál szerves N-forrással egészítik ki, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl vagy néha valamilyen nitrátos formájában. Nem ritka azonban az élesztő, ill. élesztőhidrolizátum alkalmazása sem, amely egyben növekedésfaktor-forrásként is szerepel. A C-források széles skálája jöhet szóba az antibiotikum-fermentációknál. A C-forrás fermentáció közben történő adagolása mára túlnyomó gyakorlattá vált ([fed batch technika](#)). A glükóz nagy koncentrációban ui. nagyon sok antibiotikum bioszintézisét katabolit represszióval akadályozza, és más fermentációknál is előnytelen (lásd pékélesztő előállítás). A glükózsintetizálóérték miatt ezért megfelelően alacsony értéken szükséges tartani a tenyésztés során, különösen a fermentáció második szakaszában, ahol az antibiotikum-szintézis történik. Gyakran használnak keverék C-forrásokat is, pl.: glükóz- és keményítőkeverék C-forrással indítják a fermentációt. A sejtnövekedést a könnyen asszimilálható glükóz biztosítja, míg a termelési szakaszban a biomassza amilázrendszerrel a keményítőből lassan szabadítja fel az asszimilálható glükózt, és így a katabolit represszió nem érvényesül. Hasonló megfontolás alapján alkalmaztak laktózt is (glükóz helyett) a penicillin-előállítás kezdeti korszakában. Gyakran adagolnak növényi olajokat is az antibiotikum-termelési szakaszban C-forrásként. A növényi és állati zsíradékok (szója-, kukorica-, napraforgóolaj, metiloleát, hal- és disznózsír) a következő előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek: lassan asszimilálódnak, viszonylag olcsók, jól adagolhatók, habzást gátló tulajdonságúak, bizonyos esetekben – különösen nyíróhatásra érzékeny mikrobáknál – védő hatásúak és nem utolsósorban nincs katabolit repressziót okozó hatásuk. Az elmondottak szerint az antibiotikumok fermentációs tápoldata komplex természetű, amelynek elkészítésénél természetes anyagokat használnak C- és N-forrásként. Ebből adódik, hogy a tápoldatok *ásványi anyagainak* optimalizálását csaknem lehetetlen elvégezni, mivel a természetes nyersanyagok ásványianyag-összetétele jelentősen változhat. A kukoricalékvarban bizonyos fémek koncentrációja akár egy nagyságrendet is ingadozhat.

Ennek ellenére az ásványi összetevők optimalizálása fontos kérdés, mindent meg kell tenni a lehetőleg optimális összetétel megtalálására.

Az alkoholtartalmú italok (sör, bor), ill. az ipari szesz előállítására, továbbá takarmány- és sütőélesztő- gyártáshoz egyaránt növényi szénhidrátokat és nitrogéntartalmú vegyületeket, valamint szerves nitrogénforrást használnak alapanyagként (árpát, kukoricát, gyümölcslevet, melaszt). Mivel az élesztő a keményítőt nem képes lebontani asszimilálható és erjeszhető cukorrá, ezért a keményítőtartalmú alapanyagokat előzetesen el kell hidrolizálni egyszerű cukrokká (maltózá, glükózzá).

A lignocellulózok hidrolízisének pentózok is képződnek, ezek felhasználására csak bizonyos élesztők (pl. *Candida utilis*) képesek, így a szulfidgáz „élesztősítésénél” ezt az élesztőt használják. Szükséges megjegyezni, hogy az alkoholgyártási eljárások néhány olyan mellékterméket is produkálnak, amelyeket mint tápanyagokat lehet más fermentációknál felhasználni (sörélesztő, alkohol-desztillációs maradék²⁷ stb.)

A növényi, de különösen az állati sejtek növekedésükhöz vitaminokat, növekedési faktorokat is igényelnek: általában a teljes oldható vitaminspektrumot tartalmazzák a növényi és az állati szövetek szaporítására szolgáló tápoldatok. A következő 4.7. és 4.8. táblázatokban egy-egy klasszikus, növényi sejtenyésztésre és állati sejtek tenyésztésére alkalmas alaptáplódat összetétele látható.

A növényi sejtek, szövetek tápanyagigénye igen komplex: nagyon nagy számú szerves vegyületet igényelnek növekedésükhöz. Többek között növényi hormonokat, regulátorokat (gibberellint, kinetint, indol-ecetsavat, naftol-ecetsavat, 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavat). A növényi sejtek még az optimális körülmények között is nagyon lassan növekednek, generációs idejük 2 nap vagy ennél is nagyobb, és jórészt ennek tulajdonítható, hogy a növényi sejtenyésztéssel előállított szekunder anyagcsere-termékek száma ma még nagyon korlátozott.

4.7. táblázat: MURASHIGE-SKOOG táplódat növényi sejtek szuszpenziós és kallusz kultúrájához

Összetevő	mg/dm ³	Összetevő	mg/dm ³
ÁSVÁNYI ANYAGOK		SZERVES ÖSSZETEVŐK	
NH ₄ NO ₃	1650	Szaharóz	30 000
KNO ₃	1900	Agar	10 000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Glicin	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Indolecetsav	1–30
KH ₂ PO ₄	170	Kinetin	0,04–10
Na ₂ -EDTA	37,3	Myo-inozit	1
FeSO ₄ .7 H ₂ O	27,8	Nikotinsav.HCl	0,5
H ₃ BO ₃	6,2	Piridoxin.HCl	0,5
Mn SO ₄ .4H ₂ O	22,3	Tiamin.HCl	0,1
Zn SO ₄ .4H ₂ O	8,6		
KI	0,83		
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25		
Cu SO ₄ .5H ₂ O	0,025		
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025		

Az emlőssejtek – mint amilyen a HeLa (emberi karcinoma) és az L-sejtek (egér fibroplaszt) vagy a CHO-sejtvonalak²⁸ – tenyésztéséhez nagyon komplex tápoldatokra van szükség, amelyek többek között eredetileg 5–10% szérumot (ló-, illetve marhavérszérum) is tartalmaztak (lásd az alap Eagle táplódat összetételét), ami igen-igen drága médiumkomponensnek számít. Az antitestet termelő hibridómák felfedezése kihívást fogalmazott meg a kutatók számára: olcsóbb, kémiaiilag definiált, szérummentes tápoldatot kellett kidolgozni, amelyen a hibridómákat (és egyéb emlősszöveteket) ipari léptékben, olcsón lehet szaporítani. A komplex tápközeg helyettesítésére azért is szükség volt, mivel ilyen tápoldatból nagyon nagy nehézségbe ütközött az antitestek izolálása. Ennél a feladatnál ismét bebizonyosodott, hogy a feldolgozás szempontja alapvetően befolyásolja az optimális tápoldat-összetételt. Más szóval az optimális összetétel keresésénél a mikroba vagy egyéb sejtek növekedési és termékképződési szempontjai mellett, a termék izolálásra is figyelemmel kell lenni. A kidolgozott szérummentes közegek aminosavakat (elsősorban glutamint), vitaminokat, koenzimeket, nukleinsavkomponenseket, hormonokat (inzulint, transzferint), szénhidrátokat, lipideket (pl. linolsavat) és sókat

²⁷ Ilyen melléktermékek: Distillers Dried Solubles DDS, Distillers Dried Grain DDG, Distillers Dried Grain with Solubles DDGS.

²⁸ A HeLa egy [Henrietta Lacks](#) nevű, karcinómában elhunyt, beteg immortalizált rákos sejtvonala. Chinese Hamster Ovary, Kinai aranyhórcsög petesejt.

tartalmaznak. Ma már az egyes speciális sejtvonalakra egyedileg kidolgozott és optimalizált összetételű tápoldatok kereskedelmileg beszerezhetőek.

4.8. táblázat: EAGLE tápoldat állati sejtvonalak tenyésztésére

ÖSSZETEVŐK	mg/dm ³	ÖSSZETEVŐK	mg/dm ³
L-aminosavak		Vitaminok	
arginin	105	kolin	1
cisztin	24	fólsav	1
glutamin	292	inozit	2
hisztidin	31	nikotinamid	1
izoleucin	52	pantoténsav	1
leucin	52	piridoxin	1
lizin	58	riboflavin	0,1
metionin	15	tiamin	1
fenilalanin	32	Ásványi sók	
treonin	48	NaCl	6 800
triptofán	10	KCl	400
tirozin	36	CaCl ₂	200
valin	46	MgCl ₂ ·6H ₂ O	200
Szénhidrátok		NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	150
glükóz	1000	NaHCO ₃	2 000
Szérum	5–10%		

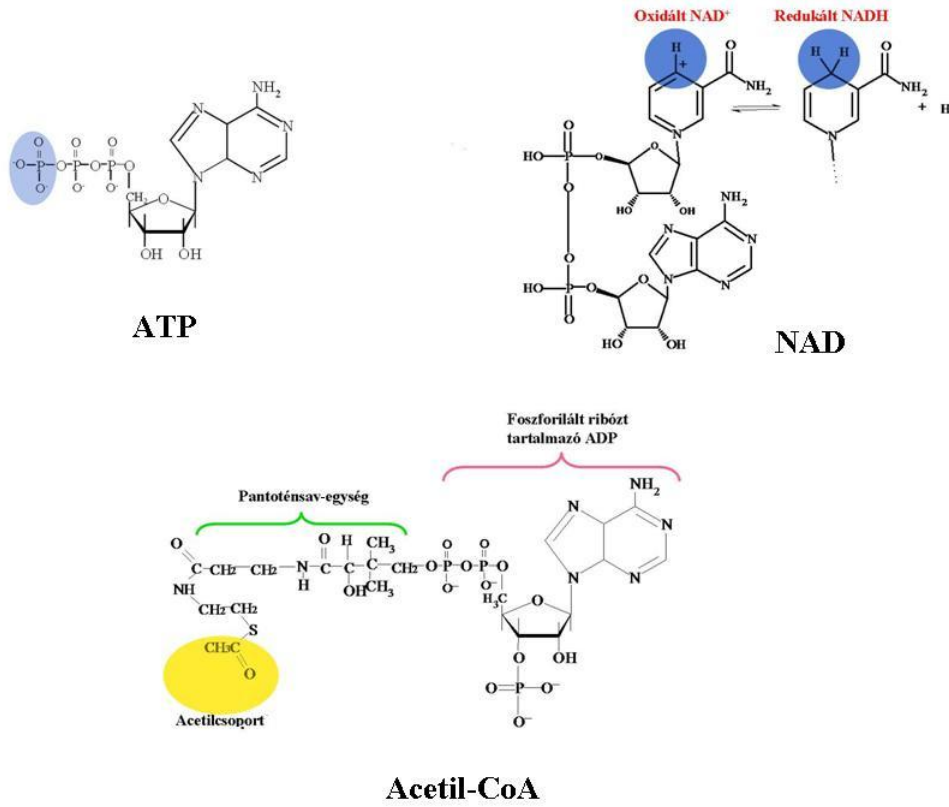
4.2.2. A szénforrás és hasznosulása

A fermentációs gyakorlatban alkalmazott hagyományos C-források a szénhidrátok: tiszta kristályos glükóz, glükóztartalmú keményítő-hidrolizátum, a kukoricakeményítő alapú glükózgyártás során a glükóz kristályosításakor visszamaradó anyalúg, szaharóz vagy szaharóztartalmú melléktermékek (nád- és répacukormelasz), esetenként egyéb cukortartalmú anyagok. Az ún. nem konvencionális C-források közé sorolhatók a különböző alkánok, alkanolok, mint az etanol és metanol, valamint a cellulóz és cellulóztartalmú ipari vagy mezőgazdasági hulladékok, melléktermékek.

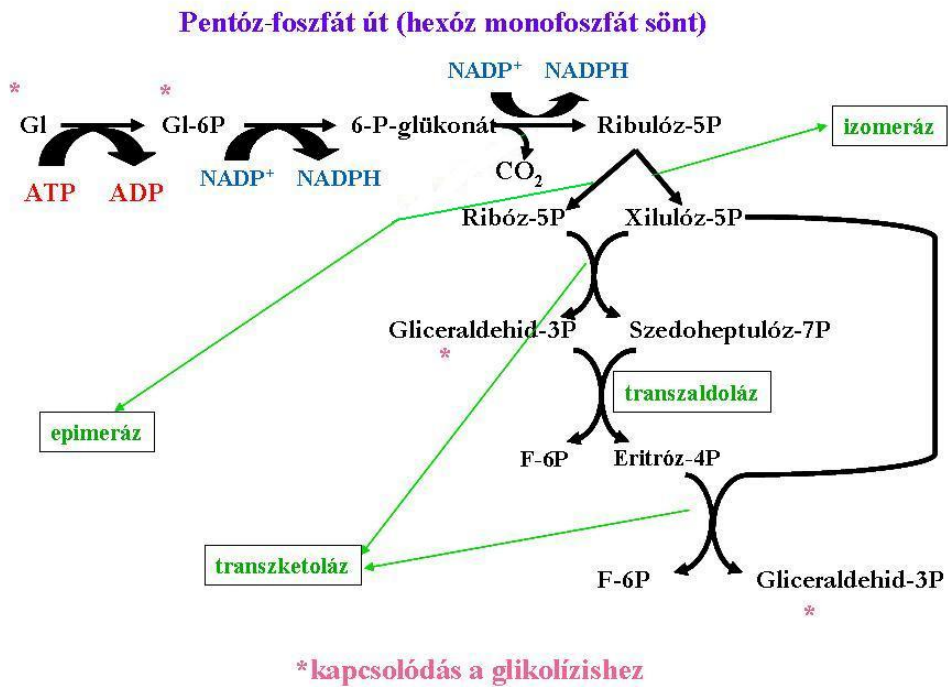
Cellulóz esetén tulajdonképpen szintén glükózhasznosításról beszélhetünk. A cellulóztartalmú anyagok hasznosítása előtt természetesen nagy perspektíva áll. Úgyszintén a nem konvencionális szubsztrátok közé sorolhatók a különböző szénhidrogének, metán- és n-paraffinok. Komplex tápoldatok esetében ezeken felül akár aminosavak, illetve fehérjék vagy zsírok, olajok is jelenthetik a C-forrást.

Bármi is legyen azonban a mikroba tényleges C-forrása, végeredményben az alapvető biokémiai reakcióutak mentén hasznosul, egyrészt a felépítés alap építőköveinek néhány kulcsvegyületén keresztül, másrészt az ezen utak mentén hasznosíthatóvá váló energia formájában.

Ezek a kulcsvegyületek, illetve kulcs metabolikus utak láthatóak a következő ábrákon. Itt egyrészt láthatjuk azokat a molekulákat, amelyek a metabolizmus fő „teherviselői” (4.11. ábra), másrészt a centrális metabolit utakat. Ezek közül a glikolízist (EMP út) és kiegészítőjét, azaz a pentóz-foszfát utat (hexóz monofoszfát sönt) említjük elsőként (3.47. és 4.12. ábra). E két centrális lebontási séma egymás mellett funkcionál, gyors mikrobánövekedés esetén 2:1, lassú növekedés esetén 10:1 vagy akár 20:1 arányban a glikolízis javára. A glikolízis lebontja a 6 C-atomos cukormolekulát 3 C-atomos piroszőlősavra (illetve 2 C-atomos AcCoA-ra), miközben csekély mértékben energia is hozzáférhetővé válik (2 ATP mol glükózonként), utóbbi pedig kapcsolatot teremt a 6 C-atomos cukrok és a 3, 4, 5, 6, 7 C-atomos cukrok között. A 4.13. ábra a néhány baktériumban az EMP út alternatívájaként működő Entner–Doudoroff -utat vázolja fel.

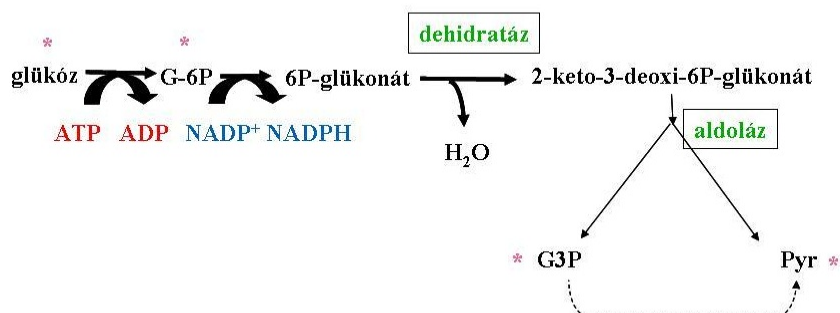


4.11. ábra: Az anyagcsere legfőbb kulcsvegyületei: ATP, AcCoA, NAD



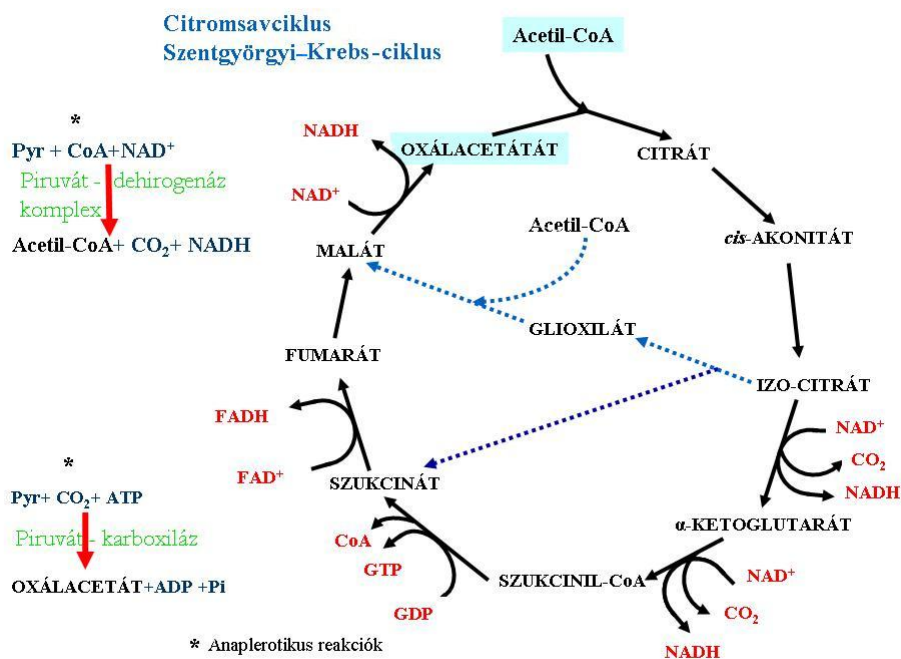
4.12. ábra: A pentózfoszfát anyagcsereút

Entner-Duodoroff út



*kapcsolódás a glikolízishez

4.13. ábra: A cukorlebontás Entner Duodoroff anyagcsereútja



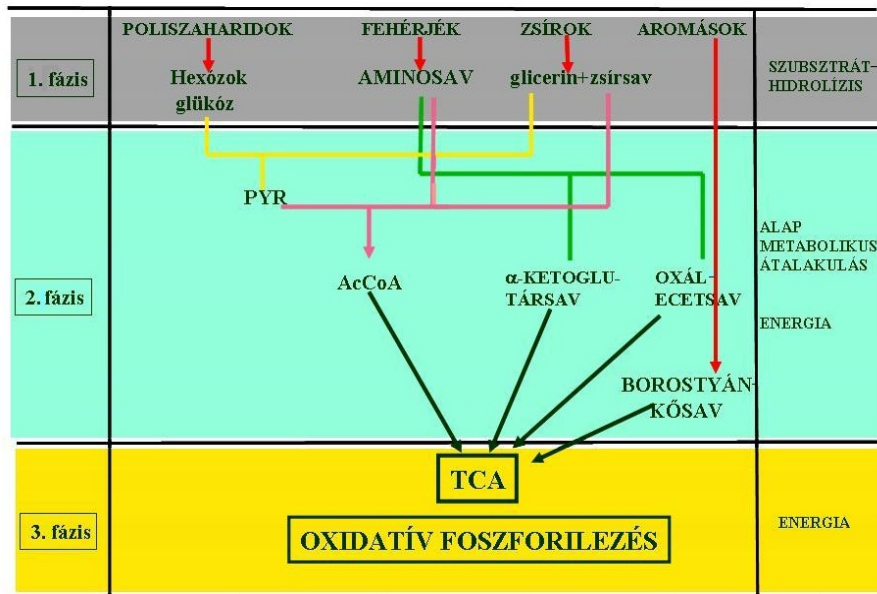
4.14. ábra: A citrátkör és az anaplerotikus reakciók

A citrátkör (TCA)²⁹, mint a következő nagyon fontos centrális metabolikus körfolyamat, kiegészítve anaplerotikus reakcióival és a gyakran rendkívül fontos gloxilát sönttel látható a 4.14. ábrán.

A 4.15. ábra összefoglalóan mutatja egy aerob heterotróf mikroorganizmus lehetséges C-forrás hasznosulásának kapcsolódásait. E szerint a hasznosulásnak három szintje van: az első szinten a szubsztrátok hidrolízise valósul meg: a poliszaharidok egyszerű cukrokká, a fehérjék és részlegesen lebontott fehérjék aminosavakká és a zsírok-olajok zsírsavakká és glicerinné bomlanak le. Ez a szint leggyakrabban teljes egészében extracelluláris enzimek segítségével folyik. A bontástermék monomer C-források azután kémiai természetüknek megfelelően a második szintre kapcsolódnak be: a monoszaharidok, illetve a glicerinné a glikolízis során piruvát-savvá, majd acetil koenzim-A-vá

²⁹ TCA ciklus=trikarbonsav kör vagy Szent-Györgyi Krebs ciklus

alakulnak, és így kapcsolódnak a harmadik szint TCA-ciklusába, míg a többi a TCA más megfelelő pontján tud bekapcsolódni a körfolyamatba. A második és a harmadik szint funkciója kettős: egyrészt szolgáltatja a hozzáférhető kémiai energiát (ATP), másrészt szolgáltatja azokat az intemedier molekulákat, amelyek a felépítés reakciósoraihoz szükségesek. Ilyen értelemben a TCA egyrészt eltünteti a teljes energiahordozó szerves molekulát (CO_2 formájában), másrészt szállíthatóvá teszi az energiahordozó H-atomokat (elektronokat) NADH (és FADH_2) formájában, ugyanakkor a feltöltési (anaplerotikus) reakciókkal a felépítéshez szükséges alpmolekulákról is gondoskodik. Az aeroboknál a TCA kiegészül a hatékony energiefelzabarádítást lehetővé tevő terminális oxidációval (4.16. ábra), míg a fermentatív mikrobák (erjesztő élesztők) csak a glikolízis során felszabaduló energiát hasznosíthatják.



4.15. ábra: A C-forrás felhasználás anyagcsereútjainak szintjei

Cukor C-forrás esetén összefoglalóként és emlékeztetőként a glikolízis-TCA-terminális oxidáció hármását egy aláhúzással nyomatékosított felkiáltójellel szemléltetjük a 4.5. animációban.

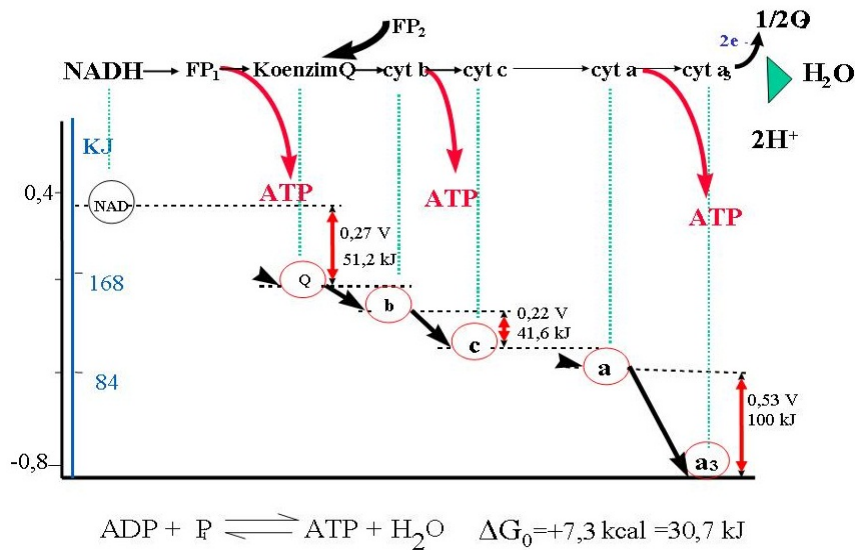


4.5. animáció: Központi aerob anyagcsereutak

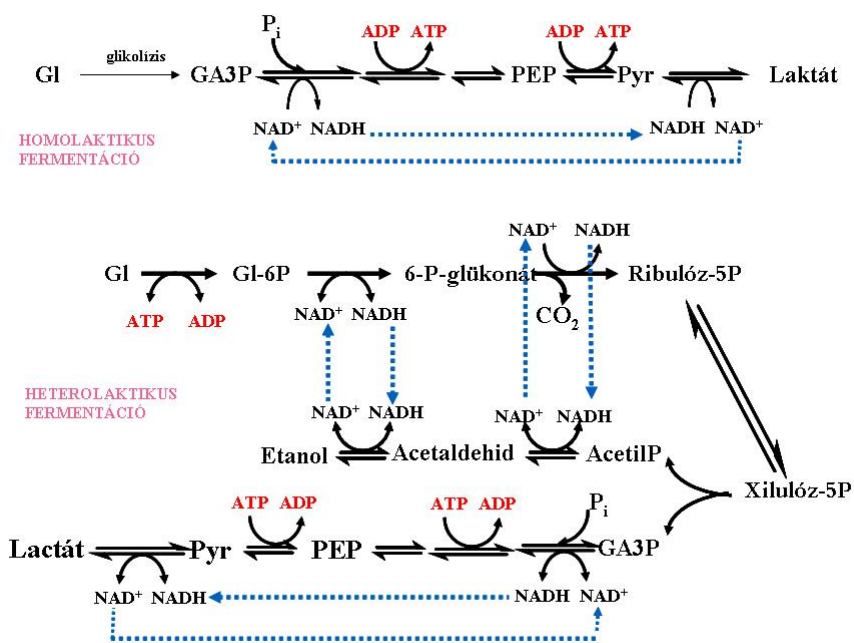
A nem aerob, fermentatív mikroorganizmusok esetében a terminális oxidációnak a redukált koenzimeket visszaoxidáló szerepe nem funkcionálhat, ezért erre egyéb anyagcsereutakat használnak az ilyen mikroorganizmusok. Ezekre láthatunk példákat a következő ábrákon.

A mikrobák egy fontos csoportja, a tejsavbaktériumok, anaerob módon a glikolízist kizárólagosan használják energiatermelő anyagcsere-folyamatként, kiegészítve azt egy (homolaktikus tejsav-fermentáció) vagy néhány olyan reakcióval (heterolaktikus fermentáció), amelyek a NAD visszaoxidálásának funkcióját töltik be (4.17. ábra). E mikrobákon kívül is vannak olyan mikroorganizmusok, amelyek hasonlóan anaerob anyagcsere-t folytatva a cukrot kisebb móltömegű termékeké alakítják az energiatermelésük és NAD-oxidációjuk során. Ezeket a lehetőségeket összefoglalóan mutatja a 4.18. ábra. Ezen anyagcsere-termék-képzési sokféleség nemcsak abból a szempontból fontos,

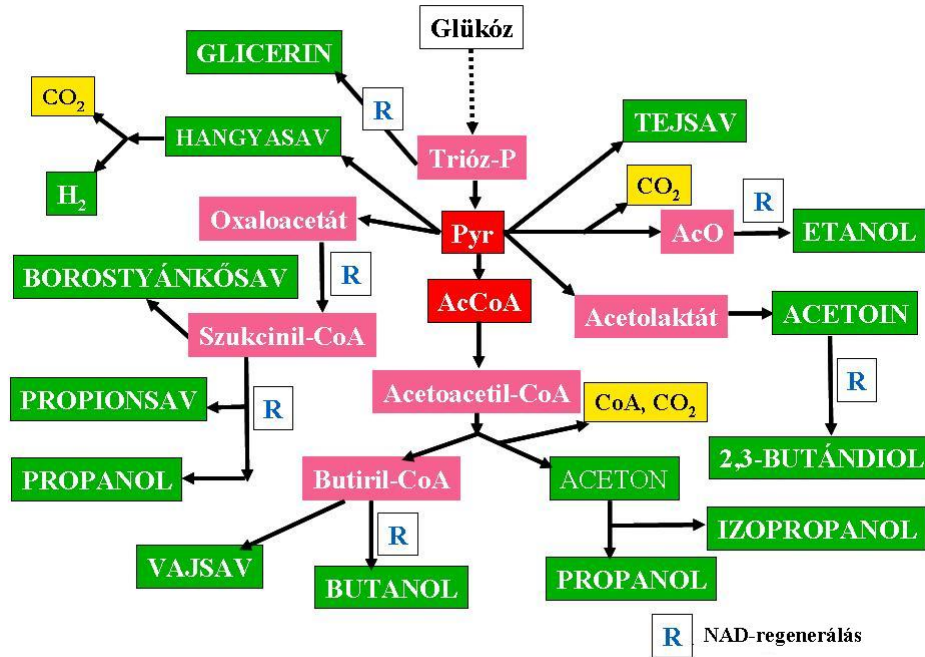
hogyan képesek anaerob körülmények között is energiát termelni, hanem ez az alapja a fehér biotechnológia egy sor eljárásának is (tejsav, anaerob ecetsav előállítás, etanol fermentáció, aceton-butanol fermentáció stb.).



4.16. ábra: Terminális oxidáció



4.17. ábra: Homolaktikus és heterolaktikus fermentáció



4.18. ábra: Anaerob (fermentatív) NAD regenerálás és anyagcseretermékei

A mikroorganizmusok szénforrás-hasznosításának mértéke a fentiekben definiált és Monod, illetve Herbert által bevezetett hozam, $Y_{x/s}$. Ezt régebben hozamkonstansnak nevezték és állandó értéknek tartották. Kiderült azonban, hogy értéke nem csupán az alkalmazott C-forrástól (lásd a 4.4. táblázat adatait) és az alkalmazott mikroorganizmustól függ, hanem a tenyésztési körülményeknek is függvénye. Hogy ezt mélyebben megérthessük, vizsgáljuk meg kvantitatíve a mikroba által felhasznált C-forrás „sorsát”: mire fordítódik, mire használja fel az élő sejt?

A C-forrás egy része beépül az újonnan képződött sejtekbe, az új sejtömeg szenként jelenik meg. Tudjuk továbbá, hogy nem csekély része arra fordítódik, hogy a fentiekben röviden összefoglalt anaerob vagy aerob lebontás során felszabaduló és ATP formájában raktározott energia a mikroba energiaigényes anyagcsere-folyamatai részére rendelkezésre álljon. A teljes szubsztrátfogyásnak (ΔS) beépült részét jelöljük ΔS_C , az energiatermelésre fordított részét ΔS_E mennyiségekkel. Ekkor felírható a teljes szubsztrátfogyásra, hogy

$$\Delta S = \Delta S_C + \Delta S_E. \quad (4.7)$$

Az egyenletet a Δx új sejtömeeggel elosztva az eredő hozam reciprokát nyerjük:

$$\frac{\Delta S}{\Delta x} = \frac{\Delta S_C}{\Delta x} + \frac{\Delta S_E}{\Delta x} \quad (4.8)$$

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_C} + \frac{1}{Y_E} \quad (4.9)$$

ahol Y_C a beépülésre ill. Y_E az energiatermelésre jellemző hozamkifejezések.

Kérdés, hogy ez a két részre bontás csupán formalitás-e, vagy meg is adható pontosan a beépülésre, illetve energiatermelésre fordított szubsztrát mennyisége. Maga az eredő hozam kísérletesen meghatározható: mérni kell a képződött új sejtömeget és az ehhez összesen elfogyasztott C-/energia-

forrás mennyiségét, illetve ábrázolni a mikrobanövekedést a szubsztráfogyás függvényében, és a kapott görbe irántangensei adják meg az eredő hozam értékét³⁰.

Az Y_C érték könnyen számítható az alábbi anyagmérleg-egyenlettel:

$$\alpha_2 \Delta x = \alpha_1 \Delta S_C, \quad (4.10)$$

ahol α_2 a mikroba (szárazanyag) C-tartalma, amely átlagosan 0,46–0,50 (azaz 46–50%) körüli érték, α_1 a szubsztrát C-tartalma (pl. glükóz esetén: $72/180 = 0,4$; etanol esetén: $24/46 = 0,52$).

A (4.10) egyenletből átrendezve megkapjuk a beépülésre jellemző szénhozamot:

$$\frac{\Delta x}{\Delta S_C} = Y_C = \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \quad (4.11)$$

Y_C tehát a mikroba és a szubsztrát széntartalmának ismeretében könnyen számítható, és most már (4.9)-ből Y_E -t kifejezve az energiahozam is becsülhető az eredő hozam ismeretében:

$$Y_E = \frac{Y_{x/s} \cdot \frac{\alpha_1}{\alpha_2}}{\frac{\alpha_1}{\alpha_2} - Y_{x/s}} = \frac{Y_{x/s} \cdot \alpha_1}{\alpha_1 - Y_{x/s} \cdot \alpha_2} \quad (4.12)$$

Néhány fermentáció esetén a termék mennyiségéből becsülhető Y_E értéke. E fermentációk esetén a termék olyan primer anyagcseretermék, amely egyértelműen az energiefelszabadítás során képződik. Ilyen fermentáció az alkoholos erjedés glükózon élesztővel, hiszen itt a mikroba csak az etanol képződéséért felelős glikolízis során felszabaduló energiát hasznosítja, az etanorból *Acetobacter aceti* segítségével aerob körülmények között történő ecetsav-fermentáció (hagyományos ecet-technológia): itt először az etanol dehidrogéneződik, majd a $NADH + H^+$ oxidálódik, és energia termelődik a terminális oxidáció során. Ilyen a glükonsav-fermentáció is glükóz alapon pl. *Acetobacter suboxydans* törzsszel, ahol az előbbihez hasonló dehidrogenezés történik (ezekkel és más hasonló folyamatokkal foglalkozunk a 3. fejezetben). Látjuk tehát, hogy olyan fermentációk esetén lehet az energiatermelésre következtetni a termék- képződésből, ahol a termék az energiatermelés céljából képződik, és a szénnek csak egy kicsiny (ha egyáltalán mérhető) része fordítódik beépülésre.

Az asszimilált (beépült) és disszimilált (energiatermelésre fordított) szubsztrát megoszlását különböző esetekben szemlélteti a 4.9. táblázat. Az adatok igen érdekesek és tipikusak, a levonható általános következtetések pedig – amelyeket természetesen sokkal több adattal is igazolni lehetne – az alábbiak:

- az aerob energiefelszabadítás határfoka jobb az anaerobnál, több szubsztrát „marad” új sejttömeg felépítésére,
- komplett táptalajon a szénforrás (szénhidrát) legnagyobb része csak energiatermelésre fordítódik, a beépült szén főtömege a természetes táptalaj komponenseiből származik,
- szintetikus tápoldaton a beépülés és az energiatermelés részesedése sokszor összemérhető nagyságú.

³⁰ Ez a görbe az exponenciális növekedés szakaszában egyenes, emiatt gondolták konstansnak a hozam értékét, de a növekedési görbe inflexió pontja után, a hanyatló fázisban ellaposodik, ami mutatja a z eredő hozam változó mibenlétét.

4.9. táblázat: Néhány mikroba glükózfelhasználásának megoszlása beépülésre és energiatermelésre

TÖRZS	Táplódat	Asszimilált szubsztrát hányada %	Disszimilált szubsztrát hányada %
<i>Streptococcus faecalis</i> Anaerob tenyészet	komplett ³¹	2	98
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Anaerob tenyészet Aerob tenyészet	komplett	2 10	98 90
<i>Aerobacter cloaceae</i>	minimál ³²	55	45

Az energiatermelésre fordított szubsztráthányad, ΔS_E is felbontható két részre, ha a termelt energia felhasználását tekintjük.

Az ATP-ben raktározott energia egy része a növekedéssel szorosan összefüggő biokémiai folyamatok energiaigényének fedezésére szolgál, mivel az új sejttömeg új sejtanyagainak (aminosavak, nukleotidok, makromolekulák: fehérjék, zsírok, nukleinsavak) szintézise energiát emésztő folyamatok.

Másrészt a mikrobák anyagcsere-tevékenysége során egy sor olyan energiaigényes folyamat is lejátszódik, amelyek látszólag vagy valóságosan sincsenek közvetlen kapcsolatban a növekedéssel, az energiafelhasználással nem jár együtt „új” anyagok szintézise. Ilyen folyamatok pl. a sejtmozgás, ozmotikus munkavégzés, aktív transzportfolyamatok stb. Ugyancsak a nem építő jellegű energiafelhasználás körébe sorolhatók azok a folyamatok, amelyek során az állandóan lebomló makromolekulák újraszintézise történik meg. Termodinamikai értelemben ezt úgy is megfogalmazhatjuk, hogy a sejteknek akkor is munkát kell végezniük (energiát kell felhasználniuk), ha látszólag nyugalmi állapotban vannak, nem növekednek, azért, hogy alacsony entrópiaszinttel jellemezhető igen összetett, rendezett állapotukat, életképességüket fenntarthassák. Utóbbi energiafelhasználásukat fenntartási (maintenance) energiának nevezzük³³ összefoglalóan, s beleértjük az összes olyan energiaigényt, ami nem hozható közvetlen összefüggésbe a növekedéssel.

A fentiek alapján az energiahozam a következőképpen bontható a növekedéssel kapcsolatos és a fenntartási energiahányadokra:

$$Y_E = \frac{\Delta x}{\Delta S_E} = \frac{\Delta x}{\Delta S_g + \Delta S_m}, \quad (4.13)$$

ahol ΔS_g a Δx új mikrobaméreg létrehozásához energiatermelésre fogyott szubsztrát, és ΔS_m a fenntartási (maintenance) energiatermelés céljára fordított szubsztrát mennyisége.

Ismert, hogy a szubsztrátfogyási sebesség a növekedési sebességgel az alábbi módon fejezhető ki a hozam definíciója értelmében:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dx}{dt} = -\frac{\mu x}{Y}. \quad (4.14)$$

Ezt a mindig alkalmazható általános összefüggést az energiatermelésre fordított szubsztrátfogyási sebességére felírva (nem tekintve a negatív előjelet):

³¹ Komplett táplódat: természetes összetevőket is tartalmazó felszintetikus vagy tisztán természetes alapú táplódat.

³² Minimál táplódat: a C-forráson kívül csak anorganikus összetevőket tartalmazó szintetikus táplódat.

³³ Maintenance of viability, maintenance of life: az életképesség fenntartása. [Pirt SJ](#) eredeti definíciója szerint: "the energy consumed for functions other than the production of new cell material" [Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.](#) 1965 Oct 12;163(991):224-31. The maintenance energy of bacteria in growing cultures.

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_E = \frac{\mu x}{Y_E} = \frac{dS_g}{dt} + \frac{dS_m}{dt} \quad (4.15)$$

Az utóbbi egyenlet első tagjára ismét alkalmazzuk a 4.14. összefüggést, és ekkor:

$$\frac{dS_g}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{EG}}, \quad (4.16)$$

ahol Y_{EG} az ún. „maximális növekedési energiahozam”, amely akkor jellemezné a folyamatokat, ha nem lenne fenntartási energiahányad ($\Delta S_m = 0$ esetben)³⁴.

A dS_m/dt -ről logikusan feltehető, hogy arányos a sejttömeg mennyiségével (kétszer annyi sejttömeg kétszer annyit mozog, kétszer annyira rendezett, tehát kétszer annyi energiát használ a rendezettség fenntartására stb.) tehát:

$$\frac{dS_m}{dt} = mx, \quad (4.17)$$

ahol m az ún. fajlagos fenntartási (maintenance) koefficiens, egysége [g szubsztrát/g sejttömeg·óra= h^{-1}].

A (4.16) és (4.17) kifejezéseket (4.15)-be helyettesítve a következő összefüggést nyerjük:

$$\frac{\mu x}{Y_E} = \frac{\mu x}{Y_{EG}} + mx \quad (4.18)$$

vagy

$$\frac{1}{Y_E} = \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{m}{\mu}. \quad (4.19)$$

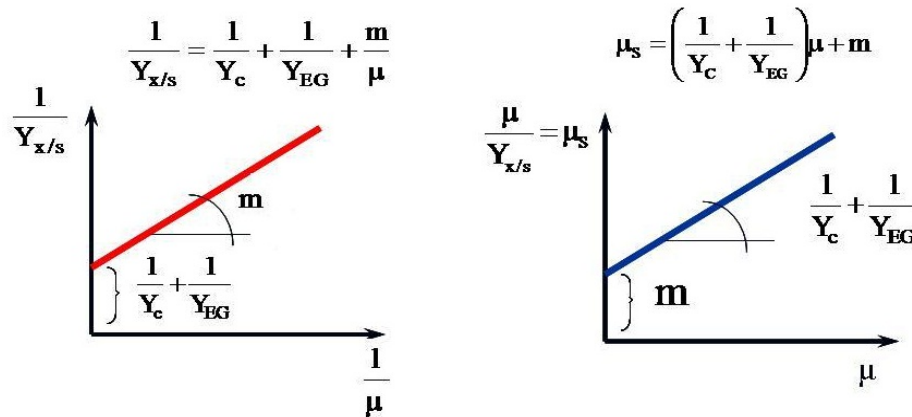
Ha most a C-beépülést is figyelembe vesszük, akkor végeredményben egy szintetikus tápoldaton növekedő mikroorganizmus teljes szubsztrátfelhasználását, illetve eredőhozam-kifejezését az alábbiak szerint adhatjuk meg:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_c} + \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{m}{\mu} \quad (4.20)$$

E hozamkifejezésből láthatóan az állandónak tartott $Y_{x/s}$ hozam valójában nem állandó, hiszen legalábbis függ a növekedés fajlagos sebességétől.

Újra felmerül a kérdés, hogy ez a felbontás formális-e csupán, vagy az egyes tagok meghatározhatóak. Erre választ ad a 4.19. ábra, amelyen az eredő hozam reciprokát ábrázoltuk a fajlagos növekedési sebesség reciprokának függvényében, illetve amelyen egy szintén gyakori alternatív ábrázolási lehetőséget láthatunk. Ha tehát mérni tudjuk az eredő hozamot, valamint a hozzá tartozó fajlagos növekedési sebességet, akkor a C-forrás és a mikroba C-tartalmának ismeretében a 4.20 egyenlet ábrázolása megteremti a lehetőségét a felbontás tényleges elvégzésének.

³⁴ Ez tehát egy elvi (el nem érhető) maximum, hiszen fenntartási energiaigény mindig van, ha esetleg elhanyagolhatóan csekély mértékben is.



4.19. ábra: A maintenance koefficiens grafikus meghatározása

A fenntartási energiaszükséglet és az m koefficiens nagyságára vonatkozóan tájékoztatást nyújt a 4.10. táblázat. Vegyük észre például, hogy pékésztő esetén a tápoldat NaCl-tartalmának 10-szeres növekedése (amely ugyancsak tízszeres ozmózisnyomás-növekedéssel egyenértékű) az m értékét is 10-szeresére növeli.

Természetesen akkor is szükséges a sejteknek fenntartási célokra energiát felhasználniuk, ha olyan közegben vannak, amelyben nincs külső C-/energiaforrás. Ekkor a saját belső tartalék energiaforrásaikat, illetve saját sejtanyaguk lebontásából származó energiát kell felhasználniuk fenntartási célokra. Ezt **endogén metabolizmus**nak hívjuk, és ennek sebességét is a mikrobátömegeggyel arányosnak tételezhetjük fel, azaz $(dS/dt)_{\text{endmet}} = k_e \cdot x$, amelyben k_e a fajlagos endogén metabolizmus koefficiens.

A saját belső energia felhasználása természetesen sejtömegecsökkenéssel jár. E jelenségnek a fermentációs folyamatok esetében kisebb jelentősége van, hiszen rendszerint van külső szubsztrát a tápoldatban. Nagyobb jelentősége van – ezért figyelembevételével mindig találkozhatunk a kapcsolódó kinetikai modellekben – a biológiai szennyvíztisztításban.

4.10. táblázat: Néhány mikroba m és m_{ATP} értékei

	Tenyésztési körülmények	fajlagos maintenance * m	koefficiens ** m_{ATP}
<i>Aerobacter cloaceae</i>	aerob, glükóz	0,094	14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	anaerob, glükóz + 0,1 mol/dm ³ NaCl	0,036	0,52
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	anaerob, glükóz + 1,0 mol/dm ³ NaCl	0,360	2,2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	aerob, glükóz	0,022	3,2
<i>Lactobacillus casei</i>	aerob, glükóz	0,135	1,5

* g energiaforrás/g sejtiszárazanyag

**mmol ATP/g sejtiszárazanyag-h

A szénforrásból történő energiatermelésre, ill. a termelt energia hasznosulására nyújt felvilágosítást egy másik hozamkifejezés, az ATP-hozam, amely megadja, hogy egy mol ATP felhasználásakor hány g új mikrobátömeg képződik. Az ATP-hozam definíciószerűen:

$$Y_{\text{ATP}} = \frac{\Delta x}{\Delta \text{ATP}} = \frac{Y'_{x/s}}{Y_{\text{ATP}/s}}, \quad (4.21)$$

ahol: $Y'_{x/s} = MY_{x/s}$ (szubsztrát móltömeg) · (eredő hozam) $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot \left[\frac{\text{g}}{\text{g}} \right] = \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$

$Y_{\text{ATP}/s}$ = egy mol energiaforrásból nyerhető ATP- molok száma

Az $Y_{\text{ATP/S}}$ értéke az energiatermelő anyagcsereút ismeretében kiszámítható, például tudjuk, hogy 1 mol glükózból anaerob körülmények között 2 mol ATP képződhet, tehát $Y_{\text{ATP/S}}=2$.

Sok kísérleti tapasztalat arra utalt, hogy függetlenül a mikrobától és a tenyésztési körülményektől, 1 mol ATP felhasználásakor átlagosan 10,5 g szárazanyagnyi új mikrobamassza képződik.

Az ATP-felhasználás ugyanúgy növekedéshez és fenntartáshoz felhasznált részre bontandó, mint a szén-/energiaforrás esetében tettük, vagyis:

$$\Delta\text{ATP} = (\Delta\text{ATP})_g + (\Delta\text{ATP})_m \quad (4.22)$$

$$\frac{1}{Y_{\text{ATP}}} = \frac{1}{Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}} + \frac{m_{\text{ATP}}}{\mu} \quad (4.22a)$$

A fenti egyenletekben alkalmazott jelölések sorrendben a következők:

$Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}$: hipotetikus maximális ATP-hozam, amely akkor lenne jellemző a folyamatra, ha az ATP csak növekedésre fordítódnék, azaz $m_{\text{ATP}}=0$ esetén.

m_{ATP} : fajlagos ATP maintenance koefficiens (értékére példákat szolgáltat a 4.10. táblázat)

A (4.22a) egyenlet alapján belátható, hogy az Y_{ATP} érték sem konstans, a 10,5 g/mol érték csak tájékoztató jellegű, valójában a mikroba által folytatott anyagcsere, az energiefelszabadításban hasznosított anyagcsereutak és a tenyésztési körülmények függvénye. Sokak véleménye szerint értéke 8,3–12,6 között változik, de találkozhatunk 5–32-ig megadott tartománnyal is a szakirodalomban. Anaerob energiefelszabadítás esetén a 10,5-ös érték megfelelő becslésnek látszik, aerob esetben nagy eltérések lehetnek.

Az eddigiekben látott hozamkifejezések mellett egy sor további hozammal is megismerkedünk a továbbiakban, e helyütt négy olyan hozamfogalom tisztázása várat még magára, amelyek a fermentációs folyamatok, illetve a mikroba-metabolizmus energetikai viszonyaival, és így szorosan a C-forrás hasznosulásával kapcsolatosak.

Régebben Y_{kcal} (ejtsd: ypszilon kilokalória), ma Y_{H} jelöléssel illetik a 4.23 egyenlettel definiált mennyiséget, amit nevezhetünk *hőhozamnak*, amely az egységnyi disszipálódott energiára (pontosabban szabadentalpia) vonatkoztatott mikrobamassza-növekedést jelenti:

$$Y_{\text{H}} = \frac{\Delta x}{-\Delta H_{\text{X}} \cdot \Delta x + \Delta H_{\text{S}} \Delta S} = \frac{\Delta x}{\Delta Q} \quad (4.23)$$

Ebben az egyenletben ΔH_{X} és ΔH_{S} sorrendben a mikrobamassza, illetve a C-forrás fajlagos entalpiája (égéshője) [KJ/g], ΔQ pedig a sejtnövekedés során felszabaduló metabolikus hő. A 4.23 egyenletet ΔS értékkel végigszotva egy olyan összefüggést kapunk, amely az eredő hozam és az előbb definiált hőhozam összefüggését mutatja meg.

$$Y_{\text{H}} = Y_{\text{kcal}} \frac{\frac{\Delta X}{\Delta S}}{-\frac{\Delta X}{\Delta S} \Delta H_{\text{X}} + \Delta H_{\text{S}} \frac{\Delta S}{\Delta S}} = \frac{Y_{\text{X/S}}}{\Delta H_{\text{S}} - Y_{\text{X/S}} \Delta H_{\text{X}}} \quad (4.24)$$

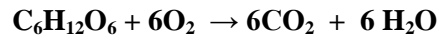
E két egyenlet (4.23 és 4.24) csak akkor ilyen alakú, ha a tenyésztés során a sejtnövekedés mellett a termékképződés elhanyagolható. Ha nem, akkor a nevezőben negatív előjellel a termék entalpiáját is figyelembe kell venni.

Aerob mikrobák anyagcsere-tevékenységének, C-hasznosulásának és ezáltal a fermentációk egyik legjellemzőbb paraméterének a *respirációs hányadost* tekinthetjük. Ez definíció szerint a légzés során képződött szén-dioxidnak és felhasznált oxigénnek a hányadosa, amit lehet differenciálisan és integrálisan is értelmezni (hasonlóan az eredő hozamhoz):

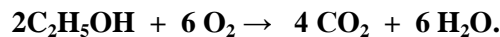
$$RQ = \frac{\Delta CO_2}{\Delta O_2} \quad \text{vagy} \quad RQ = \frac{dCO_2}{dO_2} = \frac{\frac{dCO_2}{dt}}{\frac{dO_2}{dt}} = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}} \quad (4.25)$$

E definíciók kizárólag moláris koncentrációk esetén értelmezhetőek, illetve mivel gázokról van szó, így esetenként térfogatok is szerepelhetnek.

A respirációs hányados értelmezéséhez tekintsünk egy olyan aerob fermentációt, amelynek C-/energia- forrása glükóz. Mekkora lehet a respirációs hányados? A választ megkapjuk, ha felírjuk a glükóz oxigénben történő elégetésének sztöchiometriai egyenletét:



Ennek megfelelően e folyamat RQ értéke 1. Ez a maximális érték, ami elképzelhető, hiszen megfelel annak a metabolizmusnak, amikor csak energia képződik a glükózból és semmi sejtnövekedés, beépülés nem történik. Ha azonban van sejtnövekedés, értelemszerűen a számláló széndioxidjában hiány jelentkezik, tehát $RQ < 1$ lesz. Minél nagyobb a beépülés, a respirációs hányados annál kisebb lesz egyhez képest. Ugyanígy, ha például etanol a C-/energiaforrás akkor az alábbi égetésnek megfelelően



Az $RQ = 2/3 = 0,67$. Minden olyan esetben, ha van etanolfelhasználás során sejtnövekedés is, akkor RQ kisebb lesz ennél a maximális értéknél, és minél kisebb, az annál jelentősebb sejtnövekedést (hozamjavulást) jelez.

Láthatjuk a szabályt: a maximális RQ úgy kapható meg, ha az égetés sztöchiometriai egyenletéből számoljuk ki, a valóságos fermentációk során pedig minél kisebb a tényleges RQ e maximumhoz képest, annál hatékonyabb a mikroba energiatermelése, annál nagyobb hányadát tudja a C-/energiaforrásnak új sejt tömeg termelésére fordítani.

Más a helyzet a *Saccharomyces cerevisiae* (és egyéb fermentatív mikrobák) esetében. Ekkor az erjedés sztöchiometriai egyenlete



Azaz nincsen oxigénfelhasználás, tehát az RQ nem definiálható, illetve a formális matematika szerint végtelenül nagy. A *Saccharomyces cerevisiae* (pékélesztő) ipari tenyésztésekor az aerob és az anaerob anyagcsere azonban egyidejűleg is történhet, illetve az aerob anyagcsere rossz fermentációvezetés esetén részben anaerobbá válhat (lásd a 4.4.4.5. alfejezetet). Gyakorlatilag tehát az is lehetséges, hogy az RQ 1 fölé megy. Minél nagyobb lesz 1-hez képest, annál nagyobb az anaerob cukorfelhasználás, ami rontja az ipari pékélesztő-termelés határfokát. Az RQ ebben az esetben is tehát egy informatív, értékes anyagcsere-jellemző.

Szintén az energiatermelés határfokára jellemző fogalom a *P/O hányados* (ejtsd, ahogy írva van: pé per o hányados). Ez azt adja meg, hogy az aerob anyagcsere során egy g-atomnyi (azaz egy fél mol, azaz 16 g-nyi) oxigén ellélegzése hány mol ATP-képződést eredményez. Ez eredetileg az oxidatív foszforilezésre vonatkozott, azaz elméleti értéke 2 és 3 között mozog (4.16. ábra). Mivel egy tényleges aerob fermentáció során a terminális oxidáció mellett szubsztrátszintű foszforilezés is eredményez ATP-t, ezért ennél nagyobb értékek is lehetségesek, ugyanakkor sok kísérleti tapasztalat a 2 körüli értékeket valószínűsíti.

A C-/energiaforrásból keletkezett ATP szintje egy adott sejt esetében azok energiával való ellátottságát jelenti. Ennek mérésére definiálták az energiatöltés fogalmát³⁵

³⁵ Energy charge az angolnyelvű szakirodalomban.

$$\text{Energiatöltés} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \quad (4.26)$$

Az energiatöltés tehát megadja, hogy a sejtek számára hozzáférhető ATP milyen hányada a teljes adenilát-tartalomnak. A számlálóban az ADP fele azért szerepel, mert az adenilát-kináz enzim a

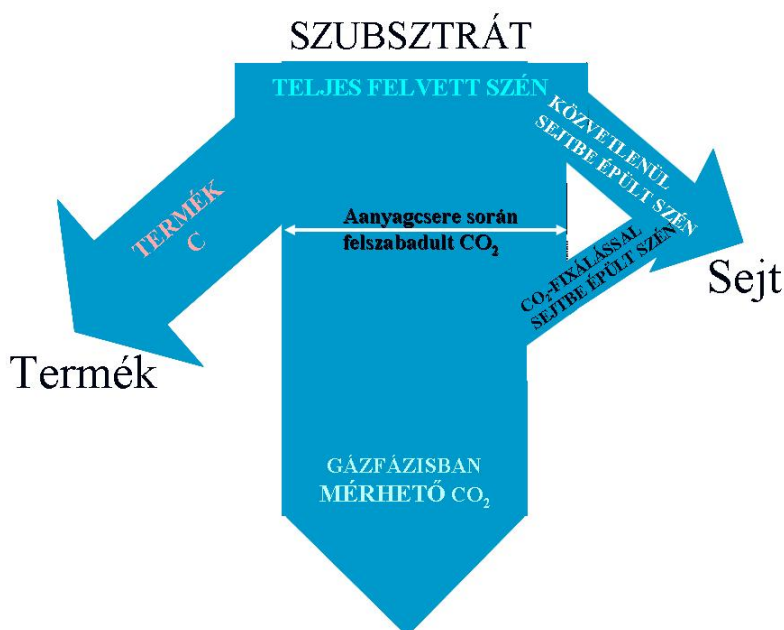


reakció értelmében át tudja alakítani ATP-vé. Az ATP-felhasználó anyagcsere maximális és az ATP-termelő anyagcsere minimális, ha az energiatöltés 1. Ha pedig 0, akkor logikusan éppen fordítva van. A két folytonosan változó görbe a 0,75-ös értéknél metszi egymást, azaz ilyen energiatöltésnél az ATP-termelő és -fogyasztó folyamatok éppen egyensúlyban vannak. Egy egészséges sejt ugyanakkor jellemzően 0,8–0,95 közötti energiatöltéssel rendelkezik.

Végezetül tekintsük át a 4.20. ábra segítségével a teljes C-forgalmat, amely figyelembe veszi a beépülést, az energiatermelést és a haszontermék termelését is. Ha ui. nem csupán sejtermelés folyik, hanem valamilyen extracelluláris anyagcsere termék is képződik, akkor ennek a szene is a C-/energiaforrásból származik. Ezt a helyzetet egy teljes deriválttal írhatjuk le:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\partial S}{\partial x} \frac{dx}{dt} + \sum_i \frac{\partial S}{\partial P_i} \frac{dP_i}{dt} \quad (4.27)$$

Ebben az első tag parciális derivált első tényezője nem más, mint $1/Y_{X/S}$, és hasonlóan a szummázott tagokban szereplő parciális deriváltak is egy-egy reciprok termékhozamot jelentenek.



4.20. ábra: C-forgalom a fermentáció során

4.3. A mikrobiális sztöhiometria alapjai

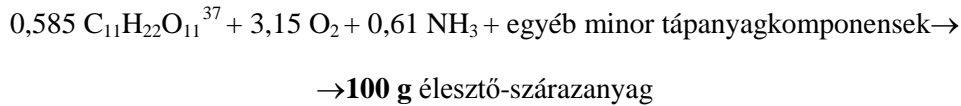
Az előző 4.2. fejezet kvantitatív leírásából is kitűnik, hogy milyen nagy jelentőséget kell tulajdonítanunk azoknak a hozamoknak, amelyek a C-/energiaforrás hasznosulását jelentik. E mennyiségi szemlélet következménye az az igény, hogy megkíséreljük a különböző hozamokat becsülni, jósolni, elméleti hozamokat számítani. Ezek haszna egyértelmű, hiszen elősegíthetik a fermentációs tápoldat gazdaságos megtervezését, valamint a szubsztráthasznosulás mérésével a fermentációs folyamat gazdaságosságának is elemei. A hozamokat természetesen nem csupán a C-, illetve energiaforrásra,

hanem valamennyi tápanyagkomponensre definiáljuk, sőt hozamjellegű kifejezések adhatók meg a termékre, a termelt szén-dioxidra, a metabolikus hőre, az energiatermelésre stb. is.

A következőkben Erickson, Eroshin és Minkevics alapvető munkája³⁶ nyomán olyan sztöchiometriai leírását adjuk a mikrobarendszernek, amely éppen e hozamkifejezések elméleti becsléséhez nyújt viszonylag egyszerű munkamódszert.

A sztöchiometriai leírást az anyagmérlegek elkészítésének igénye teremtette meg. Kezdetben főképp pékélesztő, ill. takarmányélesztő fermentációk, tehát nagy S-igényű sejtömegtermelések esetében próbálkoztak a sztöchiometriai leírásokkal.

Harrison pékélesztő fermentációkat vizsgálva azt tapasztalta, hogy azok a következő fél sztöchiometriai egyenlettel írhatók le:



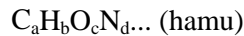
A termelt élesztő átlagos elemi összetétele pedig az alábbiak bizonyult:

100 g élesztő tartalmazott:	44,70 g	C-t
	6,16 g	H-t
	31,20 g	O-t
	8,54 g	N-t
	0,54 g	S-t
	1,09 g	P-t

Az elemösszetétel összege természetesen kevesebb 100-nál, hiszen a sejtek egyéb elemeket is tartalmaznak, amelyek a fenti adatok elégetéses módszerrel történő meghatározása során a hamuban maradnak vissza (illetve jó közelítéssel feltehető, hogy zömük a hamuban marad vissza).

Teljes sztöchiometriai egyenlethez úgy jutunk, ha a jobb oldali „termékeket” is képletek formájában tudjuk felírni.

Hogyan definiálható egy molnyi mikrobatömeg? Legegyszerűbb, ha az elemi összetétel adatait végigosztjuk az egyes elemek atomtömegével, így módon a következő mikrobaképletet nyerve:

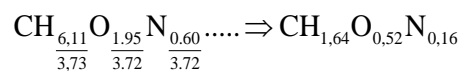


ahol $a=\text{C}\%/12$, $b=\text{H}\%/1$, $c=\text{O}\%/16$, $d=\text{N}\%/14$ stb.

Harrison élesztőjének képlete ennek alapján:



Már most szögezzük le, hogy az ilyen mikrobaképletek (ahogy az elemi összetétel maga is!) a tenyésztési körülményeknek is függvényei, tehát nem csupán a mikroorganizmus fajtájától függenek. A leírás megkönnyítésére bevezették az ún. **C-mol képletet** (Herbert), amelynél a fenti képletben C együtthatója mindig 1, azaz a képletet a C-tartalomra vonatkoztatjuk:



Ily módon definiálható a mikroba móltömege is:

1 C-molnyi az a mikrobatömeg, amely 1 g-atomnyi (=12,01 g) szenet tartalmaz.

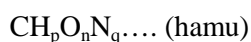
³⁶ Erickson LE, Minkevich IG, Eroshin VK (1978): Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 20, 1595–1621

³⁷ A fermentációk ipari, melaszon vezetett pékélesztő-fermentációk voltak, azaz a C-/energiaforrás szacharóz.

E C-mol definíció, vagyis az egységnyi C-tartalomra történő vonatkoztatás előnyös, mivel

- a mikrobák C-tartalma a legnagyobb ($\cong 50\%$) és a leginkább független a tenyésztési körülményektől, emiatt
- b, c, d változásai csak kismértékben változtatják meg a C-mol képletet, és
- végül logikus is e vonatkoztatás, mivel a C-mérleg a legfontosabb, gazdasági szempontból is ez a legizgalmasabb.

Egy C-molnyi mikrobatömeg „képletét” tehát általános alakban így írhatjuk



A gyakorlatban legtöbbször csak e négy legnagyobb mennyiségben előforduló (biogén) elemet tartalmazó formulát adjuk meg, esetleg még a kéntartalom is bekerül a formulába. Emiatt és a hamutartalom miatt az így nyert képletből számított képlettömeg nem felel meg a C-móltömegnek, kisebb annál.

A valódi C-móltömeg a következőképp számítható:

$$\text{C - móltömeg} = \frac{12 + p + 16n + 14q}{1 - R} \quad (4.28)$$

ahol R a hamutartalom.

A mikroba-szárazanyag R · 100%-nyi hamut tartalmaz. A mikrobában előforduló valamennyi – a C, H, O, N elemeken kívüli – egyéb elemet úgy tekintjük, hogy a hamu része.

Az elemi összetétel természetesen mikrobafüggő, *E. coli* estén a $\text{CH}_{1,77}\text{O}_{0,49}\text{N}_{0,24}$ képletet, *Candida utilis* esetén a $\text{CH}_{1,83}\text{O}_{0,54}\text{N}_{0,10}$ formulát javasoljuk alkalmazni. Ma több tankönyv egy mikrobafüggetlen átlagos biomassza-összetétellel számol: $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$. Ezek mérnöki becslésekben való alkalmazásakor azért nem követünk el nagy hibát, mert a C-mol formulában a szén a meghatározó. Szintén mérnöki becslésekben az átlagosnak mondható 5% hamuval számolhatunk. Az átlagképlettel és -hamutartalommal számolva az átlag mikrobamóltömeg: 24,72 g.

4.3.1. Általános sztöhiometriai leírás, anyag- és hőmérleg

Az eddigiek alapján, ha mind a szubsztrátok, mind a termékek jól definiált összetételű vegyületek, és ismerjük a fermentáció során keletkező valamennyi terméket, fel tudjuk írni a fermentációt jellemző sztöhiometriai egyenletet.

A legegyszerűbb esetet feltételezve tekintsünk egy aerob fermentációt általánosan, amelynek C-energiaforrása egy CH_mO_l (ugyancsak C-mol alakban felírt) összetételű vegyület. A nitrogénforrást NH_3 alakban írjuk fel, a sejttömeg képlete $\text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_q$, és egy extracelluláris $\text{CH}_r\text{O}_s\text{N}_t$ C-mol képletű termék is keletkezik. Mivel a fermentáció aerob, a szubsztrátok oldalán a molekuláris oxigén, a termékek oldalán a CO_2 és H_2O is szerepelni fog³⁸:



Az általános sztöhiometriai egyenlet együtthatóinak meghatározása (azaz a sztöhiometriai modellünk identifikálása) és az egyes együtthatók közötti összefüggések feltárása a következőképpen történik.

Az egyenlet 14 paraméteréből 8 (m, l, p, n, q, r, s, t) ismert, hiszen ismerjük a szubsztrát, a sejttömeg és a termék összetételét. Ezek közül a mikrobáét természetesen kísérletesen kell

³⁸ Újabb tankönyvek ezt a mérlegegyenletet az általánosíthatóság és a lineáris, illetve mátrixalgebrai kezelhetőség kedvéért a következő formában írják fel: $y_c \text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_q + z \text{CH}_r\text{O}_s\text{N}_t + d \text{CO}_2 + c \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_m\text{O}_l - a \text{NH}_3 - b \text{O}_2 = 0$.

Azaz pozitív előjellel a termékek, negatívvál a szubsztrátok szerepelnek a mérlegben. Ez természetesen ekvivalens az általunk csupán a könnyebb értelmezhetőség miatt alkalmazott felírással.

megállapítani vagy szakirodalmi adatokra támaszkodni. Négy anyagmérleg-egyenlet írható fel a képlet biogén elemeire, marad tehát összesen 2 kísérletesen meghatározandó paraméter. Így pl. a b (oxigénigény) és d (CO₂-termelés) vagy y_C (eredő C-mol sejthozam) és a z (termékhozam) értékeit szükséges méréssel meghatározni, és akkor a sztöchiometriai egyenlet valamennyi paramétere azonosítható.

$$\text{C-mérleg:} \quad 1 = y_c + z + d \quad (4.29)$$

$$\text{H-mérleg:} \quad m + 3a = y_c p + z r + 2c \quad (4.30)$$

$$\text{O-mérleg:} \quad 1 + 2b = y_c n + z s + 2d + c \quad (4.31)$$

$$\text{N-mérleg:} \quad a = y_c q + z t \quad (4.32)$$

A (4.29) egyenletből is kitűnik a C-mol képletek használatának egyik előnye, azaz, hogy a szubsztrát C sorsát jól mutatja be, és mintegy %-ban is kifejezi az egyes termékek hozamait. A (4.29) tehát egy hatásfok egyenlet, megmutatja a szubsztrát szénének megoszlását a keletkező új sejttömegben, az extracelluláris termékben és a keletkező szén-dioxidban.

A négy anyagmérleg-egyenlet még egy egyenlettel kiegészíthető, ha felhasználjuk az egyes komponensek elektron-egyenértékét³⁹ és ezekre vonatkozóan írunk fel mérlegegyenletet. Ezzel, mint látni fogjuk, a fermentáció energetikai (hő-) viszonyai is jól tanulmányozhatók.

Legyen az előforduló elemek elektron-egyenértéke a C, O, H és N-re sorrendben +4, -2, +1 és -3 (ez egy túlegyszerűsítés, hiszen tudjuk, hogy különösen a N többféle elektron-egyenértékkel vehet részt vegyületeiben, de gyakorlati szempontból elfogadható).

A C-energiaforrás elektron-egyenértéke ezek szerint

$$\gamma_s = 4 + m - 2l \quad (4.33)$$

A sejttömeg elektron-egyenértéke hasonlóan

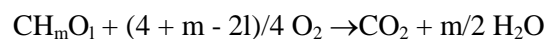
$$\gamma_x = 4 + p - 2n - 3q \quad (4.34)$$

valamint a termék elektron-egyenértéke

$$\gamma_p = 4 + r - 2s - 3t \quad (4.35)$$

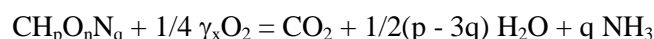
Az ammónia formájában felírt N-forrás (NH₃) és a termék szén-dioxid (CO₂), valamint víz (H₂O) elektron-egyenértéke zérus, míg az oxigénéé -4.

Próbáljuk meg értelmezni, hogy mit jelentenek az elektron-egyenértékek! Ehhez írjuk fel a szubsztrát oxigénben történő elégetésére érvényes sztöchiometriai egyenletet:



Ebben az egyenletben az elégetéshez szükséges oxigén sztöchiometriai együtthatója $\gamma_s/4$, vagyis γ_s fizikai értelme nem más, mint egy C-molnyi szénforrás elégetéséhez szükséges oxigénmólok négyszerese, más szóval azon elektronok számát jelenti, amelyeket a szubsztrát elégetésékor az oxigén felvesz.

Hasonlóan, ha a mikrobasesejttömeg égetésének reakcióegyenletét írjuk fel, akkor a



egyenletet nyerjük, amelyből látszik, hogy γ_x jelenti azon elektronok számát, amelyek 1 C-molnyi sejttömeg oxigénben történő elégetésekor az oxigénre átadódnak. Végül ugyanígy értelmezhető γ_p is.

Az elektron-egyenérték γ_x értéke igen jó közelítéssel *gyakorlatilag* állandó, mikrobától és tenyésztési körülményektől függetlenül 4,2. Tudni kell azonban, hogy valójában ez függ az előbbi

³⁹ Ez a fogalom azonos az oxidációs/redukciós fokkal vagy számmal, a fermentációs szakirodalom "felhasználható elektronekvivalens"-ként emlegeti: available electron equivalents.

tényezőktől, hiszen a mikroba-összetétel a tenyésztési körülmények függvénye. A 4,2-es érték jó közelítésként használható azokban az esetekben, ha nem ismerjük a mikroba tényleges összetételét.

A 4.11. táblázatban Minkevich és Eroshin (akik úttörő munkát fejtettek ki a mikrobiális sztöchiometria és energetika összefüggéseinek feltárásában), által egy sor mikrobára nyert értékeket találunk. Láthatóan a 4,2-es érték elég jó közelítéssel általánosnak fogadható el. Ugyanakkor az is látható, hogy azonos kísérleti körülmények között meghatározott összetételi értékek, következésképpen γ_x is kísérleti hibával terheltek, s noha a szórásértékek nem túl magasak, a 4,2-es érték csak egy mérnöki becslésként fogadható el, ha nem ismerjük az adott mikroba adott körülmények között meghatározott valódi összetételi adatait.

Az elektron-egyenértéket felhasználó módszerrel tehát az általános sztöchiometriai egyenletből egy további összefüggés írható fel, az elektronmérleg-egyenlet:

$$\gamma_s + b(-4) = y_c \gamma_x + z\gamma_p \quad (4.36)$$

Osszuk el ezt az egyenletet γ_s -sel, rendezzük át, és ekkor egy újabb hatásfokegyenlethez, egy olyan összefüggéshez jutunk, amely megmutatja, hogy a C-forrás elektronjai hogyan oszlanak meg az oxigén, az új mikrotömeg és a termék között.

$$\frac{4b}{\gamma_s} + \frac{y_c \gamma_x}{\gamma_s} + \frac{z\gamma_p}{\gamma_s} = 1 \quad (4.37)$$

$$\varepsilon + \eta + \xi = 1$$

Vagyis a szubsztrátban levő hozzáférhető elektronok $4b/\gamma_s = \varepsilon$ -od része az oxigénre, $y_c \gamma_x / \gamma_s = \eta$ -ad része az új sejttömegre és $z\gamma_p / \gamma_s = \xi$ -ed része a termék(ek)-re tevődik át a fermentáció során.

Az ε , η és ξ tehát hatásfok jellegű mennyiségek, az elektronok megoszlására utalnak.

Régen ismert tény, hogy a különböző szerves vegyületek moláris égéshője közel arányos azzal az oxigén- mennyiséggel, amely az adott vegyület elégetéséhez szükséges. Hangsúlyozzuk, hogy közelítőleg, mivel a molekulaszervezet függvényében valójában eltérések tapasztalhatók az azonos összetételű, de más szerkezetű anyagok égéshői között. Az átlagérték $Q_O = 112,6$ KJ/g-ekvivalens, ami azt jelenti, hogy 1 g-ekvivalens elektronnak oxigén által történő felvétele (az égés folyamata) során *112,6 KJ/g-ekvivalens hő szabadul fel*. E mennyiség teremti meg a kapcsolatot a sztöchiometriai leírás és elektronmérleg-egyenletek és az energetikai megközelítések között. Q_O felhasználásával ugyanis felírható az energiamérleg is:

$$Q_O \gamma_s + Q_O b(-4) = Q_O y_c \gamma_x + Q_O z\gamma_p \quad (4.38)$$

Valójában Q_O használata elhanyagolás. A hőmérleg korrekt módon felírva:

$$Q_{OS} \gamma_s + Q_O b(-4) = Q_{OX} y_c \gamma_x + Q_{OP} z\gamma_p$$

lenne, ahol Q_{OS} , Q_{OX} és Q_{OP} sorrendben a C-forrás, a sejttömeg és a termék égéshői az alábbi definíció értelmében

$$Q_{oi} = \frac{\text{szénmolnyi } i \text{ égéshő}}{\text{g-ekvivalens oxigén}} \quad (4.39)$$

A definíció értelmében pl. 1 C-mol szubsztrát égéshője $Q_{OS} \gamma_s$ és 1 mol szubsztrát égéshője K^S . $Q_{OS} \gamma_s$, ahol K^S a szubsztrát képletében a C-atomok száma.

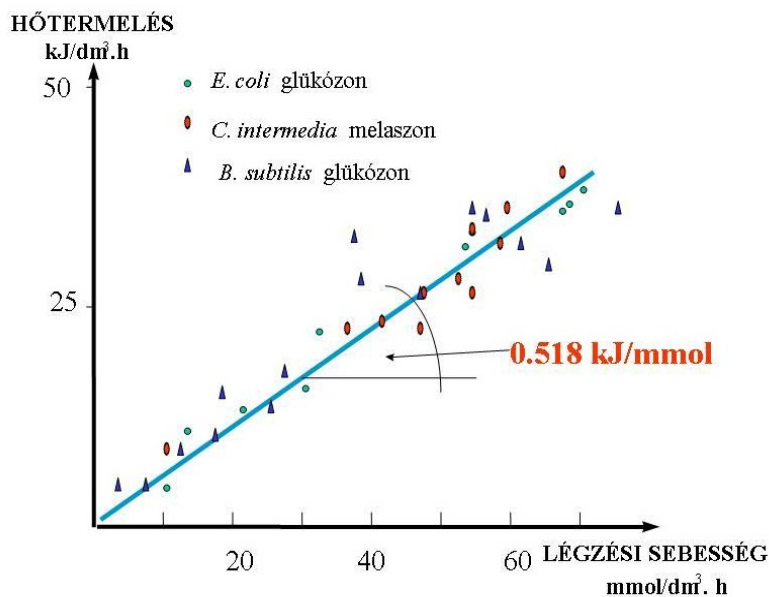
Ha megtekintjük a 4.11. és 4.12. táblázatokat, ahol néhány mikroba, illetve szubsztrát Q_{oi} értékeit is feltüntettük, láthatjuk, hogy mind a mikrobák, mind a szubsztrátok esetében $Q_O = 112,6$ KJ/g-ekvivalens jó átlagnak minősül.

Az (4.38) egyenletet $Q_O \gamma_s$ -sel végigosztva megint (4.37) az eredmény, aminek értelmében most már ε , η és ξ a hőegyenleg szempontjából is értelmezhető hatásfok jellegű mennyiségek. $Q_O \gamma_s$, azaz 1

C-mol szubsztrát égéshőjéből η -ad rész jelenik meg az új mikrotömeg $Q_{O\gamma_x y_c}$ égéshőjeként, és ξ -ed rész a termék $Q_{Oz\gamma_p}$ égéshőjeként. A metabolikus hőtermelés tehát ε -od része a szubsztrát égéshőjének. Ez utóbbi különös figyelmet érdemel, hiszen ez jelenti a valójában hő formájában felszabaduló energiahányadot. Ez tehát az elvesző hő, amelyet el kell vonnunk a fermentációk során, ha biztosítani kívánjuk az izoterm tenyésztési körülményeket.

Mivel $\varepsilon=4b/\gamma_s$ és b éppen az oxigén sztöchiometriai együtthatója, világos, hogy aerob fermentációk esetén az *oxigénfogyasztás* az a mennyiség, amely a hőképződéssel leginkább összefügg. A 4.22. ábrán egy sor fermentáció metabolikus hőtermelése van feltüntetve a légzési sebesség (oxigénfogyasztás) függvényében. E lineáris összefüggés Cooney szerint azt jelenti, hogy mintegy 518 ± 12 KJ metabolikus hőtermelést jósolhatunk felhasznált oxigénmólonként. Ha a 112,5 KJ/g ekvivalens értékből indulunk ki, ez az érték 450-460 KJ/mol-nak adódnék.⁴⁰

Meg kell itt jegyeznünk, hogy természetesen anaerob tenyésztések is exotermek, ekkor a metabolikus hőt a 4.2. fejezetben definiált Y_H segítségével becsülhetjük.



4.21. ábra: Az oxigénfogyasztás és a metabolikus hőtermelés kapcsolata

4.11. táblázat: Különböző mikrobák C-tartalma, elektron-egyenértéke és égéshői

MIKROBA	C-/energiaforrás	α_2	γ_x	Q_{Ox} (KJ/g-ekv)
<i>Candida tropicalis</i>	n-alkánok	0,493	4,385	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	n-alkánok	0,467	4,497	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glükóz	0,462	4,237	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ecetsav	0,492	4,416	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n-hexán	0,458	4,320	104,4
<i>Candida.sp.</i>	cellulóz-hidr	0,491	4,110	105,5
<i>Candida.sp.</i>	n-alkánok	0,463	4,728	117,8
<i>Candida.sp.</i>	glükóz	0,446	4,074	109,6

⁴⁰ C. L. Cooney, D. I. C. Wang R. I. Mateles: Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth. *Biotechnol. Bioeng* **11**(3), 269–281 (1969)
Itt nincs igazi egyetértés a különböző forrásokban, pl találkozhatunk kalorimetriásan, kísérletileg meghatározott 410 ± 75 KJ/mol értékkel is (*Thermochimica Acta* **415** (1-2) 1-154 (2004))

4.12. táblázat: C-források elektron-egyenértéke és égéshő

SZUBSZTRÁT	CH _m O _l típusú képlet	$\gamma_s = 4+m-2l$	Q _{os} (KJ)
Metán	CH ₄	8	112,2
Propán	CH _{8/3}	6,67	110,9
n-Hexán	CH _{7/3}	6,33	110,3
n-Hexadekán	CH _{17/8}	6,125	109,9
Metanol	CH ₄ O	6	119,0
Etanol	CH ₃ O _{1/2}	6	114,1
Glicerín	CH _{8/3} O	4,67	118,5
Ecetsav	CH ₂ O	4	109,4
Borostyánkősav	CH _{3/2} O	3,5	106,5
Glükóz	CH ₂ O	4	117
Fruktóz	CH ₂ O	4	117,7
Galaktóz	CH ₂ O	4	116,6

Az elektronmérleg-egyenlet alapján láttuk, hogy ε a szubsztráthőnek az a hányada, amely hő formájában felszabadul. Az η ugyanígy az a hányad, amely az új sejtömegekben realizálódik, annak égéshőjévé alakul. Az η -t a sejtömeg energiahozamának is nevezik.

$$\eta = y_c \frac{\gamma_x}{\gamma_s} = y_c \frac{\gamma_x}{\gamma_s} \frac{Q_{ox}}{Q_{os}} = y_c \frac{\gamma_x}{\gamma_s} \frac{Q_o}{Q_o} \quad (4.40)$$

Az η sejtömeg-energiahozam tehát a C-forrás energiataralmának új sejtömegeként történő hasznosulását jelző mennyiség. Ugyanígy definiálható a termék energiahozama, ξ is.

(4.37)-ből is következik, hogy ε nem más, mint a „hővesztesség”, vagyis

$$\varepsilon + \xi + \eta = 1 \quad (4.41)$$

minden esetben. Ilyen összefüggést nem tudnánk felírni, ha nem C-mol egységre vonatkoztatnánk.

4.3.2. Hozamkifejezések, oxigénigény

Egyéb hozamkifejezések is felírhatók, illetve definiálhatók a sztöchiometriai egyenlet alapján.

Sejtözem

C-mol hozam, ami a sztöchiometriai egyenletben a sejtömeg együtthatója

$$y_c = \frac{g - \text{atomsejtszén}}{g - \text{atomszubsztrátszén}} \quad (4.42)$$

A szokásos tömegalapú $Y_{x/s}$ eredő hozam is felírható a következőképpen:

$$Y_{x/s} = \frac{g \text{ sejt}}{g \text{ szubsztrát}} = \frac{y_c (12 + p + 16n + 14q)}{(1 - R)} \frac{1}{(12 + m + 16l)} \quad (4.43)$$

vagy a C-tartalmat felhasználva egyszerűbben

$$Y_{x/s} = y_c \frac{12}{\alpha_2} \frac{\alpha_1}{12} = y_c \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \quad (4.44)$$

Termékhozam

$$z = \frac{\text{g atom sejtészén}}{\text{g atom szubsztrát szén}} \quad (4.45)$$

Az általánosabban használt g/g dimenziójú termékhozam is kiszámítható:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{g termék}}{\text{g szubsztrát}} = \frac{z(12+r+16s+14t)}{(12+m+16l)} \quad (4.46)$$

Oxigénre vonatkozó hozam

Az általános sztöchiometriai egyenlet alapján b mol oxigén felhasználása történik y_c C-molnyi új mikrobamennyiség képződése során. A C-molra vonatkoztatott oxigénhozam tehát:

$$Y_o^c = \frac{y_c}{b} \quad (4.47)$$

Az általánosabban használt oxigénhozam kifejezés az 1 g oxigén felhasználásakor képződött új sejttömeget adja meg, amely

$$Y_o = \frac{y_c(12+p+16n+14q)}{(1-R)} \frac{1}{32b} \quad (4.48)$$

A (4.48) egyenletnél könnyebben kezelhető kifejezéshez jutunk, ha itt újra felhasználjuk a mikroba C-tartalmát.

$$Y_o = \frac{y_c 12}{\alpha_2} \frac{1}{32b} \quad (4.49)$$

Érdekes ezt az egyenletet egy kissé átalakítani, mert több következtetést is levonhatunk majd az olyan fermentációk anyag- és hőmérlegére vonatkozóan, amelyek során főleg sejttömegtermelés folyik (pékélesztő, [SCP](#) stb.). Helyettesítsük be a b értékét a (4.36)-ból kifejezve a (4.49)-be. Ekkor a

$$Y_o = \frac{y_c 12}{\alpha_2} \frac{4}{32(\gamma_s - y_c \gamma_x - z \gamma_p)} \quad (4.50)$$

összefüggést nyerjük, amely kissé átalakítva a következő alakúvá tehető:

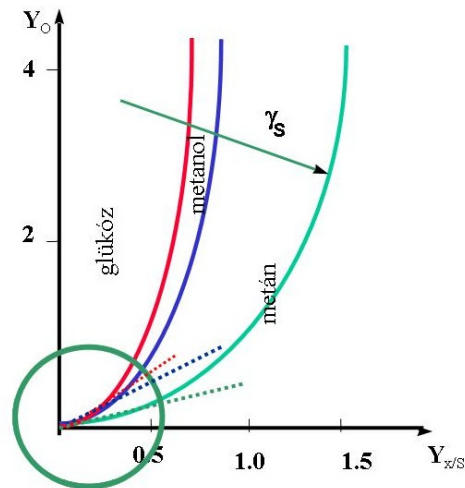
$$Y_o = \frac{3}{2\alpha_2 \gamma_x} \frac{y_c}{\frac{\gamma_s - z \gamma_p}{\gamma_x} - y_c} \quad (4.51)$$

Ipari sejttömegtermelés esetén (pl. takarmányélesztő-gyártás, [SCP](#)-fermentáció alkanolon stb.) az extracelluláris termékek mennyisége csak 1–3%, amelyet biztosan elhanyagolhatunk (a nevező z-t tartalmazó tagja elhagyható), s így a közelítő oxigénhozam sejttömegtermelés esetén egyszerűsödik:

$$Y_o \cong \frac{3}{2\alpha_2 \gamma_x} \frac{y_c}{\frac{\gamma_s}{\gamma_x} - y_c} \quad (4.52)$$

Az oxigénhozam tehát ilyen esetekben a C-hozam, y_c függvénye, ha meggondoljuk, hogy $\gamma_x \cong 4,2$ és $\alpha_2 \cong 0,46$ –0,5 jó közelítéssel állandók.

A 4.22. ábra néhány C-forrásra szemlélteti az oxigénhozam és a C-hozam, vagy ha tetszik, az eredő sejthozam kapcsolatát, hiszen (4.44) alapján ezek egymásba konvertálhatók.



4.22. ábra: $Y_O - Y_{x/S}$ kapcsolata sejtömeg tenyésztés esetén

Az ábrán látható, hogy

- Y_O monoton nő $Y_{x/S}$ növekedésével, és kis C-hozamoknál közel lineáris a kapcsolat.
- Minél kisebb γ_s , a szubsztrát elektron-egyenértéke, vagyis minél nagyobb az oxigéntartalma, annál meredekebben függ Y_O az $Y_{x/S}$ -től. A (4.52) összefüggés alapján belátható, hogy $1 \geq y_c \left\langle \frac{\gamma_s}{\gamma_x} \right\rangle$, vagyis létezik a C-hozamnak elméleti maximuma, amely azonban a gyakorlatban nem érhető el.

A szokásos $Y_{x/S}$ hozamra ez a tartomány

$$0 < Y_{x/S} < \frac{\gamma_s \alpha_1}{\gamma_x \alpha_2}, \text{ ha } \frac{\gamma_s}{\gamma_x} < 1 \text{ és } 0 < Y_{x/S} < \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \text{ ha } \frac{\gamma_s}{\gamma_x} > 1.$$

- ha y_c tart γ_s/γ_x értékhez, akkor Y_O tart a végtelenhez, aminek szemléletes jelentése az, hogy sejtermeléshez egyre kevesebb oxigén szükséges, horrible dictu 0, ha $y_c = \gamma_s/\gamma_x$. (Figyelembe véve azonban, hogy, $y_c \leq 1$ lehet csak!)

E gondolatmenet alapján létezik termodinamikailag lehetséges (gyakorlatilag el nem érhető) maximális C-hozam. Ez azt jelentené, hogy a szubsztrát összes szene sejtömeggé, a szubsztrát összes energiája a sejtömeg energiájává konvertálódna, vagyis ez esetben $\eta=1$ lenne. Az ilyen körülmények között számított hozamértékeket a 4.13. táblázatban közöljük egy sor szubsztrátra. Vessük össze $Y_{x/S}$ értékeit az előzőekben már tárgyalt néhány valódi eredő hozam értékkel!

Ha az energiahozamot, η -t a (4.52) egyenletbe helyettesítjük, a következő közelítő összefüggést nyerjük az oxigénhozamra:

$$Y_O \cong 0,777 \frac{\eta}{1-\eta} \quad (4.53)$$

Mivel a gyakorlatban $\eta < 0,7$, a szubsztráthőnek legkevesebb 30%-a metabolikus hő formájában szabadul fel⁴¹. Ezt behelyettesítve (4.53)-ba egy valószínűleg maximális

$$Y_O = 0,777 \cdot \frac{0,7}{0,3} = 1,8$$

oxigénre vonatkozó hozamot kapunk.

⁴¹ Egyes szerzők szerint 40–50%-a!

A (4.53) egyenlet, illetve a $\sim 460\text{--}500$ KJ/mol oxigéntényező ismerete nagy segítséget nyújt egy sejttömeg-tenyésztésre alkalmas reaktor megtervezésében vagy kiválasztásában, mivel a $J = \text{OTR} \cdot Y_{\text{O}}$, amelyben J a produktivitás [kg sejt/m³·h], **OTR** pedig az oxigénátadási sebesség [kg O₂/m³·h].

Ez az összefüggés támpontot nyújt arra vonatkozóan, hogy egy kívánt produktivitás eléréséhez milyen oxigénbeviteli kapacitással rendelkező bioreaktor szükséges, és a várható hőtermelés miatt milyen hőcserélő berendezéssel kell rendelkeznie.

Foglaljuk össze a fermentációs rendszer sztöhiometriai leírásának előnyeit és azt, hogy a biomérnöki gyakorlatban mire használható e megközelítés.

A sztöhiometriai egyenlet egyszerűen felírható, csak a szubsztrát és a termék összetételének ismerete és a mikroba elemi összetételének ismerete vagy mérése, illetve még két tetszőleges mérés szükséges. Mivel rendszerint sokkal több mérési lehetőségünk van, mint kettő, ezáltal egy identifikált sztöhiometriai összefüggés alkalmas lehet *méréseink konzisztenciavizsgálatára*, on line méréseink ellenőrzésére.

Feltéve, hogy egy adott esetben a mérések nem konzisztensek a sztöhiometriai leírással, pl. $Y_{\text{X/Smért}} < Y_{\text{X/SSzámított}}$, ekkor nem ismert melléktermékek jelenlétére gyanakodhatunk (ez további mélyebb vizsgálatot iniciál), vagy például, ha $RQ_{\text{mért}} \neq RQ_{\text{számított}}$, ez esetben arra gyanakodhatunk, hogy a feltételezethez képest más biokémiai reakcióutak valósultak meg, ez ismét *további mérésekre inspirál*.

A sztöhiometriai egyenlet *nem mérhető változók* becslését teszi lehetővé. Az iparban gyakran nem lehetséges a sejtnövekedés mérése, mert a tápoldat összetétele zavarja a mérést. Ekkor a mérleg-egyenletek felhasználásával tehetünk becsléseket a nem mérhető változóra.

Új fermentációs folyamat *tervezésekor* előzetes becsléseket tehetünk a különböző hozamok $X_{\text{Y/S}}$, Y_{P} , Y_{O} , Y_{H} stb. értékeire.

A technológia megtervezésekor a *reaktorkiválasztásban* segítséget nyújthat: a reaktor típusa, a hőtermelés becslése, ennek alapján a szükséges hőátadási felület, a hűtőközeg ΔT -jének és áramlási sebességének számítására módot kapunk.

4.13. táblázat: Termodinamikailag lehetséges maximális ($\eta = 1$) energiahozam alapján számolt eredő hozamok (elméleti maximális) ($\alpha_2 = 0,46$ C-tartalmú mikroba feltételezésével számítva)

C-/energiaforrás	γ_{S}	y_{C}	$Y_{\text{X/S}}$ (g/g)
Alkánok			
metán	8	(1,9)1	1,63
hexán	6,3	(1,5)1	1,82
hexadekán	6,1	(1,5)1	1,84
Alkoholok			
metanol	6,0	(1,4)1	0,81
etanol	6,0	(1,4)1	1,13
glicerin	4,7	(1,1)1	0,84
Szénhidrátok			
formaldehid	4,0	0,95	0,8
glükóz	4,0	0,95	0,8
szaharóz	4,0	0,95	0,8
keményítő	4,0	0,95	0,8
cellulóz	4,0	0,95	0,8
Szerves savak			
hangyasav	2,0	0,5	0,3
ecetsav	4,0	0,95	0,8
tejsav	4,0	0,9	0,8
fumársav	3,0	0,7	0,6
oxálsav	1,0	0,25	0,1

4.4. Fermentációs rendszerek és matematikai modellezésük

Más tudományterületekkel összehasonlítva a biológia, így a mikrobiális rendszerekkel foglalkozó fermentáció is késett a matematikai modellezés szükségességének felismerésében, de a 20. század 60-as éviben e területre is betört a matematikai szemlélet. Kézben tartani, biztonságosan reprodukálni, méginkább szabályozni és automatizálni csak olyan folyamatokat lehet, amelyeknek kvantitatív viszonyai ismertek. Ennek megfelelően kezdődött el a fermentációk mérnöki-műveleti szempontból történő matematikai leírása (sterilizálás, levegőztetés, léptéknövelés) és a mikroba-környezet rendszer kinetikai viselkedésének matematikai modellezése. A gépi számítástechnika általános elterjedése segítette elő e fejlődést, és jelenleg már ott tart e tudományterület is, hogy a matematikai modellezést a mindennapi gyakorlat részeként alkalmazza.

A növekvő modellezési információ-tömeg *rendszerezése* célszerű egyrészt a tájékozódás megkönnyítése végett, másrészt az általános modellezési elvek kifejtése az egyes konkrét modellekből segíthet a biomérnöknek saját rendszere modelljeinek felállításánál. A továbbiakban egyrészt ezen általános alapelvekkel foglalkozunk, majd néhány csoportreprezentánst mutatunk be.

Mielőtt a konkrét fermentációmódellekkel foglalkoznánk, vizsgáljuk meg rendszerünket és magának a modellezésnek a mibenlétét.

A fermentáció tudományterülete biológiai anyagformák, rendszerek vizsgálatával foglalkozik. A biorendszer *Bartholomay* szerint „*anyag objektumok sorozatának határozott csoportja (ezen szubmolekuláris részecskéket, molekulákat, sejtalkotó részeket, sejteket, sejtek populációját értjük), amelyeknek alkotó elemei meghatározott fizikai, fiziko-kémiai, morfológiai, topológiai és időbeni kapcsolatban vannak egymással és az őket körülvevő világgal, az ún. környezettel*”.

E rendszer nem statikus jellegű, állandó mozgásban van, szorosan összefügg a folyamattal, s utóbbi így nem más, mint a rendszer önmozgását, környezetével való dinamikus kapcsolatát kifejező fogalom. Ilyen értelemben a fermentációs rendszer és a fermentációs folyamat egymástól elválaszthatatlan egységben van, de nem azonos vizsgálati objektumok, ha néha értelmezésük nem is különíthető el világosan.

Lényeges rámutatni, hogy minden rendszer – így fermentációs rendszerünk is – bizonyos értelemben szubjektív: határainak kijelölése nem feltétlenül „természetes”, rendszerünk mindig olyan környezetben található, amely egy nagyobb, még nagyobb stb. rendszer része, és amely ugyanakkor más rendszereket is tartalmaz, így maga is kisebb, még kisebb stb. rendszerekből épül fel.

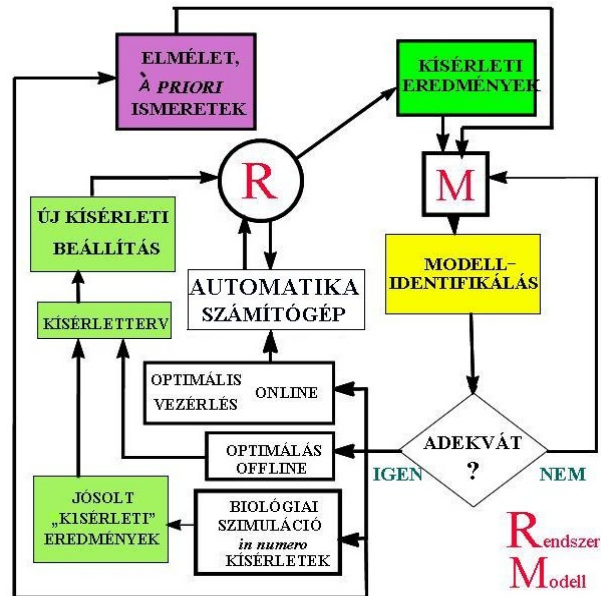
A matematikai modell a rendszert és környezetét jellemző változók közötti kapcsolatokat a matematika formális nyelvén megfogalmazó hipotézisek sorozata.

Az említett változók célszerűen *mértek* vagy legalábbis *mérhetőek*, hiszen a modell hipotézis, amelyet csak a gyakorlat, a mérés, a kísérlet igazolhat vagy vethet el.

A vizsgált rendszer matematikai modellje, a modellezés folyamata azonfelül, hogy a rendszer kvantitatív kapcsolataira rávilágítva a rendszerről alkotott kép, végső soron a tudás elmélyítését szolgálja, további előnyökkel is rendelkezik. Segítségével a kísérletes tudomány kilép a pusztán empiria talajáról, módszereinek rendszerességet ad, a kísérleti apparátus gazdaságos felhasználását segíti elő, hiszen a már elvégzett kísérleti bázisra épülő adekvát matematikai modellek interpolációra, sőt bizonyos határok között extrapolációra („mérnöki jóslások területe”) is lehetőséget adnak. Ehhez kapcsolható az ún. „*in numero* kísérleti technika”⁴² alkalmazásából adódó előny is. Bizonyos kérdésekre ugyanis a matematikus íróasztala mellől is választ kaphatunk, nem szükséges igénybe venni a biológus vagy vegyész laboratóriumát: ez a biológiai rendszerek matematikai szimulációja. Ilyen módszerekkel tanulmányozhatók a rendszerek olyan körülmények között is, amelyekben nem akarunk vagy nem tudunk kísérleti munkát végezni.

A fermentációs rendszer (R) matematikai modelljének megalkotása maga is folyamat, mégpedig a 4.23. ábrának megfelelően egy önmagát szükségyszerűen pontosító, korrigáló folyamat. Egy ilyen rendszernek nincs „legjobb” leírása, ismereteink bővülésével mindig találhatunk „jobb”, a tényleges történéseket hívebben leíró modellt (M).

⁴² Az *in numero* kifejezés gyakran az *in silico* (számítógéppel értelemben) kifejezést helyettesíti, ezeket akár szinonimaként is használhatjuk.



4.23. ábra: A matematikai modellezés maga is folyamat

A modell egyszerűsített leképezés, nem vehet figyelembe minden lejátszódó történést, minden változót, ezek közül csak a modellező által lényeges hatásúaknak ítétekkel operál. Így a matematikai modell nem természeti törvény. Más szóval nincs 1:1 megfeleltetés a rendszer és a matematikai modellje között, más modell is leírhatja többé-kevésbé adekvát módon a történéseket, és fordítva is igaz, egy adott modell többféle rendszernek is adekvát megközelítése lehet.

A modellekkel matematikai műveletek végezhetők (például egyenletei összeadhatók, differenciálhatók, integrálhatók stb.), s ezek alapvetően megváltoztathatják formáját, ami legalábbis óvatosságra int egy modell alkalmazási formájának mechanikus felhasználásával kapcsolatban, hiszen az említett műveletek elfedhetik az eredeti modellnél figyelembe vett feltételezéseket, elhanyagolásokat.

Egy fermentációs rendszerben a sejtek populációja, ezen populáció szintetizáló és átalakító tevékenysége a vizsgálat tárgya. Fermentációs rendszeren tágabb értelemben a mikroorganizmusok tenyésztését és környezetét, valamint az azt meghatározó fizikai, fizikai-kémiai paraméterek összességét értjük, a fermentációs folyamat pedig az így definiált rendszer és a benne, illetve vele történő változások, átalakulások összessége.

Mai ismereteink szerint a legegyszerűbb baktérium sejt is legalább 10^{10} molekulából épül fel (lásd példaként a gyorsan szaporodó *E. coli* összetételét bemutató 4.14. táblázatot). Ebből 1000–10 000 a különböző katalitikus hatású fehérje. A sejtekben ezek az enzimek rendkívül bonyolult anyagcsere-folyamatokat katalizálnak, amelyek összetett többszintű szabályozás alatt állnak. E megszámlálhatatlan anyag- és történésféleség mozgástörvényeinek jelenleg csak töredéke ismert, az tehát, hogy egy sejt viselkedését leírjuk, még modellszerűen is rendkívül sok elhanyagolást igénylő s óhatatlanul durva eredményre vezető kísérlet lenne. Ezt figyelembe véve az a lehetőség marad az egyedüli járható út, ha lemondunk az egy sejt tárgyalásáról, s a populáció, a sejttömeg makroszkóposan megfigyelhető viselkedését írjuk le a legfontosabbnak ítélt néhány változó figyelembevételével.

4.14. táblázat: Gyorsan szaporodó *Escherichia coli* összetétele

ÖSSZETEVŐ VEGYÜLET-CSOPORT	% A SEJT-TÖMEGBEN	ÁTLAG MÓLTÖMEG	DB/SEJT	FAJTA/SEJT
H ₂ O	70	18	4·10 ¹⁰	1
Szervetlen ionok: K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Fe ²⁺ , Cl ⁻ , PO ₄ ⁴⁻ , SO ₄ ²⁻	1	40	2,5·10 ⁸	20
Szénhidrátok és prekurzoraik	3	150	2·10 ⁸	200
Aminosavak és prekurzoraik	0,4	120	3·10 ⁷	100
Nukleotidok és prekurzoraik	0,4	300	1,2·10 ⁷	200
Lipidek és prekurzoraik	2	750	2,5·10 ⁷	50
Egyéb kis molekulák (hem, kinonok....)	0,2	150	1,5·10 ⁷	200
Fehérjék	15	40000	10 ⁶	2–3000
Nukleinsavak				
DNS	1	2,5·10 ⁹	4	1
RNS		500000	3·10 ⁴	1

A fermentációk célja a sejttömeg és/vagy valamely anyagcsere, ill. átalakítási termék nagy tömegű előállítása. Ezért ezek, illetve az ezeknek megfelelő sebességi értékek a rendszert jellemző legfontosabb változók. A többi vizsgált változó jobbára a környezetre vonatkozik. E kétféle változó kategória helyett a modellezésnél inkább a következő csoportokat alkalmazzák:

Kontrollváltozók az elsődleges hatású, a rendszerrel való kényszerkapcsolatuk alapján feltétlenül szabályozandó paraméterek. E változók száma erősen függ a fermentációk mindenkorai technikai kivitelétől, a mérési-szabályozási lehetőségektől. A kontrollváltozók közé sorolható a hőmérséklet, a tápközeg pH-ja, a fermentáléban oldott oxigén koncentrációja, kemosztát elvű folytonos fermentáció esetén a hígítási sebesség, a befolyó tápoldat szubsztrátkoncentrációja stb. Természetes, hogy e változók számának növekedése teremt meg a fermentációs folyamat kézben tartásának, reprodukálhatóságának, s ugyanígy az egyre finomabb, a részleteket is adekvát módon tükröző matematikai modellek megteremtésének lehetőségét.

Az **állapotváltozók** csoportja jelenti a tenyészet válaszait a környezeti behatásokra, így ide sorolhatjuk valamennyi anyagcsere-folyamat sebességét, az ezekben részt vevő anyagok és enzimek koncentrációit, a pH-t⁴³ stb. Az állapotváltozók csoportjáról is elmondható, hogy a vizsgált és a modellezésbe bevont ilyen változók száma és információtartalma növekvő tendenciát mutat.

Az előbbi osztályozás mellett elterjedt, és különösen bizonyos típusú matematikai modellek esetében használatos a változóknak **biológiai** és **nem biológiai** csoportokba sorolása is. Előbbiek az ún. biotikus fázis, tehát a mikrobátömeg (a fermentáléval elválasztott sejttömeg) jellemző változói. Ilyenek a sejttömeg maga vagy bizonyos alkotórészeinek mennyiségei és változási sebességeik.

A nem biológiai változók vagy más néven az abiotikus fázis változói a mikroba környezetét jellemzik (sejttömegtől elválasztott fermentálé). E csoportba sorolhatók az összes művelési jellegű változók, mint a hőmérséklet, a gázbevezetés sebessége, a fermentálé összetétele stb.

A következőkben röviden áttekintünk néhány, a matematikai modellezés szempontjából lényeges fogalmat, valamint megadjuk a leggyakrabban előforduló változók definícióit és az [IUPAC](#) által ajánlott szimbólumokat e változók jelölésére.

⁴³ Természetesen, hogy egy változó állapot vagy kontroll változó-e, azt az határozza meg, hogy szabályozzuk-e, vagy sem. A pH például állapotváltozó, ha magára hagyott rendszerben szabályozatlanul változik, de kontrollváltozó, ha szabályozzuk.

A tenyészet, kultúra jelenti a szűkebb értelemben vizsgált rendszert, amely a fermentléből, vagyis a sejtektől megszabadított rendszerből és a sejtömegeből áll. Gyakran a fermentlé kifejezést az egész tenyészetre is alkalmazzák.

A tápoldat a tápanyagokból, szubsztrátokból áll. A tenyészet növekedésén a sejtömeg növekedését értjük. E növekedést szűkebb és tágabb értelemben szemlélhetjük. Szűkebb értelemben a sejtömeg tömeg szerinti gyarapodását jelenti, amelytől meg kell különböztetni a tenyészet sejteinek szám szerinti gyarapodását. A tágabb értelmezés mindkét esetet magában foglalja. Éppen e megkülönböztetés céljából a sejtömeg jelölésére az x , [g sz.a./dm³] dimenziójú mennyiséget használjuk. Ugyanígy volumetrikus értelemben használjuk a matematikai modellezés szempontjából fő állapot-határozóként kezelt különböző növekedési sebességeket is:

A növekedési sebesség dx/dt , egysége [g sz.a./dm³·h]

A szaporodási sebesség dN/dt [db/cm³·h]

A fajlagos növekedési sebesség egységnyi sejtömegre vonatkoztatott növekedési sebesség:

$$\mu_x = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x} \quad [h^{-1}]$$

A fajlagos szaporodási sebesség pedig az egy sejtre vonatkoztatott szaporodási sebesség:

$$v = \frac{dN}{dt} \frac{1}{N} \quad [h^{-1}]$$

A generációs idő fogalma nem teljesen egyértelmű. Eredetileg a szaporodásra vonatkozott, gyakran a növekedésre is alkalmazzák. Mikroszkopikus értelemben egy sejt megkétszereződésének az ideje, makroszkópiusan pedig az egységnyi térfogatban lévő mikrobaszám, illetve mikrotömeg duplázódási idejét jelenti.

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_x} \quad \text{illetve} \quad t_g = \frac{\ln 2}{v}$$

A tápoldat tápanyagtartalmát az $\bar{S} = [S_1, S_2, S_3, \dots, S_i]$ vektor (a szubsztrátok vektora) jelöli. Index nélkül a tápanyagról vagy a limitáló szubsztrátról (értelmezését lásd a [4.1. alfejezetben](#)) beszélünk [g/dm³]. Ugyanígy az anyagcseretermékeket a $\bar{P} = [P_1, P_2, P_3, \dots, P_j]$ jelöléssel illetjük. A \bar{P} komponensei intra-, ill. extracellulárisak, tehát biotikus és abiotikus fázisúak is lehetnek, ill. megoszolhatnak bizonyos – idő függvényében – változó arányban a két fázis között. A különbségtétel igen fontos, mert az intracelluláris termékek a sejtömeg részét képezik. Amikor P termékről beszélünk egyszerűen, akkor csak extracelluláris termékről van szó.

A szubsztrát- vagy tápanyag-felhasználási sebesség:

$$\frac{dS_i}{dt} \quad [g/dm^3 \cdot h]$$

A termékképződési sebesség:

$$\frac{dP_j}{dt} \quad [g/dm^3 \cdot h]$$

A fajlagos szubsztrátfelhasználási sebesség az egységnyi sejtömegre vonatkozó szubsztrát-felhasználási sebesség:

$$Q_{S_i} = q_{S_i} = \frac{1}{x} \frac{dS_i}{dt} \quad [g/g \cdot h; h^{-1}]$$

A fajlagos termékképződési sebesség:

$$Q_p = q_{pj} = \frac{1}{x} \frac{dP_j}{dt} \quad [g/g \cdot h; h^{-1}]$$

E fajlagos sebességek – mint az RQ és a P/O is – a metabolikus kvóciensek közé tartoznak.

4.4.1. A fermentációs modellalkotás általános elvei

A fermentációs rendszer bonyolultan összetett, amelyben számos kölcsönhatás érvényesül. E bonyolult rendszer/folyamat matematikai modellezése során egy sor olyan általános és a fermentációra specifikusan érvényes törvényt, tudományos eredményt kell felhasználni, amelyek sokrétűsége magában is utal e feladat nehézségeire. Ezen alapelvek általában ismertek, mégis egyikéről-másikáról gyakran megfélekedünk. Ennek oka nem feltétlenül tájékozatlanság, hanem inkább az, hogy maradéktalan érvényesítésük kilátástalannak tűnik. A következőkben röviden összefoglaljuk a modellezésnél alkalmazott, alkalmazandó elveket, és megadjuk a fermentációs modellek csoportosítását is, amit elsőként Fredrickson és munkatársai végeztek el 1970-ben.

4.4.1.1. Fizikai alapelvek

Az anyagmegmaradás törvényét valamennyi fermentációs matematikai modell figyelembe veszi, ez teremti meg a lehetőséget az „általános” matematikai modell felállításának. A matematikai alapegyenletek ugyanis általában a fermentációs rendszert alkotó anyagokra vonatkozó különböző anyagmérlegek.

Vizsgáljuk meg a folytonos működésű, ideális, tökéletesen kevert bioreaktorra felírható anyagmérleg-egyenletet.

$$V \frac{dc_i}{dt} = f(c_{i,be} - c_i) + r_i V \quad (4.54)$$

ahol V az állandó fermentálótérfogat,

f az adagolási és elvételi térfogatáram

c_i az i -edik összetevő koncentrációja

r_i az i -edik összetevő „növekedési sebessége”.

Ilyen anyagmérleg-egyenlet annyi írható fel, ahány komponense (szubsztrátok, termékek és a sejt tömeg vagy annak komponensei) van a rendszernek. Ezen egyenletek mindig tartalmazzák az r_i képződési sebesség tagokat, amelyek miatt az anyagmérlegek egyenletrendszere önmagában nem oldható meg.

A mikrotömeg és a termékek esetében $r_i > 0$ tehát növekedést, szubsztrátok esetén természetesen $r_i < 0$, és így fogyást jelent) Éppen r_i -k modellezése jelenti a fermentációs matematikai modellezés szűk keresztmetszetét. Az anyagmérleg egyenletrendszere általánosan érvényes, és ezáltal megteremti a kapcsolatot a különböző technikai kivitelű, azaz szakaszos, félfolytonos és folytonos fermentációk között. Ezek ugyanis ilyen szempontból csak f betáplálási (elvételi) sebességekben és $c_{i,be}$ értékeiben térnek el egymástól. Így pl. értelemszerűen szakaszos fermentációk esetén $f = 0$ és úgyszintén $c_{i,be} = 0$.

A fizikai elvek második csoportját a termodinamikai elvek jelentik. A termodinamika első főtételének – az energiamegmaradás törvényének – figyelembevétele nem okoz gondot a fermentációk modellezésénél, csak abban az esetben szükséges ugyanis matematikailag megfogalmazni, ha a modellezés kiterjed a technológiai berendezésekre is, ha a folyamatban számolni kell a hőelvonással vagy a jelentős hőtermeléssel (lásd a C-forrás hasznosulását a 4.3. fejezetben).

A termodinamika második főtételével azonban más a helyzet, mivel egy sor olyan következménye van, amelyeket nem véve figyelembe, hibás modellek felállításához juthatunk.

Egy élő rendszer, így a fermentációs rendszer is termodinamikai szempontból nyílt rendszer, s mint ilyen, alapvetően irreverzibilis módon végbemenő folyamattal jár. Az irreverzibilitást és a nyitott

rendszer jelleget a környezettel való szakadatlan anyagcsere jelenti, és ez egyaránt érvényes mind az egyes sejtekre, mind a teljes populációra. Az egyes sejtek entrópiája csökkenhet vagy változatlan is maradhat, anélkül, hogy a II. főtétel érvényessége csorbát szenvedne. A mikroorganizmus úgy csökkenti vagy tartja állandó szinten entrópiáját, hogy környezetének entrópiája nagyobb mértékben növekszik. Ez természetes, ha meggondoljuk, hogy a mikroorganizmus szervezett létforma, rendezettsége nagyobb, mint környezetéé, ami csak úgy lehetséges, ha a környezet rovására tartja alacsony szinten az entrópiát. Sőt igaz e megállapítás nemcsak szaporodó, növekvő, hanem az ún. nyugvó (de élő) sejtek esetében is. Ahhoz, hogy egy nyugvó sejt életképessége fennmaradjon, munkát kell végeznie környezetén. Ilyen munkavégzés pl. az ellenszegülés a sejteket szétroncsolni akaró ozmózisnyomásnak, a sejt ionkoncentrációjának fenntartása, a mozgás stb. Azt mondhatjuk tehát, hogy még a nyugvó sejteknek is szükségük van energiára, hogy rendezettségüket fenntarthassák. Ezen elv kvantitatív következményeit a szubsztráthasznosulással foglalkozó 4.3. fejezetben fejtjük ki.

A termodinamikai tételek további következménye a fermentációs rendszerre, hogy az – nyílt rendszer lévén – nem lehet termodinamikai egyensúlyban. Ehelyett, ha az élő sejtek anyagcsereje, a ki- és bemenő anyagáram folytonos, bizonyos időbeli állandóság, ún. „steady state” figyelhető meg. Az élő rendszereknek és így fermentációs rendszerünknek is lényeges tulajdonsága az állandósult állapot, illetve az erre való törekvés. Az állandósult állapotra jellemző, hogy nem vagy csak csekély mértékben függ a komponensek kezdeti értékeitől, vagyis viszonylag széles határok között ugyanaz az állandósult állapot áll be (ekvifinalitási elv). E tulajdonság hiányzik a zárt rendszerekből, ahol az egyensúlyi állapotot egyértelműen meghatározzák a kezdeti feltételek. Az élő rendszer ilyen viselkedéséből következik, hogy a mikroba viszonylag tág határok között ugyanazon állandósult állapot elérésére törekszik, ha mások is az indulási környezeti feltételek. Extrém környezeti hatások természetesen extrém hatásokat eredményeznek.

A fermentációs folyamat állandósult állapotát **kiegyensúlyozott növekedésnek**⁴⁴ nevezzük. Erre jellemző, hogy a komponensek koncentrációváltozásának fajlagos sebességei állandóak:

$$\mu_i = \frac{1}{x} \frac{dx_i}{dt} \quad x = \sum x_i \quad (4.55)$$

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_i$$

ahol a μ_i a rendszer i -edik komponensének fajlagos növekedési sebessége. E relációk a más szóval homeosztázisnak is nevezett kiegyensúlyozott növekedés matematikai megfogalmazását jelentik.

Kétféle kiegyensúlyozott növekedésről beszélhetünk:

- a) **Korlátozatlan**, amikor semmilyen kémiai vagy fizikai tényező nem korlátozza a komponensek és az egész populáció növekedési sebességét. Ilyen a szakaszos fermentáció exponenciális növekedési szakasza és a turbidosztát elvű folytonos fermentáció, ha a rendszer exponenciális szakaszban üzemel.
- b) **Korlátozottan kiegyensúlyozott** növekedés pl. a kemosztát elvű folytonos fermentáció, ahol a limitáló szubsztrát állandó koncentrációja határozza meg a maximálisnál kisebb fajlagos sebességű növekedést.

A modellezés fizikai elveinek harmadik csoportját, az ún. konstitutív elvek csoportját azok a fizikokémiai, reakciókinetikai törvények jelentik, amelyek meghatározzák a rendszerünkben lejátszódó folyamatok, transzportfolyamatok (töltés-, energia- és momentum-, valamint anyagtranszportfolyamatok) tisztán kémiai és enzimikus reakciók sebességeit. Végül soron ezen elvek felhasználása jelenti a tulajdonképpeni modellezést. A konstitutív egyenletek jelentik a matematikai modellegyenleteket, a rendszer komponenseinek „növekedését” leíró r_i egyenleteket. Nyilvánvaló, hogy ezen egyenletek felállítása jelenti a modellezés szűk keresztmetszetét. A különböző matematikai modellek főként konstitutív egyenleteikben térnek el egymástól.

⁴⁴ Kiegyensúlyozott növekedés az angol szakirodalomban: balanced growth.

Valamennyi fermentációs matematikai modell lényegében a tömeghatás törvényének különböző megfogalmazása, azt kell tehát a legfontosabb konstitutív elvnek tekinteni. Eszerint a rendszerben lejátszódó kémiai-enzimes reakcióknak és az egész rendszer növekedésének sebességét a reagáló anyagok mennyiségei valamely hatványainak és reakciókinetikai állandóknak a szorzatai lineáris kombinációival modellezzük. A tömeghatástörvényen kívül az átadási egyenletek (tömeg-, hő-, momentum-) szerepelnek legfontosabb konstitutív összetevőként. A konstitutív egyenletek rendszerint egy

$$r_i = r_i(\bar{S}, \bar{I}, \bar{P}, \mu, \dots) \quad (4.56)$$

alakú egyenletrendszeret képeznek.

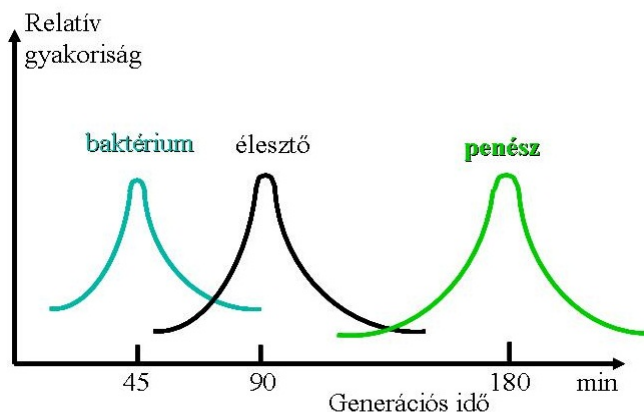
4.4.1.2. Biológiai elvek

A mikroorganizmusok növekedésük során az egyes sejtalkotó részeket (fehérjéket, nukleinsavakat stb.) minőségileg és mennyiségileg összhangban szintetizálják. Az a mikroba életképes, amely az anyagcseréjéhez szükséges energiát a környezet változásaitól függetlenül, ahhoz alkalmazkodva tudja előállítani, és a szabályozó rendszerével a környezeti változásokat kompenzálni képes (lásd homeosztázis). Konstitutív tulajdonságainak zavartalan működtetése érdekében az induktív tulajdonságok „számtalan” lehetősége közül merít. A leírtak összecsengnek a termodinamikai elveknél említett, a kezdeti feltételektől bizonyos mértékben független állandósult állapotra való törekvés tételével: mindaddig, amíg a környezet változásai megengedik, a mikroba korlátatlanul vagy korlátozottan ugyan, de kiegyensúlyozottan (steady state-ben) növekszik.

A genotípusnak a mikrobák alakjában, szaporodási módjában megnyilvánuló különbségeit legritkább esetben veszik figyelembe: gyakran fonalas gombák modellezésére ugyanazokat az összefüggéseket próbáljuk alkalmazni, mint baktériumokra, s ez elvileg helytelen. Ha megnézzük a 4.15. táblázatot, amelyben a nagy mikrobacsoportok néhány jellemzőjét hasonlítottuk össze, valamint a 4.24. ábrát, amelyen ugyanezen mikrobacsoportok generációs idő-eloszlása látható, szembetűnik állításunk helyessége. A tárgyalásunk során alkalmazott modellek alapvetően baktériumokra adekvátak, kisebb mértékben élesztők esetében is alkalmasak. Fonalas gombákra is alkalmazzuk őket, azonban ez fokozott körültekintést igényel, és a későbbiekben ezek szaporodásának néhány specifikus modelljét külön is érintjük.

4.15. táblázat: Fő mikrobatípusok azonos és eltérő tulajdonságai

JELLEMZŐK	BAKTÉRIUMOK	ÉLESZTŐK	FONALAS GOMBÁK
ALAK	Pálcika, gömb, láncok	Ellipszoid, gömb, láncok	Hifafonadék, pellet
MÉRET	0,5–4 μm	5–25 μm	5–15 μm széles és 500–5000 μm hosszú micélium
REPRODUKCIÓ	Hasadás, azonos leánysejtek	Sarjadzás, nem azonos leánysejtek	Hosszirányú, apikális növekedés
SEJTSŰRŰSÉG	1,0–1,1 gcm ⁻³	1,0–1,05 gcm ⁻³	1,0–1,05 gcm ⁻³
EGY SEJT TÖMEGE	10 ⁻¹² g	10 ⁻¹¹ g	Nem értelmezhető
FEHÉRJETARTALOM a szárazanyagban	60–80%	45–55%	25–55%
Nukleinsav-tartalom a szárazanyagban	15–25%	5–12%	5–10%
SZÉNHIDRÁT- ÉS LIPID-TARTALOM a szárazanyagban	5–30%	10–30%	10–50%



4.24. ábra: Mikrobacsoportok generációs idő-eloszlása

Különös körültekintéssel kell a modellezésben figyelembe venni azokat a környezeti tényezőket, amelyek a tenyésztet hármass esélye, azaz az új sejtanyag szintetizálása, mutációja és a sejtpusztulás irányában a történéseket és azok intenzitását meghatározzák.

A leglényegesebb környezeti tényezők hatásai és a különböző modellekben való megjelenési lehetőségei vázlatosan az alábbiakban foglalhatók össze.

A **hőmérséklet** eredő hatása az Arrhenius-összefüggés formájában vehető figyelembe, annak ellenére, hogy a makroszkópikus mikrobametabolizmus számtalan elemi, molekuláris szintű lépés eredője, amelyek mindegyike is a hőmérséklet Arrhenius-függvénye. Természetesen az élő sejt nagy fehérje- tartalmának következtében a hődenaturálódás is számottevő, így végső soron a két effektus eredőjét, egy maximumos hőmérséklet-növekedési sebesség-összefüggést kapunk (4.25. ábra). Minden mikroorganizmusnak van egy jól definiált optimális hőmérséklete, de ennek értéke nem abszolút, hanem függ a többi tenyésztési körülménytől, például a táptalaj összetételétől.

A maximum előtt, viszonylag szűk hőfokintervallumban, a fajlagos növekedési sebesség

$$\mu_x = \mu_{x0} e^{-\frac{\Delta E}{RT}} \quad (4.57)$$

alakú összefüggés szerint változik.

A fenti egyenletben μ_{x0} a fajlagos növekedési sebesség a vonatkozási hőmérsékleten.

ΔE a növekedés látszólagos aktiválási energiája⁴⁵. Ugyanakkor a denaturálódás fajlagos sebessége is az Arrhenius-összefüggés szerint írható le, így a két hatás eredője:

$$\mu_x = A_1 e^{-\frac{\Delta E_1}{RT}} - A_2 e^{-\frac{\Delta E_2}{RT}} \quad (4.58)$$

ahol: ΔE_1 ugyanaz, mint ΔE fent
 ΔE_2 a denaturálódás látszólagos aktiválási energiája
 A_1 , és A_2 állandók.

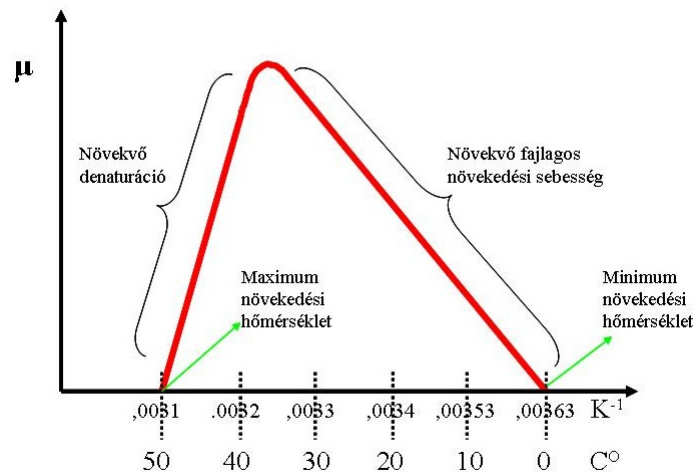
Általában $\Delta E_2 \gg \Delta E_1$,⁴⁶ ezért alacsony hőmérsékleten μ_x valóban a (4.57) egyenlet szerint változik a hőmérséklet növekedésével.

Az ábrán megjelöltük a mikroba számára minimális szükséges hőmérsékletet is, ez alatt a sejtmembrán „gélesedik”, ami olyan kis anyagátadási sebességet tenne csak lehetővé, ami nem elegendő a növekedéshez. Itt tehát már egyáltalán nincs növekedés. Ugyanígy a maximális növekedési sebesség felett sincs növekedés. Ne felejtsük el, hogy a denaturálódásnak nincs kitéve, „egy

⁴⁵ *E. coli* esetében pl. 55,4 kJ/mol volt egy adott fermentáció esetén.

⁴⁶ ΔE_1 50–80 kJ/mol, míg ΔE_2 250–300 kJ/mol tartományba esik. A *mol* a mértékegységben nem azonos a sztöchiometriai mikroba mol-lal. Itt ennek csupán formális szerepe van!

bizonyos” hőmérséklete, az a hőmérséklet növekedésével folyamatosan nő, valamint, hogy a (4.57-4.58) egyenletek állandói nemcsak a tenyésztett mikrobától, hanem a környezet egyéb tényezőitől (pH, fermentlé összetétele) is függnék.



4.25. ábra: Egy hipotetikus mezofil mikroba fajlagos növekedési sebességének függése a hőmérséklettől $\mu - 1/T$ ábrázolásban

A hőmérséklet nem csupán a növekedésre, hanem a termékképződésre is hatással van. Gyakran a növekedés és termékképződés hőfokoptimuma nem esik egybe, így a teljes fermentáció optimális hőmérsékletének, illetve optimális hőmérsékleti profiljának meghatározása olyan optimumkeresési feladat, amely éppen a matematikai modellezés segítségével oldható meg.

Jellegzetesen változik az eredő hozam is, ami a hőmérséklet növekedésével csökken, mivel minél magasabb a hőmérséklet, annál több energia szükséges fenntartási célokra. A fajlagos fenntartási koefficiens is az Arrhenius-egyenlet szerint nő a hőmérséklettel, 60–80 KJ/mol látszólagos aktiválásienergia-jellemzővel.

A **fermentlé pH-jának hatása** nem közvetlenül a sejten belüli anyagcsere-tevékenységre irányul, hanem elsődlegesen a sejtmembrán anyagtranszport-folyamataira (lásd a [2.10. fejezetet](#)). Abban az esetben, ha a pH magára hagyott rendszerben szabadon változik, állapotváltozóként, ha szabályozásra lehetőség van, kontrollváltozóként kell figyelembe venni a modellezéskor.

Igaz, hogy sok kivétel adódik, mégis egy sor általános következtetés vonható le a pH-nak a fermentációs rendszerekre gyakorolt hatásával kapcsolatban. A baktériumok rendszerint 4-8 pH-tartományban növekednek, míg az élesztőgombák a 3-6, a fonalas gombák a 3-7 pH-tartományt részesítik előnyben. Ennek megfelelően gyakran éppen a pH az a környezeti tényező, amelynek segítségével egy fermentációs rendszer idegen mikrobákkal való befertőződése meggátolható (azonban soha ne hagyatkozzunk csupán erre egy rendszer sterilítésének fenntartásánál!)

A mikroorganizmusaink tenyésztése során fellépő pH változásának több oka lehet. Ha ammónia vagy NH_4^+ -só a nitrogénforrás, akkor a fermentáció folyamán a pH csökkenni fog.

Ennek oka az, hogy a N a fermentlében NH_4^+ -formában van jelen, míg a sejtbe NH_3^+ -R formában kerül be, tehát proton marad a sejt környezetében. Ez oly mértékben jellemző pH-változást okoz, hogy egyes esetekben a N-forrás szabályozására, illetve adagolásra is felhasználható vezérlő jelnek tekinthetjük. Nitrát nitrogénforrás esetén a helyzet fordított, a tápközegből kerül proton a nitrátra, amely szintén NH_3^+ -R formában metabolizálódik, s így nőni fog a fermentlé pH-ja. Ez azonban nem szigorúan sztöchiometrikus, így szabályozásra nem alkalmas. A pH-változás másik oka az extracelluláris termékekben keresendő: egyes mikrobák növekedésük során savas karakterű termékeket választanak ki a fermentlébe (tejsav, glükonsav, citromsav stb). Ha fehérje vagy aminosavak biztosítják a N-forrást (esetleg a C-forrást is), sok esetben a fermentlé lúgosodása figyelhető meg a fermentáció során. Az aminosavak ugyanis dezaminálódva használnak fel, ami ammónia felszabadulásával jár.

A fermentációs rendszer lényeges jellemzője a benne levő aerob mikroorganizmusok légzési tevékenysége. Az oxigén ugyanis, mint fő elektronakceptor, szintén a rendszert jellemző kontroll- vagy állapotváltozókkal kapcsolatos. Maga az oldott oxigén koncentrációja vagy a fermentálásra és technológiai körülményekre jellemző oxigénátviteli koefficiens (OTR) kontrollváltozók lehetnek, míg a légzési sebesség és a fajlagos légzési sebesség (Q_{O_2}) a tenyészet fiziológiai állapotát jellemző állapotváltozók.

A légzés, levegőztetés és az oxigénellátás kulcsszerepével a 4.5. fejezetben részletesen foglalkozunk.

A **fermentlé tápanyagai** – mint környezeti tényezők – igen fontosak a mikrobák növekedése, anyagcsere-tevékenysége szempontjából. A tápanyagok minőségi és mennyiségi szempontból is lényegesek, nem utolsósorban ezek segítik elő az induktív tulajdonságok manifesztálódását a „számtalan” genotípusos lehetőség közül. Érdemes megjegyezni, hogy a szubsztrátok is (hasonlóan a pH-hoz) kontroll- és állapotváltozók is lehetnek, míg a szubsztrátfelhasználási sebességek, valamint a fajlagos felhasználási sebességek egyértelműen állapotváltozók. Koncentrációik meghatározhatják a fajlagos növekedési sebességet. Ez esetben limitáló szubsztrátról vagy szubsztrátokról beszélünk, de nagy feleslegük gátlóan is hathat a mikrobatenyészet aktivitására (szubsztráthinhibíció).

Ugyanezek érvényesek a környezetben felhalmozódó termékekre is (P_j), vagyis ezek lehetnek közömbösek, gátlóak, sőt toxikusak is a tenyészetre. Ezekről a kérdésekről a továbbiakban az egyes modelleknél részletesen beszélünk.

Felmerül a kérdés, hogy a felsorolt környezeti tényezők hogyan jelennek meg a matematikai modellekben. A szubsztrátok – így az oxigén is –, valamint a termékek a matematikai modellek konstitutív egyenleteiben, a tömeghatás törvényében és az anyagtranszportot leíró egyenletek komponenseiként szerepelnek. A hőmérséklet és a pH ritkán szerepel a modellekben expliciten, mivel a modellek rendszerint adott hőmérsékletre és pH-ra vonatkoznak. *E két környezeti tényezőt általában mint a kinetikai állandókra formálisan ható faktorokat vesszük figyelembe.* Az alaposan kidolgozott modelleket rendszerint kiegészítik a kinetikai paraméterek mint függő változók, és a pH, ill. hőmérséklet mint független változók empirikus vagy az enzimkinetikán alapuló modelljeivel.

A biológiai elvek csoportjába tartozik az a modellekben ritkán figyelembe vett tény is, hogy a fermentáció nem tisztán „születési folyamat”, hanem számításba veendő a sejtek pusztulása (a sejthalál, a lízis) és a fermentáció alatti spontán vagy a fermentálásban jelenlévő mutagén ágens indukálta mutáció is. Ezek modellezése rendkívül bonyolult feladat, hiszen a jelenségek mechanizmusa nem mindig ismert, s főként jelenlétük nem mindig észlelhető. Általánosságban elmondható: a lízist és a sejthalált legtöbbször elsőrendű kémiai reakciókként modellezzük.

Végül fontos biológiai elv az, hogy minden biológiai folyamat, így a fermentáció is, tartalmaz véletlenszerű vagy legalábbis általunk bizonytalanul ismert jelenségeket, tehát **alapvetően sztohasztikus viselkedésű**. Hogy ennek ellenére előszeretettel a **determinisztikus** leírásokat használjuk, s ez mégsem jelenti rendszerünk tulajdonságainak durva elhanyagolását, bizonyítja egyrészt az a tény, hogy a sztohasztikus megközelítések várható értékben egy-egy determinisztikus leírást adnak. Másrészt a rendszer kísérletes vizsgálatára adódó lehetőségek is ide hatnak, ugyanis a sztohasztikus jelleg legtöbbször nem ismerhető fel a jelenleg alkalmazott kísérleti módszerek mellett. Ez belátható, ha például a legegyszerűbb sztohasztikus folyamat modelljének⁴⁷ várható érték, illetve szórásnégyzet kifejezései alapján kiszámítjuk a rendszerben végezhető megfigyelések relatív szórását :

$$\text{várható érték} \quad m(t) = n_0 e^{\lambda t} \quad (4.59)$$

$$\text{szórásnégyzet} \quad \sigma^2(t) = n_0 e^{\lambda t} (e^{\lambda t} - 1) \quad (4.60)$$

$$\text{relatív szórás} \quad \frac{\sigma(t)}{m(t)} = \left(\frac{1 - e^{-\lambda t}}{n_0} \right)^{1/2} \quad (4.61)$$

⁴⁷ Ez az ún. Yule–Furrry-féle sztohasztikus születés modellje, amely a Monod-modell sztohasztikus megfelelője.

Mivel n_0 általában igen nagy (a szokásos inokulum sejtsűrűség 10^4 – 10^8 db/cm³ közé esik) a relatív szórás igen kicsiny: 10^{-4} –1% közötti. Szempontunkból még a felső 1%-os relatív szórás is kedvező, ha meggondoljuk, hogy ritkán van módunk fermentációs folyamatunk analitikai követésére e szórás-határon belüli pontossággal.

4.4.2. A fermentációs matematikai modellek főbb típusai

Mint minden matematikai modell, a fermentációs modellek is alapvetően determinisztikus vagy sztochasztikus megfontolásúak lehetnek.

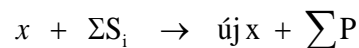
A determinisztikus-sztochasztikus megkülönböztetésen túlmenően különböző model-csoportosítási rendszerek terjedtek el a szakirodalomban. Így megkülönböztetnek szubkulturális és szubcelluláris szinten jelentkező matematikai modelleket. A modellek felépítésének jellemzőit, illetve a modellépítés koncepcióit leginkább Fredrickson és munkatársai modelcsoportosítási rendszere tükrözi híven, ezért az alábbiakban erre térünk ki részletesebben.

Fredrickson⁴⁸ és munkatársai osztályozása értelmében a fermentációs modellek az alábbi szempontok szerint csoportosíthatók:

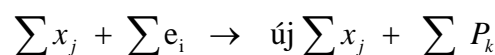
1. Sejtszám modellek: a fermentációs rendszer fő állapotváltozójának a tenyészet sejtkoncentrációját tekintik. Az eredeti angol elnevezés (segregated models) onnan adódik, hogy a tenyészet funkcionálisan és szerkezetileg elkülönült egységekből, a sejtekből tevődik össze. Ezek a modellek leginkább sztochasztikus felépítésűek.
2. Sejttömeg modellek: a sejttömeg-koncentrációt tekintik a populáció leglényegesebb állapotváltozójának, és azon a feltételezésen alapulnak (ha nincs is mindig kiemelve!), hogy a sejttömeg egyenletesen oszlik el a teljes tenyészet térfogatában. Az eredeti angol csoportnév éppen ezen egyenletes eloszlást emeli ki (distributed modes). E modellek főként determinisztikus megfontolásokon alapulnak.

A fenti csoportosításnál jellemzőbb a következő két csoport:

- A) Struktúra nélküli modellek: a tenyészet növekedését és anyagcsere-aktivitását kémiai reakciók eredőjeként modellezik. E kémiai reakciókban az egyik „reagáló komponens” a szerkezet nélküli, a fermentáléban egyenletesen eloszló sejttömeg(x) (ennyiben ezek sejttömeg modellek is), reagáló partnerei pedig az ugyancsak mindenütt azonos koncentrációjú tápanyagok (S_i). A „kémiai reakciók” termékei az új sejttömeg és a termékek (P_j). Az ilyen típusú modellek a legelterjedtebbek, és gyakorlati célokra is a leghasználatosabbak.



- B) Strukturális modellek: ugyancsak kémiai reakcióként értelmezik a fermentációs folyamatot, de a sejttömeg mint szerkezetileg és funkcionálisan megkülönböztethető részek összege szerepel. E finomabb strukturális egységek – funkciójuknak megfelelően – lépnek kölcsönhatásba a környezet tápanyagaival: a biotikus fázis komponensei reagálnak az abiotikus fázis komponenseivel és egymással, így a reakciók eredménye újabb sejttömeg, ill. strukturális részei, továbbá az abiotikus fázis termék komponensei. A strukturális fermentációs matematikai modellek kevésbé ismertek és elterjedtek, amely egyrészt magyarázható a kezelésükhöz szükséges matematikai apparátus komplexségével, másrészt nehezebb interpretálhatóságukkal.



Mindkét fent érintett matematikaimodell-csoportosítás egyaránt vonatkozhat szakaszos és folytonos fermentációs rendszerekre is. E műveleti (technikai kivitel) szempontú osztályozás jelentheti

⁴⁸ H. M. Tsuchiya, A. G. Fredrickson and R. Aris: Dynamics of Microbial Cell Populations, in Advances in Chemical Engineering Vol.6. AP 1966, TB Drew ed.

egyben a harmadik modelcsoportosítási módot is, azonban ki kell emelni, hogy a műveleti besorolás alárendelt az előzőekkel szemben, hiszen valamely konkrét fermentációs matematikai modell esetében csak az anyagmérleg-egyenletek formái térnek el a két modelltípustól.

Ezen áttekintő bevezető után meg fogjuk vizsgálni az említett modelcsoportok tartalmi jegyeit a néhány csoport reprezentáció bemutatásán keresztül.

4.4.3. *Struktúra nélküli modellek (szakaszos rendszerek)*

4.4.3.1. *Monod -modellcsalád*

A legismertebb és immár klasszikusnak mondható a Jacques Monod által kidolgozott fermentációs kinetikai modell, amelynek legfontosabb tulajdonságaival a 4.1. alfejezetben megismerkedtünk. A mai napig a legtöbb fermentációs modell a Monod-modellen alapul, de a merőben új elvekre épülő modellek is legalább határesetekben érintkeznek vele.

Monod szerint a sejttömeg növekedését kifejező konstitutív összefüggés:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu_x x, \quad (4.62)$$

vagyis a növekedés olyan autonóm folyamat, amelynek sebessége a pillantnyi sejttömeg-koncentráció függvénye. (4.62) összefüggést minden Monod alapú, de valójában minden egyéb matematikai modell alapjának is tekinthetjük. Ezen egyenlet csak állandó μ_x esetén oldható meg, és ez csak a növekedés egy időben korlátozott szakaszában, az exponenciális növekedés fázisában érvényes. Az exponenciális szakaszt a korlátozatlan kiegyensúlyozott növekedés jellemzi. Feltéve, hogy ezen exponenciális növekedési szakasz korlátozott időtartamát az okozza, hogy egy nélkülözhetetlen tápanyag már nem áll kellő mennyiségben a sejtek rendelkezésére, Monod e *limitáló szubsztrátnak* a fajlagos növekedési sebességre gyakorolt hatását a Michaelis–Menten-enzimkinetika analógiájára a következőképp modellezte:

$$\mu_x = \mu_{x\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (4.4)$$

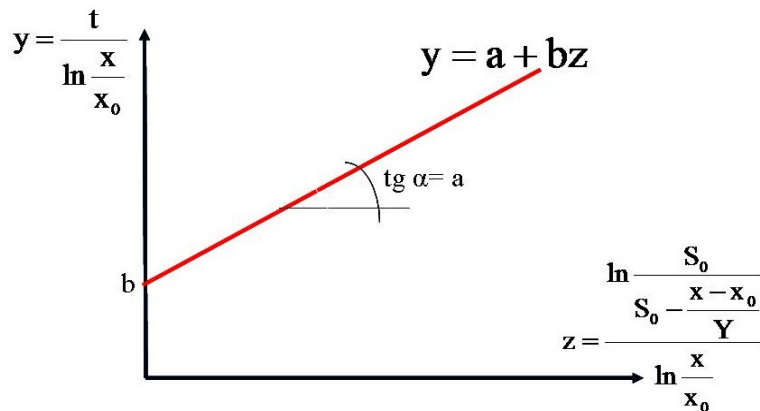
A Monod-modell tehát a fermentációs rendszert két komponense, az x és S közötti enzimes reakcióként modellezi, ahol x valamiféle totális enzimaktivitásként jelenik meg. Felhasználva az eredő hozam fogalmát is, felírhatjuk a Monod-modell teljes konstitutív egyenletrendszerét:

$$\begin{aligned} r_x &= \frac{dx}{dt} = \mu_{x\max} \frac{S}{K_S + S} x \\ r_S &= \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S}} \mu_{x\max} \frac{S}{K_S + S} x \end{aligned} \quad (4.63, 4.64)$$

A modell konstansainak meghatározási lehetőségét a 4.7. ábra grafikus módszerei teremtik meg, amelyekhez azonban a növekedési és szubsztrátfelhasználási görbékből valamilyen módszerrel meg kell határozni a növekedési és szubsztrátfogyási sebességeket, majd a fajlagos sebességeket.

Ezzel szemben a 4.26. ábrán bemutatott módszernél csak a ténylegesen mért x , S és t értékekre van szükség, s így előbbi módszerek szubjektív hibáit nem hordozza. Ehhez tekintsük az ábrán feltüntetett egyenletet az $y = a + bz$ egyenesnek, amely összefüggésben az y és z változók értelmezése az ábrából követhető. Az a tengelymetszet és b iránytangens lineáris regresszióval meghatározható, és igazak az alábbi összefüggések is, amelyeknek segítségével az ismeretlen konstansok kiszámíthatóak (az $Y_{x/S}$ eredő hozamot máshonnan kell ismernünk):

$$\mu_{x\max} = \frac{1}{a-b} \quad K_S = \frac{b}{a-b} \left(\frac{x_0}{Y_{x/S}} \right) + S_0 \quad (4.65, 4.66)$$



4.26. ábra: A MONOD-modell állandóinak meghatározása Muzicsenko szerint

Az eddigiekben az eredeti Monod-féle leírását láttuk mikrobiális rendszerünk kinetikai viselkedésének.

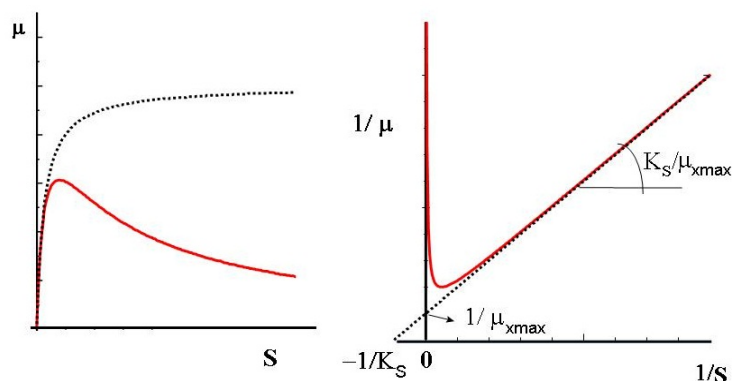
A továbbiakban hasonló alapokon nyugvó (ezért modelleszaládról beszélünk), de más-más szempont szerint attól többé-kevésbé eltérő leírásokat ismerünk meg, illetve kiegészítjük tárgyalásunkat a termék képzéssel is.

Bizonyos esetekben, bár az S limitálja a növekedést, nagy koncentrációban alkalmazva ellenkező, növekedést inhibeáló hatása lehet. E jelenség leírására többféle modellváltoztatást végeztek, de mindegyik az alábbi általános formában fejezhető ki:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu_{x\max} \frac{S}{aS + \frac{S^2}{K_i} + K_S} x \quad (4.67)$$

ahol az a állandó értéke gyakran 1, és K_i a szubsztráthinhibíciót jellemző állandó.

A szubsztráthinhibíció könnyen felismerhető mind a $\mu - S$, mind a $1/\mu - 1/S$ ábrázolások jellegzetes alakjáról, amint a 4.27. ábrán láthatjuk.



4.27. ábra: Szubsztráthinhibíció és Lineweaver–Burk-ábrázolása

A Monod-modell továbbfejlesztési lehetőségét bizonyítja, hogy segítségével leírható az olyan bonyolultabb fermentációs rendszer is, ahol egyidejűleg két vagy akár több tápanyagnak a fermentációban mérhető koncentrációja is limitálja a növekedést.

A Monod-modell n különböző limitáló szubsztrátra kiterjesztett változatának konstitutív egyenleteire három megközelítés is lehetséges:

a) interaktív vagy multiplikatív leírás:

$$\mu_x = \mu_{x\max} \frac{S_1}{K_{s1} + S_1} \frac{S_2}{K_{s2} + S_2} \dots \frac{S_n}{K_{sn} + S_n} \quad \mu_x = \mu_{x\max} \prod_{i=1}^n \frac{S_i}{K_{si} + S_i} \quad (4.68)$$

b) additív leírás

$$\mu_x = \mu_{x\max} \cdot \left(w_1 \frac{S_1}{K_{s1} + S_1} + w_2 \frac{S_2}{K_{s2} + S_2} \dots + w_n \frac{S_n}{K_{sn} + S_n} \right) \quad (4.69)$$

ahol a w -k súlyfüggvények, amelyeket a következőképpen számíthatunk:

$$w_j = \frac{\frac{K_j}{S_j}}{\sum_{i=1}^n \frac{K_i}{S_i}} \quad (4.70)$$

c) nem interaktív leírás:

$$\mu = \mu(S_1) \quad \text{vagy} \quad \mu = \mu(S_2) \quad \text{vagy} \quad \dots \quad \mu = \mu(S_n) \quad (4.71)$$

Utóbbiban az egyes függvények Monod szerintiek, és azt alkalmazzák, amelyik a legkisebb fajlagos növekedési sebességet jósolja.

Jegyezzük meg, hogy noha egyrészt a szakirodalomban az interaktív forma a legelterjedtebb, valamint az vezethető le egyedül enzimkinetikai alapon, mégis a gyakorlatban sokszor az additív összefüggések adnak jobb illeszkedést a kísérleti eredményekhez.

A két limitáló szubsztrát egyidejű hatása gyakran érvényesül az aerob fermentációk esetében, ahol a limitáló C-forrás mellett gyakran az oldott oxigén koncentrációja is limitálónak válik. Az ilyen két-szubsztrátos kinetika interaktív modellen alapuló konstitutív egyenletei a következők:

$$\begin{aligned} r_x &= \frac{dx}{dt} = \mu_{x\max} \frac{S_1 S_2}{(K_{s1} + S_1)(K_{s2} + S_2)} x \\ r_{S1} &= \frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S1}} r_x \\ r_{S2} &= \frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S2}} r_x \end{aligned} \quad (4.72, 4.73, 4.74)$$

ahol értelemszerűen mindkét szubsztrátra definiálva van az $Y_{X/Si}$ hozam. Ha például S_2 a szén-/energia- forrás és S_1 az oldott oxigén koncentrációja, akkor a (4.73) egyenletet ki kell egészíteni az anyagátviteli taggal is, amely az oxigénnek a fermentáléban való oldódását írja le (lásd részletesen a 4.5. fejezetben):

$$r_{S1} = \frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S1}} \mu_{x\max} \frac{S_1 S_2}{(K_{s1} + S_1)(K_{s2} + S_2)} x + K_L a (S_1^* - S_1) \quad (4.73a)$$

Érdekes eredményre jutunk, ha ez utóbbi egyenletet tüzetesebben megvizsgáljuk. Amennyiben az aktuális oldott oxigén-koncentráció lényegesen kisebb a telítésinél (ez elég gyakori a nagy levegő-igényű, nagy mikrobakonzentrációjú aerob sejt-tömegtenyésztések esetében), valamint figyelembe

vesszük, hogy az aktuális oxigénkoncentráció egy fermentáció folyamán mindig egyensúlyi is (dinamikus egyensúly!), azaz olyan S_1 jön létre, amely mellett az oxigén oldódása egyenlő a mikrobák oxigénfogyasztásával, vagyis:

$$\frac{dS_1}{dt} = 0 \quad (4.73b)$$

Ez a következő egyenlet érvényességét jelenti, ha a kicsiny S_1 -et elhanyagoljuk S_1^* mellett:

$$r_x = \frac{dx}{dt} \cong Y_{x/s} K_L a S_1^* \quad (4.75)$$

Más szóval lineáris növekedési összefüggést kapunk (a jobb oldal közel állandó). Ez lehet az egyszerű magyarázata az exponenciális és hanyatló növekedési fázis között gyakran észlelt egyenes növekedési görbének vagy a kis oxigénátadást biztosító rázott lombikos tenyésztés során gyakran tapasztalt lineáris növekedésnek.

A limitáló szubsztrátnak a növekedési sebességre gyakorolt hatásával kapcsolatban említést kell tenni három olyan matematikai modellről, amelyek formailag különböznek ugyan a Monod-modelltől, de keletkezésük körülményei miatt logikusan itt tárgyalandók. Arról van szó ugyanis, hogy ezek az eredeti Monod-modell néhány esetben tapasztalható nem adekvát volta miatt születtek, annak javítása céljából. Valójában azt feltételezik, hogy a fajlagos növekedési sebesség és a limitáló szubsztrát koncentrációja közötti összefüggést leíró telítési görbe nem Monod szerinti egyszerű hiperbola, hanem a görbét más empirikus függvényekkel közelítik. Ilyenek TEISSIER, MOSER és CONTOIS növekedési modelljei, amelyeknek konstitutív egyenletei sorrendben a következők:

Teissier-egyenlet:
$$\mu = \mu_{x \max} (1 - e^{-K_S}) \quad (4.76)$$

Moser-egyenlet:
$$\mu = \mu_{x \max} \frac{S^n}{K_s + S^n} = \mu_{x \max} (1 + K_s S^{-n})^{-1} \quad (4.77)$$

Contois-egyenlet:
$$\mu = \mu_{x \max} \frac{S}{K_{sx} + S} \quad (4.78)$$

A Moser-egyenlet tekinthető a legáltalánosabbnak a fenti megközelítések közül, és ha $n=1$, akkor átmegy a Monod-egyenletbe. Érdemes megjegyezni, hogy e három egyenlet az eredeti Monod-alapegyenlettel együtt felírható a következő általános differenciálegyenlet formájában is, és ekkor a paraméterek a 4.16. táblázat szerintiek.

$$\frac{d\mu^*}{dS} = K \mu^{*\alpha} (1 - \mu^*)^\beta \quad (4.79)$$

ahol $\mu^* = \mu_x / \mu_{\max}$ a dimenziómentes fajlagos növekedési sebesség.

4.16. táblázat: A MONOD-modell „javításai” egy egyenletben

	α	β	K
Monod	0	2	$1/K_S$
Teissier	0	1	$1/K$
Moser	$1-1/n$	$1+1/n$	$n/K_S 1/n$
Contois	0	2	$1/K_{SX}$

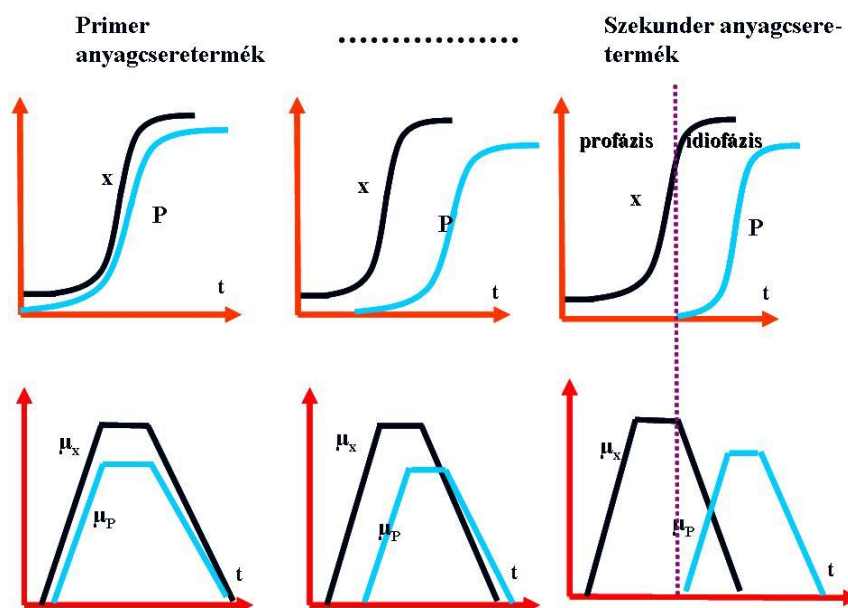
A Monod-modellcsalád részének tekintjük a szakaszos fermentációk termékképződési viszonyait, azaz az r_p konstitutív megfogalmazását leíró egyszerű struktúra nélküli modelleket is, tekintve, hogy az alább ismertetendő termékképződési modellek a növekedés modellezésében Monod követői.

Az első szisztematikus és kinetikai szempontból is korrekt kvalitatív termékképződési modellt Elmer Gaden Jr. adta közre⁴⁹ 1959-ben. Szó szerinti fordításban a következőképpen: „A fermentációk három típusba sorolhatóak a termékképződés szempontjából. **Type I:** olyan folyamatok, amelyekben a főtermék a primer energiametabolizmus eredménye. Az ilyen rendszerek a legáltalánosabbak a régebbi típusú fermentációk között, pl: (1) aerob élesztőtenyésztés (sejttömegtermelések általában), (2) alkoholos fermentáció, (3) a glükóz oxidációja glükonsavvá és (4) disszimilációja tejsavvá.

Type II: olyan folyamatok, amelyekben a fő termék indirekt módon keletkezik az energiametabolizmus során. E típusú rendszerekben a termék nem direkt eredménye a szénforrás oxidációjának, hanem ezek között a metabolit termékek közötti mellékreakcióknak vagy további reakcióknak az eredménye. Példák: (1) citromsav és itakonsav és (2) bizonyos aminosavak képződése.

Type III: olyan folyamatok, amelyekben a fő termék egyáltalán nem az energiametabolizmus során keletkezik, hanem attól függetlenül képződik vagy akkumulálódik a sejt által... Erre az elsődleges példát az antibiotikumok szolgáltatják.”

Ezek a típusok jól megkülönböztethetők egymástól, ha a fajlagos növekedési sebességnek és a fajlagos termékképződési sebességnek az idő függvényében történő lefutását vizsgáljuk a 4.28. ábra szerint. Az I. típusba sorolható termelés esetén a két görbe időben együtt fut, a **III. típus** esetén a növekedés és a termékképződés időben teljesen elválik egymástól. Más szóval a termékképződés az *idiofázisban* történik. A **II. típusban** pedig van eltérés a két görbe időbeni lefutásában, a termék nem teljesen paralell képződik a sejttömeggel, hanem a növekedés egy későbbi fázisában kezdődik el. Ez mintegy vegyes típusként értelmezhető.



4.28. ábra: Gaden-féle termékképződési típusok

A Gaden-féle csoportosítással többé-kevésbé harmóniában van a legismertebb termékképződési kinetikai modell, amely Luedeking és Piret⁵⁰ nevéhez fűződik, és egyidejűleg született avval. A termékképződést modellező konstitutív egyenletük a következő:

⁴⁹ Elmer L. Gaden, Jr.: Fermentation Process Kinetics, J. of Biochem. and Microb. Technol and Eng. 1(4) 413–429 (1959).

⁵⁰ Luedeking R., Piret E. L.: Kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. J. Biochem. and Microbiol. Technol. and Eng. 1(4), 393(1959)

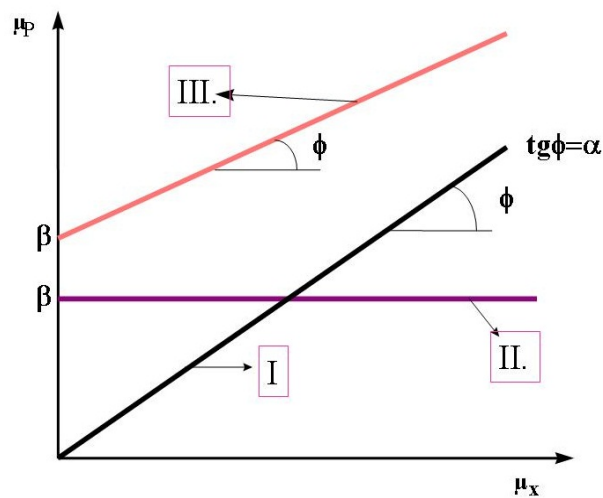
$$r_p = \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x \quad (4.80, 4.81)$$

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \mu_p = \alpha \mu_x + \beta$$

Az α és β konkrét értékei szerint a fermentáció három típusba sorolható a termékképződés szempontjából, mégpedig:

I. típus: $\alpha > 0$ és $\beta = 0$	növekedéshez kötött termékképződés
II. típus: $\alpha = 0$ és $\beta > 0$	növekedéshez nem kötött termékképződés
III. típus: $\alpha > 0$ és $\beta > 0$	vegyes típusú fermentáció

A Luedeking–Piret-kinetika jellemző grafikus ábrázolása és egyben az α ill. β állandók grafikus meghatározási lehetősége a 4.29. ábrán látható.



4.29. ábra: Luedeking–Piret-féle termékképződési típusok

Gyakran a termékképződési modell a toxikus metabolit termékek növekedésre gyakorolt hatásának leírására is szolgál. Ilyen termékkinhibíciós hatást már Hinshelwood⁵¹ is modellezett a következőképpen:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu_{x\max} (1 - \alpha P) x \quad (4.82, 4.83)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} = \beta x$$

Toxikus metabolit terméknek a haszontermék képződésére, illetve a haszonterméknek a saját képződésére gyakorolt hatását is többen modellezték. E modellek közül FRIEDMAN és GADEN, ill. AIBA és munkatársai modelljeire térünk ki. Az előbbi szerzők a Luedeking–Piret kinetikai egyenlet módosítása alapján a következő összefüggéseket nyerték a *Lactobacillus delbrückii* tejsav-fermentációjára:

$$\mu_p = \alpha \mu_x + \beta - \gamma P' \quad (4.84)$$

ahol P' a haszontermék ($=P$) vagy az inhibitortermék ($=I$) koncentrációja és γ állandó.

⁵¹ Sir Cyril Norman Hinshelwood *The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell* (1946) c. könyvében.

Aiba és munkatársai modellje a termék hatását a fajlagos növekedési sebességre exponenciális függvénnyel veszi figyelembe (alkoholfermentáció)

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu_{x,\max} \frac{S}{K_s + S} e^{-k_i P} \cdot x, \quad (4.85)$$

amelyben k_i az inhibíciót jellemző empirikus állandó.

Gyakran a termék-inhibíciót az enziminhibíciók analógjaiként tárgyalják, kompetitív vagy nem kompetitív inhibíciót feltételezve:

$$\text{Kompetitív termék-inhibíció esetén: } \mu_x = \mu_{x,\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S} \quad (4.86)$$

$$\text{Nemkompetitív termék-inhibíció esetén: } \mu_x = \mu_{x,\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_s}{S}\right) \left(1 + \frac{P}{K_p}\right)} \quad (4.87)$$

Az élesztők által végzett etanolfermentáció jó példája a nem kompetitív termék-inhibíciónak is, ha az etanol koncentrációja meghaladja az 5%-ot.

4.4.3.2. Az általánosított logisztikus egyenlet mint segédmodell

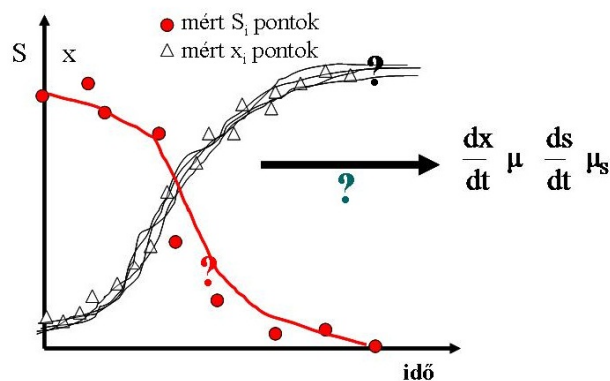
A modellillesztés gyakori és a számítástechnika nélküli múltban szinte kizárólag alkalmazott útja a formulák kísérletesen meghatározható mennyiségei között lineáris kapcsolatok keresése, a modellek linearizálása, majd a legkisebb négyzetek módszerének alkalmazása. Jó példa erre az enzimkinetikában széleskörűen alkalmazott Lineweaver–Burk-féle ábrázolásmód vagy a fermentációs termékképződési viszonyok klasszikus, Luedeking–Piret-féle tárgyalásmódja. E módszerek közös problémája és gyenge pontja azonban, hogy a folyamatok sebességeivel operálnak, és ezek a sebességek az esetek nagy többségében kísérletileg nem mérhető mennyiségek. Egy matematikai modell és az ábrázolható linearizált kapcsolatok általában

$$\frac{dc_i}{dt} = \phi(c_1 \dots c_n, a_0 \dots a_m, t) \quad (4.88)$$

alakúak, ahol c_i a rendszer i -edik anyagának koncentrációja és a_j a meghatározandó állandók.

Ezzel szemben a mérések eredményei általában c_i -t értékpárok sorozatából állnak (lásd a 4.30. ábrán a növekedési „görbét”, amely csak pontjaiban adott). Felmerül a kérdés, hogyan differenciáljuk a kísérletileg nyert c_i -t görbéket. Általánosan alkalmazott eljárás a c_i -t mért értékek ábrázolása, a pontok közé folytonos görbe berajzolása, majd grafikus differenciálás differenciahányados képzésével.

Nem igényel bizonyítást, hogy néhány c_i -t pontpár közé végtelenféleképpen húzhatunk „idealizált” görbét, és az sem, hogy az ezt követő grafikus differenciálás csak megnöveli az így elkövetett szubjektív hibát. Fokozottan érvényes e megállapítás a fermentációs kinetikai számítások esetében, ahol tudvalevőleg a munkai igényes analitika miatt kevés kísérleti pontunk van, és a kísérleti módszerek hibája is jó, ha 1% körüli, de gyakran 5–10% is lehet.



4.30. ábra: Pontjaikban adott kísérleti „fermentációgörbék”

Könnyen megoldható a probléma, ha kinetikai modellünk

$$c_i = f_i(a_0, a_1 \dots t) \quad (4.89)$$

alakú, mert ekkor a lineáris vagy nemlineáris regressziószámítás közvetlenül alkalmazható a mérési eredmények c_i -t sorozatára. Ilyen explicit matematikai modell azonban ritkán áll rendelkezésünkre. Ha modellünk analitikusan nem megoldható differenciálegyenlet-rendszer, manapság akkor sem jelent megoldhatatlan problémát a paraméterek optimális meghatározása, de az alkalmazott numerikus – és így feltétlenül számítógépi megoldást igénylő – algoritmusok felhasználása mellett szükség van a kinetikai összefüggések fenti, sebességeken alapuló számítására is. Annál is inkább, mert az ilyen összefüggések a modell felállításban is, a kvalitatív kép megszerzésében is hasznosak lehetnek, nem csak a paraméter-bebecslési munka során.

Az említett okok miatt fermentációs kinetikai kísérleti *adataink modellépítés előtti értékelésére* olyan segédmodellt alkalmazunk, amely a fenti formájú. E segédmodellt formálisan használjuk, függetlenül attól, hogy milyen munkamodellt építünk vagy használunk fel rendszerünk tényleges leírására. Számítási segédeszköz tehát csupán, amellyel csak a „görbeidealizálás”, adatanalízis munkáját kívánjuk szubjektív hibáktól mentessé tenni.

Milyen követelményeket támasztunk egy ilyen segédmodellel szemben?

1. Analitikusan kezelhető, zárt formájú függvénykifejezés legyen, amely az idő függvényében kifejezi a mikrobakoncentrációt és/vagy termék(ek) koncentrációját és/vagy a felhasznált szubsztrát(ok) koncentrációját.
2. Legyen folytonos és folytonosan differenciálható, hogy a nem mérhető sebességek is számíthatóak legyenek tetszőleges időpontban.
3. Ne tartalmazzon túl sok paramétert, és a paraméterek mindegyikének vagy legalább néhányának legyen fizikai értelme is. (Ez nem elengedhetetlenül szükséges feltétel, tekintve, hogy segédmodellről van szó, de hasznos, ha teljesül.)
4. Egy egyenlet írja le a teljes szakaszos fermentáció ciklusát.
5. Legyen flexibilis, azaz sokféle típusú fermentációhoz ugyanaz az egyenlet legyen illeszthető.

E követelményeknek látszólag megfelel egy n -ed fokú polinom. Ismeretes, hogy m kísérleti ponton átfektethető egy $m-1$ fokú parabola. Csakhogy így az illesztett görbe minden ponton átmegy, és két-két pont között inflexiós pontok vagy lokális szélsőértékek lehetségesek, tehát éppen arra nem használható, amire szeretnénk. Alacsonyabb fokú polinomok alkalmazása viszont nem feltétlenül lesz eléggé flexibilis.

Jó és általánosan alkalmazható segédmodellnek bizonyult az EDWARDS és WILKE által fermentációk kinetikai modellezésére elsőként alkalmazott, úgynevezett általánosított logisztikus egyenlet, amelyet a *mikrobanövekedés leírására* alkalmaztak.

A mikrobanövekedés leírása az általánosított logisztikus egyenlettel

TSHUCHIYA, FREDRICKSON és ARIS szerint abból a feltételezésből, hogy a növekedési sebesség csak a pillanatnyi mikrobakoncentrációtól függ adott időben (=autonóm rendszer), azaz

$$r_x = \frac{dx}{dt} = r_x(x) \quad (4.90)$$

megkapható mind a Monod szerinti, mind a logisztikus egyenlet szerint, feltéve, hogy az r_x függvény x változását tekintve folytonos, sorba fejthető (McLaurin-sor) az $x = 0$ helyen. Ha a sorfejtésben az első tagnál megállunk, a Monod-modellt, ha a másodrendű tagot is figyelembe vesszük, a logisztikus egyenletet nyerjük.

$$r_x = r(\xi) + \frac{dr(\xi)}{dx} \cdot (x - \xi) + \frac{1}{2} \frac{d^2r(\xi)}{dx^2} \cdot (x - \xi)^2 + \Theta(x - \xi)^2 \quad (4.91)$$

(Ebben a közelítésben az utolsó, Θ , egy hibatag.)

Mivel sejt csak a már jelen lévő sejtekből képződhet, így $x = 0$ esetben biztosan $r(0) = 0$, tehát

$$0 = r(\xi) + \frac{dr(\xi)}{dx} \cdot (-\xi) + \frac{1}{2} \frac{d^2r(\xi)}{dx^2} \cdot (-\xi)^2 + \Theta(-\xi)^2 \quad (4.92)$$

Tekintsük a 4.31. ábrát, ahol a szokásos $dx/dt-x$ diagramban az esetünknek megfelelő képet rajzoltuk fel (ez a diagram a 4.3. ábrán is látható elfordított alakban). Mivel ξ -t tetszőlegesen vettük fel, az előző összefüggés $\xi = x$ helyen is érvényes, így mivel

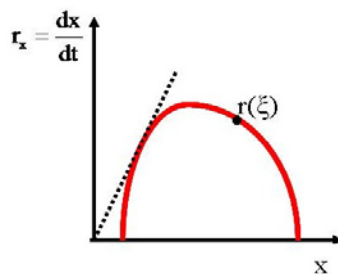
$$\frac{dr(\xi)}{dx} = \frac{dr(x)}{dx} = \frac{dr}{dx} \quad (4.93)$$

írhatjuk a következőket:

$$0 = r - \frac{dr}{dx} x + \frac{1}{2} \frac{d^2r}{dx^2} x^2 \quad (4.94)$$

Megszorozva 2-vel, elosztva x^2 -tel és átrendezve, a következő másodrendű Euler-típusú lineáris, homogén, változó együtthatójú differenciálegyenletet nyerjük:

$$\frac{d^2r}{dx^2} - \frac{2}{x} \frac{dr}{dx} + \frac{2}{x^2} r = 0 \quad (4.95)$$



4.31. ábra: $r(\xi)$ bárhol választható a sebességi görbén

A z segédváltozót a $x=e^z$ definíció szerint bevezetve, és felhasználva a bevezetésből adódó következő összefüggéseket egy állandó együtthatós differenciálegyenlethez jutunk:

$$\frac{dz}{dx} = \frac{1}{x} = e^{-z} \quad \ln x = z \quad (4.96)$$

$$\frac{dr}{dx} = \frac{dr}{dz} \frac{dz}{dx} = \frac{dr}{dz} e^{-z} \quad \text{és} \quad \frac{d^2r}{dx^2} = \frac{d^2r}{dz^2} e^{-2z} - \frac{dr}{dz} e^{-2z} \quad (4.97)$$

$$\frac{d^2r}{dz^2} - 3 \frac{dr}{dz} + 2r = 0 \quad (4.97)$$

Ennek ún. karakterisztikus egyenlete és annak megoldása a következő:

$$\lambda^2 - 3\lambda + 2 = 0 \quad \lambda_{1,2} = \frac{3 \pm \sqrt{9-8}}{2} \quad \begin{matrix} = 1 \\ < \\ = 2 \end{matrix} \quad (4.98)$$

Így végül a differenciálegyenlet általános megoldása (visszahelyettesítve az eredeti változót is):

$$r = C_1 e^z + C_2 e^{2z} = C_1 x + C_2 x^2 \quad (4.99)$$

Amelyben a C_1 és a C_2 tetszőleges állandók. Emeljük ki x -et! És legyen $C_1/C_2 = -\beta$ és $C_1 = \mu$, ekkor

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu \beta x \left(\frac{1}{\beta} - x \right) = \mu x (1 - \beta x) \quad (4.100)$$

Ez a Verhulst–Pearl-féle *logisztikus differenciálegyenlet*, amelynek megoldása x -re a következő:

$$x = \frac{\frac{1}{\beta}}{1 + \frac{\frac{1}{\beta} - x_0}{x_0} e^{-\int_0^t \mu dt}} \quad (4.101)$$

Mivel $\lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = \frac{1}{\beta}$ ezért logikus, hogy $\beta \equiv x_{\max}$.

Ezt behelyettesítve (4.101)-be, a logisztikus egyenletet kapjuk:

$$x = \frac{x_{\max}}{1 + \frac{x_{\max} - x_0}{x_0} \exp(\mu t)} \quad (4.102)$$

Ha a μ állandó ($=\mu_{\max}$), akkor az exponenciális és a hanyatló fázis leírására alkalmas egyenletünk van, ami tehát ugyanazt „tudja”, mint a MONOD-modell. Ha a gyorsuló növekedés szakaszát is szeretnénk leírni, akkor figyelembe kell vennünk, hogy ezalatt a μ nem állandó, hanem valamilyen függvény szerint nő az időben 0-tól μ_{\max} -ig. A μ fajlagos növekedési sebességet az idő folytonos függvényének tételezzük fel és Taylor sorba fejtjük (az ötlet Edwards és Wilke⁵² nevéhez fűződik)

$$\mu(t) = a'_0 + a'_1 t + a'_2 t^2 + \dots + a'_{n-1} t^{n-1} \quad (4.103)$$

⁵² Edwards W. H., Wilke C. R.: Biotechnol. Bioeng. 10 205 (1968)

Ha ezt behelyettesítjük a (4.102) egyenletbe, megkapjuk az nevezett szerzők által fermentációk leírására elsőként alkalmazott általánosított logisztikus egyenletet (ÁLE):

$$x = \frac{x_{\max}}{1 + \exp(a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^n)} \quad (4.104)$$

Az ÁLE a szakaszos fermentáció növekedési görbéjének minden szakaszát képes leírni a lag szakasz kivételével, ez tehát egy struktúra nélküli növekedési modell, amely a növekedési görbét minden további megfontolás nélkül (pl. nem használja a hozamot, illetve a szubsztráttól függést) *per se* írja le.

Szubsztrátfogyás és termékképződés modellezése az ÁLE-vel

Ha felhasználjuk az eredő hozam definícióját, akkor a következő két összefüggés egyértelmű:

$$\frac{dx}{dS} = Y \quad \text{és} \quad S_0 - S = \frac{1}{Y}(x - x_0) \quad (4.105)$$

ahonnan

$$x = Y \left(S_0 - S + \frac{1}{Y} x_0 \right) \quad (4.106)$$

Ezt a logisztikus differenciálegyenletbe helyettesítve a szubsztrátfogyási sebességre is egy logisztikus differenciálegyenletet nyerünk:

$$\frac{dS}{dt} = -\mu(t) \frac{Y}{x_{\max}} S \left(\frac{x_{\max}}{Y} - S \right) \quad (4.107)$$

Természetesen (4.107) megoldása is (4.104)-hez hasonló, ÁLE alakú. Hasonlóképpen, ha figyelembe vesszük a következő relációkat

$$\begin{aligned} -\frac{dS}{dt} &= \frac{\partial S}{\partial x} \frac{dx}{dt} + \frac{\partial S}{\partial P} \frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_x} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} \\ \text{ha} \quad \frac{\frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt}}{\frac{1}{Y_x} \frac{dx}{dt}} &= \text{állandó} \end{aligned} \quad (4.108)$$

a termékképződésre is levezethető egy logisztikus differenciálegyenlet és annak megoldásaként egy általánosított logisztikus egyenlet.

Látjuk tehát, hogy az ÁLE mind a növekedés, mind a szubsztrátfogyás, mind pedig a termékképződési görbe – azaz a fermentáció ún. elsődleges kinetikai képe – leírására alkalmas. Ennek alapján javasolható egy primer kinetikai kiértékelésére használni a mért kinetikai adatoknak.

Az alábbiakban az ÁLE néhány tulajdonságát adjuk meg, amelyek ismeretében az egyenlet illesztése a kísérleti pontokhoz megvalósítható.

A lag szakaszt az egyenlet nyilvánvalóan nem írja le, ezért annak végére, azaz a gyorsuló növekedési szakasz kezdetére kell transzformálni a fermentáció lefutásának időtengelyét.

1,3 vagy 5 polinom fokszámú alakjában alkalmazzuk; az 1 esetében csak arra képes, mint maga a MONOD-modell, 5 esetén már nagyon flexibilis, akár még a diauxiás növekedési görbe is leírható vele.

Írjuk fel most általános alakban:

$$Z = \frac{Z_{\max}}{1 + \exp(b_0 + b_1 t + b_2 t^2 + b_3 t^3 + \dots + b_n t^n)} \quad (4.109)$$

ahol Z lehet x , S és P_i , valamint Z_{\max} lehet x_{\max} és S_0 vagy $P_{i\max}$.

Az általános alakból látszik, hogy ha b_n negatív, akkor nagy idők esetén ez dominál, és Z tart a Z_{\max} -hoz (emiat alkalmas x és P_i leírására), ha pedig b_n pozitív, akkor Z tart a 0-hoz (ezért alkalmas S leírására).

A paraméterek alkalmas megválasztásával, azaz az egyenletnek kísérleti pontokhoz illesztésével elérhető, hogy a teljes időtartományban az utolsó konstans, azaz b_n dominálva a növekedési, szubsztráfogyási és termékképződési görbék legyenek leírhatóak (természetesen mindegyiket külön-külön illesztve!). Ha az illesztések megtörténtek, azaz modellünk paramétereit identifikáltuk, a zárt formulák alkalmasak sebességeknek, fajlagos sebességeknek és egyéb, a kinetikai értékelésben alkalmazott formuláknak, képleteknek a tetszőleges időpontokban történő kiszámítására.

Az esetenként érdeklődésre számítható deriváltak az alábbiak:

$$\frac{dZ}{dt} = -Z_{\max} [1 + \exp P]^{-2} \cdot \exp P \cdot \frac{dP}{dt} = -Z \left(1 - \frac{Z}{Z_{\max}}\right) \cdot \frac{dP}{dt} \quad (4.110)$$

amiben

$$P = b_0 + b_1 t + b_2 t^2 + b_3 t^3 + \dots + b_n t^n \quad \text{és} \quad \frac{dP}{dt} = b_1 + 2b_2 t + 3b_3 t^2 + \dots + n b_n t^{n-1} \quad (4.111)$$

Az általánosított logisztikus egyenlet illesztése a kísérleti pontokhoz

Az illesztéshez bármely nemlineáris regressziószámítást lehetővé tevő algoritmus, illetve szoftver alkalmas. Ezek úgy működnek, hogy egy kezdeti paraméter-kombinációval számított helyettesítési értékeknek a mért értékektől való eltérését számítják, mégpedig egy-egy ismeretlen hibataggal kiegészítve, majd az így kapott összegzett különbség négyzeteit minimalizálják. Ily módon egy-egy korrekciót számítanak ki az előző becsült paraméterek értékeihez. A korrekciót ezután hozzáadják az előző paraméterekhez, majd ezt az eljárást addig ismétlik (iteráció), amíg egy elhatározott relatív változáson belülre nem kerülnek az utolsó lépésben meghatározott korrekciók (pl. 1%).

Minden ilyen program működéséhez szükséges tehát egy kezdeti (nulladik) paraméter-kombináció becslése. Ez az ÁLE esetében igen egyszerűen történik. Z_{\max} -ot ránézésre becsüljük meg a kísérleti adatokból. A b_i paraméterek becslése egy lineáris egyenletrendszerrel megoldható, azaz pl. Excel táblázatkezelővel is. Ennek algoritmus a következő.

Rendezzük át az ÁLE-t a következő alakba, azaz a polinomot fejezzük ki:

$$(b_0 + b_1 t + b_2 t^2 + \dots + b_n t^n) = \ln \left(\frac{Z_{\max}}{Z} - 1 \right) \quad (4.112)$$

Helyettesítsünk a $t_i, -Z_i$ kísérletileg mért értékek közül annyit az egyenletbe, amennyi a paraméterek száma plusz egy (=n+1), így egy, a paraméterekre nézve lineáris n+1 ismeretlenes egyenletrendszert kapunk, amelynek megoldása szolgáltatja a konstansok első becslő értékeit. Vigyázzunk, hogy a teljes időtartományt fogják át a kiválasztott mérési pontok, valamint minden mért Z érték kisebb legyen, mint az első közelítésnek választott Z_{\max} !

$$(b_0 + b_1 t_1 + b_2 t_1^2 + \dots + b_n t_1^n) = \ln \left(\frac{Z_{\max}}{Z_1} - 1 \right)$$

$$(b_0 + b_1 t_2 + b_2 t_2^2 + \dots + b_n t_2^n) = \ln \left(\frac{Z_{\max}}{Z_2} - 1 \right)$$

$$(b_0 + b_1 t_3 + b_2 t_3^2 + \dots + b_n t_3^n) = \ln \left(\frac{Z_{\max}}{Z_3} - 1 \right)$$

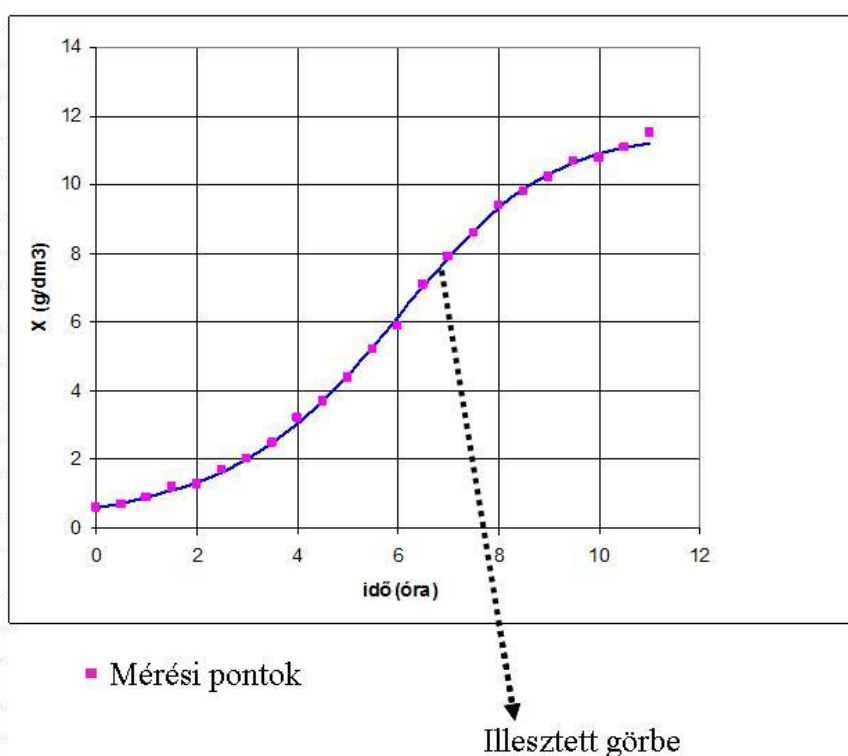
M
⋮

$$(b_0 + b_1 t_n + b_2 t_n^2 + \dots + b_n t_n^n) = \ln \left(\frac{Z_{\max}}{Z_n} - 1 \right)$$

Az így kapott lineáris egyenletrendszer megoldható, eredményeit pedig a nemlineáris regressziószámítás nulladik közelítéseként használjuk fel. Példát láthatunk az illesztésre a 4.32. ábrán.

idő (óra) $x_{\text{mért}}$ $x_{\text{számított}}$
 g/dm³

0	0,6	0,621834
0,5	0,7	0,747009
1	0,91	0,903595
1,5	1,2	1,099573
2	1,3	1,344526
2,5	1,7	1,649525
3	2	2,026625
3,5	2,5	2,48772
4	3,2	3,042515
4,5	3,7	3,695547
5	4,4	4,442597
5,5	5,2	5,267521
6	5,9	6,141145
6,5	7,1	7,023778
7	7,9	7,871608
7,5	8,6	8,64513
8	9,4	9,316395
8,5	9,8	9,872399
9	10,2	10,31408
9,5	10,7	10,65239
10	10,8	10,90357
10,5	11,1	11,08521
11	11,5	11,21363



4.32. ábra: ALE illesztése kísérleti pontokhoz.

4.4.3.3. A gombanövekedés kinetikája

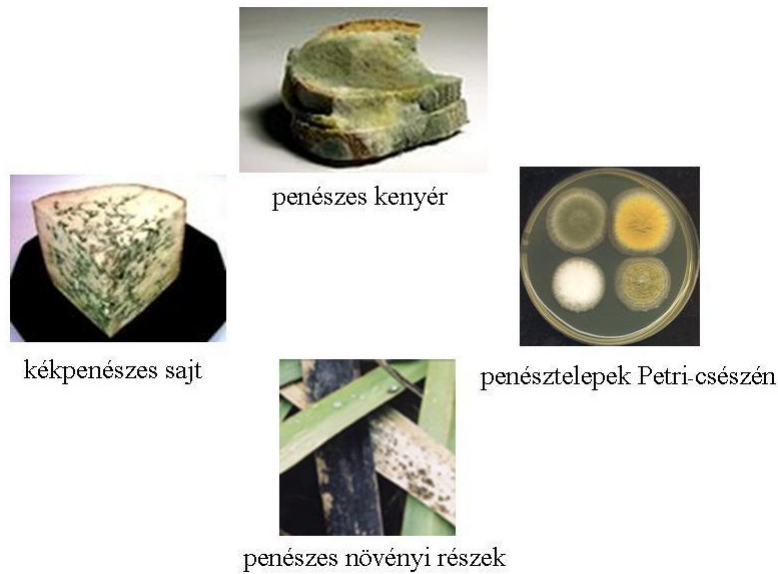
A fonalas gombák jellegzetes növekedési mintázatot követnek attól függően, hogy milyen körülmények között tenyésztik őket. [Szubmerz](#) körülmények között hifafonadékokat alkotnak, amely átszővi a fermentlevet, s annak bizonyos körülmények között jellegzetes reológiai karaktert adnak (lásd a [4.5.7. alfejezetet](#)).

A micéliális növekedés leírására leginkább a formális Monod-modellt alkalmazzák, ami többé-kevésbé jól leírja a növekedést, noha tudjuk, hogy a hifafonalak fonálvégi hosszirányú növekedéssel gyarapodnak.

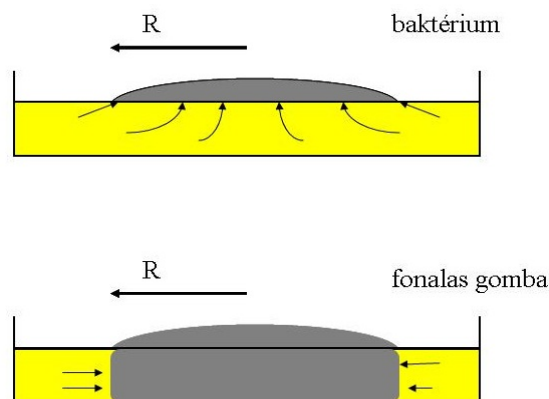
A felületi kétdimenziós növekedést, amelynek néhány esetét a 4.33. ábrán láthatjuk, a Petri-csészében történő növekedés modelljével közelíthetjük leginkább. Ezt az jellemzi, hogy a telepsugár növekedési sebessége gyakran állandó:

$$\frac{dr}{dt} = k \quad (4.113)$$

A gombatelepek kétdimenziós növekedése Petri-csészében eltér a baktériumokétól, míg utóbbiak csak a felületen növekednek, addig a gombák a teljes táptalajmélységből veszik fel tápanyagaikat, és át is szövik azt, amint sematikusan láthatjuk a 4.34. ábrán. Természetesen csak addig állandó k , ameddig valamely táptalajkomponens nem válik limitálónak (ez azonban nem következik be egy Petri-csésze teljes felületének teleppel való benövéséig).



4.33. ábra: Felületi fonalas gomba növekedés néhány esete



4.34. ábra: Petri-csészén a baktériumok és a fonalas gombák eltérően növekednek

Ha a (4.113) megfigyelést mikrotömeg szerinti növekedésre akarjuk lefordítani, írjuk fel először egy r sugarú és h magasságú fonalas gombatelep tömegét:

$$X = r^2 \pi \cdot h \cdot \rho \quad (4.114)$$

amelyben ρ a telep sűrűsége. Ha a telep nő, mind a sugár, mind a tömege növekszik, a növekedés sebessége pedig

$$\frac{dX}{dt} = 2\pi r h \rho \frac{dr}{dt} \quad (4.115)$$

Ha a (4.114)-ből r -et kifejezzük és (4.113)-mal együtt a (4.115) egyenletbe helyettesítjük, megkapjuk a teleptömeg növekedésének sebességét.

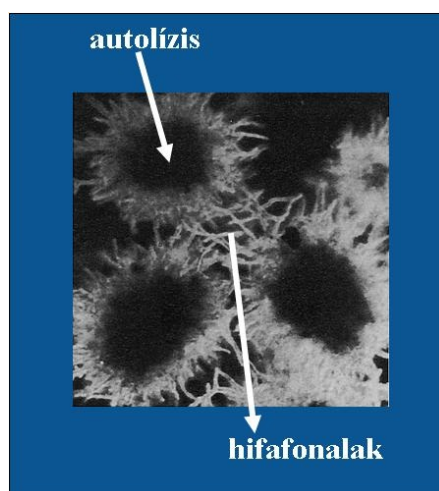
$$\frac{dX}{dt} = 2\pi h k \rho \left(\frac{X}{\pi h \rho} \right)^{1/2} \quad (4.116)$$

Ha ezt integráljuk, eredményül egy négyzetes időbeli változást mutató növekedési görbét kapunk:

$$X = (\psi t + X_0^{1/2})^2 \quad \text{amelyben} \quad \psi = k(\pi h \rho)^{1/2}, \quad (4.117)$$

E kétdimenziós telepnövekedéstől különbözik a gombanövekedés harmadik lehetséges formája, az ún. göbös (pelletes) növekedés (lásd 4.35. ábra), amely bizonyos gombáknál szubmerz körülmények között fordul elő. A göbök tulajdonképpen kompakt vagy laza háromdimenziós hifafonal-szövedékek, amelyek igen kicsiny (búzagrízszerű és nagyságú) mérettől egészen nagy amorf (akár egy teljes rázólabdikot kitöltő) méretekig növekedhetnek. Növekedésük során a kicsiny szemcsék gömb-szimmetrikusak és tömörek vagy „szőrösök”, ahogy nőnek előbb-utóbb a göbök belsejében lévő sejtek tápanyaghiány (pl. oxigén-) miatt lizálni kezdenek, ezért egyre nagyobb folyadéktérfigat tölti ki belsejüket, és így a tömör göb gömbhéj szerkezetűvé alakul át. A még kompakt göbök növekedésére a kétdimenziós gondolatmenethez hasonlóan levezetve az alábbi harmadfokú időfüggvényt nyerhetjük, amely tehát harmadfokú növekedési görbét jósol:

$$X = \left(\frac{\varphi t}{3} + X_0^{1/3} \right)^3, \quad \text{amelyben} \quad \varphi = k(\pi h \rho)^{1/3} \quad (4.118)$$



4.35. ábra: *Penicillium* göbös morfológiája

A göbös növekedést többféle környezeti hatás is kiválthatja, nincs általános elmélet erre. Például, ha a konidiospórák összetapadnak, és egyidőben csíráznak ki, és a képződő hifafonalak egymásba gabalyodva növekednek vagy bizonyos tápanyagsokk, sók, tápanyaghiány stb. okozhatják ezt a speciális gombanövekedést. Vannak olyan ipari fermentációk, amelyeknél ez a növekedési forma a kívánatos (pl. citromsav-fermentáció).

4.4.4. Strukturális modellek

4.4.4.1. Általános strukturális modell

A struktúra nélküli matematikai modellek a fermentációs rendszer élő anyagát szerkezet nélküli sejtömegnek tekintik. Az e fejezetben ismertetett strukturális matematikai modellek valamivel mélyebben bemutatják a rendszert felépítő sejtek biológiai sajátosságait. Minőségileg finomabb modellezést jelent, ha modellünk számításba veszi, hogy a sejtömeg nem valamiféle totális enzimaktivitást képvisel, hanem szerkezetileg, funkcionálisan megkülönböztethető részekből épül fel.

Tehát míg a struktúra nélküli modellek a sejtömeget x , belül ismeretlen, homogén, valamely tulajdonságokkal rendelkező „fekete dobozként” fogják fel, addig a most tárgyalandó strukturális modell- család esetében helyesebb lenne „szürke dobozról” beszélni: tudjuk, hogy különböző kémiai anyagok építik fel a sejtömeget, néha figyelembe vesszük, hogy ezek hogyan alkotnak funkcionálisan elkülöníthető sejtstruktúrákat, ennyiben már a doboz belsejébe tekintettünk.

Az általános strukturális modell a következőképpen alakítható ki. Repräsentálja fermentációs rendszerünk jellemző fiziológiai állapotát az, hogy milyen komponensekből és milyen mennyiségben épül fel. Az x sejtömeg tehát

$$X = (x_1, x_2, \dots, x_j, \dots, x_B) \quad (4.119)$$

komponensekből, ugyanilyen módon jelölt mennyiségekkel épül fel, az úgynevezett fiziológiai állapotátározó vektor tehát (4.119), ahol B jelenti a modellezésbe bevont biológiai változók számát.

A teljes biomassa mennyisége így

$$x = \sum_{j=1}^B x_j \quad (4.120)$$

Az x_j elemek jelenthetik a fehérjék, nukleinsavak, ATP, szerkezeti anyagok stb. biomasszában levő koncentrációit és/vagy jelenthetnek összefoglaló, közelebről nem definiálható mennyiségeket, pl. „genetikus anyag”, „szintetikus anyag” stb.

Az x definiálásához hasonlóan definiáljuk az e vektort, amely jelentse a biomassa környezetének (sejtmentes fermentálé) szubsztrát és termék jellegű, extracelluláris, abiotikus fázis komponenseit:

$$e = (e_1, e_2, \dots, e_A) = (S_1, S_2, \dots, S_N, P_1, P_2, \dots, P_M) \quad (4.121)$$

ahol A jelenti az abiotikus fázis modellezésbe bevont komponensei számát, amelyből N szubsztrát és M termékfajtát különböztetünk meg ($N + M = A$).

Tegyük fel, hogy R különböző biokémiai reakció játszódik le az abiotikus fázis és a biotikus fázis komponensei között. Ha a k -adik ilyen reakcióban az abiotikus fázis i -edik (e_i) komponensének A_{ki} mennyisége vesz részt, akkor A_{ki} nem más, mint e komponens k -adik reakcióban érvényes „sztöhiometriai koefficiense”. Ha r_k a k -adik reakció sebessége (elemi sebessége, azaz egységnyi anyagszámok között végbemenő reakció sebessége), akkor $A_{ki} \cdot r_k$ jelenti a k -adik reakcióban az e_i „képződési sebességét”. Az összes reakcióban tehát e_i az alábbi sebességgel „képződik”:

$$\sum_{k=1}^R A_{ki} r_k \quad (4.122)$$

Hasonlóan x_j komponens sztöhiometriai együtthatója a k -adik reakcióban B_{kj} , így x_j e reakcióban $B_{kj} r_k$ sebességgel képződik. Az összes reakcióban x_j „képződési sebessége”, tehát

$$\sum_{k=1}^R B_{kj} r_k \quad (4.123)$$

A strukturális modellek általános differenciálegyenleteit úgy kapjuk, hogy minden komponensre alkalmazzuk az anyagmegmaradás elvét. Az abiotikus fázisra az anyagmegmaradási mérlegegyenlet általános esetben (folytonos, tökéletesen kevert reaktorra)

$$\frac{de_i}{dt} = \frac{f_i}{V} (e_{ibe} - e_i) + \sum_{k=1}^R A_{ki} r_k, \quad (4.124)$$

ahol $i=1,2,\dots,A$,
míg a biotikus fázisra hasonlóan

$$\frac{dx_j}{dt} = \frac{f}{V} (x_{jbe} - x_j) + \sum_{k=1}^R B_{kj} r_k \quad (4.125)$$

ahol $j=1,2,\dots,B$.

Áttérve a vektor-mátrix jelölésmódra, és szakaszos tenyésztésre szűkítve a tárgyalást, a két anyagmegmaradási egyenlet:

$$\frac{d\mathbf{e}}{dt} = \mathbf{r} \cdot \underline{\mathbf{A}} \quad (4.126)$$

$$\frac{d\mathbf{x}}{dt} = \mathbf{r} \cdot \underline{\mathbf{B}} \quad (4.127)$$

amelyekben az $\underline{\mathbf{A}} = [A_{ki}]$ és $\underline{\mathbf{B}} = [B_{kj}]$ a sztöhiometriai mátrixok.

A reakciósebesség-vektor pedig

$$\mathbf{r} = (r_1, r_2, \dots, r_k, \dots, r_R) \quad (4.128)$$

A strukturális modellek felállításának tehát – hasonlóan a struktúra nélküliekhez – az r_k komponensek tényleges modellezése, matematikai leírása jelenti a szűk keresztmetszetét. Az r_k megformulálásában itt is a tömeghatástörvény és a transzportfolyamatok kinetikai összefüggései jelentik a felhasználandó konstitutív elveket. Ezek általánosságban az

$$r = r(\mathbf{x}, \mathbf{e}) + \text{átadási sebesség} \quad (4.129)$$

alakban fogalmazhatók meg.

Jegyezzük meg, hogy a strukturális modellek is a sejttömegmodellek közé tartoznak, azonban találkozhatunk bennük sejt számmodell-elemekkel is. A strukturális modellekben ugyanis gyakran szerepelnek olyan x_j komponensek, amelyek „nukleinsavat”, „genetikai anyagot” stb. jelentenek, amelyek mennyiségeinek arányosságát a sejtszámmal ezek a modellek feltételezik.

4.4.4.2. Williams-modell

A felépítésében legegyszerűbb strukturális modellt Williams fejlesztette ki⁵³, s ezt itt mint példát ismertetjük, az általános strukturális modell könnyebb megértése céljából.

A sejttömeget két ($B=2$) funkcionálisan megkülönböztethető részből összetettnek tételezzük fel:

x_1 : a sejttömeg „szintetikus része”, amely a környezet egyetlen, a növekedést limitáló tápanyagát ($A=1$, $e=[S]$) felveszi, és egy sor kémiai reakcióban, amelyeket a modell nem vizsgál,

⁵³ F. M. Williams: Journal of theoretical Biology 15, 190 (1967)

átalakítja. Az x_1 tehát az S tápanyaggal „táplálkozik” és úgy képzelhetjük el, mint a sejttömeg kis móltömegű anyagainak és az ezek átalakításában részt vevő enzimeknek az összességét.

x_2 : a sejttömeg úgynevezett „strukturál-genetikus” része, amely az x_1 asszimilált anyagaival „táplálkozik” és a sejtek önreprodukciójáért felelős. Világos, hogy duplázódás csak akkor jön létre a biomasszán belül, ha ez az x_2 biomasszatömeg is megduplázódott. Ha egy sejt x_2 mennyisége γ , akkor a sejttömegben jelen lévő sejtek száma $N=x_2/\gamma$. Ugyanakkor a (4.120) egyenlet értelmében a teljes sejttömeg $x = x_1 + x_2$. Williams modellje a biotikus és az abiotikus fázisok között két reakciót tételez fel, azaz $R=2$, és $r=[r_1, r_2]$.

Az első reakcióban a szubsztrátfelvételt a

$$r_1 = k_1 S(x_1 + x_2) = k_1 Sx \quad (4.130)$$

konstitutív egyenlet modellezi. A (4.130) egyenlet szerint a tápanyagfelvétel sebességét az anyagtranszport sebessége határozza meg, amely a sejttömeg teljes tömegével arányos (valójában a felületével, a sejt mérettel, x).⁵⁴

A második reakcióban másodrendű reakció játszódik le x_1 és x_2 között: x_1 átalakul x_2 -vé:

$$r_2 = k_2 x_1 x_2 \quad (4.131)$$

A sztöchiometriai mátrixok a következők:

$$\underline{A} = \begin{bmatrix} A_{11} \\ A_{21} \end{bmatrix} \quad \text{és} \quad \underline{B} = \begin{bmatrix} B_{11} & B_{12} \\ B_{21} & B_{22} \end{bmatrix}$$

ahol $A_{11} = -1$, mivel a (4.130) reakcióban az S fogy, és egységnyi tömegátalakulásokat figyelünk,
 $A_{21} = 0$, mivel az S a (4.131) reakcióban nem vesz részt,
 $B_{11} = 1$, mivel az x_1 szintetikus rész az első reakcióban gyarapodik,
 $B_{12} = 0$, mivel x_2 az első reakcióban részt vesz ugyan, de mennyisége nem változik,
 $B_{21} = -1$, mivel x_1 jelenti a „tápanyagot” x_2 számára, és végül
 $B_{22} = 1$, mivel a második reakcióban x_2 gyarapodik.

Éppen az egyszerűség miatt választottuk Williams modelljét, bonyolultabb esetben természetesen a sztöchiometriai mátrix komponensei valódi együtthatók, sokszor számok, de lehetnek kifejezések, változók is.

A (4.124) és (4.125) egyenletek alapján tehát a modell differenciálegyenletei a következők szakaszos rendszert feltételezve:

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= k_1 S(x_1 + x_2) - k_2 x_1 x_2 \quad \left(= \sum_1^2 B_{kj} r_k ; j=1 \right) \\ \frac{dx_2}{dt} &= k_2 x_1 x_2 \quad \left(= \sum_1^2 B_{kj} r_k ; j=2 \right) \\ \frac{dS}{dt} &= -k_1 S(x_1 + x_2) \quad \left(= \sum_1^2 A_{ki} r_k ; i=2 \right) \end{aligned} \quad (4.132, 4.133, 4.134)$$

Érvényes továbbá a következő két összefüggés is:

⁵⁴ Ezt a tápanyagfelvételt modellezhetnénk úgy is, hogy a tápanyagot csak az x_1 kompartment veszi fel, azaz $r_1 = k_1 S x_1$, ekkor egy teljesen más modellt nyernénk.

$$\frac{dN}{dt} = \frac{1}{\gamma} \frac{dx_2}{dt} = \frac{k_2 x_1 x_2}{\gamma} \quad (4.135, 4.136)$$

$$\frac{dx}{dt} = k_1 S x$$

Ha S_0 és $x_0 = x_{10} + x_{20}$ kezdeti értékeket tekintjük, nyilvánvaló, hogy a modell szerint a fermentáció bármely időpillanatában

$$S_0 + x_0 = S + x \quad \text{azaz} \quad (4.137, 4.138)$$

$$S = S_0 + x_0 - x$$

amely összefüggés azt a rejtett feltételezést tartalmazza, hogy a hozam konstans és egységnyi $Y = 1$.

A modell egyenletei tehát a (4.132–4.136) differenciálegyenlet-rendszer, amelynek numerikus megoldásához meg kell állapítanunk a változók kezdeti feltételeit. Ehhez tekintsünk egy olyan tenyészetet, amely már a stacioner fázisban van, a szaporodás befejeződött. Oltjuk majd egy ilyen tenyészetből származó inokulummal vizsgálandó tenyészetünket.

A fermentáció stacioner fázisában (a fermentáció végén), ha az összes sebesség már zérussal egyenlő, akkor

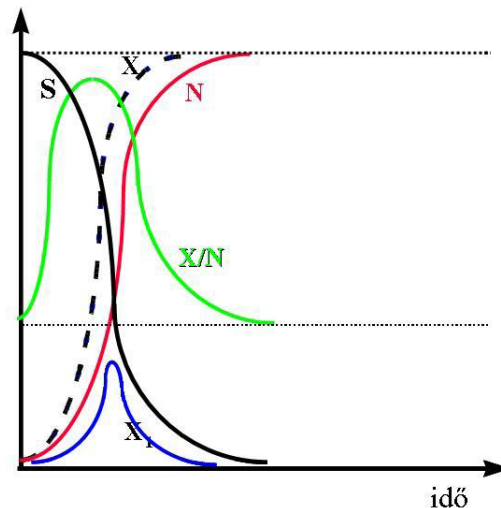
$$\begin{aligned} k_2 x_1 x_2 &= 0 \\ -k_1 S(x_1 + x_2) &= 0 \\ k_2 x_1 N &= 0 \end{aligned} \quad (4.139)$$

amely csak úgy lehet, ha $S = 0$, de $x_2 \neq 0$ és $N \neq 0$ sem, míg az $x_1 = 0$. Ebből következik, hogyha ilyen nyugvó tenyészetből inokulálunk egy friss tápoldatot, induláskor a kezdeti feltételek a következők lesznek:

$$S = S_0, \quad x_2 = x_{20}, \quad N_2 = N_{20} \quad \text{és} \quad x_1 = 0.$$

Utóbbi annyira közelíti a valóságot, hogy stacioner tenyészetrel oltva, valóban eléggé hosszú *lag* szakasz lesz a fermentáció elején. (A „szintetikus rész” mennyisége kicsi). Jól szemlélteti ezt a 4.36. ábra, amely a Williams-modell előbbi, kezdeti feltételekkel történt numerikus megoldását ábrázolja. Ez a *lag* azonban csak a sejtszámra vonatkozik, mivel a teljes biomassa azonnal növekedik (a modell szerint!), ami x_1 azonnali növekedéséből adódik. A modell avval a kísérleti tapasztalattal is jól egyezik, hogy a sejtek az exponenciális fázisban a legnagyobbak (lásd x/N görbét!).

Leírja a modell az exponenciális növekedés fázisát is, ahol mind a teljes biomassa, mind a sejtszám növekszik, és amely szakaszban láthatóan a „szintetikus rész” mennyiségének maximuma van. A hanyatló fázisban a sejtek mérete újból az eredeti inokulumra jellemző mérethez közeledik, míg a stacioner fázisban eléri azt.

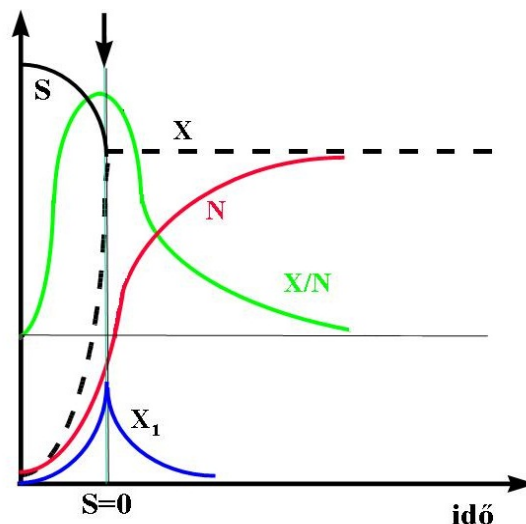


4.36. ábra: A Williams-modell numerikus megoldása

A 4.37. ábra a matematikai modellezés egyik hasznos lehetőségére, az *in numero* vagy *in silico* „kísérleti technikára” hívja fel a figyelmet. Ezen az ábrán egy olyan kísérlet szimulációjának eredményei vannak feltüntetve, amelyet laboratóriumban igen nehéz megvalósítani: a fermentáció (nyíllal jelölt) adott időpontjában teljesen és azonnal megvonjuk a tápanyagot tenyészetünktől. Láthatóan a modell a várható valóságnak megfelelően reagál, az x biomassza nem növekszik tovább, de az x_2 „strukturál-genetikus” rész igen, vagyis a baktériumok az elkezdett osztódásukat mindenképpen befejezik, s erre van kísérletes bizonyíték is.

A modell, bár igen egyszerűsített módon tekinti a fermentáció folyamatát, néhány jellemző – mindenki által kísérletileg tapasztalható – tulajdonságát jól leírja, másokat viszont torz módon ábrázol.

Williams modellje természetesen – és ezt talán felesleges hangsúlyozni – gyakorlati célokra nem túlzottan alkalmas. Ez elsősorban az x_1 és x_2 strukturális komponens túlegyszerűsített megfogalmazásában rejlik.



4.37. ábra: *In numero* szimulációs kísérlet a Williams-moddal

Még egy érdekességet tapasztalhatunk a Williams-moddal kapcsolatban. Ha a (4.137, 4.138) anyagmérleg-egyenletet tekintjük, belátható, hogy ennek alapján igaz az alábbi is:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 S x = k_1 (S_0 + x_0 - x) x = k_1 (S_0 + x_0) x - k_1 x^2 \quad (4.140)$$

Ami nem más, mint a logisztikus differenciálegyenlet (idézzük ide a (4.100) számú egyenletet):

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu \frac{1}{x_{\max}} x(x_{\max} - x)$$

Tehát a Williams-modell is tartalmazza a logisztikus differenciálegyenletet, amelyet integrálva egy logisztikus növekedési görbét kaphatunk az alábbiak szerint:

$$x = \frac{S_0 + x_0}{1 + \frac{S_0}{x_0} \exp\left(-\frac{k_1 t}{S_0 + x_0}\right)} = \frac{x_{\max}}{1 + \frac{S_0}{x_0} \exp\left(-\frac{k_1 t}{x_{\max}}\right)} \quad (4.141)$$

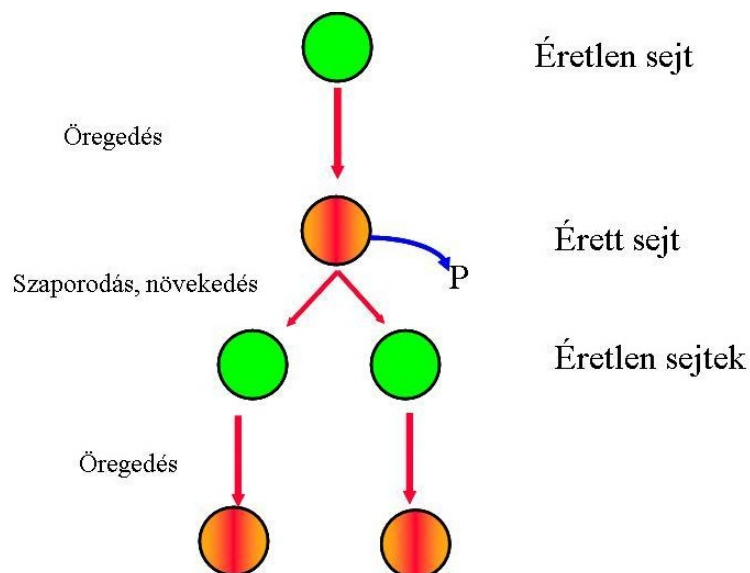
4.4.3.3. Antibiotikum termelésének koreloszlás modellje⁵⁵

A másodlagos metabolitok termelése, amint már láttuk, a növekedési fázis kései szakaszában, az úgynevezett idiofázisban vagy a növekedési fázis stacionárius szakaszában történik. A Luedeking–Piret termékképződési modell, illetve a termékképződés Gaden-féle módoszatai szerint növekedéshez nem kötött termékképződésnek tekintjük a szekunder anyagcsere-termékek termelési kinetikáját.

Ha a termelő mikroorganizmusok egysejtűek, a szekunder anyagcsere-termelés csak akkor indul meg, ha az osztódás már befejeződött, a növekedés leállt, míg fonalasként esetében a termelés alatt is folytatódhat a növekedés. Ennek az az oka, hogy a fonalakban lévő sejtek már az idiofázisban lehetnek, ugyanakkor a fonal végén lévő csúcsi sejtek (az apikális osztódás a fonalasként tulajdonsága) még növekedhetnek.

Egy egyszerű, a biokémiai történésekkel nem operáló modell írható fel ezekre a szekunder termelésekre az ún. **sejtkor** fogalmának bevezetésével. Két korcsoportot különböztetünk meg: az egyik az úgynevezett *érett sejtek csoportja*, amelyek képesek az adott antibiotikum termelésére, valamint az *éretlen sejtek csoportja*, amelyeknek sejtjei még nem képesek termelni.

Az érett sejtek (X_2) növekedését Monod-kinetikával írjuk le, míg az éretlenek (X_1) elsőrendű kinetikával alakulnak át érettekké, illetve az érettekből képződnek szintén Monod kinetikája szerint. A 4.38. ábrán láthatjuk a fentiek értelmezését.



4.38. ábra: Az érett sejtek az éretlenekből keletkeznek, és azok érettekké alakulnak

⁵⁵ H.W. Blanch, D.S. Clark: Biochemical Engineering, Marcel Dekker, NY 1996 pp241–244 alapján.

Az anyagmérlegek (azaz a konstitutív egyenletek) szakaszos tenyésztésre a következőképpen írhatók fel:

$$\frac{dX_1}{dt} = -a_{1 \rightarrow 2} \cdot X_1 + \frac{2 \cdot \mu_{\max} \cdot S \cdot X_2}{S + K_S} \quad (4.142)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = a_{1 \rightarrow 2} \cdot X_1 - \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X_2}{S + K_S}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X_2}{S + K_S}$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(\frac{1}{k}\right) \cdot \frac{dX_2}{dt}$$

ahol X_1 az éretlen sejtek koncentrációja
 X_2 érett sejtek koncentrációja
 P termékkoncentráció
 $X = X_1 + X_2$ a sejtpopuláció mérete
 Y eredő sejthozam
 $a_{1 \rightarrow 2}$ érési sebességi állandó

Ezzel a modellel jól sikerült **szimulálni** például a *Bacillus brevis* **gramicidin-S** termelését (ami egy ciklikus dekapeptid antibiotikum). A Gramicidin-S szintetáz aktivitása a növekedés kései exponenciális szakaszában drámaian megnő, és ennek következtében ekkor kezdődik el és a stacionárius fázisban folytatódik a Gramicidin-S szintézise.

A konstansok becsülését szakaszos fermentációból származó adatok alapján egy úgynevezett t_m érési idő (maturációs idő) bevezetésével történt. Az a sebesség, amellyel a sejtek öregednek (azaz érnek), illetve átlépnek az idiofázisba, egy t_m idővel korábbi éretlen sejt növekedési sebességétől függ, azaz egy adott időpontban a sejtöregedés

$$\left. \frac{dX_2}{dt} \right|_t = \left. \frac{dX}{dt} \right|_{t-t_m} \quad (4.143)$$

A termékképződési sebesség e definíció alapján, valamint annak integrálja a következő:

$$\left. \frac{dP}{dt} \right|_t = \left(\frac{1}{k}\right) \left. \frac{dX}{dt} \right|_{t-t_m} \quad (4.144)$$

$$P(t) = \left(\frac{1}{k}\right) \left[X_{t-t_m} - X_0 \right]$$

ahol X_0 az inokulum sejtkoncentrációja.

A k , és t_m grafikusán becsülhető egy közelítéssel eljárással. $P(t)$ -t ábrázoljuk az $X(t-t_m)$ függvényében különböző t_m -ek esetén, és azt a t_m -t választjuk, ahol már jó linearitást kapunk. Ekkor az egyenes iránytangense k lesz. Néhány példa a maturációs időre és $1/k$ értékeire különböző antibiotikum-fermentációk esetében:

Gramicidin-S	$t_m = 2$ h	$1/k = 237$ mg AB/g sejt
Kloramfenikol	$t_m = 12$ h	$1/k = 0,2$ g kloramfenikol/g sejt
Penicillin	$t_m = 40$ h	$1/k = 2,2 \cdot 10^5$ egység penicillin/g sejt

4.4.4.4. *A Monascus α -galaktozidáz termelésének strukturális modellje*

A termékképzésnek a Luedeking–Piret termékképződési modellel történő nem strukturális leírása természetesen sok esetben nem elégséges, illetve ma az anyagcserének a mesterséges befolyásolására, megváltoztatására törekszünk (metabolic engineering), ami azt jelenti, hogy több mint egy génnek (enzimnek) a megváltoztatásán keresztül egy egész anyagcsereút módosítása válik lehetségessé, ezért értelemszerűen mélyebb, pontosabb leírásra kell törekednünk. Ennek lehetőségének megteremtéséhez járul hozzá a strukturális modellek felépítése és alkalmazása.

Egy viszonylag egyszerű, de az eddigieknél lényegesen összetettebb anyagcseremodell a *Monascus* gomba α -galaktozidáz (**ag**) enzim termelését leíró modell, amelyet Imanaka 1973-ban alkotott meg⁵⁶. Az α -galaktozidáz enzim (**E.C.3.2.1.22**) terminális, nemredukáló alfa-D-galaktóz végek lehasítását katalizálja alfa-D-galaktozidokról: pl. galaktóz oligoszaharidokról, galaktomannánokról. A triszaharid rafinózból szaharózmaradékkal galaktózt hasít le, a galaktózból és glicerintől reverzibilisen galaktozil-glicerint lehet előállítani segítségével.

A *Monascus* gomba **ag** termelését katabolit represszió befolyásolja: amikor a gombát glükózon mint egyedüli C-/energiaforráson növesztjük, nincs α -galaktozidáz-termelés, ugyanakkor ha glükózt és galaktózt is tartalmazó tápoldatban növekedik a gomba, először a glükózt hasznosítja, majd annak elfogyása után tér át a galaktóznak a felvételére és felhasználására (diauxiás növekedést mutat).

A diauxiás növekedést a 4.6. animáción szemlélhetjük meg. (Megjegyezzük, hogy ez nagyon sok mikroba esetében jellemző növekedési kép, például ha *E. coli*-t tejcukron, vagy *Saccharomyces cerevisiae*-t glükózon szakaszos aerob tenyésztésben szaporítunk⁵⁷).

4.6. animáció: *Diauxiás növekedési görbe*

Ha egy ilyen szakaszos *Monascus* tenyésztésben a glükózkoncentráció egy küszöbérték alá csökken, az α -galaktozidáz indukálódik és termelése elkezdődik, mégpedig mintegy 80 perccel a küszöb-koncentráció-érték alá csökkenés után. Hasonlóan, ha egy olyan tenyésztéshez, amelyben folyik a α -galaktozidáz termelése, glükózt adnak, akkor mintegy 40 perccel később a represszió kifejeződik és az enzimtermelés leáll. Imanaka modelljében a szubsztráttranszportot és az enzimtermelésnek ezt az időben több tíz perccel belül érvényesülő génszintű szabályozását vette figyelembe és modellezte.

Legyen az extracelluláris glükóz koncentrációja S_D (dextróz) és a galaktózé S_G , a sejten belüli galaktóz- koncentráció pedig S_{Gi} . Tételezzük fel, hogy a galaktóz kompetitív módon inhibeálja a glükózhasznosítást, ekkor a gombanövekedés mindkét szubsztrátum általi limitáltságát a következőképpen írhatjuk fel:

$$\mu = \frac{\mu_{mD} S_D}{K_{SD} + S_D + \frac{K_{SD}}{K_i} S_G} + \frac{\mu_{mG} S_G}{K_{SG} + S_G}, \quad (4.145)$$

ahol az első tag a fajlagos növekedési sebességnek glükóz által történő meghatározottságát írja le, egyidejű kompetitív galaktózinhibíció mellett, míg a második a galaktóz limitáló hatását írja le.

⁵⁶ A modell ismertetése H.W. Blanch, D. S. Clark: Biochemical Engineering, Marcel Dekker, NY 1999 és Imanaka, T. et al: J. Ferment. Technol. 51(6) 423 (1973) alapján történt.

⁵⁷ Ebben az esetben a glükózon előbb alkohol képződik, majd azon folytatódik tovább a növekedés.

A glükózrepressziót a modell úgy képes mechanikusan figyelembe venni, hogy feltételezi, hogy ha a glükózkoncentráció egy küszöbértéknél nagyobb (vagy egyenlő avval) $S_D \geq S_{Dc}$, akkor a galaktóztanszport a sejtbe azonnal megszűnik, a transzportmodellben $U=0$ és következményként a μ_{mG} is 0-vá válik.

A galaktóztanszportját a sejtbe hordozós transzporttal (lásd a könnyített diffúzió modelljét a 2.10. alfejezetben) modellezzük. A galaktóztanszport fehérjekötő helyeinek maximális koncentrációja legyen G_G . Ehhez a transzportfehérjéhez kötődik az extracelluláris galaktóz, amelynek a sejtekbe történő átadási sebessége, egy Langmuir-féle adszorpciós izoterma (= Michaelis–Menten-kinetika) szerint függve a külső S_G koncentrációtól, a következő transzport-egyenlettel írható le:

$$\text{galaktóz transzport sebesség} = U \left(\frac{G_G S_G}{K_m + S_G} - S_{Gi} \right) \quad (4.146)$$

Ebben az U egy anyagátadási koefficiens (h^{-1}), a S_{Gi} pedig a sejten belüli galaktózkoncentráció ($\mu\text{g gal/mg sz.a}$).

Kísérletileg kimutatták, hogy 5 mg/l glükóz jelenléte esetén a galaktózfelvétel elhanyagolható, valamint azt is, hogy a galaktózfelvétel konstitutív, és nincsen időkésés a felvételében (azaz nem genetikai, hanem enzim szinten szabályozott).

E kísérleti bizonyítás során glükózon növesztett sejteket lecentrifugáltak, és kimosták a sejtek mellől a tápoldat maradékát, majd 5 mg/l galaktóztartalmú tápoldatban inkubálták. Azt tapasztalták, hogy a galaktózfelvétel azonnal elindult. Ha viszont ugyanezekhez a sejtekhez 5 mg/l glükózt is adtak, a galaktózfelvétel nem indult el.

Magát a galaktozidáz termelést a jól ismert Jacob–Monod-féle operonmodell felhasználásával írjuk le. A galaktóz távollétében egy R represszor kapcsolódik a génhez, és inhibeálja a mRNS-szintézist. Amikor galaktóz van jelen a sejtben, az kapcsolódik a represszorhoz (RS_{Gi}), és így nem képes az operonhoz kötődni, azaz az enzimszintézis elkezdődhet. Ezt a (nem azonosított) intracelluláris represszort a gomba állandó k_2 sebességgel termeli, ugyanakkor egy elsőrendű reakció szerint bomlik is $k_3 R$ sebességgel, illetve reverzibilisen kapcsolódik a galaktózzal, illetve szétválik a galaktóztól. A reá vonatkozó mérlegegyenlet tehát a következő, X -szel megszorozva:

$$\frac{dRX}{dt} = (k_2 - k_3 R - k_4 RS_{Gi} + k_5 [RS_{Gi}]) X \quad (4.147)$$

A represszornak a DNS-transzkripcióra és így a mRNS-termelésre gyakorolt hatását a következőképpen írhatjuk le:

A mRNS szintézise a szabad represszor koncentrációjától függ. Amikor galaktóz van jelen, a represszor hozzákötődik, így a szabad represszor koncentrációja csökken, és így nem tudja megakadályozni a mRNS-szintézist. A mRNS-szintézis sebességét arányosnak tételezzük fel a represszor koncentrációjának egy maximális értéktől (R_{max}) való eltéréssel. Ugyanakkor a mRNS bomlik is k_7 sebességi állandóval jellemezhető elsőrendű reakcióban. Így az anyagmérleg a mRNS-re (szintén X -szel szorozva):

$$\frac{dMX}{dt} = \{k_6 (R_{max} - R) - k_7 M\} X \quad (4.148)$$

Végül az enzimtermelés sebessége értelemszerűen a mRNS aktuális szintjével arányos:

$$\frac{dEX}{dt} = k_8 MX \quad (4.149)$$

Az alapvető modellegyenletek felírása után most megszerkeszthetjük az egész rendszerre vonatkozó mérlegegyenleteket. Használjuk a glükózra és a galaktózra vonatkozó eredő hozamokat, azaz: az Y_D és Y_G értékeket.

A belső galaktózra vonatkozó teljes derivált (hiszen mind S_{Gi} , mind X változók)

$$\frac{dS_{Gi} X}{dt} = X \frac{dS_{Gi}}{dt} + S_{Gi} \frac{dX}{dt} = X \frac{dS_{Gi}}{dt} + \mu X S_{Gi}, \quad (4.150)$$

továbbá:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \left\{ \frac{\mu_{mD} S_D}{K_{SD} + S_D + \frac{K_{SD}}{K_i} S_G} + \frac{\mu_{mG} S_G}{K_{SG} + S_G} \right\} X \quad (4.151)$$

Ez az egyenlet a növekedés Monod szerinti leírása glükóz vagy galaktóz limitáló szubsztrát esetére, míg a szubsztrátok fogyasztását az alábbi egyenletek adják meg:

$$\frac{dS_D}{dt} = -\frac{X}{Y_D} \frac{\mu_{mD} S_D}{K_{SD} + S_D + \frac{K_{SD}}{K_i} S_G} \quad \text{és} \quad \frac{dS_G}{dt} = -\frac{X}{Y_G} \frac{\mu_{mG} S_G}{K_{SG} + S_G}, \quad (4.152)$$

ahol ha $S_D \geq S_{DC}$ akkor $\mu_{mG} = 0$.

A belső galaktózkoncentráció változására vonatkozó egyenlet

$$\frac{dS_{Gi}}{dt} = U \left(\frac{G_G S_G}{K_m + S_G} - S_{Gi} \right) - k_1 S_{Gi} - \mu S_{Gi}, \quad (4.153)$$

ahol ha $S_D \geq S_{DC}$, akkor $U = 0$.

$$\frac{dR}{dt} = (k_2 - k_3 R - k_4 R S_{Gi} + k_5 [RS_{Gi}]) - \mu R \quad (4.154)$$

$$\frac{dM}{dt} = \{k_6 (R_{max} - R) - k_7 M\} - \mu M, \quad (4.155)$$

ahol ha $R \geq R_{max}$, akkor $R = R_{max}$.

Továbbá igazak az alábbiak:

$$\frac{dE}{dt} = k_8 M - \mu E \quad (4.156)$$

$$\frac{d[RS_{Gi}]}{dt} = k_4 R S_{Gi} - k_5 [RS_{Gi}] - \mu [RS_{Gi}] \quad (4.157)$$

(A (4.154–4.157) egyenletek a teljes deriváltakból kaphatók meg.)

Imanaka a kinetikai paramétereket szakaszos és steady state folytonos tenyészeteket felhasználva határozta meg, az intracelluláris paramétereket becsléssel, a hozamokat pedig kísérlettel állapította meg.

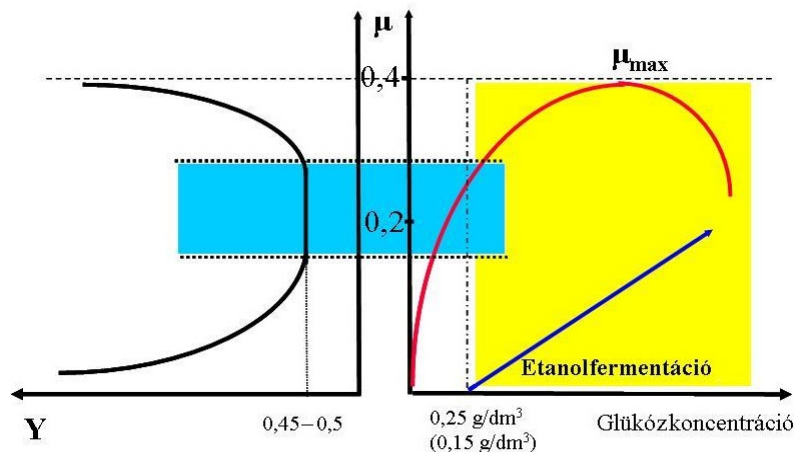
A modell jól írja le a galaktózfelvételnek a glükóz által történő katabolit represszióját, és az α -galaktozidáz lassú növekedését miután a glükóz elfogyott, és a galaktóz sejtekbe irányuló transzportja elindult. A modell lényege a Jacob–Monod-operonmodellnek a termékképzési kinetika leírására történő egyszerű felhasználása.

4.4.4.5. A péklesztő növekedésének strukturális anyagcseremodellje

A *Saccharomyces cerevisiae*-t (a péklesztőt) ipari körülmények között, aerob körülmények mellett tenyésztik, szemben az anaerob módon végrehajtott alkoholos fermentációjával. E gomba tehát mindkét körülmények között anyagcserére képes. Az alábbi modell⁵⁸ figyelembe veszi, hogy ez az élesztőgomba speciális anyagcsere-lehetőséggel rendelkezik. A *Saccharomyces cerevisiae* mind az aerob respirációs metabolikus úton (glükóz → CO₂ + sejt tömeg), mind az anaerob fermentációs metabolikus úton (glükóz → etanol + CO₂ + sejt tömeg) képes a növekedéséhez és fenntartásához szükséges kémiai energia megtermelésére.

Kis növekedési sebességek esetén az anyagcsere teljesen oxidatív (aerob), azaz a respirációs hányados 1 és az eredő hozam $Y_{x/s}$ közel 0,5 g sejt/g glükóz. Ez a helyzet egészen egy kritikus fajlagos növekedési sebesség eléréséig, amely felett az anyagcsere egyre inkább anaerobbá válik. Ezen fermentatív anyagcsere során az eredő hozam csökken, és a fajlagos szén-dioxid képződési sebesség, valamint az etanolképződés sebessége növekszik. A kritikus fajlagos növekedési sebesség kissé magasabb, mint az etanolon mérhető μ_{max} . A respirációról a fermentációra történő átállás az enzimmérszletben is jellemző változást okoz: a tipikus respirációs enzimek, például az izocitrát liáz, a malát dehidrogenáz és a citokrómok repressziót szenvednek nagyobb fajlagos növekedési sebességeknél, és a glikolízis válik a fő energiaszolgáltató anyagcsereúttá. Kis növekedési sebességeknél viszont a glikolízis enzimeit találhatók kicsiny szinten.

Amint a fajlagos növekedési sebesség növekszik, a sarjadzó élesztők százalékos aránya közel lineárisan nő. Ezt a lineáris összefüggést, valamint az átlagos generációs időt használva ($t_g = \ln 2 / \mu$) a sarjadzási periódus hosszát ki lehet számítani. Kicsi a változás a sarjadzás hosszában a különböző növekedési sebességek esetében. Kis fajlagos növekedési sebességnél a generációs idő nagyobb a sejtosztódást követő gapfázis meghosszabodása miatt (poszt mitotikus gap avagy G₁ fázis). Így a teljes sejtszaporodási ciklust tekintetbe véve az összes fázis hossza állandó, azaz a DNS replikációé, ami az S fázis; a mitózisé, ami a G₂ fázis; és a sejtosztódásé, ami az M fázis; és csak a G₁ fázis időtartama változó. E fázis alatt a sejtbe szubsztrát felvétel és akkumuláció történik, tartalék szénhidrátok (trehalóz, glikogén) szintetizálódnak és raktározódnak el, és majd a többi fázisban az energiaforrás szerepét betöltve fogynak el.



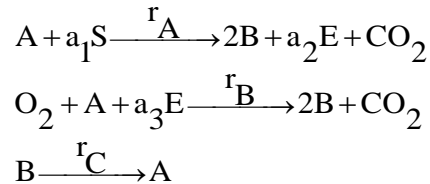
4.39. ábra: A cukorkoncentráció hatása az élesztő-anyagcserére (Crabtree effektus)

A vizsgált modell a sejtciklusnak ezen a két fő állomásra bontásán alapszik. G₁ fázisnak a hossza a limitáló szubsztrát hozzáférhetőségétől függ, míg a G₂, M és S fázisok összegét a szubsztrát koncentrációjától függetlennek tételezzük fel. A sejt tömeg tehát lényegében két részből áll, a modell két kompartmentes: A tömeg, amely a szubsztrát felvételét és az energiatermelést végzi, és B

⁵⁸ A modellt H. W. Blanch, D. S. Clark: Biochemical Engineering, Marcel Dekker, NY 1996 pp 231–236 alapján ismertetjük.

sejttömeg, amely a reprodukcióért és az osztódásért felelős. Ebben ez a modell megegyezik a Williams-moddal (4.4.4.2. alfejezet). A **B** tömeg állandó sebességgel konvertálódik **A**-vá, és az **A** tömeg pedig felveszi a szubsztrátot és termeli a **B** tömeget, mégpedig időben változó sebességgel.

A respirációs enzimeknek a glükóz általi represszióját (a Crabtree-effektust) eredetileg a glükóz katabolit repressziójaként magyarázták. Ma már bizonyított, hogy a nagy katabolikus fluxus a direkt oka a respiráció inhibíciójának, és a glükózkoncentráció csak másodlagos szerepet tölt be. A modell tehát azt tételezi fel, hogy mind a glikolízis, mind a respiráció az **A** kompartment tevékenysége, és ez szolgáltatja az energiát a növekedéshez. A reakciók sémája és sebességeik a következők:



Az alkoholos fermentáció sebessége:

$$r_A = k_1 A \frac{S}{K_S + S} \quad (4.158)$$

A respiráció sebessége:

$$r_B = k_2 A \frac{E}{K_E + E} \quad (4.159)$$

A a sarjadzás sebessége:

$$r_C = k_B \quad (4.160)$$

(4.158–4.160) egyenletekben $A + B = X$, azaz a teljes sejttömeg, és E az etanol koncentrációja.

A sarjadzás ($B \rightarrow A$) tehát állandó sebességgel történik, míg a respiráció és a fermentáció MONOD-kinetikát követ. Valamennyi alkotóra felírhatóak az anyagmérleg-egyenletek (ezek a modell konstitutív egyenletei) a következőképpen (és az egyszerűség kedvéért csak szakaszos tenyésztésre):

$$\begin{aligned} \frac{dB}{dt} &= 2r_A + 2r_B - r_C \\ \frac{dA}{dt} &= -r_A - r_B + r_C \\ \frac{dE}{dt} &= a_2 r_A - a_3 r_B \\ \frac{dS}{dt} &= -a_1 r_A \end{aligned} \quad (4.161-4.164)$$

A konstansok itt is becsültek, illetve részben kísérleti eredményeken alapulnak, azaz mért adatokhoz illesztésből származnak.

A hozam az alkoholos fermentációra:

$$Y_{x/S} = \frac{1}{a_1} = 0.15 \text{ g/g}$$

A hozam az aerob respirációra:

$$Y_{x/S} = \frac{1}{a_3} = 0.45 \text{ g/g}$$

Így a sztöchiometriai együtthatók, amelyek e hozamok reciprocai, $a_1 = 6,67$ és $a_3 = 2,22$.

Az etanoltermelés sztöchiometriájából pedig $a_2 = 2,80$.

Néhány fajlagos sebesség a következőképpen számítható ki:

Fajlagos szubsztrátfogyasztási sebesség:

$$q_S = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = -\frac{a_1 r_A}{X} \quad (4.165)$$

Specifikus etanol-termékképződési sebesség:

$$q_E = \frac{1}{X} \frac{dE}{dt} = \frac{a_2 r_A - a_3 r_B}{X} \quad (4.166)$$

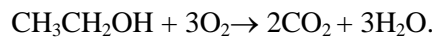
Specifikus növekedési sebesség:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4.167)$$

Fajlagos légzési sebesség:

$$q_{O_2} = \alpha \frac{r_B}{X} \quad (4.168)$$

Az α a sztöchiometriából kapható meg: respirációnál az etanol teljes oxidációja CO₂-dá 3 mol oxigént igényel, minden két mol CO₂-képződés mellett e szerint a sztöchiometriai egyenlet szerint:



Az élesztő elemi összetétele alapján pedig 1,53 g oxigénre van szükség 1 g új sejttömeghez, így $\alpha = 1,53/32 = 0,048$. Ennek alapján a fajlagos légzési sebesség számítható:

$$q_{O_2} [\text{mol/g*óra}] = (1,53/32) \frac{r_B}{X} = 0,048 \frac{r_B}{X} \quad (4.169)$$

A fajlagos CO₂-termelési sebesség, azaz q_{CO_2} , a C-mérlegből kapható meg:

$$CO_2 \text{ széntartalom} = GLÜKÓZ_{\text{széntartalom}} - ETANOL_{\text{széntartalom}} - SEJT_{\text{széntartalom}} \quad (4.170)$$

Ezt az anyagmérleget természetesen a fajlagos sebességekre is felírhatjuk (emlékezzünk a sztöchiometriánál tanultakra: statikus egyenletek együtthatói a sebességi kifejezésekben is alkalmazhatóak)

$$q_{CO_2} [\text{mol/g*óra}] = (0,4q_S - 0,52q_E - 0,48\mu) / 12 \quad (4.171)$$

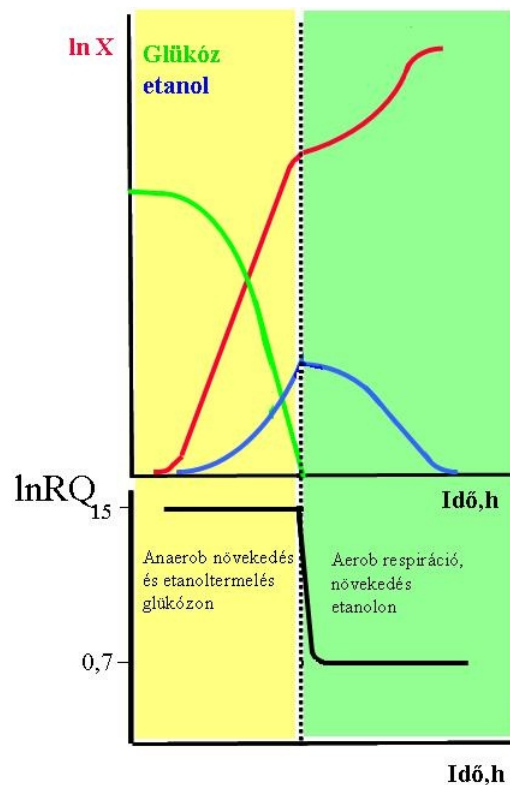
A modell többi állandóját a modellnek a kísérleti eredményekhez történt illesztéséből kapták⁵⁹. Ezek a következők:

$$\begin{array}{ll} k_1 = 5,5 \text{ h}^{-1} & a_1 = 6,67 \\ K = 0,51 \text{ h}^{-1} & a_2 = 2,8 \\ k_2 = 0,3 \text{ h}^{-1} & a_3 = 2,22 \\ K_S = 0,5 \text{ g/l} & K_E = 0,02 \text{ g/l} \end{array}$$

Ez az egyszerű strukturális modell igen jól leírja a *Saccharomyces cerevisiae* szén- és energia-metabolizmusát. A kétkompartmentes modell értelmében kis μ értékeknél a fajlagos S-felvételi sebesség kicsi, és az A-hányad, ami ezt a tevékenységet végre tudja hajtani, nagy. A sejtekbe irányuló S-fluxus alacsony, és így a sejtek a lassabb, de sokkal hatékonyabb respirációs anyagcsereúton termelik energiájukat. Ellenkező esetben, ha a μ nagy, akkor a sejtekbe irányuló (A-tömegén keresztül történő) szubsztrátfluxus két okból is növekedik: a sejtenkénti katabolizmus sebessége nő, és az A-tömeg csökken. A megnövekedett fluxus következtében a respirációs út telítetté válik egy a k_2 által meghatározott μ -nél. Ekkor a glikolízis sebessége nő. (Ez a Crabtree-effektus modell szerinti értelmezése.)

⁵⁹ Bijkerk A. H. and R. J. Hall: Biotechnol. Bioeng 19, 267 (1977)

Amikor a glikolízises anyagcsereút telítetté válik, a glükózra vonatkozó μ_{\max} -ot érjük el. Így szakaszos tenyészetben azt látjuk, hogy a kezdeti, glikolízis támogatta gyors katabolikus fluxus nagy fajlagos növekedési sebességet és kis A-tömeg-hányadot eredményez egy csökkent respirációs aktivitással. Etanol akkumulálódik, és végül, ha a glükóz elfogyott, a tenyészet áttér a respirációra, és a képződött etanolt asszimilálja. A respirációkor elegendő alacsonyabb katabolizmus az A-tömeg növekedését idézi elő, és így jelentkezik egy adaptáció, és utána egy második növekedési fázis nagyobb A-tömeeggel és a kisebb szükséges katabolikus fluxussal. A modell a 4.40. ábrán látható módon világosan megkülönbözteti a glükózon, illetve az azt követő alkoholon történő növekedést (diauxia), és a két különálló fázist a respirációs hányados drámai változása is hűen mutatja.



4.40. ábra: Szakaszos élesztő-fermentáció glükózon: diauxiás növekedés

4.4.5. Folytonos fermentációs rendszerek és modellezésük

4.4.5.1. Kemosztát elvű folytonos fermentáció

A folytonos fermentációs rendszerek közül legismertebb és leginkább alkalmazott rendszer a kemosztát, ennek a kutatáson, tehát elméleti jelentőségén túl, gyakorlati felhasználása is jelentős, elsősorban a nagyipari sejttömegtenyésztések, alkoholos fermentációk és a biológiai szennyvíztisztítás esetében.

A kemosztát elnevezés azt jelenti, hogy olyan rendszerről van szó, amelyet a mikrobapopuláció állandósult állapota jellemez, s ezt az állandósult állapotot (mint látni fogjuk: korlátozottan kiegyensúlyozott növekedést) a környezet fizikai paramétereinek állandóságán túl a kémiai környezeti paraméterek állandósága határozza meg.

A kemosztátot lényegében egyidejűleg 1950-ben vezette be a kutatási gyakorlatba Monod, illetve Novick és Szilárd. Utóbbiak „eredeti kemosztát” berendezése egy levegőztetett üvegekészülék volt, amelynek rajzát a 4.41. ábrán láthatjuk⁶⁰.

⁶⁰ Novick A., Szilárd L.: Science 111, Dec 15 (1950) reprintjéből.

Saját kezelésünk megkönnyítése érdekében tekintsük a 4.42. ábrán vázolt legegyszerűbb felépítésű folytonos fermentációs rendszer kísérleti összeállítását, és kíséreljük meg e folytonos rendszer matematikai leírását. Az ábra szerint a tökéletesen kevert (CSTR) reaktorban kezelt fermentlé térfogata állandó (V), amely csak úgy tartható fenn, ha mind a friss tápoldat betáplálási sebessége, mind a leerjedt fermentlé elvételi sebessége állandó és azonos (f).

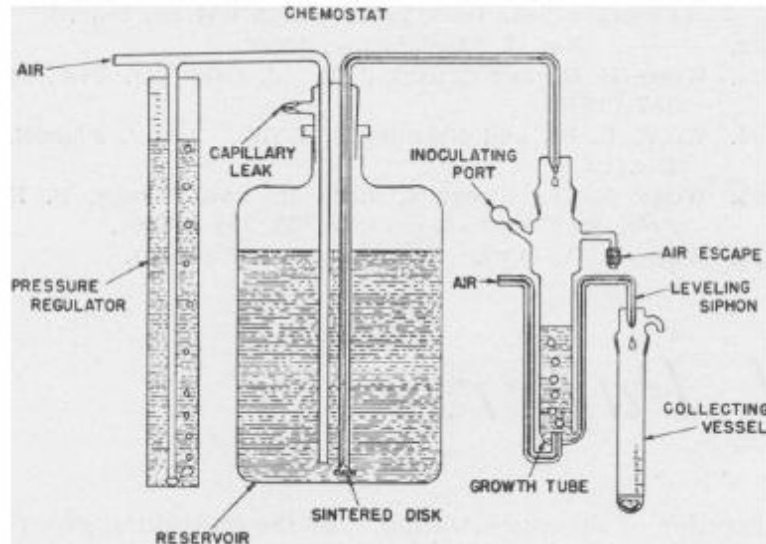
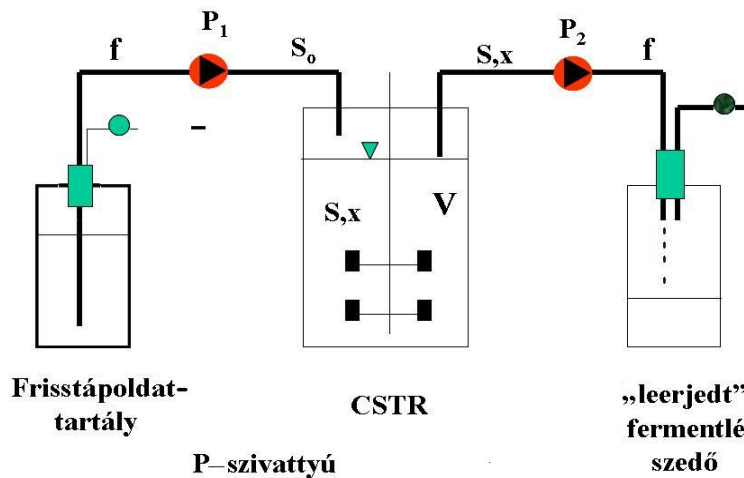


FIG. 1

4.41. ábra: Novick és Szilárd „eredeti kemosztát”-ja



4.42. ábra: Kemosztát folytonos (egylépcsős, homogén, nyílt) rendszer sematikus felépítése

Rendszerünkre felírhatjuk az anyagmérleg-egyenletet mind a sejtömege, mind a tápoldat szubsztrátjaira:

Anyagmérleg a sejtömege:

$$V \frac{dx}{dt} = V \left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{növekedés}} - f \cdot x \quad (4.172)$$

Anyagmérleg az i -edik szubsztrátra:

$$V \frac{dS_i}{dt} = f S_{i,0} - f S_i - V \frac{1}{Y_{x/S_i}} \left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{növekedés}} \quad (4.173)$$

Bevezetve a **hígítási sebesség** fogalmát, amely definíciószerűen $D=f/V$, és áttérve arra az esetre, amikor a szubsztrátok közül egyetlen, a limitáló szubsztrát határozza meg a növekedési viszonyokat, azaz a többi tápanyagkomponens elegendően nagy feleslegben van, valamint feltéve, hogy a növekedés és a limitáló szubsztrát fogyása leírható a Monod-moddal⁶¹, akkor írhatjuk, hogy

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx = (\mu - D)x = \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - D \right) x \quad (4.174)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu x}{Y}. \quad (4.175)$$

Állandósult állapotban valamennyi, a rendszert jellemző paraméter állandó lesz, azaz pl.

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad \text{és} \quad \frac{dS}{dt} = 0,$$

amelyből következik, hogy $\mu = D$. Az ebben az állandósult állapotban (steady state) kialakuló mikroba- és limitálószubsztrát-koncentrációt megkaphatjuk, ha a $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$ Monod-összefüggést egyenlővé tesszük a hígítási sebességgel, és belőle kifejezzük S-t:

$$D = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{illetve} \quad \bar{S} = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \quad (4.176)$$

A (4.175) összefüggésből, ismét az állandósult állapot feltételéből (4.177)-et nyerjük,

$$D(S_0 - \bar{S}) = \frac{\mu x}{Y}, \quad (4.177)$$

amelyből viszont az állandósult állapotbéli mikrobakoncentráció fejezhető ki:

$$\bar{x} = Y(S_0 - \bar{S}) = Y \left(S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right). \quad (4.178)$$

Ezt az állandósult állapotú folytonos fermentációs rendszert kemosztátnak nevezzük, ami azt jelenti, hogy a betáplált friss tápoldat összetétele, amelyet itt a limitáló szubsztrát S_0 koncentrációjával jellemeztünk, valamint a rendszert reguláló másik paraméter, a hígítási sebesség (ami természetesen két újabb kontrollváltozót jelent, mégpedig a reaktortérfogatot és a betáp térfogatáramát), egyértelműen meghatározza állandósult állapotban a mikroba környezetét. Ez a környezet állandó lesz (=kemosztát), és mikroorganizmusunk ennek a környezetnek megfelelő fajlagos növekedési sebességgel fog szaporodni.

Milyen maximális hígítási sebesség érhető el egy kemosztát rendszerben?

Monod szerint $\mu \cong \mu_{\max}$ -szal, ha $S \gg K_S$, illetve esetünkben, ha $S = S_0$. Ekkor

$$\mu = D_{\text{kritikus}} = \mu_{\max} \frac{S_0}{S_0 + K_S} \cong \mu_{\max} \quad (4.179)$$

fajlagos növekedési sebesség jellemzi a rendszert.

⁶¹ Ez nagyon fontos feltétel; más modell érvényessége esetén más eredményeket kapunk.

Ugyanakkor azonban (4.178) alapján $\bar{x} = Y(S_0 - S_0) = 0$ lesz, azaz a rendszerből valamennyi sejt kimosódik. Következésképpen a kemosztát rendszer csak $\mu = D < \mu_{\max}(S_0 / (S_0 + K_S))$ hígítási sebességek esetén hozhat létre stabil állandósult állapotot nullánál nagyobb kimenő mikrobakoncentráció mellett. A zárójelben lévő kifejezés nem minden esetben közel egy, azaz a fenti feltétel szigorúbb, mint amit rendszerint megemlíteni szoktak, azaz, hogy $D < \mu_{\max}$ legyen.

Vegyük észre, hogy ez a gondolatmenet egyszersmind azt jelenti, hogy **a kemosztát rendszer mindig szubsztrátlimitben működik**, azaz korlátozottan kiegyensúlyozott növekedés jellemzi (μ mindig kisebb, mint az azonos körülmények között szakaszos fermentációban, az exponenciális növekedést jellemző μ_{\max}).

A kemosztát folytonos fermentációt jellemzi a szakaszos fermentációnál nagyobb produktivitása. A produktivitás az egységnyi térfogatú fermentléből időegység alatt kapható sejtömeg mennyiségét jelenti, célszerűen szárazanyag-koncentrációban kifejezve, kemosztátunkra ez

$$J = D \cdot x \quad [\text{g/l.h}] \quad \text{vagy} \quad [\text{kg/m}^3\text{h}]. \quad (4.180)$$

Vizsgáljuk meg, hogy mekkora lehet maximálisan egy kemosztát folytonos fermentációs rendszer produktivitása. Ehhez tekintsük az előbbi (4.180) egyenletet, amelybe (4.178) behelyettesítésével az alábbi összefüggést nyerjük:

$$J = D \cdot \bar{x} = D \cdot Y \left(S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (4.181)$$

Ez a függvény D -től függ, azaz a maximális produktivitást olyan hígítási sebességnél fogjuk elérni, ahol teljesül, hogy a D szerinti deriváltja zérus, azaz

$$\frac{\partial J}{\partial D} = 0. \quad (4.182)$$

Könnyen levezethető, hogy ekkor az a hígítási sebesség, amely a maximális produktivitást eredményezi, a következő:

$$D_{\max} = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \left(\frac{K_S}{S_0 + K_S} \right)^{1/2} \right) \quad (4.183)$$

Az ehhez tartozó kimenő mikrobakoncentráció pedig

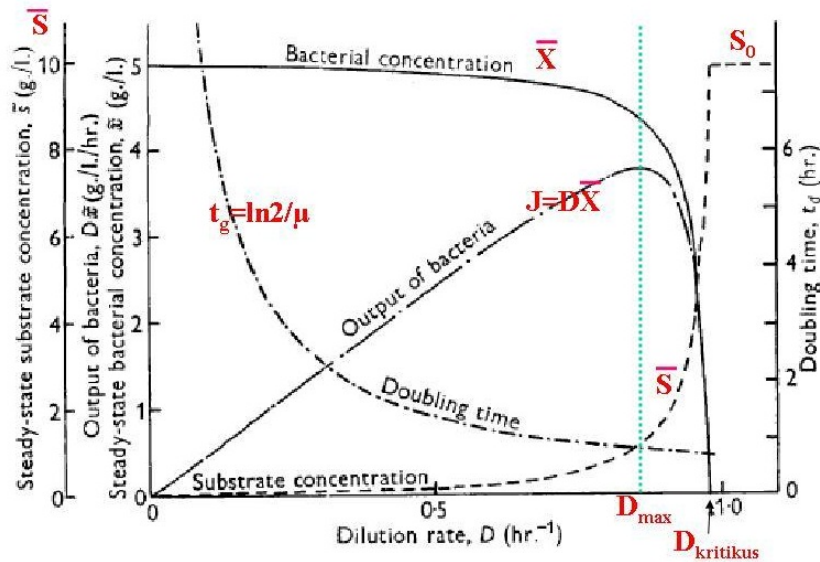
$$\bar{x}_{\max} = Y \left[S_0 + K_S - \sqrt{K_S (S_0 + K_S)} \right]. \quad (4.184)$$

A kemosztát maximális produktivitása tehát e kettő szorzata, azaz

$$\begin{aligned} J_{\max} &= D_{\max} \bar{x}_{\max} = \mu_{\max} Y \left[1 - \left(\frac{K_S}{K_S + S_0} \right)^{1/2} \right] \cdot \left[K_S + S_0 - \sqrt{K_S (S_0 + K_S)} \right] = \\ &= Y \mu_{\max} S_0 \left(\sqrt{\frac{K_S + S_0}{S_0}} - \sqrt{\frac{K_S}{S_0}} \right)^2 \end{aligned} \quad (4.185)$$

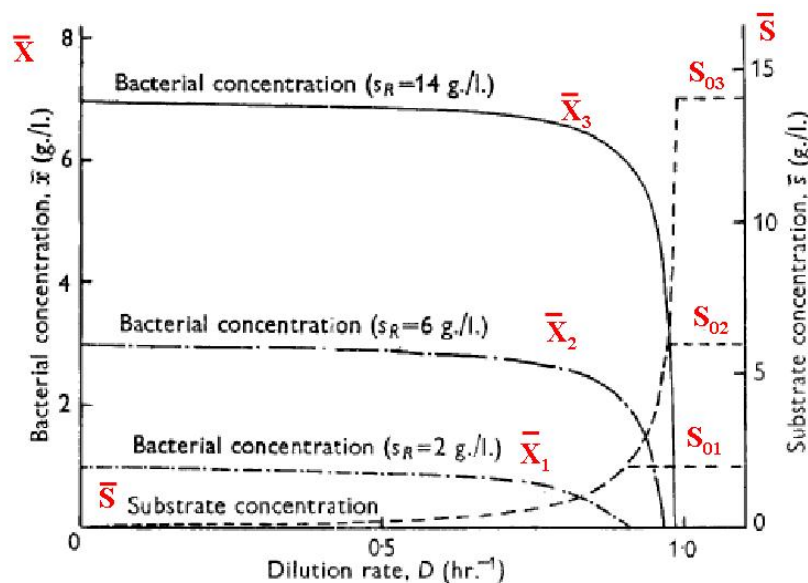
Ha $S_0 \gg K_S$, akkor a (4.185) a $J_{\max} \cong Y \cdot \mu_{\max} \cdot S_0$ kifejezéssé egyszerűsödik, amely tehát megadja a kemosztát maximális produktivitását. Ez nyilván olyan elméleti maximum, ami tájékoztat ugyan lehetőségeinkről, de a gyakorlatban nem valósítható meg, mivel ilyen produktivitással (lásd 4.43. ábrát) stabilitási problémák miatt nem lehetséges a gyakorlatban kemosztátot üzemeltetni. Az ábrából

láthatóan ugyanis a D/x görbe maximuma igen közel esik a $D_{\text{kritikus}} \sim \mu_{\text{max}}$ értékhez, vagyis a kritikus hígítási sebességhez, ahol pl. a tápoldatpumpa, illetve lefejtőrendszer valamilyen hibája folytán fellépő D -ingadozás nagyon könnyen a mikrobajetek kimosódásához vezethet. A valóságban gyakran ennél is rosszabb a helyzet, mert $S_0 \gg K_S$ nem minden esetben teljesül, és akkor a μ_{max} -nál esetenként már jóval kisebb hígítási sebességeknél is kimosódik a rendszer.



HERBERT, ELSWORTH, TELLING (1956). The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study, *J. gen. Microbiol.* 14, 601–622

4.43. ábra: Kemosztát rendszer jellemzőinek függése a hígítási sebességtől



4.44. ábra: Kemosztát rendszer jellemzőinek függése a betáp limitálósusztrát-koncentrációjától

Az állandósult állapotnak a hígítási sebességtől való függését esetében összefoglalóan a 4.43. ábrán tüntettük fel, amit Herbert és munkatársai klasszikus kemosztátos publikációjából vettünk át a szerzők iránti tiszteletből.⁶² Az ábrán jól látszik, hogy egy nagyon széles hígítási sebesség tartományban a bioreaktorból távozó fermentlé mikrobakonzentrációja alig változik, és ennek meg-

⁶² Herbert D., Elsworth, R., Telling R. C. (1956): The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study *J. Gen. Microbiol.* 14, 601–622.

felelően annak szubsztrát- koncentrációja is alig változik, és igen alacsony szinten van. Az ugyancsak Herbert eredeti cikkéből vett következő ábrán pedig azt láthatjuk, hogy míg értelemszerűen az elfolyó lé mikroba- koncentrációja erősen függ a limitáló szubsztrát bemenő koncentrációjától, addig a kimenő egyáltalán nem függ attól. Ezen érdemes kissé elgondolkozni, mert például ez azt is jelenti, hogy kemosztátban nem érvényesülhet szubsztrátinhibíció, akármekkora ugyanis a bemenő tápoldat szubsztrát-koncentrációja, a reaktorban azonnal egy kicsiny értékre esik le.

4.4.5.1.1. *A kemosztát rendszer tranziens viselkedése, a tartózkodási idő*

A fejezet eddigi részében a kemosztát folytonos fermentáció állandósult állapotával foglalkoztunk. Valóban az állandósult állapot megléte az a legfontosabb jellemzője a rendszernek, amely drámai módon megkülönbözteti az időben folytonosan változó szakaszos rendszertől, utóbbi ugyanis (az exponenciális szakasz kivételével, ahol a mikroba viselkedése indifferens a S-koncentrációra) tipikusan tranziens viselkedésű folyamat.

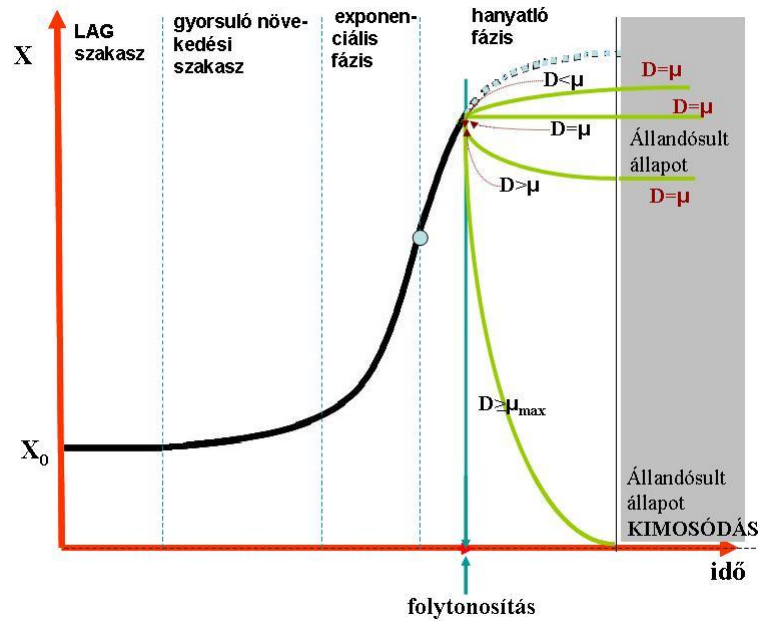
A kemosztát esetén is van azonban tranziens, nem állandósult állapotú viselkedés:

- a folytonos fermentáció indításakor, tehát amikor a szakaszos rendszerről folytonosra térünk át. Hangsúlyozzuk, hogy minden folytonos fermentáció szakaszosként indul.
- bármiféle ugrás vagy impulzuszavarás után, tehát ha megváltoztatjuk a kontrollváltozókat, pl a hígítási sebességet, a betáplált szubsztrát(ok) koncentrációját, a rendszer hőmérsékletét, pH-ját és így tovább.

Ezen átmeneti állapotok tanulmányozása két szempontból is fontos:

- a tranziens viselkedés megismerése a rendszer stabilitására adhat felvilágosítást, ugyanis véletlenszerű változások (pl. az adagolási sebességben, pumpakimaradás, levegőkimaradás stb.) is érhetik a rendszert, illetve
- a fermentációs rendszer kinetikai viselkedése tanulmányozásának egyik gyümölcsöző módszere éppen a tranziensek matematikai modellezése.

A MONOD-modell szerinti leírásból egyértelmű, hogy a kemosztát rendszer önszabályozó. Függetlenül attól, hogy a hanyatló fázis milyen x , S koncentrációjánál térünk át a folytonos tenyésztésre, a beállított hígítási sebesség fogja meghatározni, hogy milyen állandósult állapot áll be, feltéve, hogy $D < D_{\text{kritikus}}$ (lásd a 4.45. ábrát és a 4.7. animációt!). Felmerülhet a kérdés, honnan tudhatjuk, hogy milyen hígítási sebesség választható. Ezt csak akkor tudhatjuk biztosan, ha ismerjük mikrobánk adott körülmények között érvényes kinetikai állandóit (μ_{max}), vagy ha grafikus módszerrel tervezzük folytonos rendszerünket.

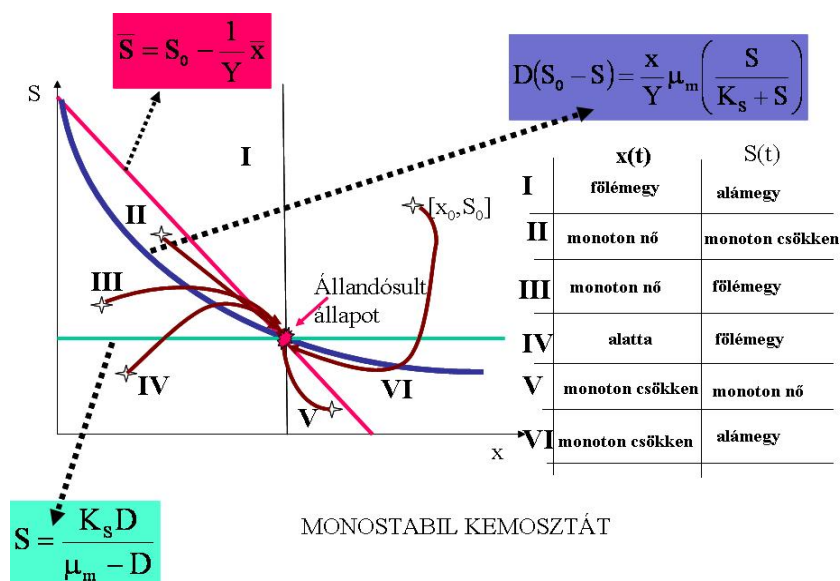


4.45. ábra: A folytonos fermentációs rendszer mindig szakaszos rendszerként indul



4.7. animáció: Folytonos rendszer indítása

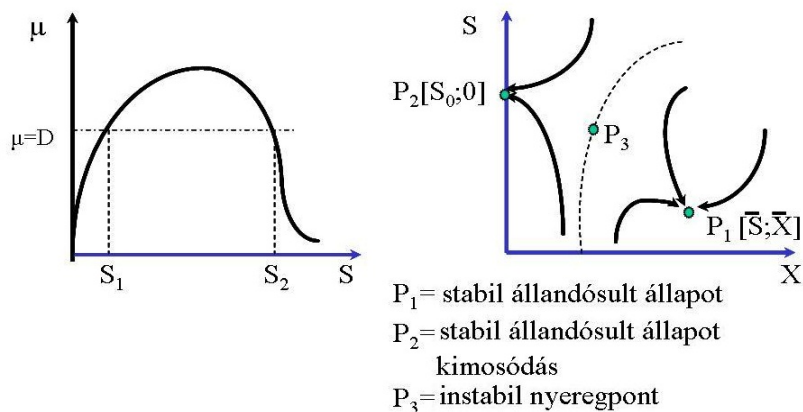
De vajon minden esetben egy határozott állandósult állapotot kapunk? Ha a fermentációs rendszer adekvát módon leírható a Monod-modellel, akkor igen, a kemosztát monostabil rendszernek bizonyul, egy tranziens után mindig ugyanaz a $\mu=D$ meghatározta \bar{x} és \bar{S} -koncentrációval jellemezhető állandósult állapot áll be, amint a 4.46. ábra ún. fázissík diagramján láthatjuk. Ennek az az oka, hogy egy adott fajlagos növekedési sebességhez csupán egy adott szubsztrátkoncentráció tartozik. Ekkor bármilyen módon zavarjuk is meg a rendszert, azaz mozdítjuk ki az állandósult állapotából, ugyanabba az állandósult állapotba fog visszatérni. Hogy milyen úton, azaz milyen tranziens mentén valósul meg ez a visszatérés, ez a kitérés helyétől függ. Ezen tranziensek rendkívül érdekes viselkedést mutathatnak – az ábrán követhető módon – például lehet az, hogy egy adott pontból az elérendő állandósult állapotot úgy közelíti meg a rendszer, hogy az út mentén nő vagy csökken, illetve akár irányt is válthat az adott X vagy S paraméter változása.



4.46. ábra: Monostabil kemosztát

Ha azonban eltérő kinetika jellemzi rendszerünket, nem feltétlenül egy stabil állandósult állapot lehet, sőt elképzelhető, hogy a rendszer instabil lesz (pl. két szélső érték között oszcillálni fog). Így például, ha szubsztátinhibíció lép fel, akkor egy $\mu=D$ érték két S -koncentrációnál is lehetséges, azaz a rendszer oszcillálhat. A két stabil állandósult állapotra (amelyek közül az egyik a kimosódást jelenti) jellemző fázisdiagramot a [4.47. ábrán](#) mutatjuk be.

A környezeti paraméterek ugrásszerű, impulzusszerű vagy éppen periódikus változása vagy változtatása okozta tranziensek matematikai leírása meglehetősen bonyolult, e jegyzet kereteit mindenképpen meghaladja, ugyanígy nem feladatunk itt az állandósult állapotok stabilitását vizsgálni.⁶³



4.47. ábra: Többszörös állandósult állapot (szubsztátinhibíció)

Azt a kérdést azonban meg kell vizsgálnunk, hogy egy környezeti paraméterben bekövetkezett változás után mennyi ideig kell várunk, amíg az új állandósult állapotot (ha van) jellemző paramétereket mérhetjük.

A kemosztát elvű folytonos fermentációs rendszer leírásakor feltételeztük, hogy reaktorunk tökéletesen kevert, így mind időben, mind térben mindenütt homogén, koncentrációgradiensek nem

⁶³ A stabilitásvizsgálathoz jó megközelítést találhatunk pl. Blanch–Clark (1996): Biochemical Engineering, Marcel Dekker, N. Y., Basel, Hong Kong című könyvében.

alakulnak ki a reaktorban. A rendszerből vett mintát jellemző koncentrációk (x, S, \dots) ugyanazok, mint az elfolyó lé jellemző koncentrációi. Ugyanakkor, ha egy a rendszerbe bekerülő elemi folyadék-részecske sorsát követjük, könnyű belátni, hogy egy eloszlásfüggvénnyel lesz jellemezhető a tartózkodási idő.

Tekintsük a rendszer valamely anyagának koncentrációját zéró megfigyelési időpontban m_0 -nak, valamint t időpontban m -nek. Ekkor az adott anyagnak dm -nyi koncentrációja (azaz egységnyi térfogatban lévő mennyisége) távozik a rendszerből a kicsiny t , ill. $t + dt$ időpontok között (azaz éppen dt idő alatt):

$$-dm = Dmdt \quad (4.186)$$

Ennek a dm -nyi anyagnak tehát t és $t+dt$ közötti értékű a tartózkodási ideje. Viszonyítsuk ezt a mennyiséget az induló koncentrációra, vagyis nézzük meg, hogy az eredetileg jelen levő anyagnak milyen tört része távozik a rendszerből (ugyanezen kicsiny dt idő alatt) a t és $t + dt$ időpontok között. Legyen ez a dF definíciószerűen:

$$dF = -\frac{dm}{m_0} \quad (4.187)$$

A dF tehát a t és $t + dt$ közé eső tartózkodási idejű anyaghányad. A (4.186) és (4.187) egyenletek egyesítésével:

$$dF = D \frac{m}{m_0} dt \quad (4.188)$$

Ebből m -et kiküszöbölhetjük, ha a (4.186) egyenletet integráljuk, ugyanis

$$-\int_{m_0}^m \frac{dm}{m} = D \int_0^t dt \quad \rightarrow \quad \int_{m_0}^m d \ln m = D \int_0^t dt, \quad (4.189)$$

illetve

$$\frac{m}{m_0} = e^{-Dt}. \quad (4.190)$$

Utóbbi eredményt (4.188)-ba helyettesítve megkapjuk a

$$dF = D \cdot e^{-Dt} dt, \quad (4.191)$$

illetve az

$$E = \frac{dF}{dt} = D \cdot e^{-Dt} \quad (4.192)$$

függvényt, amely a folytonos fermentációs rendszert (CSTR) jellemző tartózkodásiidő eloszlás sűrűségfüggvénye. Így a rendszerben lévő eredeti anyagmennyiségnek az a hányada, amelynek tartózkodási ideje t_1 és t_2 közé esik, az alábbi lesz:

$$F_{t_1, t_2} = \int_{t_1}^{t_2} E dt = \int_{t_1}^{t_2} D e^{-Dt} dt = e^{-Dt_1} - e^{-Dt_2} \quad (4.193)$$

ahol $F(t) = \int_0^t E(t) dt$ a tartózkodásiidő eloszlásfüggvénye. Ugyanígy a 0 és t időpont közötti tartózkodási idejű anyaghányadot akkor kapjuk meg, ha az $E(t)$ sűrűség függvényt 0 és t között integráljuk:

$$F_{0,t} = \int_0^t E dt = \int_0^t D e^{-Dt} dt = 1 - e^{-Dt} \quad (4.194)$$

Hasonlóan a t és ∞ időpontok között a rendszerben tartózkodó anyaghányad

$$F_{t,\infty} = \int_t^{\infty} E dt = \int_t^{\infty} D e^{-Dt} dt = e^{-Dt} \quad (4.195)$$

és végül, értelemszerűen 0-tól ∞ ideig a teljes anyagmennyiség kikerül a rendszerből, tehát:

$$F_{0,\infty} = \int_0^{\infty} D e^{-Dt} dt = 1 \quad (= F_{0,t} + F_{t,\infty}) \quad (4.196)$$

Mit jelentenek a fentiek folytonos fermentációs rendszerünk esetében? Tekintsünk példaként egy olyan kemosztát rendszert, ahol a hígítási sebesség $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$, azaz az átlagos tartózkodási idő 5 óra.

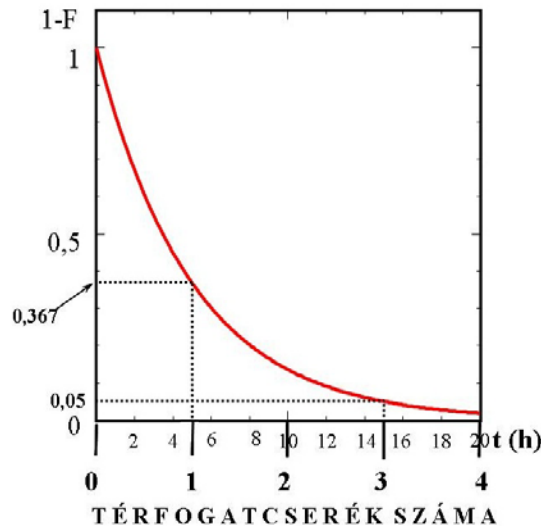
A 4.17. táblázat és a 4.48. ábra szemlélteti a térfogatcsereék függvényében ezt az esetet. Ennek megfelelően, ha egy folytonos rendszeren valamilyen zavarást végzünk, például megváltoztatjuk valamely tápanyag bemenő koncentrációját, legalább 3-4 térfogatcsereét ($t \cdot D = t/t_{\text{átlagos}} = \theta$) kell megvárni, hogyha a rendszernek a változtatásra adott válaszára, új állandósult állapotára vagyunk kíváncsiak.

4.17. táblázat: *Térfogatcsereék hatása a folytonos kemosztát fermentációra (a tartózkodás idő eloszlásának értelmezése)*

Térfogatcsere	1-F*	F**
$Dt=0,2 \text{ h}^{-1} \cdot 5 \text{ h}=1$	0,367	0,633
$=0,2 \text{ h}^{-1} \cdot 10 \text{ h}=2$	0,135	0,865
$=0,2 \text{ h}^{-1} \cdot 15 \text{ h}=3$	0,05	0,950
$=0,2 \text{ h}^{-1} \cdot 20 \text{ h}=4$	0,015	0,985

*térfogatrész még nem cserélődött ki

**térfogatrész már eltávozott a rendszerből



4.48. ábra: *A térfogatcsereék hatása az eredeti anyagmennyiség reaktorban maradó hányadára*

4.4.5.1.2. A szakaszos és folytonos rendszer összehasonlítása

Egy fermentációs rendszer megítélésekor általában három fő paramétert kell megvizsgálni: az eredő hozamot, a termékkoncentrációt és az eredő produktivitást. Sejttömegtermelés esetén az eredő hozam és a produktivitás kiemelten fontos. Érdemes utóbbit tüzetesebben megvizsgálnunk a folytonos fermentációval kapcsolatban, mert így szembeötlő lesz a folytonos rendszer kedvezőbb volta a szakaszossal szemben sejttömegtermelés esetén.

A 4.49. ábra segítségével nézzük meg először egy szakaszosan működő fermentor működési ciklusait! Egy szakaszos reaktor működése során több ismétlődő ciklust kell figyelembe venni:

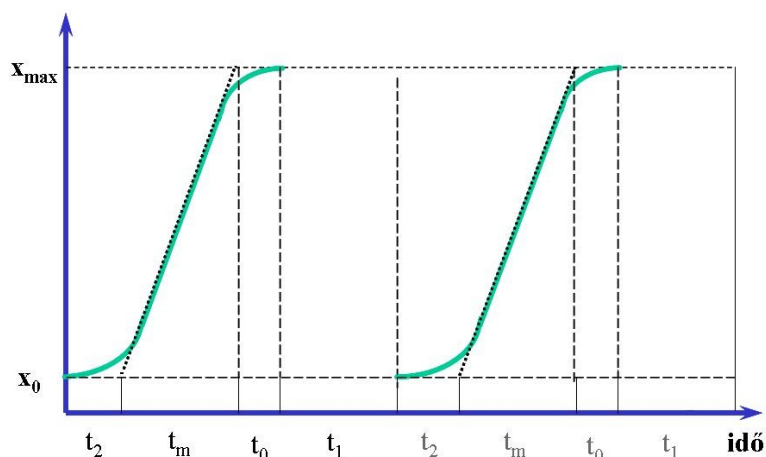
t_1 : az előző fermentáció „vágásának” (fermentlé lefejtése a szakaszos fermentáció végén), a fermentor mosásának, a táptalaj elkészítésének és sterilizálásának ideje,

t_2 : lag és a gyorsuló növekedés szakaszának ideje,

t_m : exponenciális fázis ideje, itt történik a legnagyobb mérvű szaporodás, ezt tekinthetjük leginkább „hasznos” időnek,

t_0 : hanyatló fázis ideje.

A ciklusidő tehát ezek összege, azaz $t_c = t_m + t_0 + t_1 + t_2 = t_m + t_1$, a vágáskor „learatható” sejt-tömeg ennyi összes működési idő alatt keletkezett.



4.49. ábra: Szakaszos fermentáció működési ciklusai

Ha a t_m idő alatt exponenciális növekedést tételezünk fel⁶⁴, akkor

$$t_m = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \frac{x_{\max}}{x_0}, \quad (4.197)$$

vagyis a szakaszos rendszer produktivitása felírható a következőképpen, ha a teljes S_0 kiindulási szubsztrát Y hozammal sejt-tömegé alakul:

$$J_{\text{szakaszos}} = \frac{\Delta x}{\Delta t_c} = \frac{YS_0}{\frac{1}{\mu_{\max}} \ln \frac{x_{\max}}{x_0} + t_1} \quad (4.198)$$

Ezzel szemben láttuk, hogy a kemosztát maximális produktivitása közelítőleg

$$J_{\text{kemosztát}} \cong Y\mu_{\max}S_0. \quad (4.199)$$

A két produktivás hányadosa

$$\frac{J_{\text{kemosztát}}}{J_{\text{szakaszos}}} = \ln \frac{x_{\max}}{x_0} + t_1\mu_{\max}. \quad (4.200)$$

⁶⁴ Kissé „csalunk” tehát a szakaszos tenyésztés javára.

Nézzük meg, hogy az összefüggésben szereplő paraméterek milyen szokásos tartományban mozognak.

Az x_{\max}/x_0 a legtöbb szakaszos fermentáció esetén 5–100 érték közé esik, így $\ln(x/x_{\max})$: 1,6–4,6. A t_i „nem hasznos” előkészítési, sterilizációs és vágási idő 10–20 órát igényel, míg a mikrobák generációsidő-tartományát 1–7 órára tehetjük, amely μ_{\max} : 0,1–0,6 értéknek felel meg. Így $t_i\mu_{\max}$ is nagyobb, mint 1 (1–12 közötti a fenti számokkal). Végeredményben tehát a vizsgált hányados mindenképpen egynél nagyobb, azaz a kemosztát produktivitása lényegesen nagyobb a szakaszos rendszerénél.

A 4.18. táblázat néhány összehasonlító példa adatát tartalmazza e kérdéstről. Látható, hogy minél kisebb a felhasznált mikroba generációs ideje és minél nagyobb a szakaszos rendszer nem hasznos időigénye, annál inkább előnyös kemosztát rendszert alkalmazni mikrobátömeg tenyésztése esetén, mert annál nagyobb lesz a produktivitás, az adott reaktortér kihasználtsága.

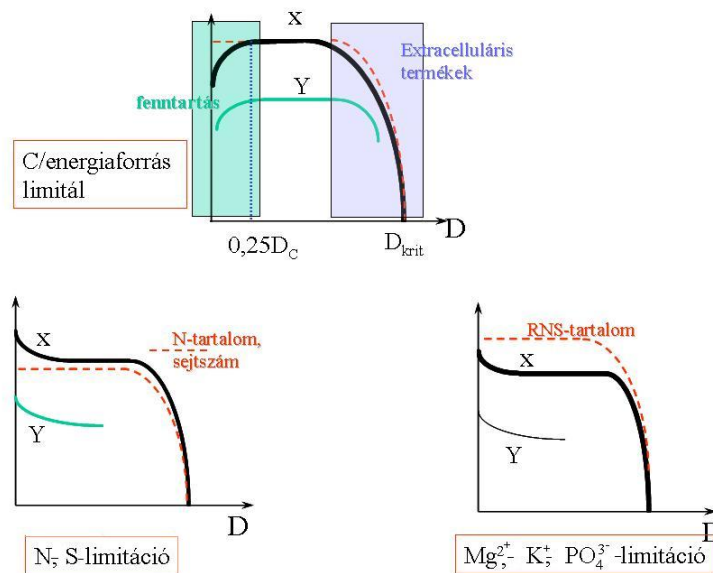
4.18. táblázat: Kemosztát és szakaszos fermentáció produktivitásának összehasonlítása

t_g [h]	$J_{\text{kemosztát}} / J_{\text{szakaszos}}$	
	$t_i=10$ h	$t_i=20$ h
3	7	9
1,5	9	14
1,0	12	18

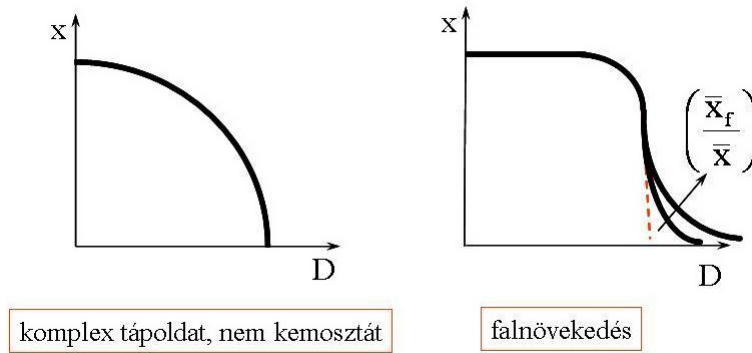
4.4.5.1.3. Eltérések az elméleti viselkedéstől

Kemosztát elvű folytonos fermentáció kísérleti megvalósításakor gyakran nem a 4.43. ábrán megadott képet nyerjük. Ennek többféle oka lehet. Amellett, hogy a görbék lefutásának eltérő volta kézenfekvő, ha a Monod-modell helyett másféle kinetikával írható le az adott mikroorganizmus viselkedése, vannak olyan okok is, amelyek mikrobiális fiziológiai (biokémiai) vagy reaktortechnikai okokra vezethetők vissza.

Néhány eltérő fermentációkép magyarázatát az alábbiakban adjuk meg (lásd a 4.50. és 4.51. ábrákat).



4.50. ábra: Eltérések a Monod-modell jósolta viselkedéstől 1.



4.51. ábra: Eltérések a Monod-modell jóslata viselkedéstől 2.

A 4.50. ábra első grafikonja szerint kis ($< 0,25 D_{\text{kritikus}}$) hígítási sebességek esetén kisebb a Monod-modell által jóslott elméletinél. Ez természetes, ha meggondoljuk, hogy az eredő hozam nem állandó, maga is a fajlagos növekedési sebesség függvénye (4.2.2. fejezet). A fenntartásienergia-igényt ui. (4.175) egyenlet felírásakor nem vettük figyelembe. Ha ezt megtesszük, kissé módosul az eddigiekben kialakult kép.

$$A \quad \frac{dx}{dt} = (\mu - D) \cdot x \quad (4.174)$$

összefüggés igaz a sejtkoncentráció-változásra, de a szubsztrátkoncentráció változása esetén – ha S a szén- és energiaforrás is egyben – a következő összefüggést kell felírunk:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \left(\frac{1}{Y_C} + \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{m}{\mu} \right) \cdot \mu x \quad (4.201)$$

Feltételezve az állandósult állapotot, $\mu = D$, $\frac{dx}{dt} = 0$, és $\frac{dS}{dt} = 0$, valamint $\bar{S} = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}$, így a következő

$$D(S_0 - S) = \left(\frac{1}{Y_C} + \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{m}{\mu} \right) \cdot \mu x \quad (4.202)$$

egyenletből az állandósult állapotbeli mikrobakoncentrációt kifejezve, a következő formulát kapjuk:

$$\bar{x} = \frac{S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}}{\frac{1}{Y_C} + \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{m}{D}} \quad (4.203)$$

Nagy hígítási sebességek esetén $m/D \approx 0$, azaz a fenntartási energiaszükséglet elhanyagolhatóan kicsiny a beépülés és a növekedési energiaszükséglethez képest, ekkor

$$Y_{x/S} \cong \frac{Y_C Y_{EG}}{Y_C + Y_{EG}} = \text{állandó} \quad (4.204)$$

Kis D -k esetén viszont a nevezőben m/D jelentősen csökkentheti az eredő hozamot és így értékét is.

Ennek az ábrának a D_{kritikus} -hoz közeli szakaszán is eltérést tapasztalhatunk az elméletitől. Sokszor ugyanis a hozam, és így \bar{x} is, kisebb az elméletinél D_{kritikus} -hoz közeli hígítási sebességeknél, ahol tehát igen gyors a növekedés. Ennek oka az, hogy a nagy fajlagos növekedési sebességnél a gyors intermedier anyagcsere lehetővé teszi, hogy bizonyos, nagy sebességgel képződő intermedier

termékek (piruvát, acetát, alkohol stb.) kikerüljenek a sejtekből, csökkentve ezáltal a sejtömegre számított eredő hozamot, ill. a sejt koncentrációt⁶⁵.

A 4.50. ábra második grafikonja szerinti képet akkor kaphatjuk, ha nem a C-/energiaforrás jelenti a kemosztát limitáló szubsztrátját, hanem például a N-forrás vagy a kénforrás. Ekkor kisebb hígítási sebességeknél – amikor tehát a növekedés lassú – a C-/energiaforrás túlzottan nagy koncentrációban van jelen, és a mikrobáknak lehetősége van bizonyos tartaléktápanyagokat akkumulálni (poliszacharidok, lipidek, β -OH-butirát). Ekkor tulajdonképpen a sejtömeg nő, a hozam nő, az egyes sejtek lesznek nagyobbak. Ha azonban a sejtszámot vagy a sejtek fehérje- vagy N-koncentrációját ábrázoljuk (szaggatott vonal), visszakapjuk az elméleti görbét.

Az ábra harmadik diagramján látszólag az előzőhöz hasonló a kép. Itt azonban más esetről beszélhetünk, ez a kép akkor fordul elő, ha a tenyészet K^+ , Mg^{++} vagy PO_4^{3-} limit alatt áll. Ismert, hogy mindhárom ion szorosan összefügg a nukleinsav-szintézissel. A kis hígítási sebességeknél lassan növekedő sejtek esetén az RNS- szintézis is lassú, amelyhez fenti ionok még elegendő mennyiségben állnak rendelkezésre. Ha azonban a hígítási sebesség nő, a fajlagos növekedési sebesség, tehát az RNS-szintézis sebessége is növekszik, amelyhez már nem elegendő a rendelkezésre álló ionszint, így ezen ionok is limitálónak válnak és befolyásolják \bar{X} és Y értékét. Ebben az esetben akkor kapnánk szabályos görbét, ha az RNS-tartalmat ábrázolnánk, amint a piros szaggatott vonal mutatja.

A 4.51. ábra első diagramja gyakran mérhető komplex, nem (jól) definiált összetételű táptalajok felhasználása esetén. A fajlagos növekedési sebesség (D) növekedésével a sejtek tápanyagigénye változik, a táptalajból hol ez, hol az a komponens is limitálónak válhat. Azt mondhatjuk, hogy ebben az esetben nem tudjuk, melyik tápkomponens(ek) a limitáló szubsztrát(ok). Ezt a típust nemkemosztát folytonos fermentációnak nevezik.

A fentiekben bemutatott négy példája a folytonos, kemosztát elvű fermentáció anomális viselkedésének azt sugallja, hogy a folytonos fermentációknál fokozottan gondosan kell megválasztani egyrészt a limitáló szubsztrátot, másrészt megtervezni a tápoldat egyéb minőségi és mennyiségi összetételét.

A 4.51. ábra másik diagramja egy technikai okokra visszavezethető anomális viselkedést, az ún. falnövekedést mutatja. Sok mikroorganizmus, főképp fonalas mikroba képes megtapadni a bioreaktor üveg vagy fém felületein, s ez a hosszú folytonos fermentáció alatt akár masszív lerakódó sejtömeget is jelenthet. Ráadásul a falnövekedés azt is okozhatja, hogy a képződött mikrobarétegből időről időre nagy darabok válnak le, megnövelve a szuszpendált mikrobátömeget is. Amellett, hogy ilyen esetben a folytonos technika nehézkes, pontatlan eredményeket nyerhetünk a mintavételezés során, a falnövekedés egy érdekes kinetikai eredményre is vezet. Legyen \bar{X} a szuszpendált mikrobák koncentrációja bioreaktorukban, \bar{X}_f pedig a megtapadtan növekedő sejtömeg egységnyi térfogatra vonatkoztatva. (Ez tehát szintén koncentráció dimenziójú mennyiség.) Ekkor a kemosztát mérlegegyenletek a következőképpen alakulnak állandósult állapotban:

$$D\bar{X} = \mu\bar{X} + \mu\bar{X}_f \quad (4.205)$$

$$D(S_0 - \bar{S}) = (\mu\bar{X} + \mu\bar{X}_f) / Y_{x/s}$$

A hígítási sebesség ebből

$$D = \mu \left(1 + \frac{\bar{X}_f}{\bar{X}} \right), \quad (4.206)$$

ami nagyobb, mint μ , azaz $D_{kritikus} > \mu_{max}$ is elérhető egy falnövekedéses kemosztáttal, a rendszer nem fog kimosódni, torzul az eredetileg várt görbe, és ez a torzulás annál nagyobb, minél nagyobb a falnövekedés mértéke.

A kemosztát alapvető összefüggéseinek levezetésekor azzal a feltételezéssel élünk, hogy az alkalmazott bioreaktor tökéletesen kevert, azaz a beáramló friss tápoldat pillanatszerűen (a valóságban az átlagos tartózkodási időnél lényegesen rövidebb idő alatt) elkeveredik a rendszerben. Néhány

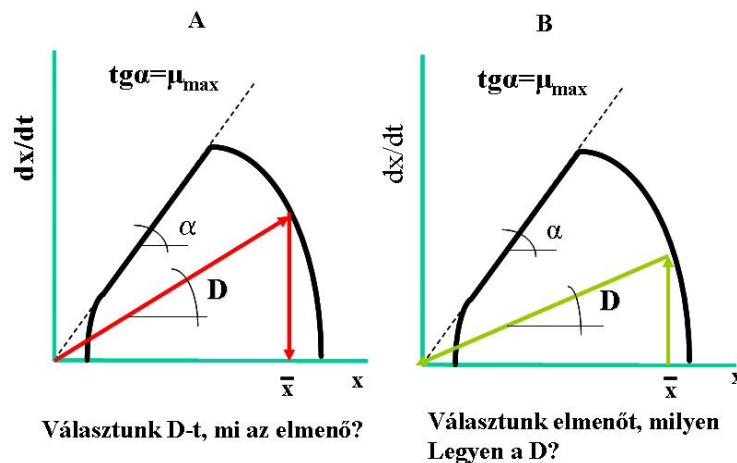
⁶⁵ Evvel a jelenséggel találkozhatunk a pékésztő-fermentáció Crabtree-effektusa esetén is. Lásd 4.4.4.5. alfejezetet

literes, laborléptékű bioreaktor esetén ez a feltételezés elfogadható, kivéve pl. nagyon viszkózus fermentálé, intenzív habzás vagy a sejteknek a reaktorfelületekhez történő tapadása esetén. Ha a keverés-keveredés nem tökéletes, olyan terek alakulhatnak ki a reaktorban, amelyekre a D nem jellemző: akár kisebb, akár nagyobb effektív hígítási sebesség is érvényes lehet. Így ha a beállított D közel van $D_{kritikus}$ értékéhez, lehetnek olyan reaktorterületek, amelyekre $D_{tényleges} > D_{kritikus}$, tehát itt „kimosódás” történhet, míg $D_{tényleges} < D_{kritikus}$ esetén a mikroba lassabban nő, mint azt kívánjuk. Ezáltal az elméletileg várttól eltérő, de főképpen nem becsülhető eredmények alakulhatnak ki. Erről a kérdésről a 4.6.1. alfejezetben részletesebben szólnunk.

4.4.5.1.4. A kemosztát tervezése

A (4.176) és (4.178) egyenletekben megadott állandósult állapot-összefüggések teremtik meg a kemosztát megtervezésének lehetőségét, ha ismerjük az egyenletekben szereplő kinetikai állandókat. Ehhez szakaszos kísérletek elvégzése szükséges, ugyanolyan környezeti körülmények között (pH, hőmérséklet, tápoldat összetétel), mint a tervezett folytonos fermentáció körülményei. E kísérletekből a kinetikai konstansok meghatározhatóak.

Ha vannak szakaszos eredményeink, akkor egy grafikus módszer is rendelkezésünkre áll, amelynek alapját a 4.52. ábra módszere teremti meg. A módszer lépéseit követhetjük a 4.8. animáción is.



4.52. ábra: Folytonos kemosztát tervezése grafikus módszerrel



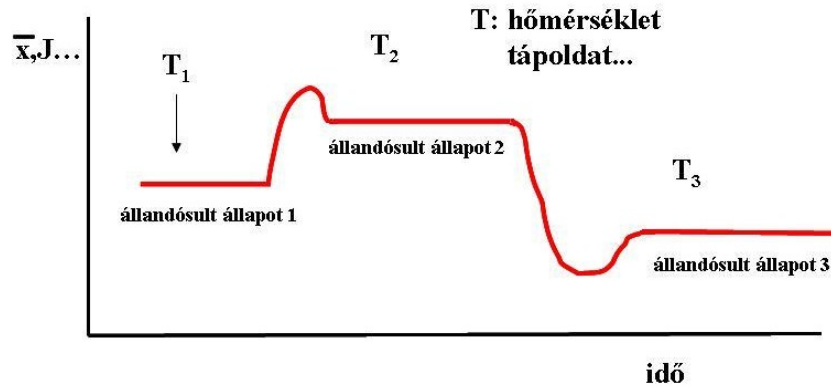
4.8. animáció: Folytonos rendszer tervezése grafikus módszerrel

4.4.5.1.5. A kemosztát alkalmazásai

A kemosztát elvű folytonos fermentáció előnyei a szakaszos rendszerrel szemben összefoglalóan a következők:

- produktivitása nagyobb, mint a szakaszos rendszeré, állandósult állapotban a mikrobák kiegyensúlyozottan növekednek (homogén, azonos fiziológiai állapotú és azonos beltartalmú tenyészet vehető el a rendszerből),
- a folytonos működés és állandósult állapot jobb lehetőséget teremt a mérés- és szabályozástechnikai feladatok elvégzésére.

Előnyei alapján főként nagytömegű sejtelőállítás céljára érdemes felhasználni (SCP, pékélesztő, takarmányélesztő). Egy sor kutatási célú felhasználása is van. Segítségével a környezeti tényezők hatása reprodukálható körülmények között viszonylag gyorsan vizsgálható. Így az állandósult állapotok elmozdulása alapján egyfaktoros vagy kísérlettervek alapján többfaktoros offline optimálási célokra is felhasználható (táplódat-optimálás, pH, hőmérséklet optimálás, stb.) (4.53. ábra)



4.53. ábra: Kemosztát felhasználása optimálásra

Az egyszerű, egylépcsős kemosztát felhasználása azonban nem minden területen lehetséges. A kemosztátban történő termékképződésre vonatkozóan még nem született átfogó elmélet, ipari elterjedése a „termékes” fermentációk esetén nem jellemző, kivéve az alkoholos erjedéseket: az ipari etanol és sör fermentációját. Várhatóan primer anyagcseretermékek esetén (ahol a termékképződés főként a növekedéshez kötött) terjedni fog, bár leírtak már – laborléptékben – szekunder metabolit (penicillin) és enzimtermelő kemosztát rendszereket is.

Az 1950-es években történt bevezetése óta az állandósult állapotú kemosztát tenyésztés előnyös volta széleskörűen beigazolódott. A modern biológiai kutatásokban is alkalmazást nyer, például felhasználják a környezet kiváltotta evolúciós események tanulmányozására, az ún. mutátor gének viselkedésének (antimikrobiális szerekkel szemben kialakuló rezisztencia) tanulmányozására. Egyáltalán a modern fiziológiai kutatásoknak egy nélkülözhetetlen eszköze lett, hiszen segítségével lehet állandó körülmények között tanulmányozni a mikrobák viselkedését. „Csak idő kérdése, hogy a különböző „omikai” (genomika, transzkriptomika...) kutatások is felfedezzék a kemosztátban rejlő lehetőségeket”.⁶⁶ A valós világ modellezésének igénye azonban az eredeti kemosztátnak a továbbfejlesztéseit is kiváltotta, mint például az egyéb „-sztátok”, amelyekről a következőkben szólnunk.

Megjegyezzük még, hogy a kemosztát folytonos fermentációs rendszer felhasználása csaknem kizárólagos a biológiai szennyvíztisztításban.

4.4.5.2. Egyéb speciális kemosztát alapú folytonos technikák

A kemosztát elvű folytonos fermentáció megvalósítható több lépcsőben is. Ez több kevert reaktor egymás utáni kapcsolását jelenti, s a táplódat- és tenyészétáramlás megvalósítási módjától függően beszélhetünk:

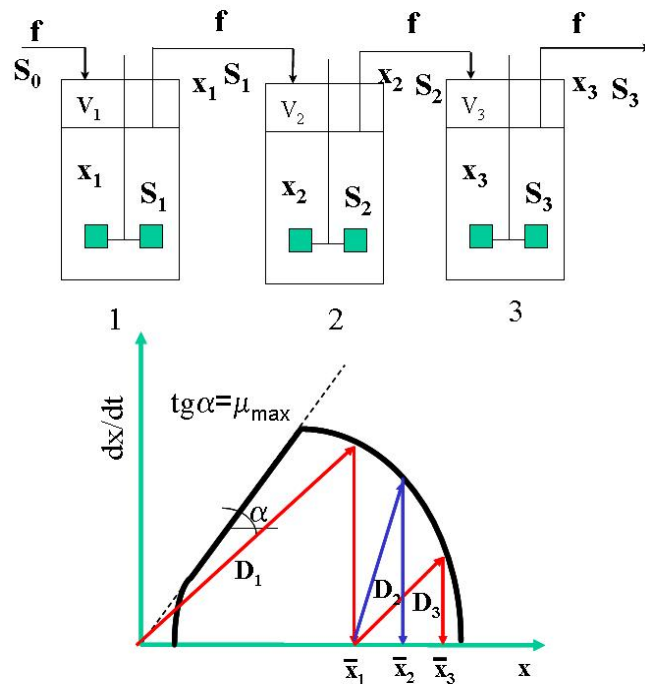
- egyáramú többlépcsős rendszerről (4.54. ábra),
- többáramú többlépcsős rendszerről (4.55. ábra).

Az egyáramú rendszer hasonló grafikus módszerrel tervezhető, mint azt a 4.52. ábrán láttuk. Míg a 4.54. ábrán egy olyan háromlépcsős egyáramú rendszert szemléltettünk, amelynek reaktorai egyformák, a tervezés módszerét bemutató grafikon olyan rendszerre vonatkozik, ahol mindhárom reaktor más-más méretű. Mikor van egy ilyen változó reaktorméretű operáló rendszernek létjogosultsága?

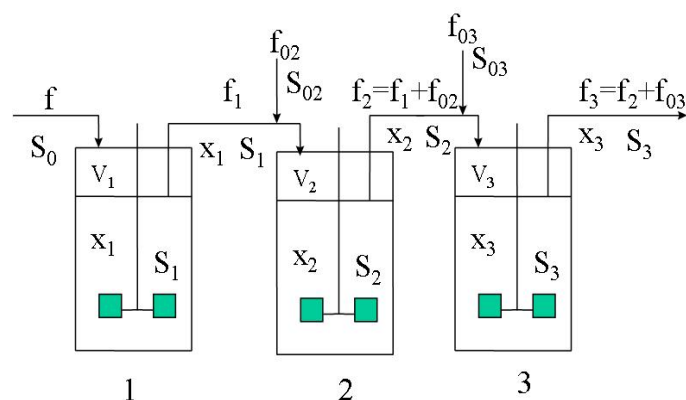
⁶⁶ P. A. Hoskisson, G. Hobbs: Continuous culture – making a comeback? Microbiology (2005), 151, 3153–3159.

Képzeljünk el egy szekunder metabolitot, amelyet termelő mikrobát az első lépcsőben nagy produktivitással (viszonylag kis reaktorban), nagy hígítási sebességgel tenyésztünk, majd átvezetjük a második lépcsőbe, amelynek reaktora jóval nagyobb, azaz a hígítási sebesség jóval kisebb lesz, mivel f -nek azonosnak kell lennie minden lépcsőre. Ekkor a fajlagos növekedési sebesség leesik egy olyan szintre, ahol már elkezdődik a szekunder metabolit képződése. Más esetben az első lépcsőben (az előzőekhez hasonlóan) csak a sejtömeg termelésére koncentrálnak, majd a második lépcsőben egy enzimes biotranszformációt hajtunk végre sejteinkkel.

Sejtömegtermelés szempontjából a 4.55. ábrán látható reaktorkapcsolás hasznosabb az előzőnél, hiszen itt a második, harmadik stb. lépcsőbe bevezetett friss tápoldat nagyobb növekedést tesz lehetővé, mint az egyáramú rendszer.



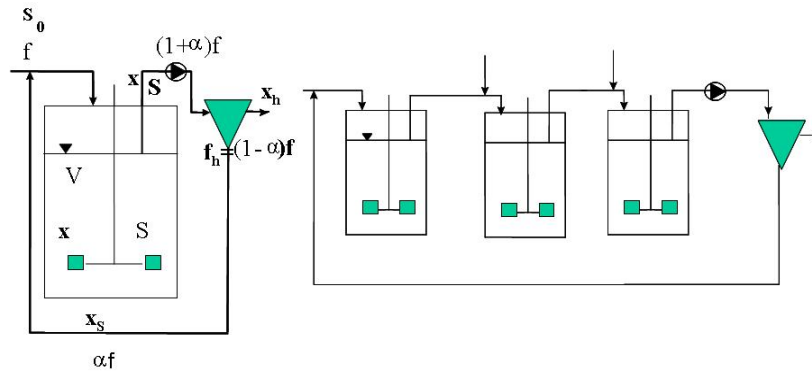
4.54. ábra: Egyáramú többlépcsős kemosztát rendszer



4.55. ábra: Többáramú többlépcsős kemosztát rendszer

Gyakran alkalmazott módszer (például a biológiai szennyvíztisztításban kizárólagosan) a leeresztett fermentáló sejtartalom egy részének visszatáplálása a folytonos rendszerbe. Az ilyen úgynevezett sejt-visszatartásos rendszerek azért előnyösek, mert magasabb sejt-koncentráció tartható fenn a reaktorban, és ezáltal nagyobb termelési vagy átalakítási sebesség érhető el. A 4.56. ábrán egy egylépcsős és egy háromlépcsős ilyen rendszer vázlatát láthatjuk. Az ábrán egy gravitációs ülepítőt tüntettünk fel a sejt-

elválasztás céljára, ami a szennyvíztisztításban általános, de természetesen egyéb megoldások, mint folytonos centrifuga, keresztáramú mikroszűrés vagy egyéb sejtválasztási megoldások is integrálhatók a kemosztáthoz.



4.56. ábra: Visszatáplálásos (részleges sejtvisszatartás) kemosztát rendszerek

Az ábra bal oldalán egy olyan elrendezés látható, amelynél a reaktorból távozó fermentlé egy részét (α hányadát) visszatáplálják. A sejtszeparátorban a fermentlevet egy nagyobb és egy kisebb sejtkoncentrációjú részre választják szét. A visszatáplálás a nagyobb sejtkoncentrációjú hányadból történik. Az ábra alapján világos, hogy a teljes térfogatáram $f = f_h + f_s$, vagyis a rendszerbe és a rendszerből történő anyagáramlás egyenlő. Írjuk fel az anyagmérleget a fermentorra:

$$V \frac{dx}{dt} = \alpha f x_s - (1 + \alpha) f x + V \mu x \quad (4.207)$$

Állandósult állapotban

$$\alpha f x_s + V \mu x = (1 + \alpha) f x \quad (4.208)$$

Amelyből, ha a $D=f/V$ hígítási sebességet felhasználjuk, a μ -re a következő összefüggést nyerjük:

$$\mu = D \left(1 + \alpha \left(1 - \frac{x_s}{x} \right) \right) \quad (4.209)$$

Most meg kell határoznunk, hogy mitől függ az x_s/x arány. Ehhez írjunk fel anyagmérleget a sejtszeparátorra, feltételezve, hogy $x_h=0$, azaz sejtmentes az f_h anyagáram (ez cél lehet egy biológiai szennyvíztisztítóban, azaz nem engedjük, hogy a tisztított lébe sejt kerüljön):

$$(1 + \alpha) f x = f_s x_s = \alpha f x_s \quad (4.210)$$

Ebből a kérdéses x_s/x érték az alábbi:

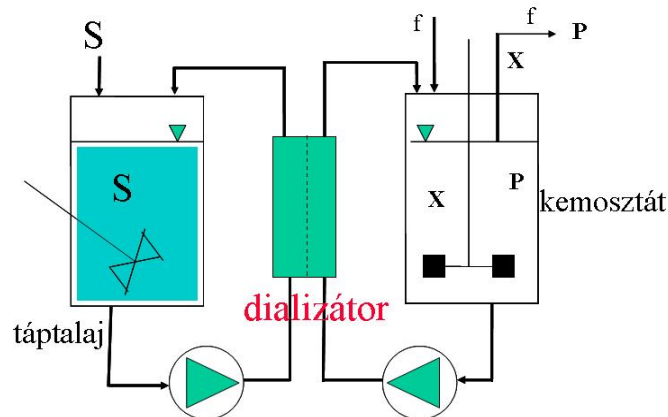
$$C = \frac{x_s}{x} = \frac{1 + \alpha}{\alpha} \quad (4.211)$$

Ebben a rendszerben tehát, mivel $C > 1$, ezért $D > \mu$ esetén is lehet állandósult állapot! Ez a sejtvisszacirkuláció, illetve sejtvisszatartás egyik legnagyobb előnye (ez akkor is igaz, ha nem sejtmentes az elvétel!). A sejtvisszatartásos rendszerben az állandósult állapotbeli szubsztrát koncentráció az elvett lében

$$\bar{S} = \frac{K_s D (1 + \alpha (1 - C))}{\mu_{\max} - D (1 + \alpha (1 - C))} \quad (4.212)$$

Végezetül megemlítjük a dialízissel egybekötött sejtvisszatartásos folytonos fermentációs rendszert, amelyet elsősorban olyan esetekben érdemes használni, amikor a szubsztrát (és/vagy termék)

gátlólag hat a mikroorganizmusokra (4.57. ábra), vagyis a szubsztrátot csak bizonyos ütemben lehet adagolni, vagy a terméket folyamatosan el kell távolítani.



4.57. ábra: A dialízistenyésztés (integrált fermentációs rendszer) egy lehetséges megvalósítása

4.4.5.3. Egyéb folytonos fermentációs rendszerek

A kemosztát elvű nem az egyetlen lehetséges folytonos működésű fermentációs rendszer. Abból a szempontból azonban egyedi, hogy ez az egyetlen olyan folytonos tenyésztési módszer, amely önszabályozó, azaz a választott hígítási sebességen (ami természetesen magában foglalja a szintén választható hasznos térfogatot és rátáplálási sebességet is) és bemenő szubsztrát-koncentráción kívül más szabályozandó mennyiség nincs, csupán ezek a kontrollváltozói, azaz szabályozástechnikai szempontból egyszerű. Néhány kedvezőtlen tulajdonsága is van azonban, amelyek kiváltották az egyéb, folytonos rendszerek irányában történő fejlesztéseket.

Ilyenek a következők:

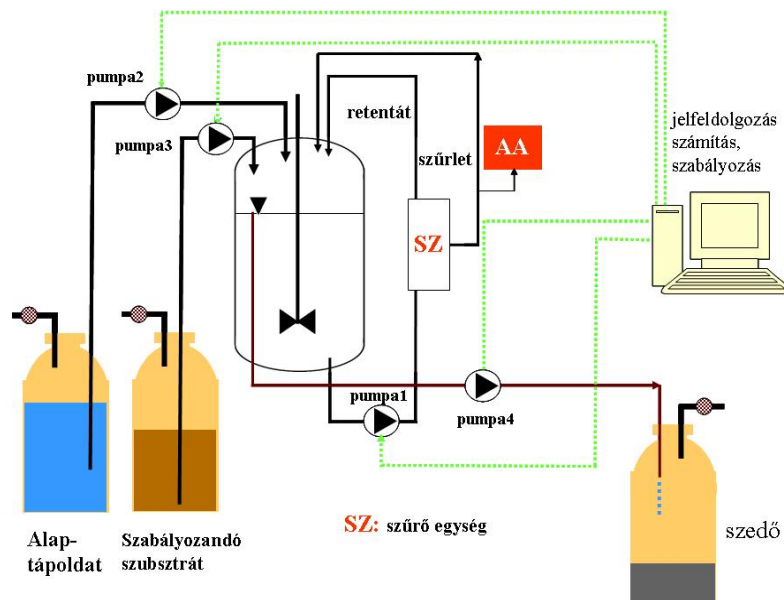
- A reaktorban kicsiny a limitáló szubsztrát koncentrációja, azaz az S-változás következményei a mikrobiális fiziológiára nem tanulmányozhatók.
- Előbbiből adódóan csak μ_{\max} -nál kisebb fajlagos növekedési sebességek állíthatók be, azaz nem használható ki a mikroorganizmus maximális növekedési potenciálja.

Az első hátrány kiküszöbölésére szolgálnak a különböző úgynevezett auxosztátok vagy más elnevezéssel nutrisztátok, míg a másodikat a turbidosztát rendszer oldja meg.

A **nutrisztát** vagy **auxosztát** elnevezés a tápoldat tápanyagkomponenseire utal: ezekben a rendszerekben valamilyen szubsztrátnak a koncentrációját szabályozzuk, tartjuk állandó értéken vagy éppen változtatjuk elhatározás szerint. A 4.58. ábra szerint a fermentlé egy kis részét az 1. szivattyú juttatja az SZ-szel jelzett szűrőegységre (ami egy mikroszűrő vagy ultraszűrő, rendszerint keresztáramú felépítéssel). Ez elválasztja a sejttömeget a tiszta létől. A retentát visszajut a fermentorba, míg a szűrlet kis része az automatikus analizátorba kerül (AA), amely meghatározza a tartani kívánt szubsztrát tényleges koncentrációját. Az analizátor jele alapján a komputer szabályozó algoritmus elkészíti a beavatkozó jeleket, amelyek a szubsztrát- és az alaptápoldat-adagoló pumpákat (pumpa2 és pompa3) vezérlik: növelik vagy csökkentik a beadagolási sebességeket. A folytonos működést egy negyedik szivattyú (pumpa4) biztosítja, mindig annyi levet fejt le, amennyi a fermentlé térfogatának állandó értéken tartásának céljából szükséges. Láthatóan egy ilyen nutrisztát működése lényegesen bonyolultabb, mint a kemosztáté, akár ha csak a felhasználandó szivattyúk számát tekintjük is. Előnye azonban, hogy tetszőlegesen lehet megválasztani a kitüntetett szubsztrát koncentrációját a fermentlében. Sikeresen alkalmaztak ilyen rendszereket például arra, hogy a glükóz különböző szitjeinek a mikrobákra (pl a Crabtree-effektuson keresztül) gyakorolt hatását vizsgálják, illetve, hogy bizonyos xenobiotikumok mikrobák által történő lebomlását (például pentaklórfenol lebontó mikrobák esetében) a xenobiotikum koncentrációjának függvényében lehessen vizsgálni.

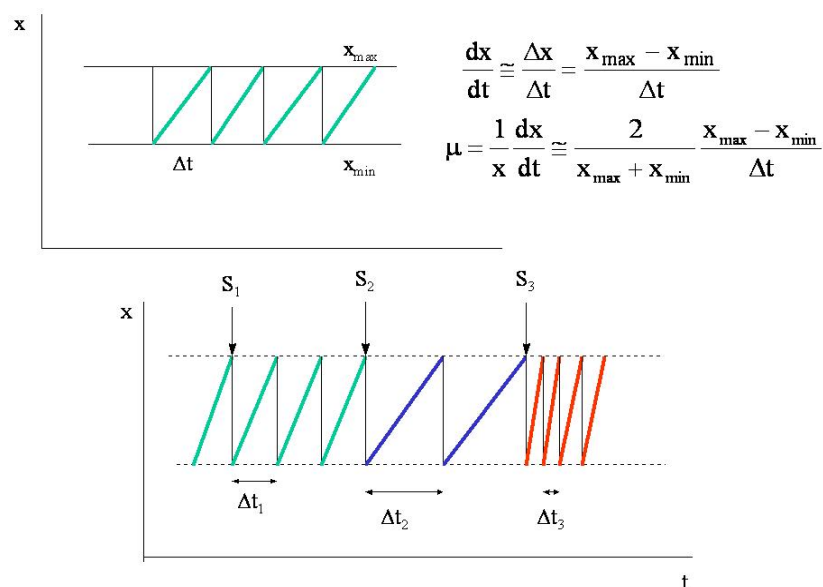
Speciális nutristát az úgynevezett pH-auxosztát. Ebben az esetben csupán a fermentlé pH-ját szabályozzák úgy, hogy számítógépes algoritmus segítségével adagolják a friss tápoldatot olyan ütemben, hogy a pH állandó értéken maradjon. Ez a rendszer tehát nagymértékben a tápoldat, illetve a fermentlé pufferkapacitásától függ. Nyilván nem minden esetben alkalmazható, csak ha direkt összefüggés van a pH és a tápoldat összetétele között, valamint a pH-változás jellegzetes a fermentáció során (pl. valamilyen sav képződik).

A nutristátokra, illetve auxosztátokra is jellemző az állandósult állapot, ennek a matematikai leírása azonban korántsem olyan egyszerű, mint láttuk a kemosztát esetében.

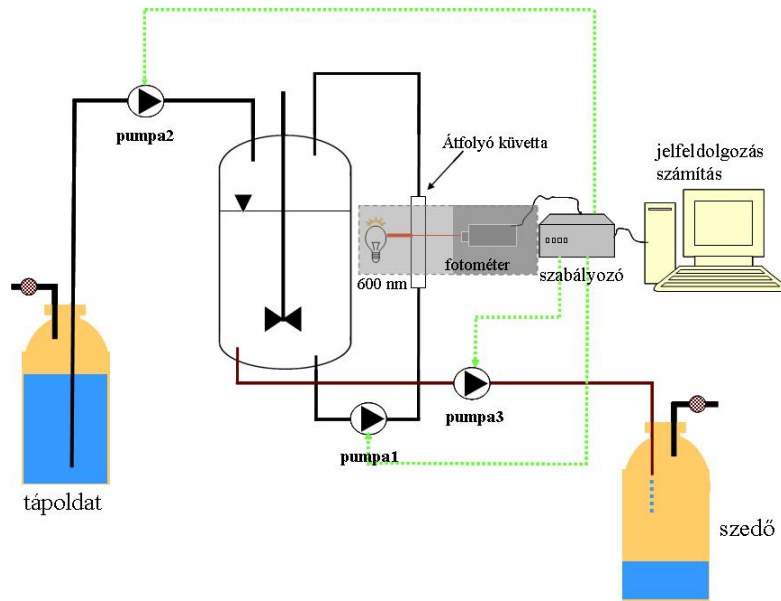


4.58. ábra: Nutristát folytonos fermentációs rendszer felépítése

Speciális fermentációs technika a **turbidosztát elvű folytonos fermentáció**. Tekintsük a 4.59. ábrán látható felső diagramot, amely a turbidosztát működési elvét magyarázza, valamint a 4.60. ábrát, ahol a technikai kivitel követhető. A fermentáció természetesen itt is szakaszosként indul (ez nem látható a 4.59. ábrán!). A fermentlevet egy cirkuláltató szivattyú (pumpa1) külső mérő körben átfolyó küvetán át keringeti, s így a fermentlé zavarossága (**optikai denzitás**) folyamatosan mérhető (elvét lásd a 4.8.1. alfejezetben).



4.59. ábra: Turbidosztát folytonos fermentáció elve és felhasználása optimalásra



4.60. ábra: Turbidosztát folytonos fermentáció felépítése

Amikor x mikrobakoncentráció (illetve az avval arányos optikai denzitás) eléri a tetszőleges értékűre választható x_{\max} értéket, egy automata elindít egy szivattyút (pumpa3), amely elkezdifejteni a fermentlevet, ugyanakkor előzővel azonos térfogatárammal, illetve azonos mennyiségű friss tápoldat betáplálása történik (pumpa2). Így a fermentlé felhígul, a mikrobakoncentráció csökkenni kezd. Amikor eléri a szintén tetszőleges értékű, előre beállítható x_{\min} értéket, a lefejtő és adagoló szivattyúk leállnak.

A mikrobakoncentráció újra növekedni kezd, míg x_{\max} értékét újra el nem éri, és innentől a ciklus ismétlődni kezd. Ilyen módon tetszőlegesen szűk Δx tartományban tartható a rendszer (turbidosztát = állandó optikai denzitással vezérelt folytonos fermentáció), és eléggé szűk tartományban történő megválasztása esetén tetszőlegesen megközelíthető egy valódi folytonos rendszer. A turbidosztátban a növekedési és a fajlagos növekedési sebesség könnyen mérhető, ugyanis a

$$\frac{dx}{dt} \cong \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{\Delta t} \quad (4.213)$$

és

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \cong \frac{1}{x} \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{2}{x_{\max} + x_{\min}} \frac{x_{\max} - x_{\min}}{\Delta t} \quad (4.214)$$

összefüggések alapján a mérések időmérésre vezethetők vissza. Az idő viszont rendkívül pontosan mérhető. Az x_{\max} és x_{\min} a kísérletező által beállított tetszőleges állandó értékek. A mikrobát jellemző legfontosabb kinetikai paraméter méréséhez tehát csupán a Δt , azaz a fűrészfogak között eltelt idő, a szivattyúk működési ideje között eltelt idő mérése szükséges. Előnye a rendszernek, hogy a Δx a szakaszos fermentáció mind exponenciális mind hanyatló fázisában is megválasztható.

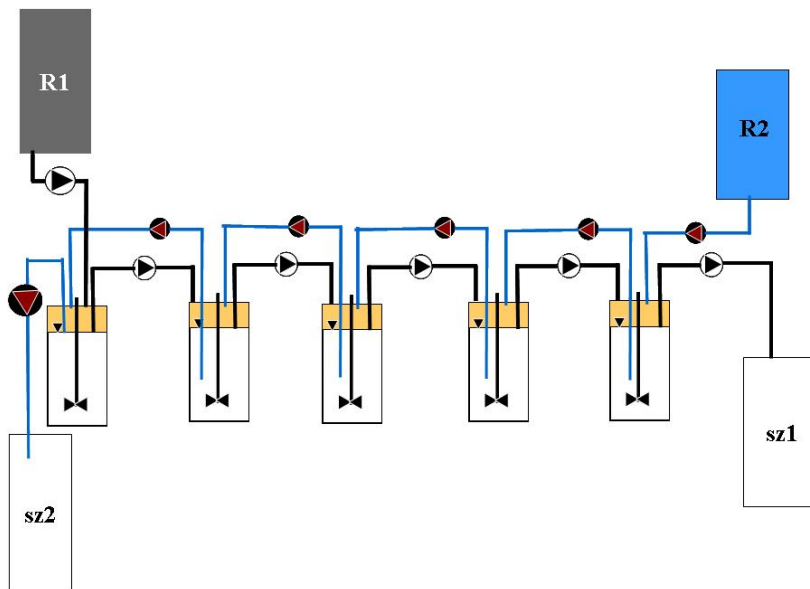
E tenyésztési technika elsősorban kutatási célokra alkalmas. Mivel bármely növekedési szakaszban üzemeltethető, így megvalósítható benne az exponenciális szakasz minden határon túl történő meghosszabbítása (korlátatlanul kiegyensúlyozott növekedés) is. Sikeresen alkalmazható egy paraméteres vagy kísérletterv alapján történő többparaméteres offline optimalásra. Tekintsük a 4.59. ábra alsó diagramját, ahol a tápoldat valamilyen S_1 komponensének (vagy egyszerűen az S koncentrációjának) hatását szemléltettük. S_1 adagolása esetén (kellően sok fűrészfogból) Δt_1 jellemző időt mértük. Ha a szubsztrát koncentrációját S_2 -re változtattuk, a $\Delta t_2 > \Delta t_1$ mért értékek jelentették a rendszer válaszát e beavatkozásra. Láthatóan ez kedvezőtlenül befolyásolta a mikrobánövekedést. Most áttérve S_3 táptalajra Δt_3 érték adódott, s ez szerint az $S_1 \rightarrow S_2$ változás a növekedés sebességére kedvező hatású. A „lépegetést” folytatva S szempontjából az optimum megközelíthető. Az ábrán természetesen csak az elért állandósult állapotokat szemléltettük, de ne felejtjük el, hogy a változtatás hatására itt is

egy tranziens szakasz jelentkezik először, az új állandósult állapot beállítását a Δt -k statisztikai elemzésével lehet megállapítani.

Megjegyezzük, hogy e technika a folytonos zavarosság-mérés követelményei miatt csak egysejtű mikrobák viszonylag híg tenyészei és tükrös tápoldat esetén alkalmazható, amikor az optikai denzitás pontosan mérhető.

4.4.5.4. Gradosztát fermentáció

A gradosztát fermentációs technika egy olyan többlépcsős kétáramú (és ellenáramú) folytonos rendszer, amelyben előremenő irányban egy és visszafelé menő irányban egy másik szubsztrát koncentrációja csökken a kemosztátnál látottak szerint (4.61. ábra). Az R1 tápoldattankból történik a betáplálás az első reaktorba, míg az R2 rezervoárból az utolsóba (az ábra egy ötlépcsős rendszert ábrázol). Az SZ1 szedő az ötödik lépcsőből, míg az SZ2 az elsőből kifolyó fermentlé gyűjtésére szolgál. A felépítés biztosítja, hogy két szubsztrátnak ellenirányú gradiense valósuljon meg. Az ábrán bemutatott rendszernek 11 pumpa biztosítja a működését, ebből is láthatóan nem a legökonomikusabb, és meglehetősen bonyolult rendszer. Valójában ez is kutató berendezés, amelyet R. W. LOVITT és J. W. T. WIMPENNY munkássága⁶⁷ nyomán ismerünk, és elsősorban egymás mellett élő több species (pl. versengő törzsek, lásd 4.4.7. fejezet), azaz vegyes tenyészetek vizsgálatára használják. Úgy is tekinthetjük, mint két ellenkező irányban működő többlépcsős rendszer „egymásba olvasztását”.



4.61. ábra: Gradosztát kemosztát rendszer

4.4.6. Speciális fermentációs technikák

4.4.6.1. Rátáplálósos szakaszos (fed batch) fermentáció

A szakaszos fermentáció hanyatló fázisában valamennyi metabolikus kvóciens (fajlagos sebesség) maximális értékétől zérusig változik, s ennek oka legtöbbször a limitáló szubsztrát – gyakran a C-/energia- forrás – elfogyása. A kemosztát folytonos fermentáció esetén ezt a hanyatló fázist célszerűen még viszonylag nagy μ -vel jellemezhetően hosszabbítjuk meg elvileg végtelen ideig úgy, hogy azonos sebességgel friss tápoldatot adagolunk és leerjedt fermentlevet veszünk el (azaz a térfogat állandó). Szintén a hanyatló fázis meghosszabbításaként értelmezhetjük a fed batch technikát, amikor

⁶⁷ R. W. LOVITT, J. W. T. WIMPENNY (1981): The Gradostat a Bidirectional Compound Chemostat and its Application in Microbiological Research, *Journal of General Microbiology* 127, 261–268.

állandó, változó vagy periodikus módon friss tápanyago(ka)t adagolunk a rendszerbe, de fermentélevétel nem történik a reaktorból.

Ezt a technikát egyre elterjedtebben használják mind a fermentációs iparban, mind a kutatásban, olyan esetekben, ahol viszonylag alacsony, de állandó szintű S-koncentrációt kell fenntartani (élesztő-fermentáció, glükózrepresszió, Crabtree-effektus), amikor viszonylag magas, de állandó S-koncentrációt kell alkalmazni (citromsav-fermentáció), vagy amikor a prekuzort folyamatosan adagolni kell (penicillin: fenilecetsav, triptofán: indol), akkor hasznosan alkalmazható ez a technika.

Valójában a tisztán szakaszos fermentációval napjainkban nem is igen találkozhatunk, elég, ha a már majd minden technológiánál alkalmazott pH-szabályozásra gondolunk (betáplálás van, elvétel nincs).

A fed batch technikát úgy is tekinthetjük, mint a CSTR-ben folytatott kemosztát elvű folytonos fermentációnak egy olyan speciális esetét, amelyet változó térfogat és csak betáplálás mellett hajtanak végre. A térfogatváltozás sebessége egyenlő a betáplálási sebességgel, amely lehet állandó, időfüggő, folytonos, de akár periodikus függvény is:

$$\frac{dV}{dt} = f(t) \quad (4.215)$$

Definiálható a hígítási sebesség is, amely most változó lesz:

$$D(t) = \frac{f(t)}{V(t)} \quad (4.216)$$

Ha X-szel jelöljük a rendszerben jelen lévő teljes sejttömeget, akkor a mikrobakoncentráció $x = X/V$, ezért a mikrobakoncentráció változási sebessége

$$\frac{dx}{dt} = \frac{V \frac{dX}{dt} - X \frac{dV}{dt}}{V^2} \quad (4.217)$$

Tekintsük a fenti egyenlet egyszerűbben felírt változatát:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{V} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{V} D \cdot X \quad (4.218)$$

Igaz továbbá, hogy

$$\frac{d(Vx)}{dt} = \mu(Vx) \quad (4.219)$$

A (4.218) és (4.219) egyenlet felhasználásával a következő kifejezést nyerjük az x időbeni változására:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{V} \mu(V \cdot x) - \frac{1}{V} D(V \cdot x) = (\mu - D)x, \quad (4.220)$$

ami formálisan egyenlő a kemosztátra kapott kifejezéssel. Értelme azonban más: itt a mikrobakoncentráció csökkenését nem a kimosódás, hanem a változó (egyre csökkenő) D okozta térfogatonvekedés idézi elő. Viszonylag kis betáplálási sebesség esetén itt is ki fog alakulni egy kvázi-állandósult állapot: a hígítás okozta mikrobakoncentráció csökkenést a növekedés kompenzálja, $\mu = D$.

A szubsztrátfogyásra is felírható az anyagmérleg-egyenlet:

$$\frac{dS}{dt} = (S_{be} - S)D - \frac{1}{Y} \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} x \quad (4.221)$$

Természetesen állandósult állapotban dS/dt is zérussal egyenlő, így kifejezhető a steady state szubsztrát- koncentrációja, és mikrobakoncentrációja:

$$\bar{S} = \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \quad (4.222, 4.223)$$

$$\bar{x} = Y(S_{be} - \bar{S})$$

A (4.222) és (4.223) egyenletek megint formálisan azonosak a kemosztát folytonos rendszerre kapott állandósult állapotot jellemző kifejezésekkel. A kifejezések szemmel láthatóan függenek D -től, de D változása igen csekély, így \bar{x} gyakorlatilag állandó lesz (kvázi steady state). Az állandósult állapotot szemléletesen úgy értelmezhetjük, hogy a befolyó friss szubsztrát azonnal átalakul sejttömeggé, azaz $\bar{x} \cong Y(S_{be} - \bar{S})$ szintén állandó.

A teljes sejttömeg természetesen nő. Tegyük fel, hogy állandó betáplálási sebességet alkalmazunk, ekkor

$$\frac{dV}{dt} = f \text{ állandó és } \rightarrow \int_{V_0}^V dV = f \int_0^t dt \rightarrow V = V_0 + ft. \quad (4.224)$$

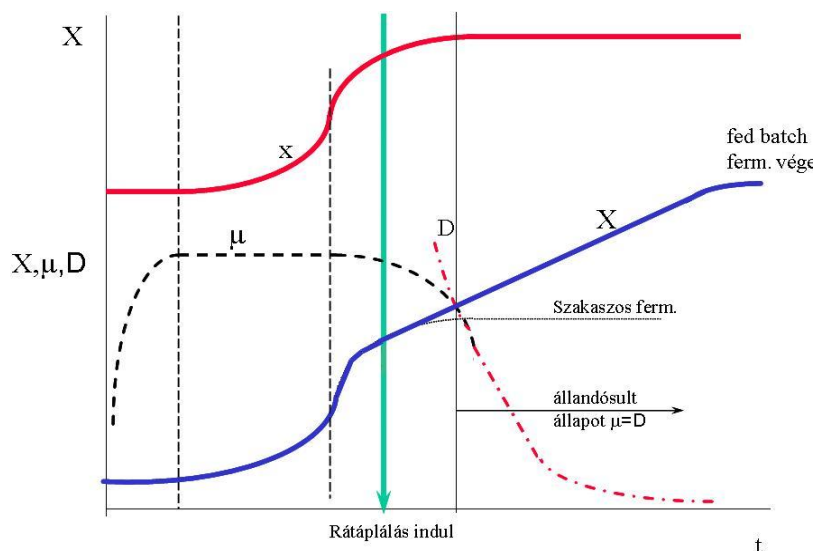
Vagyis a lineáris térfogatonövekedés miatt a sejttömeg

$$X = V\bar{x} = V_0\bar{x} + f\bar{x}t \cong x_0 + fY S_{be}t \quad (4.225)$$

szerint az időben lineárisan növekedik.

A fed batch fermentáció képe $f = \text{állandó betáplálási sebesség}$ esetén a 4.62. ábrán látható. Mint minden fermentáció, ez is szakaszos módon indul, majd egy adott időpontban kezdődik el a rátáplálás. A fed batch üzemmódban történő működtetés idejét a reaktortérfogat és az alkalmazott hígítás határozza meg. Általában induláskor a V_{teljes} térfogatú reaktort $(0,5-0,6)V_{\text{teljes}}$ térfogatig töltik fel, majd a fed batch üzemmóddal $(0,7-0,85)V_{\text{teljes}}$ értékig lehet felmenni.

E módszerrel tehát a növekedési ciklust mintegy meghosszabbítjuk, és így jobb reaktorkihasználtságot érhetünk el.



4.62. ábra: Rátáplálásos szakaszos fermentáció képe

4.4.6.2. Félfolytonos fermentáció

A félfolytonos fermentációs technika esetében a szakaszos tenyésztés adott időpontjában a tenyésztéből lefejtenek egy bizonyos térfogathányadot, majd a reaktort feltöltik friss tápoldattal az eredeti térfogatra (4.63. ábra). Így szintén jobb reaktorkihasználtság és nagyobb produktivitás érhető el, mint az egyszerű szakaszos tenyésztéssel. Szemben a kemosztáttal, amely csak szubsztrátlimitben üzemeltethető, félfolytonos fermentációt a szakaszos növekedés bármely szakaszában, így az exponenciális növekedés fázisában is üzemeltethetünk, hiszen x_{\max} és x_{\min} értéke bárhol megválasztható. Feltéve, hogy x_{\max} és x_{\min} értékek a növekedési görbe exponenciális szakaszába esnek,

$$x_{\max} = x_{\min} e^{\mu \Delta t} \quad \text{vagy} \quad \ln \frac{x_{\max}}{x_{\min}} = \mu \Delta t, \quad (4.226)$$

ahol: Δt az egyes lefejtések-adagolások között eltelt idő.

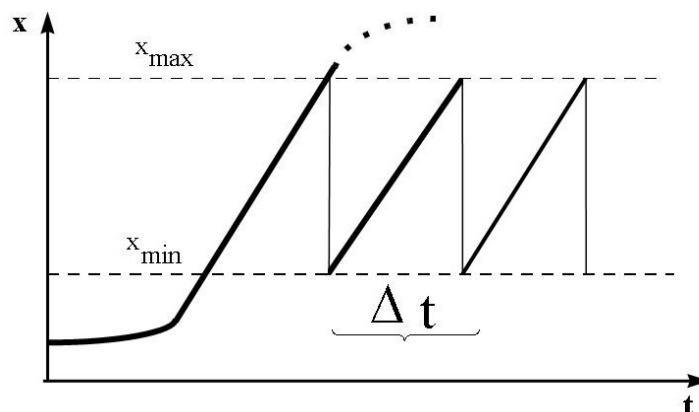
Ha a fermentáló térfogata V , és ennek α hányadát fejtjük le alkalmanként, akkor kifejezhető egy látszólagos hígítási sebesség:

$$D = \frac{\alpha V}{\Delta t} \frac{1}{V} = \frac{\alpha}{\Delta t} = \frac{\alpha \mu_{\max}}{\ln \frac{x_{\max}}{x_{\min}}} \quad (4.227)$$

A félfolytonos rendszer produktivitása ennek alapján:

$$J = D \cdot x = \frac{\alpha \mu_{\max}}{\ln \frac{x_{\max}}{x_{\min}}} x_{\max} \quad (4.228)$$

A félfolytonos rendszer elvileg végtelen ideig fenntartható, valójában az egyes szakaszokban a mikrobákat ért kis (véletlen vagy szisztematikus) változások lassan eltorzítják az egymást követő ciklusokat, ezért néhány ciklus után célszerű új szakaszos tenyésztést indítani.



4.63. ábra: Félfolytonos fermentáció képe

4.4.6.3. Ismételt fed batch fermentáció

A rátáplálásos technika oly módon is megvalósítható, hogy kombináljuk a benne rejlő előnyöket a félfolytonos technika előnyeivel. Ugyanis ha a rátáplálásos szakasz végén a tenyésztet bizonyos térfogatát lefejtjük, a rátáplálás újra indítható, és elvileg a ciklus végtelenszer ismételhető. A gyakorlatban természetesen néhányszoros ismétlést szoktak csak végrehajtani (pl. penicillin fermentációjánál).

4.4.7. Vegyes kultúrák, mikrobiális kölcsönhatások

A 4.19. táblázatban összefoglaltuk a mikrobiális kölcsönhatások legfontosabb típusait a közvetett kölcsönhatások vonatkozásában. Ezeket az jellemzi, hogy a kölcsönhatásban részt vevő specieszek nem érintkeznek egymással fizikailag, a hatás csak valamilyen közvetítő anyag vagy annak hiánya következtében lép fel. Ezzel szemben a 4.20. táblázatban összefoglalt kölcsönhatások direktek, a specieszek fizikai kontaktusa által érvényesülnek. A mikrobiális kölcsönhatások jelentősége az ökológiai rendszer(ek) fenntartásában, illetve a mesterségesen fenntartott kevert tenyészetek, például a biológiai szennyvízkezelés esetében nyilvánvaló.

A kölcsönhatások sokféleségéből csupán a kompetíció és a predáció eseteivel foglalkozunk részletesebben, illetve speciális esetként a plazmidtartalmú mikrobák versengését tárgyaljuk. Tudni kell, hogy az itt tárgyalt eseteknél a természetben lényegesen összetettebbek az előforduló kölcsönhatások. Az itt tárgyalt esetekben csak két kölcsönható speciesz jelenlétét tételezzük fel.

4.19. táblázat: Indirekt kölcsönhatások

B hatása A-ra	A hatása B-re	Példa	A kölcsönhatás leírása	A kölcsönhatás elnevezése
0	0	Joghurt Streptococcus Lactobacillus	Nincs kölcsönhatás	NEUTRALIZMUS
-	-	Kizárás (crossover), ha $\mu_A > \mu_B$	Versengés Negatív hatás a tápanyagok elvételével	KOMPETÍCIÓ
-	-		Toxin/inhibitor termelésével okozott kölcsönös negatív hatás	ANTAGONIZMUS
-	0	Antibiotikum termelése (inhibíció,antibiózis)	Toxin/inhibitor termelésével okozott negatív egyoldalú hatás,	AMENZALIZMUS
-	+		Negatív hatás lízist okozó ágens termelésével, pozitív hatás a biomassza szolubilizálásával	ECCRINOLÍZIS
+	0	Kénbaktérium (aerob) $H_2S \rightleftharpoons SO_4^{2-}$ Desulfovibrio(anaerob)	Stimuláló anyag termelése (+) <u>Inhibitor</u> eltávolítása (+)	KOMMENZALIZMUS
+	+		I. KOMMENZALIZMUS A és B egyidejű jelenléte nem kell	PROTOKOOPERÁCIÓ
+	+	Alga $CO_2 \rightleftharpoons O_2 + CH_4$ Baktérium	I. KOMMENZALIZMUS A és B egyidejű jelenléte kell	MUTUALIZMUS

4.20. táblázat: Direkt kölcsönhatások

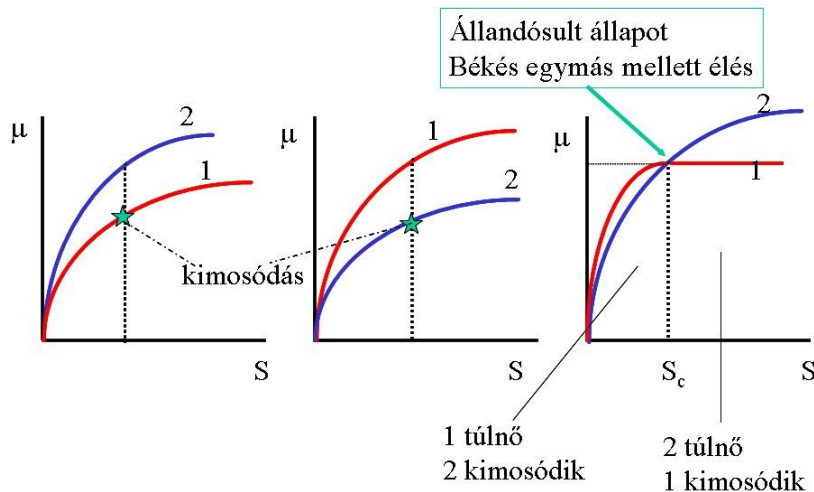
B hatása A-ra	A hatása B-re	Példa	A kölcsönhatás leírása	A kölcsönhatás elnevezése
-	+	Baktérium protozoa	B A-val táplálkozik	PREDÁCIÓ
-	+	Baktérium mikrofág	A (B) parazita behatol a gazda (A) testébe, és annak bioanyagaival táplálkozik	PARAZITIZMUS endo-, ekto-
+	+(ESETLEG 0)	Alga + protozoa Kérődző + bacik	A és B fizikai kontaktusban együtt növekednek	SZIMBIÓZIS
+	-		Térért való küzdelem	CROWDING

4.4.7.1. Kompetíció

Vito Volterra⁶⁸ olasz matematikus nevéhez fűződik az első olyan modell, amely egymással versengő két speciesz növekedését írja le zárt rendszerben. Ahelyett, hogy e modellel foglalkoznánk, tekintsünk egy olyan kemosztát folytonos rendszert, amelyben két egymással versengő törzs együtt tenyésztése történik. Ekkor az anyagmérlegek a két specieszre rendre a következők:

$$\frac{dx_1}{dt} = -Dx_1 + \mu_1(S)x_1 \quad \frac{dx_2}{dt} = -Dx_2 + \mu(S)x_2 \quad (4.229)$$

Ha állandósult állapot létezik, az a „békés egymás mellett élés” esete. De hogyan lehetséges ez? Ha megtekintjük a μ -S görbéket a 4.64. ábrán, világos, hogy csak akkor lehet állandósult állapot, ha egy adott szubsztrátkoncentráció mellett a fajlagos növekedési sebességek ugyanakkorák, azaz ha a görbék metszik egymást:



4.64. ábra: Versengés a szubsztrátért két speciesz között

A harmadik ábrán S_c jelöli ki azt a szubsztrátkoncentrációt, amelynél egyedül lehetséges állandósult állapot, ekkor a két populáció pontosan egyenlő mértékben szaporodik. A szubsztrátra is felírhatjuk az anyagmérleget, és abból állandósult állapotban a következő összefüggések adódnak:

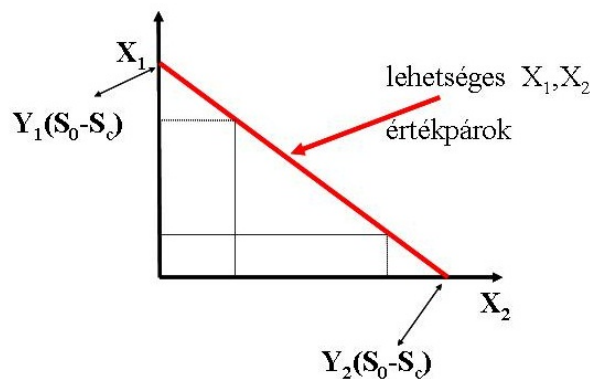
⁶⁸ **Vito Volterra** (1860–1940) olasz matematikus és fizikus, aki a matematikai biológia egyik úttörője volt.

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_1}\mu_1 x_1 - \frac{1}{Y_2}\mu_2 x_2$$

ha $D = D_c = \mu_1(S_c) = \mu_2(S_c)$, akkor

$$D_c(S_0 - S_c) - \frac{1}{Y_1}\mu_1 x_1 - \frac{1}{Y_2}\mu_2 x_2 = 0 \quad \rightarrow S_0 - S_c = \frac{x_1}{Y_1} + \frac{x_2}{Y_2} \quad (4.230)$$

Ha az állandósult állapotot jellemző x_1 -et és x_2 -t az ún. fázissíkon ábrázoljuk, a 4.65. ábrán látható képet nyerjük, amelynek egyenes pontjai megadják az állandósult állapotban elérhető x_1 , x_2 értékpárokat. Láthatóan tehát S_0 értéke nem befolyásolja S_c értékét, de meghatározza x_1 és x_2 mennyiségét. Ugyanakkor azt is látni kell, hogy végtelen számú x_1 - x_2 értékpár kialakulhat a fázisábra pontjainak megfelelően. Hogyan lehet egy kemosztátban végtelen állandósult állapot? Úgy, hogyha az egyik x -et valamilyen állapotba mesterségesen kimozdítjuk, akkor a másik speciesz mikroba-koncentrációja is el fog mozdulni, és egy új állandósult állapot áll be.



4.65. ábra: Állandósult állapotok két versengő speciesz esetében

Ha a Monod-modell érvényességét feltételezzük, összefüggéseket kaphatunk S_c -re és D_c értékére:

$$\mu_{1m} \frac{S}{K_{S1} + S} = \mu_{2m} \frac{S}{K_{S2} + S}$$

$$\mu_{1m} S(K_{S2} + S) = \mu_{2m} S(K_{S1} + S) \quad /:S \quad (4.231)$$

$$S_c = \frac{\mu_{1m} K_{S2} - \mu_{2m} K_{S1}}{\mu_{2m} - \mu_{1m}} \quad \text{és} \quad D_c = \frac{\mu_{1m} K_{S2} - \mu_{2m} K_{S1}}{K_{S1} - K_{S2}}$$

Kétféle mikroba(csoport) versengésére fontos gyakorlati példa az eleveniszapos szennyvíztisztításnál a flokkulens, illetve fonalas populációk kiegyensúlyozott együttélése.

4.4.7.2. Zsákmány (préda)-ragadozó (predátor) kölcsönhatások (predáció)

Ebben az esetben az együttélő két speciesz egyike a másik bekebelezésével táplálkozik (ez a ragadozó vagy predátor), míg a másik a táplálékforrásul szolgáló speciesz, amely valamely nem élő komponensekből összetett táptalajon növekedik (utóbbi a zsákmány vagy préda).

A természetben a predáció a táplálékláncban, a szén-/energiaforrás-transzferben jelentős, a természetes ökológiai rendszerek fenntartása, a gyorsan növekedő specieszek által a táplálékforrások kimerítésének megakadályozása nem elképzelhető a predációs történések nélkül.

Mesterséges rendszerre az eleveniszapos biológiai szennyvíztisztítás jelent példát: protozoák táplálkoznak az egyszerűbb szubsztrátokat lebontani képes baktériumokkal. Mind a természetes, mind

a mesterséges ökorendszerekre az jellemző, hogy állandósult állapot ritkán alakul ki, ehelyett inkább bizonyos visszatérő ciklusosság (oszilláció) jellemzi azokat.

A legegyszerűbb matematikai modell, amely leírja a predátor és a préda szaporodásának, illetve pusztulásának dinamikáját, **Volterra és Lotka**⁶⁹ nevéhez fűződik. E modell szerint a zsákmány minden szubsztrát okozta korlátozás nélkül növekszik, illetve szaporodik (exponenciálisan), növekedését csak a ragadozó által okozott „fogyása” korlátozza, míg a ragadozó ez utóbbi „fogyás” sebességével arányos módon növekszik, illetve szaporodik, de ugyanakkor elsőrendű kinetikát követve pusztul is. Tekintsük ezt az egyszerű kinetikát, legyen n_1 a zsákmány koncentrációja, a ragadozóé pedig n_2 .⁷⁰ A fentiek szerint

$$\frac{dn_1}{dt} = an_1 - \gamma \cdot n_1 n_2 \quad (4.232)$$

ahol a γ a ragadozó és a zsákmány közötti „ütközések” hatékonyságának mérőszáma, azaz azt méri, hogy a bekövetkező ütközések (találkozások) közül milyen gyakran kebelezi is be a ragadozó az áldozatát.

Láthatóan a ragadozó hiányában ennek a differenciálegyenletnek csak az első tagja lenne érvényes, amely a zsákmány növekedését határozza meg, és azt semmi nem korlátozná: minden határon túl exponenciálisan növekedne (lásd eredeti MONOD-modell szubsztrátlimit nélkül). A ragadozóra pedig a következő differenciálegyenlet írható fel:

$$\frac{dn_2}{dt} = -bn_2 + \varepsilon \cdot \gamma \cdot n_1 n_2, \quad (4.233)$$

ahol ε az effektív hozam, amellyel a zsákmányból, mint tápanyagból, a ragadozó testanyaga lesz. Az egyenlet első tagja a ragadozó elsőrendű halálozási sebességét írja le, ahol b a fajlagos elhullási sebesség.

A két differenciálegyenlet matematikai alakjából következik, hogy formálisan létezhet egy – egyáltalán nem triviális – állandósult állapot, amikor mindkét speciesz koncentrációjának változási sebessége zérus, azaz mennyiségük állandó,

$$an_1 = \gamma \cdot n_1 n_2 \quad \longrightarrow \quad n_{2s} = \frac{a}{\gamma} \quad \varepsilon \cdot \gamma \cdot n_1 n_2 = bn_2 \quad \longrightarrow \quad n_{1s} = \frac{b}{\varepsilon \cdot \gamma} \quad (4.234)$$

Felhasználva ezeket az állandósult állapotbeli koncentrációkat, egyszerűen dimenziómentessé tehetők az eredeti differenciálegyenletek, ha bevezetjük a következőket, azaz a változókat állandósult állapotú koncentrációjukra normáljuk:

$$\begin{aligned} y_1 &= \frac{n_1}{n_{1s}} & y_2 &= \frac{n_2}{n_{2s}} \\ n_1 &= y_1 n_{1s} & n_2 &= y_2 n_{2s} \\ \frac{dn_1}{dt} &= n_{1s} \frac{dy_1}{dt} & \frac{dn_2}{dt} &= n_{2s} \frac{dy_2}{dt} \end{aligned} \quad (4.235)$$

Igy a dimenziómentes differenciálegyenletek most már a következő alakúak lesznek:

$$\frac{dy_1}{dt} = a(1 - y_2)y_1 \quad \frac{dy_2}{dt} = -b(1 - y_1)y_2 \quad (4.236)$$

⁶⁹ Alfred James Lotka (1880–1949) amerikai matematikus, fizikus. A jólismert Lotka–Volterra-modellt a két kutató egymástól függetlenül alkotta meg.

⁷⁰ Itt ugyan koncentrációról beszélünk, de tekinthetjük ezeket a mennyiségeket egy adott élőhelyen létező egyedek „darabszámának” is.

Osszuk el a két egyenletet egymással és szorozzuk meg $a(1-y_1)/y_2$ -vel, ekkor az alábbi szimmetrikus és integrálható differenciálegyenletet nyerjük:

$$\frac{a}{y_2} \frac{dy_2}{dt} - a \frac{dy_2}{dt} + \frac{b}{y_1} \frac{dy_1}{dt} - b \frac{dy_1}{dt} = 0, \text{ amelynek megoldása}$$

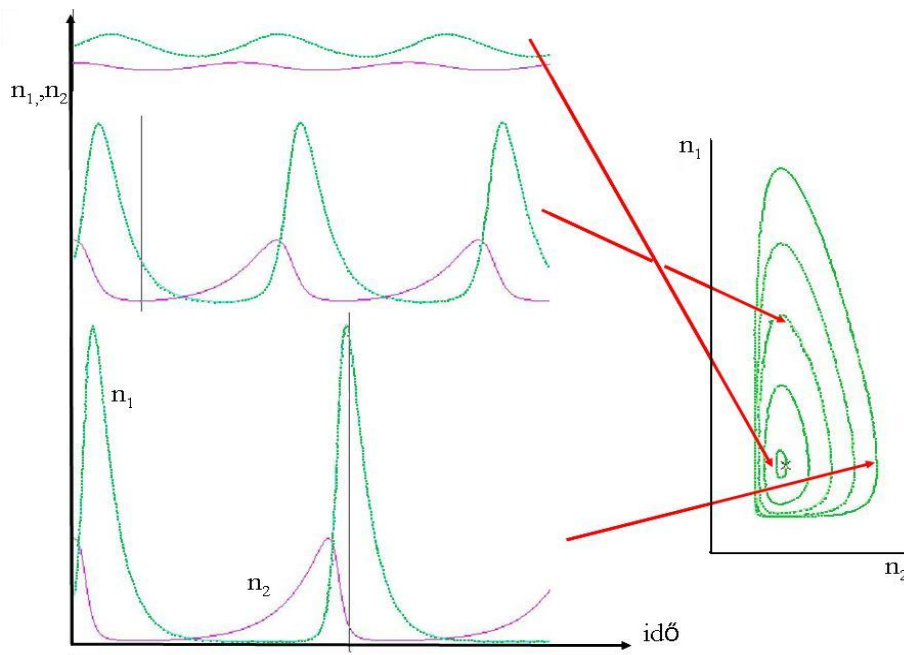
$$a \cdot \ln y_2 - a \cdot y_2 + b \cdot \ln y_1 - b \cdot y_1 = C \quad \text{illetve} \quad (4.237)$$

$$\left(\frac{y_1}{e^{y_1}} \right)^b \left(\frac{y_2}{e^{y_2}} \right)^a = e^C$$

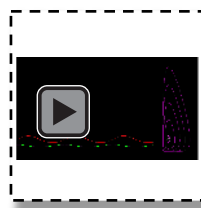
ahol a C integrációs állandó a kezdeti feltételektől függ. A megoldást fázissíkon ábrázolva mutatja a 4.66. ábra jobb oldala. Az oszcilláció különböző kezdeti feltételek esetén másutt-másutt valósul meg, ezt ún. „lágy oszcillációnak” nevezzük. A fókuszpont a nemreális állandósult állapotot reprezentálja.

A 4.66. ábra bal oldali diagramjai az idő függvényében ábrázolják a ragadozó és a préda koncentrációjának alakulását. Az ábrán jól érzékelhető a periodikusság, és egy cikluson belül a szabály, azaz, hogy először a préda nő, majd a ragadozó, amellyel együtt jár a prédakonzentráció csökkenése, amit viszont a ragadozó koncentrációjának csökkenése követ, s ekkor ismét nőni tud a zsákmány (és ez ismétlődik).

A 4.2. videófilmen folyamatában követhetjük nyomon lágy oszcilláció esetén a préda és a predátor koncentrációjának alakulását az idő függvényében, illetve a fázissíkon való mozgást eközben.



4.66. ábra: Periodikus oszcilláció a zsákmány és a ragadozó növekedésében



4.2. videó: Predáció – lágy oszcilláció

Integráljuk a zsákmányra vonatkozó differenciálegyenletet egy ciklusra a következők szerint:

$$\frac{1}{y_1} \frac{dy_1}{dt} = a(1 - y_2)$$

$$\ln \frac{y_1(T)}{y_1(0)} = aT - a \int_0^T y_2(t) dt \quad (4.238)$$

mivel a periódus határon $y_1(T) = y_1(0)$, azaz mivel $\ln 1 = 0$

$$1 = \frac{1}{T} \int_0^T y_2(t) dt, \text{ illetve visszatérve a dimenziós változókra } \frac{1}{T} \int_0^T n_2(t) dt = n_{2s},$$

azaz a periódikus görbe integrációs átlaga, függetlenül attól, hogy hogyan néz ki a görbe, mindig a nemvalódi állandósult állapotot adja meg.

Ezért a 4.66. ábrán látható trajektóriák fókuszpontja a steady state érték. Ez a gondolatmenet természetesen a másik specieszre, n_1 -re ugyanígy igaz.

Végezzünk el egy gondolat kísérletet: tegyünk a rendszerbe egy olyan mérget, amely mindkét specieszre letális, és hatása arányos a speciesz koncentrációjával⁷¹ (azaz elsőrendű kinetikájú az általa okozott pusztulás), ekkor a kiindulási differenciálegyenleteket ki kell egészíteni egy-egy pusztulást leíró taggal: $-\sigma_1 n_1$ és $-\sigma_2 n$. Evvel az „állandósult állapotok” értéke is megváltozik a következők szerint:

$$n_{1s} = \frac{b + \sigma_2}{\varepsilon \cdot \gamma} \quad \text{és} \quad n_{2s} = \frac{a - \sigma_1}{\gamma}, \quad (4.239)$$

azaz a mérge hatására érdekes módon **nő** a préda, és **csökken** a ragadozó (predátor) steady state koncentrációja, illetve a fenti integrációs átlag.

Az itt tárgyalt Lotka–Volterra-modell gyenge pontja az, hogy ragadozó távollétében exponenciálisan növekvő zsákmánykoncentrációt jósol minden határon túl, azonkívül a ragadozó nem indokolt pusztulása is nehezen magyarázható (sok minden okozhatja, de egyik sincs a modellben figyelembe véve).

Reálisabb modellt kapunk a MONOD-megközelítés felhasználásával. Tekintsünk ennek megfelelően egy kemosztátot (pl. egy eleveniszapos szennyvíztisztítót), amelyben a baktériumpréda egy szerves limitáló szubsztrát okozta szubsztrátlimitben növekedik, míg mivel a ragadozó számára a préda a limitáló szubsztrát, arra is a MONOD-modellt alkalmazzuk. (Itt nincs ragadozóhalál!) A kemosztát anyagmérleg-egyenletei ekkor:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_1} \frac{\mu_{1\max} S x_1}{K_1 + S}$$

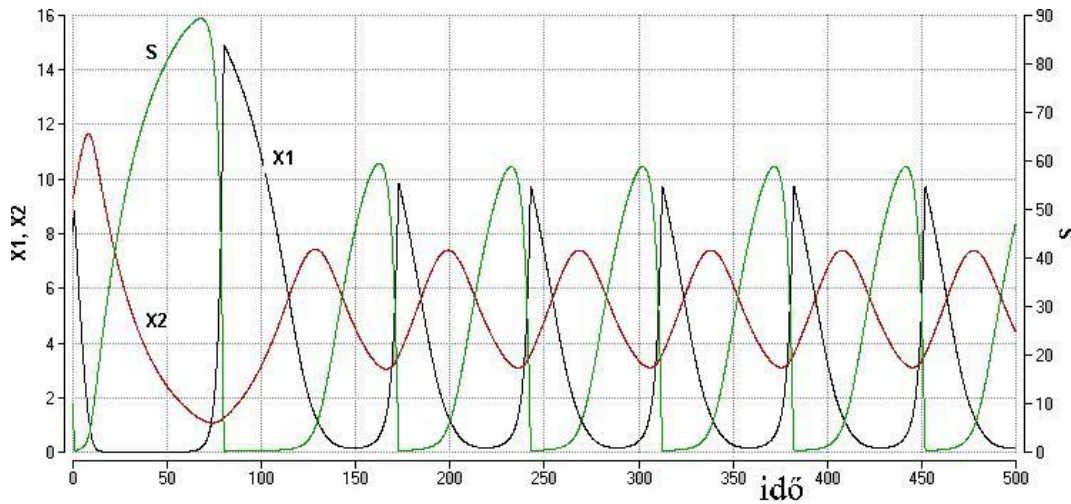
$$\frac{dx_1}{dt} = -Dx_1 + \frac{\mu_{1\max} S x_1}{K_1 + S} - \frac{1}{Y_2} \frac{\mu_{2\max} x_1 x_2}{K_2 + x_1} \quad (4.240-4.242)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = -Dx_2 + \frac{\mu_{2\max} x_1 x_2}{K_2 + x_1}$$

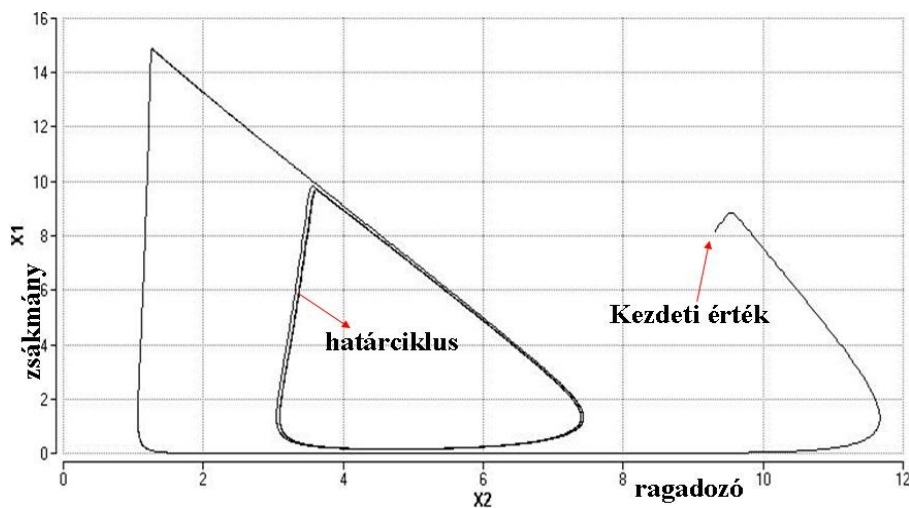
Ennek a modellnek a megoldása is periodikusságot mutat az alábbi ábrák tanúsága szerint minden paraméter tekintetében (x_1 , x_2 és S), a fázissíkon látható trajektóriák viszont ún. kemény oszcillációt jelentenek, azaz a kezdeti értéktől függetlenül a rendszer ugyanahhoz az ismétlődéshez érkezik el. (Az

⁷¹ Talán szemléletesebb, ha a nyúl és a róka esetét nézzük. Ha jön a vadász, aki mindkettőre lő, az eset hasonló a fent vizsgáltkhoz: a nyulak, tehát a préda száma nőni fog, míg a rókáké csökken.

ábrák a *Dictyostelium discoideum* mint ragdozó és az *E. coli* mint zsákmány kölcsönható rendszerét mutatják be.



4.67. ábra: A (4.240–4.242) egyenletek megoldása az időben (szimuláció): $\mu_{max2}=0,1\text{ h}^{-1}$ $\mu_{max1}=0,5\text{ h}^{-1}$
 $K_2=2\text{ g/dm}^3$ $K_1=2\text{ g/dm}^3$ $Y_1=0,17$, $Y_2=0,5$, $D=0,05\text{ h}^{-1}$ $S_0=5\text{ g/dm}^3$, $x_{10}=8$, $x_{20}=9$.



4.68. ábra: A szimuláció ábrázolása fázisdiagramon – kemény oszcilláció

4.4.7.3. Plazmidtartalmú mikrobák tenyésztése és kinetikája

A mikrobiális kölcsönhatások, illetve a versengés speciális esete az, amikor plazmidtartalmú és plazmidot nem tartalmazó mikrobákat tenyésztünk egyidejűleg.

A genetikailag manipulált mikroorganizmusok idegenfehérje-termelése a módosított plazmidok replikációjának és a sikeres transzlációnak a következménye, s az esetleg igen nagyszámú, idegen gént hordozó plazmid „tevékenysége”, azaz az idegen fehérje szintézise a gazdasejt növekedése szempontjából kedvezőtlen. E sejtek mintegy nagysúlyú „hátizsákot” cipelnek magukkal, ezért lassabban növekednek, mint a plazmidot nem tartalmazó sejtek, illetve a tápanyagokra (elsősorban a limitáló szubsztrátra) vonatkozó hozamok is kisebbek a plazmidtartalmú sejtek esetén. Érthető ezért egyrészt a plazmidvesztés nullánál nagyobb valószínűsége, másrészt az a tény, hogy egy vegyes populációban – amelyben tehát plazmidos és plazmidmentes sejtek együtt fordulnak elő – a plazmidmentes sejtek túlnövik a plazmidtartalmú sejteket. A plazmidtartalomnak a mikroorganizmus szaporodása közben történő megváltozását plazmidvesztés által, illetve a genetikai instabilitást általában többféle tényező okozhatja és ezek együttesen is előfordulnak:

1. Szegregációs instabilitás:

Az ún. LCN (low copy number), azaz kis kópiaszámú plazmidok esetében rendszerint speciális mechanizmus biztosítja a plazmidoknak a replikáció utáni egyenletes megoszlását a leánysejtekben. Az ilyen viselkedésű sejtek általában 20 kópiaszám alatti plazmidmennyiséget tartalmaznak.

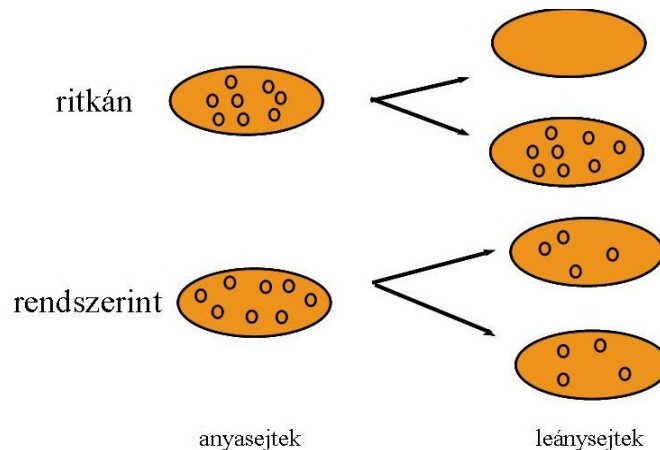
Ezzel szemben az ún. HCN (high copy number), azaz nagy kópiaszámú plazmidok esetén (100, de akár 800–1000 plazmid is lehet egy sejtben!) a replikálódott plazmidok megoszlása az anya- és leánysejtek között véletlenszerű és binomiális eloszlást követ.

A 4.69. ábrának megfelelően nagy valószínűséggel egyenletesen oszlanak el a plazmidok, de nullánál nagyobb annak a valószínűsége is, hogy az egyik leánysejtbe nem kerül plazmid.

Ez a valószínűség a következő:

$$p(0) = 2 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^c = 2^{(1-c)}, \quad (4.243)$$

ahol c az együltreplikálódó plazmid egységek száma (másképpen replikációs egység), amely nem azonos a plazmidszámmal.



4.69. ábra: Plazmideloszlás sejtosztódáskor

Az eddigieket egy számpéldával világíthatjuk meg.

Tekintsünk egy 40 plazmid egységet tartalmazó sejtet. Ennek a valószínűsége, hogy osztódáskor plazmidmentes sejt jön létre, $p(0) = 2^{(1-40)} = 1.8 \cdot 10^{-12}$.

Nézzük most azt az esetet, ha a 40 plazmidnyi DNS fele *dimer*, ötöde pedig *tetramer* alakjában van jelen, azaz ilyen az együtt replikálódó egységek eloszlása. Ekkor a 40 monomer plazmid ekvivalens megfelel 20 monomer ekvivalensből álló 10 dimernek, valamint 8 monomer plazmid ekvivalensnek megfelelő 2 tetramernek, valamint $40 - 20 - 8 = 12$ ténylegesen monomer plazmidnak. Így az együtt replikálódó egységek száma $12 + 10 + 2 = 24$.

A szegregáció valószínűsége ekkor $p(0) = 2^{(1-24)} = 1.2 \cdot 10^{-7}$, ami az előző esethez képest százezerszeres szegregációgyakoriság-növekedést jelent.

Végül tekintsük azt az esetet, amikor az átlagosan 40 plazmidot tartalmazó populáció olyan összetételű, hogy a sejtek felében csak 10 kópia van jelen, míg a másik felében 70. Ekkor a szegregáció valószínűsége a következő:

$$p(0) = 0.5 \cdot p(0)_{10} + 0.5 \cdot p(0)_{70} = 0.5 \cdot 2^{(1-10)} + 0.5 \cdot 2^{(1-70)} = 9.8 \cdot 10^{-4} + 8.5 \cdot 10^{-22} \approx 9.8 \cdot 10^{-4}.$$

Az utóbbi eset értelmében csak az alacsonyabb kópiaszámú sejtek fogják meghatározni a plazmid-szegregáció gyakoriságát.

2. Strukturális plazmid instabilitás:

Előfordulhat, hogy a plazmidon kódolt markerek, például az antibiotikum-rezisztencia génje sejten belüli rekombinációval integrálódik a gazdasejt kromoszomális DNS-ébe, ugyanakkor esetleg a plazmidon történő mutáció miatt a fehérjetermelés képessége megszűnhet. A marker tehát megvan, úgy tűnik, hogy pl. antibiotikumadagolással – azaz a szelekciós nyomás fenntartásával – csak a plazmidhordozók fognak szaporodni, pedig mivel a fehérjét nem termelő sejtek megszabadultak a metabolikus „hátizsáktól”, nagyobb fajlagos növekedési sebességük miatt éppen az ilyen rekombinációk fognak felhalmozódni a tenyészetben. A sejten belüli rekombináció, és a plazmidmutáció együtt, de külön-külön is az idegen fehérjét nem termelők feldúsulásához vezethet.

3. Gazdasejt mutációk is okozhatják az idegen fehérjetermelés képességének a megszűnését. Ha például a fehérjeszintézis a *Lac* promoterhez kötött, abban az esetben, ha a *Lac* promoter mutációt szenved úgy, hogy a sejt nem rendelkezik ezután *laktóz permeáz*szal, akkor a sejt nem lesz képes az induktor laktóz felvételére és nem lesz képes a fehérjetermelés beindítására.

4. Végül külön is meg kell említeni a gyorsabban szaporodó, tehát idegen fehérjét nem termelő sejteknek a fajlagos **növekedési sebességek különbözőségéből** eredő túlnövést. Ez a negyedik hatás tulajdonképpen az előző háromnak is mindig következménye.

A plazmidstabilitás befolyásolása molekuláris biológiai és engineering (azaz a tenyésztéssel kapcsolatos) módszerekkel is lehetséges.

- Nagy erőfeszítéseket tesznek egyrészt, hogy növeljék a plazmid *kópiaszámot* (50 felett általában stabilnak mondható, *E. coli*-nál a legjobb eredményeket 25–250 nagyságú kópiaszám esetén érték el). A szegregációs plazmidvesztés valószínűsége a gazdasejtekben előforduló *természetes* plazmidok esetében rendszerint kisebb mint 10^{-7} , de a rekombináns plazmidok esetében akár 10^{-5} – 10^{-3} nagyságú is lehet, ami már komoly szegregációs instabilitást okozhat. Amint a fenti számpélda bizonyítja, az együtt replikálódó egységek számának csökkentése is jó módszer ennek a valószínűségnek a csökkentésére, erre vonatkozó eredmények is vannak.
- Másrészt a *promoter erősségének* fokozására – amely a fehérjetermelés nagyságát meghatározó másik tényező – tesznek erőfeszítéseket. Leggyakrabban az IPTG-vel (izo-propil- β -D-tiogalaktozid) indukálható *Lac promotert*, illetve a hőmérséklet-emeléssel (30-ról 42 °C-ra) indukálható λ_{p_L} *promotert* alkalmazzák.
- Kis léptékben szokásos az állandó *szelekciós nyomás* fenntartása, azaz antibiotikum adagolása a plazmidtartalmú sejtek szaporodásának fenntartására. Ez azonban nyilvánvalóan nem alkalmazható nagy léptékben, hiszen az antibiotikum-rezisztencia az antibiotikum lebontásának képességét jelenti, így állandóan kellene adagolni a drága antibiotikumot.
- A plazmidra egy olyan, a mikrobaműködés szempontjából fontos vegyület termeléséért felelős gént építenek, amelyet előzőleg kiiktattak a kromoszómáról. Így csak a plazmidtartalmú sejtek lesznek életképesek, a plazmidmentesek elpusztulnak. Ezt a módszert a kromoszóma-mutáció komplementálásának nevezzük.
- A kisebb plazmidok stabilabbak, az együltreplikálódó plazmidszám csökkentése szintén csökkenti a szegregációs instabilitást.
- Úgynevezett *runaway replikációs plazmidok* alkalmazása esetén például az *E. coli* csak egy plazmidkópiát tartalmaz a szaporodási fázisban, ilyenkor nincs metabolikus megterhelés. Ha már magas a mikrobaszám, indukciót alkalmaznak, de nemcsak a fehérjetermelő génre, hanem a plazmidreplikációt elindítóra is. Ekkor egy gyors kópiaszám-növekedés indul meg, akár 800-as kópiaszám is kialakulhat.
- Szintén genetikai módszerrel a fenti, 4. pontban leírt fajlagos növekedési sebességkülönbség is eliminálható. Készíthető olyan mutáns, amelyben ha nincs plazmid, kisebb lesz a fajlagos növekedési sebesség, mintha lenne, és ennek következtében a plazmidvesztett sejtek nemhogy nem tudják túlnőni a plazmidhordozókat, hanem éppen fordítva történik.

- Kihasználható a többlépcsős komosztát tenyésztési technika, illetve a kétfázisú szakaszos fermentáció technikája is. Utóbbi például a λ_{pL} promoter esetén azt jelenti, hogy az *E. coli*-t 30 °C-on tenyésztjük (esetleg antibiotikum jelenlétében) az exponenciális fázis végéig, illetve a hanyatló fázis közepéig, majd megemeljük a hőmérsékletet 42 °C-ra. Ekkor a szaporodás gyakorlatilag leáll (lelassul), és a fehérjetermelés elkezdődik. Nyilvánvaló, hogy amíg a promoter nem működik, azaz a kisebb hőmérsékleten, addig nincs metabolikus megterhelés, s így noha keletkezhetnek plazmidvesztett sejtek, de nem tudják túlnőni a plazmidhordozókat. Az itt felsoroltak csupán néhány lehetőséget említenek, valójában igen sok módszerrel próbálkoznak (próbálkoztak) e kérdés megoldására.⁷²

A plazmidtartalmú sejtek tenyésztésének kinetikai megvilágításához induljunk ki abból, hogy annak a valószínűsége, hogy a plazmidhordozó sejtekből (jelöljük mennyiségüket X^+ -szal) plazmidmentes jön létre: p . Ekkor N_0 db sejt osztódásakor $N_0(1-p)$ plazmidos és $N_0(p)$ plazmidmentes sejt születik.

Az egyes sejtajták számának alakulását az egymást követő generációk során az alábbi séma szemlélteti:

$$\begin{array}{ll}
 \text{1. generáció} & N_0 + N_0(1-p) = 2 N_0 - N_0 p = N_0(2-p) \\
 & \qquad \qquad \text{anya} \quad \text{leány} \\
 \text{2. generáció} & N_0(2-p) + N_0(2-p)(1-p) = N_0(2-p)^2 \\
 & \cdot \\
 & \cdot \\
 & \cdot \\
 \text{n. generáció} & N_0(2-p)^n
 \end{array}$$

E séma a plazmidhordozókra vonatkozik, de ne felejtjük el, hogy közben a plazmidmentes sejtek is szaporodnak (sőt gyorsabban, mint a plazmidosok). A teljes populáció leírása csak egy eléggé bonyolult rekurzív formulával végezhető el, amely mindig tartalmazza az n -edik és $(n-1)$ -edik generáció jellemzőit is, ezért evvel a fajta leírással nem foglalkozunk tovább, helyette eddigi kinetikai leírásainkhoz is közelebb álló módon írjuk le a rendszert az IMANAKA és AIBA (1981) által felírt modellel. Kinetikai leírásuk alapfeltevése a limitáció nélküli növekedés (korlátatlanul kiegyensúlyozott növekedés), és hogy a sejtömeg arányos a sejtszámmal.

A pozitív (azaz plazmidokat hordozó) sejtek növekedési sebessége:

$$\frac{dX^+}{dt} = (1-p)\mu^+ X^+ \quad (4.244)$$

A negatív (plazmidot nem hordozó) sejtek növekedési sebessége:

$$\frac{dX^-}{dt} = p\mu^+ X^+ + \mu^- X^- \quad (4.245)$$

Ha a p és μ^+ állandók, a (4.244) egyenletet integrálni lehet és behelyettesíteni a (4.245)-be. Az ekkor kapott elsőrendű lineáris differenciálegyenlet is megoldható.

⁷² Arról nem is beszélve, hogy az egész probléma eliminálódik, ha olyan rendszert használunk, amelynél az idegen fehérje termelése nem plazmidon, hanem a gazdasejt kromozómális DNS-én kódolt. Ilyen és egyéb megfontolások miatt terjedt például el a *Pichia pastoris* gazdasejtszisztem.

$$\begin{aligned}
X^+ &= X_0^+ \exp[(1-p)\mu^+ t] \\
\frac{dX^-}{dt} - \mu^- X^- &= p\mu^+ X_0^+ \exp[(1-p)\mu^+ t] \\
y' + ay + B(t) &= 0 \quad y = Ce^{-at} + \frac{A}{a+B} e^{Bt} \quad (4.246) \\
\text{ha } B(t) &= Ae^{Bt} \quad \text{ekkor a megoldás} \\
X^- &= \frac{p\mu^+ X_0^+}{(1-p)\mu^+ - \mu^-} \left\{ \exp[(1-p)\mu^+ t] - \exp(\mu^- t) \right\} + X_0^- \exp(\mu^- t)
\end{aligned}$$

Az X^+ és az X^- egyenletek tehát a kétféle mikroba szaporodását írják le. Valójában minket a plazmidhordozók részaránya érdekel a teljes populációban, ezért vezessük be ezt a mennyiséget az alábbi definíció értelmében:

$$f = \frac{X^+}{X^+ + X^-} = \frac{X^+}{X} \quad (4.247)$$

Ha ebbe behelyettesítjük a fenti egyenleteket, majd némileg átalakítjuk, a következő bonyolult formulát nyerjük a plazmidhordozók hányadára:

$$f = \frac{\exp[(1-p)\mu^+ t]}{\exp[(1-p)\mu^+ t] + \frac{p\mu^+}{(1-p)\mu^+ - \mu^-} \left\{ \exp[(1-p)\mu^+ t] - \exp(\mu^- t) \right\} + \frac{X_0^-}{X_0^+} \exp(\mu^- t)} \quad (4.248)$$

A tenyésztés során keletkezett generációk száma, $n = \mu^+ t / \ln 2$ felhasználásával (mert hiszen szubsztrátlimit-mentes exponenciális növekedést tételeztünk fel), ha bevezetjük az $\alpha = \mu^- / \mu^+$ jelzőszámot, amely méri a plazmidhordozó sejteknek a metabolikus megterhelését, a fenti összefüggésnek egy használhatóbb formáját nyerhetjük, amely

*a generációk számának,
a plazmidvesztés valószínűségének és
a metabolikus megterhelésnek*

a függvényében mutatja a plazmidhordozó sejhányad alakulását a tenyésztési idő változásában.

$$f = \frac{1 - \alpha - p}{1 - \alpha - p \left(2^{-n(1-\alpha-p)} \right)} \quad (4.249)$$

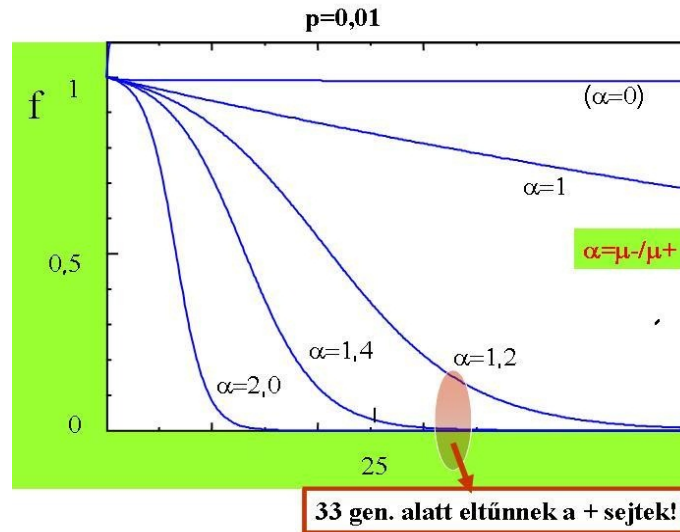
Gondoljuk át, hogy egy tipikus ipari tenyésztés során hány új generáció születik, azaz legalább hány generáción át kellene fenntartani a plazmidhordozóknak a túlsúlyát a rendszerben.

A szokásos tenyésztési lépcsőket tekintsük az alábbiak szerint:

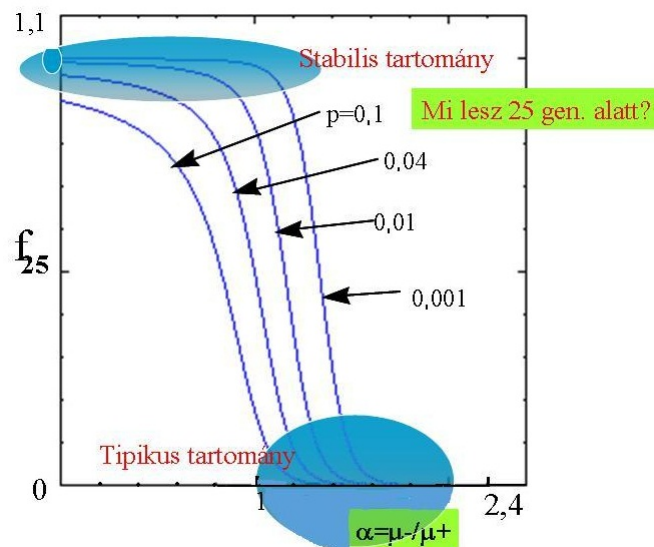
1. ferde agaros tenyészet
2. 250–300 ml-es rázott lombikos tenyészet
3. 10–25 literes laborfermentoros tenyésztés
4. 300–3000 literes kísérleti üzemi lépték
5. termelő-tenyésztő lépték 10–100 m³.

Ha 3% inokulálást, azaz 33-szoros lépcsőnkénti növekedést feltételezünk, $2^n = 33$, ahonnan $n = 5$. Tehát lépcsőnként 5 generációval, összesen 25 generációval kell számolnunk. (Jegyezzük meg, hogy nem ez a szokásos inokulárány-megadás, az inkább a térfogati arányra vonatkozik, a 3% a köznapi szóhasználatban azt jelent, hogy 100 litert három liter oltóanyaggal oltunk!)

Ez a 25 generáció jelenti tehát a minimális plazmidstabilitási követelményt. A fenti egyenletnek a megoldásait szemléltették a következő két ábrán.



4.70. ábra: Plazmidhordozók hányada a generációk számának függvényében



4.71. ábra. Plazmidos sejtek hányadának változása α függvényében

A 4.70. ábrán feltüntettük a tipikus tartományt az α -ra, azaz az 1-2 tartományt, amely jellemző a plazmidok okozta metabolikus teher mértékére. Egy átlagosnak mondható $\alpha=1,4$ -nél 33 generáció alatt teljesen kimosódnak a plazmidhordozók.

A második szimuláció szerint (4.71. ábra) 25 generáció alatt lényegében bármilyen p valószínűség mellett eltűnnek a rendszerből a plazmidhordozók.

Vizsgáljunk meg most egy kemosztát rendszert, amelyben plazmidtartalmú sejteket tenyésztünk. Írjuk fel az anyagmérleg-egyenleteket a plazmidos és plazmid nélküli sejtekre:

$$\begin{aligned}\frac{dX^+}{dt} &= -DX^+ + (1-p)\mu^+X \\ \frac{dX^-}{dt} &= -DX^- + p\mu^+X^+ + \mu^-X^-\end{aligned}\quad (4.250)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dX^+}{dt} + \frac{dX^-}{dt} = (\mu^+X^+ + \mu^-X^-) - D(X^+ + X^-)$$

Ha a kemosztát X-re állandósult állapotban van, akkor az utóbbi egyenletet 0-vá téve a következő összefüggést nyerjük:

$$\begin{aligned}\mu^+X^+ + \mu^-X^- &= D(X^+ + X^-), \text{ ahonnan} \\ \mu^+(X^+ + \alpha X^-) &= D(X^+ + X^-)\end{aligned}\quad (4.251)$$

Ha nincs különbség a plazmidos és plazmidot nem tartalmazó sejtek fajlagos növekedési sebességei között, azaz $\alpha=1$ (csalás a javukra!), akkor $\mu^+=D$, és ekkor a két kiindulási egyenletbe visszahelyettesítve egy kifejezést kaphatunk a kétféle sejt növekedésének időbeli függvényére:

$$\begin{aligned}X^+ &= X_0^+ \exp(pDt), \\ X^- &= X_0^- + X_0^+(1 - \exp(-pDt))\end{aligned}\quad (4.252)$$

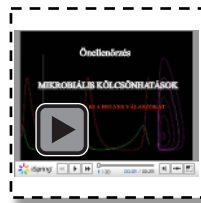
azaz a plazmidhordozók koncentrációja az időben exponenciálisan csökken, míg a negatív sejtek koncentrációja nő.

Ha az $\alpha \neq 1$, akkor a (4.250) egyenletek numerikus megoldásával juthatunk eredményre, de nyilvánvaló, hogy ekkor még gyorsabb lesz a plazmidtartalmúak kimosódása rendszerünkől.

A fermentációs rendszerek matematikai modellezésével foglalkozó fejezetünk végén ellenőrizd megszerzett tudásodat a következő feladatokkal, önellenőrzéssel: 4.9. animáció és 4.10. animáció.



4.9. animáció: *Önellenőrzés: fermentációs kinetika*



4.10. animáció: *Önellenőrzés: mikrobiális kölcsönhatások*

4.5. Fermentációs rendszerek levegőellátása

4.5.1. Bevezetés, az oxigén szerepe

Ismert, hogy az élővilág organizmusai az életműködésükhöz elengedhetetlenül szükséges kémiai energiát igen változatos úton-módon állíthatják elő. A metabolizmus során felhasználható kémiai energia szerves vagy szervetlen vegyületek mint energiaforrások oxidációja során szabadul fel. Ilyen értelemben RESPIRÁCIÓNAK (egyelőre kerüljük ennek magyar megfelelőjét, a légzés kifejezést) nevezzük azokat az energiatermelés céljából végbemenő anyagcsere-folyamatokat, amelyekben valamely szerves vagy szervetlen vegyületet az organizmus szervetlen vegyület segítségével oxidál.

Ha az oxidáló ágens nem oxigén, e folyamatokat ANAEROB RESPIRÁCIÓNAK nevezzük, ha viszont oxigén, akkor AEROB RESPIRÁCIÓRÓL (s ezt fogjuk a következőkben légzésnek nevezni) beszélünk.

A 4.21. táblázatban néhány anaerob, illetve aerob respirációt végző mikroorganizmus respirációját jellemezzük. A *-gal megjelöltek példák az anaerob respirációra.

4.21. táblázat: A respiráció fajtái

Energiaforrás (redukáló=oxidálódó szubsztrát)	Oxidáns (Terminális elektronakceptor)	Respiráció termékei	Példa
H ₂	O ₂	H ₂ O	Hidrogénbaktériumok
*H ₂	SO ₄ ²⁻	H ₂ O+S ²⁻	<i>Desulfovibrio</i>
NH ₃	O ₂	NO ₂ ⁻ + H ₂ O	Nitrifikáló baktériumok
NO ₂ ⁻	O ₂	NO ₃ ⁻ +H ₂ O	Nitrifikáló baktériumok
*Szerves vegyületek	NO ₃ ⁻	N ₂ +CO ₂	Denitrifikálók
Fe ²⁺	O ₂	Fe ³⁺	<i>Ferrobacillus</i>
S ²⁻	O ₂	SO ₂ +H ₂ O	<i>Thiobacillus</i>
Szerves vegyületek	O ₂	CO ₂ +H ₂ O	Legtöbb mikroba, növényi és állati szervezetek

Nagyon sok ipari fermentációs technológiában olyan mikrobákat alkalmaznak, amelyek aerob respiráció, légzés útján szerves anyagból fedezik energiaszükségletüket, azonban ne felejtjük el, hogy pl. az aerob *Ferrobacillus*, *Thiobacillus* csoport bányászatban történő felhasználása már nagy léptékben is megvalósult, valamint rendkívül sok jelentős anaerob fermentációs technológia is van.

Vizsgáljuk meg, hogy az aerob respiráció esetén mi az oxigén szerepe, és mivel jellemezhető a mikroorganizmusok oxigénigénye: tanulmányozzuk az aerob mikroorganizmusok energiafelszabadításának biokémiai útját!

Ennek vázlatos összefoglalása szerepel a 3.47., a 4.14. és 4.16. ábrákon. Látjuk, hogy az energia-termelés szempontjából az Embden–Meyerhof-út (3.47. ábra) szerepe csupán az, hogy előállítja a citrátkör által „feldolgozható” piruvátot (6 C-atomos cukorból 3 C-atomos vegyületet), miközben csupán minimális felhasználható energia szabadul fel: glükózmólonként 2 ATP. Ez az, ami lehetővé teszi bizonyos mikrobák anaerob körülmények közötti anyagcsere-tevékenységét: például a *Saccharomyces cerevisiae* (péklesztő) glükóz C-energia forráson levegő jelenléte nélkül is növekedni képes alkoholos erjedés közben. Ezt az anaerob anyagcserét különböztessük meg élesen a fentiekben érintett anaerob respirációtól!

Továbbmenve, magának a citrátkörnek (4.14. ábra) a szerepe is közvetett az energianyerés szempontjából. Ebben történik meg az „elektronhordozó” H-atomok leválasztása a C-forrásról, valamint itt képződik a végtermék CO₂ fő tömege. A NAD⁺ és FAD⁺ kosubsztrátokhoz kapcsolt H-atomok azután végül is a terminális oxidáció (légzési lánc, 4.16. ábra) során „találkoznak” a molekuláris oxigénnel, amely azokat vízzé, a légzés másik végtermékévé oxidálja (ez a biológiai durranógáz reakciója). A terminális oxidáció lényegében elektrontranszportlánc, a H elektronja soklépéses, enzimek katalizálta folyamatban adódik át a molekuláris oxigénre. Energetikailag ez egy hegyről a völgybe irányuló elektronáramlást jelent, amelynek során három enzimkatalizálta lépésnél is akkora a szabadenergia-változás, amely elegendő egy-egy ATP-molekula szintéziséhez. Az oxigén

tehát nem közvetlenül reagál az energiaforrással, csupán végső elektronakceptor, és a metabolizmus során keletkező CO₂ oxigénje nem a molekuláris oxigénből származik (e gyakori tévedés az eredő reakcióegyenlet egyszerűsítéséből származik), a molekuláris oxigén a másik végtermékben, a vízben jelenik meg.

Igen vázlatosan a fentiek jelentik tehát az iparilag tenyésztett mikrobák többségének energia-felszabadítási mechanizmusát, és jelölik ki ebben a mechanizmusban a légzés, a molekuláris oxigén szerepét. Arra a kérdésre tehát, hogy mi az oxigén szerepe az aerob mikrobák élettevékenységében, a rövid válasz: energiatermelés, végső elektronakceptor. A kép összefoglaló áttekintése céljából nézzük meg a [4.5. animációt](#).

Ne felejtjük el azonban, hogy a kép nem ilyen egyszerű. Egyrészt vannak olyan biokémiai folyamatok, amelyek során direkt módon oxigénbeépülés történik, másrészt funkcionálnak olyan alternatív légzési láncok, amelyek során nem képződik ATP. Az első esetre példát mutat a 3.1. ábrán látható triptofán- lebontási reakció, amelyhez hasonló reakciókat a különböző oxidázok, oxigenázok, illetve dioxigenázok katalizálnak. A második esetre az *Aspergillus niger* gombával végzett citromsav-fermentáció során működő alternatív légzés a példa, amely oxigénfelvétellel jár, ugyanakkor nem képződik raktározott energia.

Hangsúlyozni kell azonban, hogy ha légzésről, oxigénigényről beszélünk, akkor leggyakrabban az energiatermelésre kell gondolni, a direkt beépülés elhanyagolható mértékű, az alternatív légzés pedig igen speciális eset.

4.5.2. Mikroorganizmusok oxigénigénye

Aerob mikroorganizmusok tenyésztése kétféle módon történhet: felületi, ill. ún. szubmerz tenyésztési körülmények között. Az utóbbiról tudnunk kell, hogy lehetőségének felfedezése, vagyis az a tapasztalat, hogy a mikroorganizmusok tápoldatok belsejében is növekedhetnek (innen az elnevezés: szubmerz = bemeztett), teremtette meg a nagy léptékű fermentációs ipar lehetőségét. Mindkét tenyésztési mód esetén a mikroba a tápközegben oldott oxigént veszi fel és hasznosítja. Az oxigén, mint a bevezetőben láttuk, lényegében szintén enzimes folyamatok eredményeként tölti be elektronakceptor szerepét, tehát elfogadható az a megállapítás, hogy ugyanúgy szubsztrátja a növekedésnek, mint a többi tápanyagok. Ezért az is érthető, hogy a tápoldatban oldott oxigén koncentrációjának ugyanolyan hatása van a fajlagos növekedési sebességre, mint az egyéb tápanyagoknak.

A mikrobák oxigénigényét két módon lehet megadni:

$$1. \text{ légzési sebesség} = \frac{dc}{dt} \text{ [mmol O}_2\text{/dm}^3\cdot\text{h}], \text{ [kg O}_2\text{/m}^3\cdot\text{h]} \quad (4.253)$$

$$2. \text{ fajlagos légzési sebesség [h}^{-1}\text{]} \quad (4.254)$$

Mindkét definíció igényt, mégpedig kielégített igényt, valóságos légzési sebességet jelent. Mivel az oxigén a növekedés szubsztrátja, felírhatjuk, hogyha egyedüli limitáló tényezője a növekedésnek, akkor a növekedési sebesség

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \frac{c}{K_{O_2} + c} x, \quad (4.255)$$

ahol c az oldott oxigén koncentrációját jelenti, és $[\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ vagy $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}]$ a szokásos használt mértékegységei.

Az oxigénre vonatkozó eredő hozam definíció szerint

$$Y_o = \frac{\Delta x}{\Delta c}, \quad (4.256)$$

amelynek bevezetésével a légzési sebesség is felírható:

$$\frac{dc}{dt} = -\frac{1}{Y_o} \frac{dx}{dc} = -\frac{1}{Y_o} \mu_{\max} \frac{c}{K_{O_2} + c} x \quad (4.257)$$

Ezt a mikrobakonzentrációval elosztva a fajlagos légzési sebességet – a másik oxigénigény-jellemzőt – kapjuk:

$$Q = \frac{1}{x} \frac{dc}{dt} = -\frac{1}{Y_O} \mu_{\max} \frac{c}{K_{O_2} + c} \quad (4.258)$$

Ha a (4.258) egyenletet grafikusán ábrázoljuk, a 4.72. ábrát nyerjük. Ez egy derékszögű hiperbola, amelynek aszimptótája, μ_{\max}/Y_O , értelemszerűen a maximális fajlagos légzési sebességet jelenti.

A (4.258) egyenlet és a 4.72. ábra elemzése, diszkussziója hasonló ahhoz az eljáráshoz, amelyet a növekedés Monod szerinti kinetikai leírásánál követtünk. (4.6.–4.8. ábrák).

Ha $C \gg K_{O_2}$, akkor a nevezőben elhanyagolható C -hez képest, és ezért

$$Q \cong Q_{\max} \cdot \quad (4.259)$$

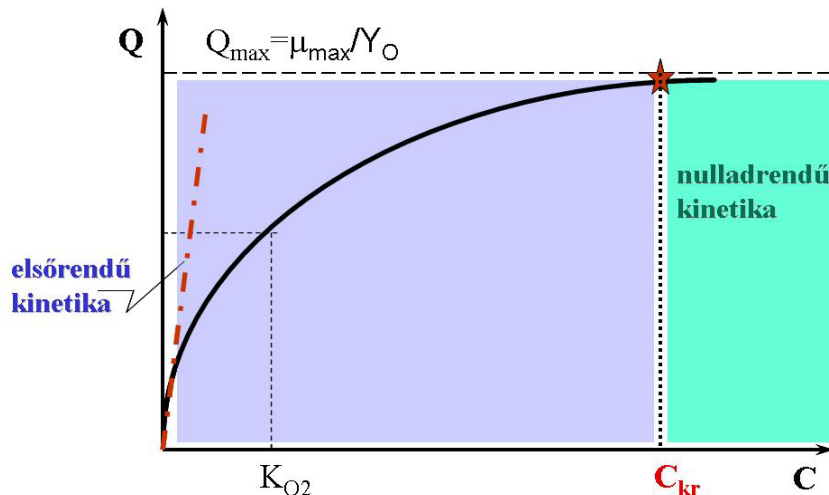
Ez másként megfogalmazva azt jelenti, hogy gyakorlatilag (elméletileg nem!) létezik egy C_{kr} **kritikus oldottoxigén koncentráció**, amely felett a mikroba légzési enzimszere telített az oxigénnel, amely felett a fajlagos légzési sebesség maximális és nem függ az oldott oxigénkoncentrációjától.

Ha $C \ll K_{O_2}$ (az origó közelében), akkor C elhanyagolható K_{O_2} mellett, és így a

$$Q \cong Q_{\max} \frac{c}{K_{O_2}} \quad (4.260)$$

összefüggést nyerjük, amely azt jelzi, hogy kis oldottoxigén koncentrációk esetén a légzés lineárisan függ az oldottoxigén koncentrációjától. E két szélső tartomány között átmeneti „reakciórend” érvényesül.

A 4.72. ábrából azt is láthatjuk, hogy K_{O_2} , az oxigén szubsztrátelítési állandója, számértékileg megegyezik a $Q_{\max}/2$ értékhez tartozó oldottoxigén koncentrációval.



4.72. ábra: A fajlagos légzési sebesség függése az oldottoxigén koncentrációjától

A (4.256) definícióegyenlet szerinti oxigénhozam nem valódi állandó, maga is függvénye a növekedési sebességnek ($Y_{x/s}$ -hez hasonlóan). E függvény az alábbi:

$$\frac{1}{Y_O} = \frac{1}{Y_{OG}^{\max}} + \frac{m_O}{\mu} \quad (4.261)$$

Ez az összefüggés nem tartalmaz beépülési tagot, pedig tudjuk, hogy vannak direkt oxigénbeépülési reakciók is. Ezeknek a hozzájárulása azonban a teljes oxigénfogyasztáshoz igen kicsiny, ezért a beépülésre jellemző tag elhagyása jogos.

A fentiek alapján tehát az oxigénigénnyel, léggéssel kapcsolatban előforduló legfontosabb kinetikai, illetve technológiai paraméterek a következők:

μ_{\max}	– fajlagos növekedési sebesség
Y_O	– eredő oxigénhozam (az elnevezés kissé zavaró, hiszen itt nem oxigén-előállításról van szó); jobb az <u>oxigénre vonatkozó eredő hozam</u> kifejezés)
m_O	– az oxigénre vonatkozó fajlagos fenntartási koefficiens [g O ₂ /g sejt·h]
Y_{OG}^{\max}	– maximális oxigénre vonatkozó hozam
Q_{\max}	– maximális fajlagos oxigénigény vagy maximális fajlagos légzési sebesség
K_{O_2}	– oxigénre vonatkozó szubsztráttelítési állandó (Monod-modell)
C_{kr}	– kritikus oldottoxigén koncentráció

Hogy e mennyiségek nagyságáról fogalmat alkossunk, tekintsük meg a soron következő 4.21–4.24. táblázatokat, amelyekben valódi fermentációk esetén mért értékeket tüntettük fel. Az adatok használhatóságához tudni kell, hogy ezek konkrét példák, amelyekből csak a nagyságrendek és a táblázatokból látható tendenciák általánosíthatóak:

- Valamennyi paraméter értéke függ a mikrobafajtától, az alkalmazott C-forrástól (ezzel kapcsolatban lásd a sztöchiometriai 4.3. fejezetet is), a tenyésztési körülményektől (szakaszos, folytonos, N-forrás, hőmérséklet stb.).
- Igen kifejezett m_O és K_{O_2} hőmérséklettől való függése.
- C_{kr} értéke valójában igen kicsiny a fermentalevekben szokásos (könnyen elérhető) oxigénkoncentrációhoz képest, tehát általában már 0,1–1 mg/dm³ oldottoxigén-szint biztonsággal garantálja a légzési enzimrendszer telítettségét, vagyis a maximális légzésintenzitást.

A fentiekben az oxigénigénynek (Q) csupán az oldottoxigén koncentrációjától való függését vizsgáltuk meg. Hangsúlyozzuk, hogy Q_{\max} maga is változó, függ az *egyéb tenyésztési körülményektől* is, s ennek megfelelően szakaszos fermentáció során a fermentációs idő előrehaladtával változik. Jól szemlélteti ezt a 4.73. ábra, amelyen több különböző fermentáció során mért fajlagos légzési sebességeket tüntettünk fel.

E különbségek és változások itt elsősorban a mikroba- és a C-forrás változásaiból, valamint az egyéb tápanyagok, fizikai paraméterek, illetve a tenyésztés fiziológiai állapotának (amely szintén a környezeti tényezők függvénye, de függ a tenyésztés korától is) a változásaiból következnek. Az ábra változásai tipikusak, egy szakaszos fermentáció során a fajlagos légzési sebesség először mindig nő, majd egy maximum elérése után a fermentáció végére ismét lecsökken.

A 4.25. táblázatban összehasonlítottuk a glükóznak mint C-/energiaforrásnak és az oldott oxigénnek a tápoldatban hozzáférhető koncentrációit, illetve a rájuk vonatkozó kritikus koncentrációkat és ezen szubsztrátok fajlagos felhasználási sebességeit egy feltételezett pékéslesztő-tenyésztésben, amelyben mintegy 1 g/dm³ élesztőtömeg van. Láthatóan, míg a glükóz rendelkezésére álló koncentrációja négy nagyságrenddel nagyobb, mint az oldott oxigéné, addig a fajlagos felhasználási sebességeik azonos nagyságrendűek. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy szükséges az oxigén folyamatos utánpótlása, hiszen a megadott felhasználási sebességek glükóz esetén mintegy 17 órára elegendő glükózt jelentenek, míg az oldott oxigénszint, ha nem pótoljuk levegőztetéssel, kevesebb mint 2 perc alatt zérusra csökkenne.

Ez az egyszerű gondolatmenet bizonyító erejű arra nézve, hogy a vízben csekély mértékben oldódó oxigén különleges helyet foglal el és kivétel a szubsztrátok sorában: még szakaszos tenyésztés esetén is folyamatosan adagolni kell. Ezt a folyamatos betáplálást nevezzük levegőztetésnek, amellyel kapcsolatos oxigénátadási műveletekkel foglalkozunk az alábbiakban részletesen.

4.21. táblázat: Y_o eredő oxigénhozam és m_o fenntartási koefficiens értékek (N-forrás: NH_3)

MIKROBA	Tenyésztési mód	C-forrás	Y_o [C-mol mikroba/ mol O_2]	m_o [mol O_2 / C-mol mikroba·h]
<i>Methylococcus</i> sp	folytonos 42 °C	metanol	0,39	0,08
<i>Candida lipolitica</i>	szakaszos 18 °C	n-alkán	0,71	0,03
	21 °C	n-alkán	0,71	0,06
	27 °C	n-alkán	0,70	0,11
	30 °C	n-alkán	0,69	0,14
<i>Candida utilis</i>	folytonos 30 °C	etanol	1,04	0,01
	folytonos 30 °C	glükóz	2,04	0,02
<i>E. coli</i>	szakaszos 20 °C	glicerin	1,92	0,003
	folytonos 37 °C	ecetsav	1,20	0,31
<i>Penicillium chrysogenum</i>	folytonos 25 °C	glükóz	1,64	0,02
<i>Klebsiella aerogenes</i>	folytonos 30 °C	glükóz	1,79	0,03

4.22. táblázat: Néhány kísérletileg tapasztalt Y_o érték

MIKROBA	Szubsztrát	Y_o [g·g ⁻¹]
<i>Aerobacter aerogenes</i>	maltóz	1,5
	fruktóz	1,46
	glükóz	1,11
<i>Candida utilis</i>	glükóz	1,32
	acetát	0,70
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	etanol	0,42
<i>Methylomonas</i> sp.	metanol	0,53
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glükóz	0,97
<i>Penicillium chrysogenum</i>	glükóz	1,35

4.23. táblázat: Néhány kísérletileg észlelt kritikus oldottoxigén-koncentráció (C_{Kr}) és Q_{max} érték (C-forrás: glükóz)

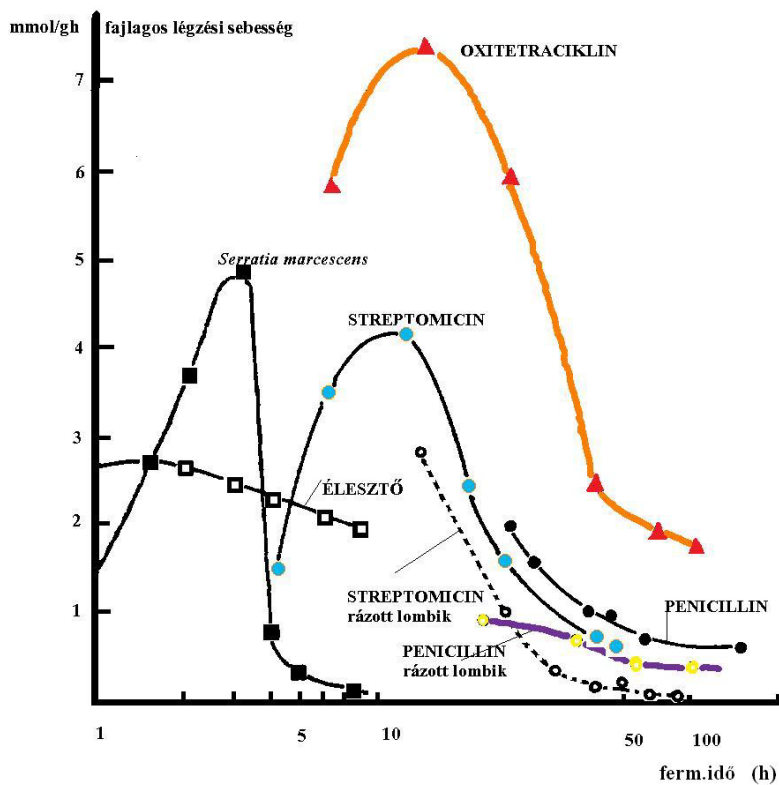
MIKROBA	Hőmérséklet °C	$C_{kritikus}$		Q_{max} mmol/g·h
		mmol/dm ³	mg/dm ³	
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	0,02	0,64	-
<i>E. coli</i>	37	0,008	0,256	5-8
<i>Penicillium chrysogenum</i>	24	0,022	0,704	20-30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	0,004	0,128	10-15

4.24. táblázat: Oxigén-szubsztráttelítési állandók néhány mikroorganizmusra

MIKROBA	Hőfok °C	K _{O2} μmol/dm ³	K _{O2} mg/dm ³
<i>Acetobacter suboxydans</i>	19,2	0,002	6,4·10 ⁻⁵
<i>Bacillus megatherium</i>	19,2	0,060	1,92·10 ⁻³
<i>Bacillus megatherium</i>	21,2	0,090	2,88·10 ⁻³
<i>Bacillus megatherium</i>	32,2	0,277	8,86·10 ⁻³
<i>E. coli</i>	19,2	0,002	6,4·10 ⁻⁵
<i>Serratia marcescens</i>	18,8	0,004	1,28·10 ⁻⁴

4.25. táblázat: A glükóz és oxigén mint szubsztrátok összehasonlítása
(*Saccharomyces cerevisiae*, 1 g/dm³)

	Glükóz	Oxigén
Koncentráció a fermentáléban	1% ≈10 ⁴ mg/dm ³	7 mg/dm ³
Kritikus koncentráció	50 mg/dm ³	0,7 mg/dm ³
Fajlagos felhasználási sebesség	580 mg/g.h	208 mg/g.h



4.73. ábra: Néhány ipari fermentáció fajlagos oxigénigénye

A tanultak elmélyítése céljából oldjuk meg a 4.11. animációban megfogalmazott feladatot.



4.11. animáció: Önellenőrzés: fajlagos légzési sebesség

4.5.3. Az oxigénabszorpció és -felhasználás alapösszefüggései

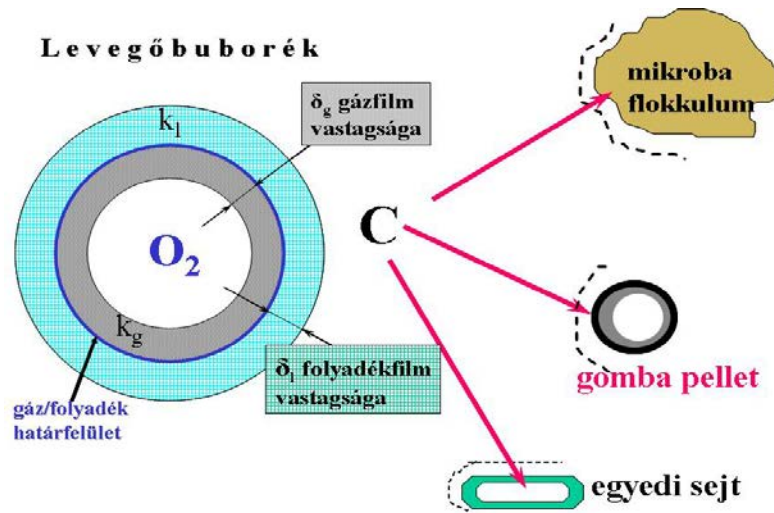
Az oxigénnek a tápoldatba, illetve a fermentlébe történő anyagátadási folyamatát, valamint a mikrobák által történő felvételét alapvetően meghatározza a molekuláris oxigénnek bizonyos nem vagy csak csekély mértékben kevert, stagnáló folyadék-, illetve gázfilmeken történő diffúziója. Az oxigénabszorpció, illetve -felvétel komplex folyamatát szemlélteti a 4.74. ábra. Ezek szerint az oxigénnek a következő ellenállásokon kell keresztüljutnia, amíg a mikroba szubsztrátként hasznosítani tudja, másképpen megfogalmazva a következő elemi anyagátadási lépések jellemzik e folyamatot:

1. A gázbuborék főtömegéből az oxigénmolekula diffúzióval jut a gáz/folyadék határfelületre a felületet gázoldalról borító gázfilmen keresztül. Ez az $1/k_g$ ellenállással vagy a k_g vezetőképességgel (anyagátadási tényező) jellemezhető δ_g vastagságú gázfilmen történő átvitelt jelent.
2. Az oxigén ezután ismét diffúzióval adódik át a δ_1 vastagságú – a gázbuborékot burkoló – stagnáló, azaz nem kevert folyadékfilmen, amelynek ellenállását az $1/k_1$ tényezővel, illetve a k_1 anyagátadási együtthatóval jellemezhetjük.⁷³
3. Gyakran a folyadék főtömege szintén ellenállást képvisel, mert bár ezen az oxigén keverés által, tehát konvekcióval jut keresztül, azonban sokszor a keveredés nem tökéletes vagy éppen helyenként gyenge, így ez a folyamat sem pillanatszerű.
4. A következő nem kevert régió a mikrobákat körülvevő folyadékfilm. Ennek ellenállása esetenként nem elhanyagolható. Itt már az oxigénfelvétel mechanizmusáról van szó, amely tehát egy folyadékfilmen keresztül történő diffúzióval kezdődik, majd
5. folytatódik az egyedi mikrobacejt (baktérium- vagy élesztősejtek vagy gombafonalak) vagy mikrobátömeg ([flokikulum](#)) vagy összefüggő mikrobatelep ([pellet](#)) belsejébe történő diffúzió oxigéntranszporttal.
6. Végül ellenállásként tekinthetjük az oxigénhasznosulás „reakció-ellenállását” is, tehát azt, hogy a mikroba légzése is időben bizonyos sebességgel jellemezhető folyamat.

E hat ellenállás közül az esetek többségében a sebességmeghatározó lépés az 1. és a 2. folyamat, ezek közül is elsősorban az utóbbi, vagyis az oxigénmolekuláknak a buborékot körülölelő folyadékfilmen történő transzportja jelenti az oxigénátadás leglassabb, sebességmeghatározó lépését.

A gázbuborék belsejéből a folyadék főtömege felé irányuló O_2 -transzport leírására többféle elméletet dolgoztak ki. Ezek közül csak a kétfilmelméletet tárgyaljuk, a másik két elterjedt elméletre csak utalást teszünk.

⁷³ Vegyük észre, hogy maga a határfelület egy fizikai fikció, egy vastagság és ellenállás nélküli képzeletbeli vonal két különböző fizikai tulajdonságokkal rendelkező fluidumtömeg között.

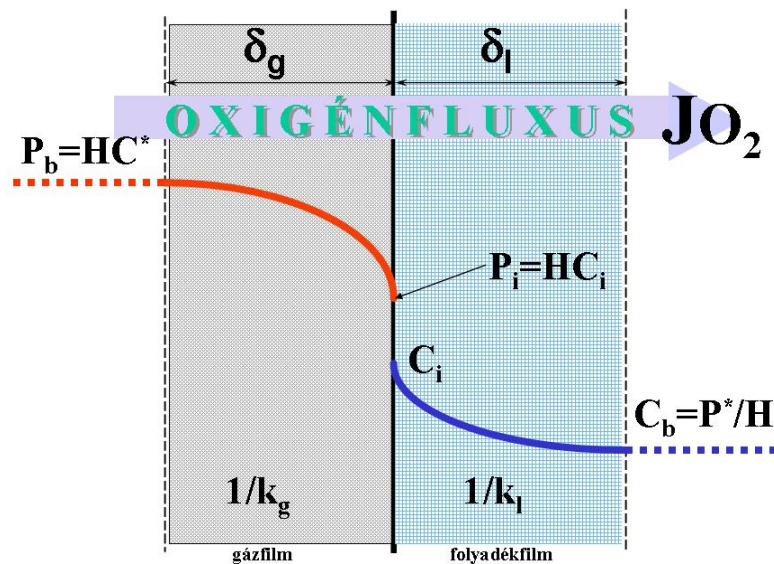


4.74. ábra: Az oxigén buborékból történő abszorpciójának és a mikrobák által történő felvételének folyamatai

A kétfilmelmélet szerint a gázbuborék belső és külső felületéhez rendelhető egy-egy stagnáló gáz-, illetve folyadékfilm, amelynek ellenállása rendre $1/k_g$, ill. $1/k_l$. Ezek reciprocai, azaz a gázoldali, illetve folyadékoldali anyagátadási tényezők az oxigénnek gázban, illetve folyadékban mérhető diffúziós állandójával arányosak:

$$k_g = \frac{D_{O_2}^{\text{gáz}}}{\delta_g} \quad \text{és} \quad k_l = \frac{D_{O_2}^{\text{folyadék}}}{\delta_l},$$

ahol δ a gázoldali, illetve folyadékoldali film vastagságát jelenti.



4.75. ábra: Az oxigénabszorpció kétfilmelméletének alapsémája

Tekintsünk most egy a 4.75. ábrán vázolt olyan rendszert, amelyben buborékból történő oxigénátadás történik, s a folyadékfázis jól kevert, vagyis a folyadék főtömegében az oldott oxigén kon-

centrációja mindenütt azonos (C_b). Tételezzünk fel állandósult állapotot a gáz/folyadék határfelületre, azaz nincs O_2 -akkumuláció a határfelületen.⁷⁴

Az oxigénfluxus felírható a következőképpen:

$$J_{O_2} = \frac{\text{határfelületen átadott } O_2 \text{ (mol vagy g)}}{\text{felület}} = \frac{\text{hajtóerő}}{\text{ellenállás}} \quad 75$$

Esetünkben az oxigénfluxus kétféleképpen is felírható, tekintetbe véve, hogy a hajtóerő kifejezhető a gáz parciális nyomások vagy a koncentrációk különbségeként is

GÁZBUBORÉK → HATÁRFELÜLET = HATÁRFELÜLET → FOLYADÉK

$$J_{O_2} = \frac{p_b - p_i}{\frac{1}{k_g}} = \frac{C_i - C_b}{\frac{1}{k_l}} \quad (4.262)$$

$$J_{O_2} = Hk_g(C^* - C_i) = \frac{\frac{p_i}{H} - \frac{p^*}{H}}{\frac{1}{k_l}}$$

ahol: **H** a Henry-állandó

p_b a gázbuborékban mérhető oxigén parciális nyomás és C^* a vele (hipotetikusán) egyensúlyt tartó folyadékban lenne az oldott oxigén koncentrációja.

C_b a folyadék főtömegében mérhető oldott oxigén koncentrációja és p^* lenne a vele egyensúlyban lévő gáz oxigén parciális nyomása.

C_i és p_i a határfelületi oldott oxigén szintje, ill. parciális nyomása.

Természetesen „keresztben” is felírhatók az egyenletek, illetve nincs oxigénfelhalmozódás a határfelületen, így felírható egy egyenlet, amelyben csak a parciális nyomások és egy, amelyben csak a megfelelő koncentrációk szerepelnek:

$$J_{O_2} = k_g(p_b - p_i) = \frac{k_l}{H}(p_i - p^*) \quad (4.263)$$

$$J_{O_2} = Hk_g(C^* - C_i) = k_l(C_i - C_b)$$

Mivel a p_i határfelületi parciális nyomás és a vele egyensúlyt tartó C_i határfelületi oldott oxigén-koncentráció nem mérhető mennyiségek, ezért fejezzük ki p_i -t és C_i -t a megfelelő (4.263) egyenletből.

E szerint

$$p_i = \frac{\frac{p^*}{k_g} + \frac{H}{k_l} p_b}{\frac{H}{k_l} + \frac{1}{k_g}} \quad (4.264)$$

⁷⁴ Nyilvánvaló, hogy egy a fiktív határfelületre érkező oxigénmolekulának „azonnal” tovább is kell haladnia, tehát felhalmozódás kizárt.

⁷⁵ Vö.: Ohm-törvény: $I = \frac{\Delta U}{\sum R_i}$

$$C_i = \frac{Hk_g C^* + k_1 C_b}{k_1 + Hk_g} \quad (4.265)$$

Utóbbi kifejezést (4.263) egyenletbe helyettesítve, az oxigénfluxus, koncentrációkkal kifejezve, végül is a következő lesz:

$$J_{O_2} = \frac{C^* - C_b}{\frac{1}{Hk_g} + \frac{1}{k_1}} \quad (4.266)$$

Természetesen parciális nyomással is megadható a fluxus:

$$J_{O_2} = \frac{p_b - p^*}{\frac{H}{k_1} + \frac{1}{k_g}} \quad (4.267)$$

Bevezetve az eredő folyadékoldali oxigénátadási tényezőt, illetve az eredő gázoldali oxigénátadási tényezőt,

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{Hk_g} + \frac{1}{k_1} \quad \frac{1}{K_g} = \frac{H}{k_1} + \frac{1}{k_g} \quad (4.268)$$

az oxigénfluxus kétféle felírása a folyadékoldal, illetve a gázoldal mennyiségeivel az alábbi lesz:

$$J_{O_2} = K_L (C^* - C_b) \quad J_{O_2} = K_g (p_b - p^*) \quad (4.269)$$

E két kifejezés közül legtöbbször a koncentrációkkal felírt formát alkalmazzuk a fermentációs gyakorlatban. Mivel a Henry-állandó értéke (lásd a [4.26. táblázat](#)ot) igen nagy szám (pl. O₂-re 30 °C-on 47 500 bar/móltört), és mivel az oxigén diffúziósebessége a gázfázisban sokkal nagyobb, mint a folyadék- fázisban, vagyis

$$\frac{k_g}{k_1} \cong \frac{D_{O_2}^{\text{gáz}}}{D_{O_2}^{\text{folyadék}}} \approx 10^4, \quad (4.270)$$

ezért $K_L \cong k_1$, vagyis valóban a sebesség meghatározó lépés a 2. folyamat, a folyadékfilmen keresztül folyó oxigéntranszport, és az eredő folyadékoldali oxigénátadási tényező maga a folyadékoldali oxigén- átadási tényező.

Megjegyezzük, hogy a kétfilmelméleten kívül, amelyet Nernst 1904-ben alkotott meg, a gáz→folyadék oxigénabszorpcióra egy sor egyéb elméleti leírás is ismert, amelyek többé-kevésbé hasonlóan, esetenként reálisabban modellezik a tényleges viszonyokat. Maga a kétfilmelmélet tehát azt feltételezi, hogy az anyagátadási tényező:

$$k_1 = \frac{D_{O_2}^{\text{folyadék}}}{\delta} \quad (4.271)$$

Sokszor e helyett a következő empirikus összefüggés jobban leírja az anyagátadási viszonyokat:

$$k_1 = \frac{(D_{O_2}^{\text{folyadék}})^n}{\delta} \quad (4.272)$$

ahol az n csak 0,8–0,9 értékű.

Ezzel szemben Higbie (1935) ún. folyadékbehatolási modellje más összefüggést feltételez a folyadékoldali anyagátadási tényező és az oxigén diffúziós állandója között:

$$k_1 = 2 \sqrt{\frac{D_{O_2}^{\text{folyadék}}}{\pi t_{\text{érintkezési}}}} \quad (4.273)$$

Ebben a $t_{\text{érintkezési}}$ egy a buborékfelületen lévő folyadékelemnek a felületen való tartózkodási idejét jelenti.

Dankwerts (1951) felületmegújulási modellje feltételezi, hogy a gáz-folyadék határfelületen mozaikszerűen elhelyezkedő folyadékelemek vannak, amelyek különböző ideig érintkeznek a gázzal, s ezalatt oxigénátadás történik, majd ezen folyadékelemek kicserélődnek a folyadék főtömegéből származó „friss” (kevesebb oldott oxigént tartalmazó) folyadékelemekkel. E modell értelmében a k_1 folyadékoldali tömegátadási tényező nem a diffuzivitással, hanem annak négyzetgyökével arányos:

$$k_1 = \sqrt{D_{O_2} s} \quad (4.274)$$

ahol s a folyadék főtömegéből származó friss folyadékkal történő kicserélődés frekvenciája (1/sec).

Mind a kétfilmelmélet, mind ez utóbbi leírások *egyparaméteres modellek*, ami alatt azt értjük, hogy a diffuzivitáson kívül csupán egy paraméter, a folyamat hidrodinamikájától függő δ vagy $t_{\text{érintkezési}}$ vagy s paraméter határozza meg k_1 értékét.

Végeredményben az oxigénfluxusból az eredő oxigénabszorpció-sebességet akkor kapjuk meg, ha a fluxust a teljes anyagátadási felületre számítjuk ki:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C), \quad (4.275)$$

ahol

K_L – az eredő folyadékoldali tömegátadási tényező [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$],

a – térfogategységre jutó anyagátadási felület [$\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3} = \text{cm}^{-1}$],

$K_L a$ – eredő folyadékoldali (térfogati) oxigénabszorpció együttható [s^{-1}],
(A fermentációs gyakorlatban leginkább h^{-1} értékben adjuk meg.),

C^* – telítési oxigénkoncentráció (mg/dm^3),

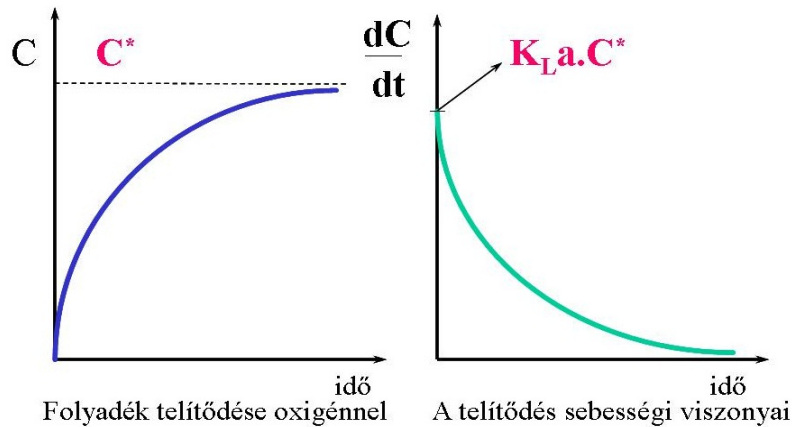
C – az aktuális oldott oxigén-koncentráció (mg/dm^3).

Konstans $K_L a$ és C^* mellett (4.275) analitikusan megoldható a változók szétválasztásával:

$$\int_0^C \frac{dC}{C^* - C} = \int_0^C -d \ln(C^* - C) = \int_0^t K_L a \cdot dt \quad (4.276)$$

$$C = C^* (1 - e^{-K_L a t}) \quad (4.277)$$

A (4.275) és a (4.277) egyenleteknek megfelelő grafikus ábrázolások az oxigénabszorpció sebességi viszonyait, illetve egy vizes rendszer oxigénnel történő telítődését mutatják a 4.76. ábra szerint. Felhívjuk a figyelmet a $K_L a \cdot C^*$ maximális sebességi értékre, amelyet gyakran a bioreaktorok oxigénátadási viszonyait jellemző **OTR (oxygen transfer rate)** értéként adnak meg ($\text{kgO}_2 / \text{m}^3 \cdot \text{h}$).



4.76. ábra: Az oxigénabszorpció: telítődés és sebességi viszonyok

Az előzőekben az oxigénabszorpció sebességi viszonyait tiszta vizes, mikroba nélküli rendszerben vizsgáltuk, most nézzük meg, hogy hogyan módosul ez a kép egy lélegző mikrobatenyészet (fermentlé) esetében.

Ekkor az oldottoxigén-koncentráció változásának sebességét az abszorpció és a lélegzés sebességének eredője határozza meg:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) - xQ$$

OLDÓDÁSI SEBESSÉG FOGYASZTÁSI SEBESSÉG
 ↘ ↘

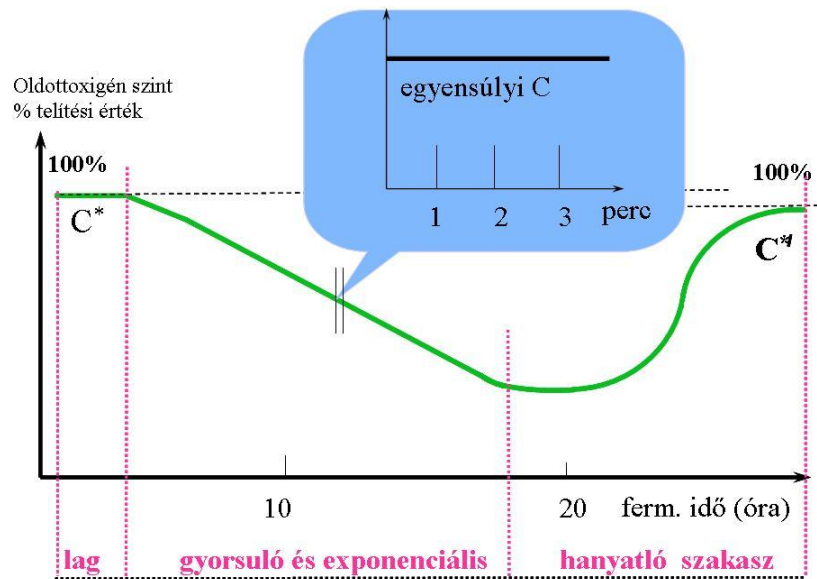
Belátható, hogy ki fog alakulni egy dinamikus egyensúly az abszorpció és a lélegzés között, vagyis:

$$\frac{dC}{dt} = 0 \quad \text{és} \quad K_L a (C^* - C) = xQ \quad (4.278)$$

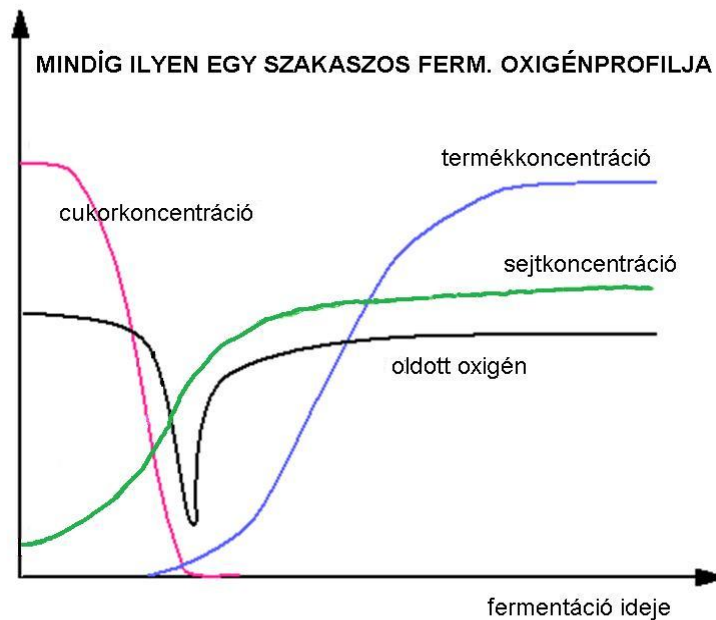
Tegyük fel ugyanis, hogy ezen egyensúly nem jön létre pl. úgy, hogy adott időpontban $K_L a (C^* - C) > xQ$. Ezek szerint ekkor $dC/dt > 0$, vagyis az oldott oxigén koncentrációja növekedne. Ekkor viszont a $C^* - C$ hajtóerő csökkenne mindaddig, míg az egyensúly be nem áll. Az egyensúlynak $K_L a (C^* - C) < xQ$ esetén történő felbomlása hasonló gondolatmenet szerint szintén nem lehetséges (illetve tartósan nem állhat fenn).

Tehát mindenképpen egy C egyensúlyi oldottoxigén-koncentráció alakul ki a fermentációs rendszerben.

Tudjuk azonban, hogy a fermentáció során C nem állandó, jellemző változást mutat, mégpedig a 4.77. ábrán látható módon. A mindenkori egyensúly és e jellemző változás nem jelent ellentmondást, ha meggondoljuk, hogy egy szakaszos fermentáció során mind x és Q, mind $K_L a$ és C^* változik a tenyésztés során. Az egyensúly tehát állandóan felborul majd helyreáll, miközben a „konstans” egyensúlyi oldottoxigén koncentrációja az ábra szerint változik. A görbe egy piciny szakaszát tekintve (oly rövidet, amely alatt a paraméterek változása elhanyagolható), C valóban állandó. Ezt kívánja bemutatni az ábrán a kinagyított szakasz. Ha egy szakaszos fermentáció képét most már kiegészítjük az oldottoxigén- koncentráció profiljával is, akkor mindig a 4.78. ábrán látottakhoz hasonló képet kapunk. Az egyensúlyi oldottoxigén-koncentrációnak egy szakaszos fermentáció során történő változását a [4.12. animáción](#) is követhetjük.



4.77. ábra: Egyensúlyi oldottoxigén-koncentráció a fermentációs folyamat alatt



4.78. ábra: Szakaszos fermentáció képe



4.12. animáció: Szakaszos fermentáció oldottoxigén-profilja

4.5.4. A telítési oxigénkoncentráció függése a tenyésztési körülményektől

Az oxigén vízes oldatokban csekély mértékben oldható gáz, amelynek az oldhatóságát állandó hőmérsékleten a Henry törvény írja le:

$$C^* = \frac{1}{H} p_{O_2} \quad (4.279)$$

ahol H – a Henry-állandó [bar/móltört; bar.dm³/mol; bar.dm³/mg] (értékeit lásd a 4.26. táblázatban),
 p_{O_2} – az oxigén parciális nyomása (amely a C^* koncentrációjú oldattal egyensúlyt tartó légtérben lenne mérhető) [bar],
 C^* – a telítési oxigénkoncentráció, az oxigén oldhatósága [mol/dm³; mg/dm³].

A C^* -nak a hőmérséklettől való függését a Henry-állandó függésével szokás leírni:

$$\frac{d \ln H}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = \frac{\Delta G}{R}, \quad (4.280)$$

ahol: T – a hőmérséklet (°K),
 R – az egyetemes gázállandó,
 ΔG – az oxigénabszorpció hője (negatív érték).

4.26. táblázat: Különböző gázok Henry-állandó értékei különböző hőmérsékleteken (vízben)

Hőmérséklet °C	Henry-állandó *10 ⁻⁴ [bar/móltört]		
	N ₂	CO ₂	O ₂
0	5,29	0,073	2,55
10	6,68	0,104	3,27
20	8,04	0,142	4,01
30	9,24	0,186	4,75
40	10,40	0,233	5,35
50	11,30	0,283	5,88
60	12,0	0,341	6,29

A vízben való oxigénoldhatóság értékeit a 4.27. táblázat adataiból tudhatjuk meg különböző hőmérsékleteken.

A (4.280) egyenlet különböző közelítő megoldásai is ismertek. Ezekkel az oxigén oldhatóságának jó becsléseit számíthatjuk. Ilyen közelítés Wilhelm (1977) egyenlete 1 bar nyomásra a következő formulával:

$$R \ln X = A + \frac{B}{T} + C \ln T + DT \quad (4.281)$$

ahol X az oldott oxigén vagy a CO₂ móltörtje, és az állandók az alábbi 4.28. táblázat szerintiek.

4.27. táblázat: Oxigén oldhatósága vízben levegő és tiszta oxigéngáz esetén

Hőmérséklet °C	Henry-állandó $\times 10^2 \text{ bar} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$	C* levegő mg/dm^3	C* tiszta oxigén mg/dm^3
0	7,03	14,8	70,3
10	5,49	11,5	54,9
15	4,95	10,4	49,5
20	4,5	9,45	45,0
25	4,14	8,69	41,4
26	4,07	8,55	40,7
28	4,01	8,29	39,5
30	3,84	8,05	38,4
35	3,58	7,52	35,8
40	3,37	7,07	33,7

4.28. táblázat: Wihelm közelítésének állandói oxigénre és szén-dioxidra

	T(TARTOMÁNY)	A	B	C	D
OXIGÉN	274–348 °K	-286,94	15450,6	36,5593	0,0187662
SZÉN-DIOXID	273–353 °K	-317,66	17371,2	43,0607	-0,00219107

Szintén a (4.280) egyenlet közelítő megoldása C*-ra az Antoine-egyenlet (lásd a desztilláció műveletét is)

$$C^* \cong \frac{A}{B + t} \quad (4.282)$$

alakú összefüggés is, amelyben 4–33 °C hőmérséklet-tartományban

C* – az oxigén oldhatósága (mg/dm^3),

A – 468,

B – 31,6 értékű állandó, és

t – a hőmérséklet °C-ban megadva.

Végül a (4.280) egyenlet közelítése az alábbi hatványsor is, amely szintén alkalmas C* becslésére:

$$C^* \cong 14,16 - 0,3943 \cdot t + 0,007714 \cdot t^2 - 0,0000646 \cdot t^3 \quad (4.283)$$

ahol C* az oxigén oldhatósága (mg/dm^3), t pedig a hőmérséklet °C-ban megadva.

Mindhárom közelítő összefüggés tiszta vízre vonatkozóan szolgáltat oxigénoldhatósági adatokat. Vegyük észre, hogy az oxigén oldhatósága csökken a hőmérséklet növekedésével.

Az oldhatóságnak az adott tápoldat összetételétől való függésének a becslése lényegesen nehezebb feladatot jelent.

C* értékét elsősorban a tápoldat elektrolitjainak fajtái és mennyisége határozzák meg.⁷⁶ A tiszta vízben és egy többféle elektrolitot tartalmazó oldatban mérhető telítési oxigénkoncentrációk aránya a következőképpen adható meg:

⁷⁶ Ezek befolyásoló hatásának számszerűsítése *Setchenov, van Krevelen* és *Hoftijzer*, valamint *Dankwerts* munkájához fűződik.

$$\lg \frac{C_0^*}{C^*} = \sum_i H_i I_i, \quad (4.284)$$

ahol C_0^* – az oxigén oldhatósága tiszta vízben,
 C^* – az oxigén oldhatósága az adott elektrolitoldatban,
 H_i – ionspecifikus kisózási állandók,
 I_i – az i-edik ionfajtára vonatkozó ionerősség értéke.
 Az ionerősség az ismert összefüggéssel számítható:

$$I_i = 0,5c_i z_i^2 \quad (4.285)$$

amelyben c_i – az i-edik ion molaritása (g-ion⁷⁷/dm³), z_i – az i-edik ion töltése.

A szervesetlen sók hatásának szemléltetésére áll itt a 4.29. táblázat, amelyben NaCl kisózó hatását láthatjuk az oxigén oldhatóságára.

4.29. táblázat: Oxigén oldhatósága NaCl-oldatban 25 °C-on és 1 bar oxigénnyomáson

NaCl-koncentráció mol/dm ³	C* mg/dm ³
0	41,4
0,5	34,3
1,0	29,1
2,0	20,7

Néhány fermentációs tápoldatban előfordulható ionra vonatkozóan a 4.30. táblázat tartalmazza az ionspecifikus állandókat. Megjegyezzük, hogy az ionok kisózási hatásának fenti becslése a fermentációs technológiai szempontjából szintén jelentős CO₂ vonatkozásában is használható, ezért a táblázatban a szén-dioxidra vonatkozó megfelelő adatokat is megadjuk.

4.30. táblázat: Ionspecifikus állandók CO₂ és O₂ oldatára (25 °C)

Kationok	H _i (l.g-ion ⁻¹)		Anionok	H _i (l.g ion ⁻¹)	
	O ₂	CO ₂		O ₂	CO ₂
H ⁺	-0,774	-0,311	Cl ⁻	0,844	0,340
Na ⁺	-0,550	-0,129	Br ⁻	0,820	0,324
K ⁺	-0,596	-0,198	I ⁻	0,821	0,311
NH ₄ ⁺	-0,720	-0,264	OH ⁻	0,941	
Mg ²⁺	-0,314	-0,079	NO ₃ ⁻	0,802	0,291
Ca ²⁺	-0,303	-0,071	SO ₃ ²⁻	0,453	0,213
Mn ²⁺	-0,311		CO ₃ ²⁻	0,485	
			PO ₄ ³⁻	0,320	0,147

A fermentációs tápoldatokban jelen levő szerves anyagoknak szintén hatásuk van az oxigén oldhatóságára, s ez is a Setchenov-egyenlettel írható le:

$$\lg \frac{C_o^*}{C_{szerv}^*} = kC_{szerv}, \quad (4.286)$$

ahol k az ún. Setchenov-állandó és C_{szerv} az adott szervesanyag koncentrációja a tápoldatban.

⁷⁷g-ion = iontömegnyi

A logaritmusos összefüggést lineárisan is szokták közelíteni, amikor is az egyenlet a következő alakot ölti:

$$C_{\text{szerv}}^* = C_o^* (1 - m C_{\text{szerv}}) \quad (4.287)$$

Közelítő számításokat tesz lehetővé az az adat is, miszerint glükózra, laktózra, szaharózra a fenti egyenlet egyaránt alkalmazható $m = 0,0012 \text{ dm}^3/\text{g}$ értékkel mintegy $150\text{--}200 \text{ g/dm}^3$ cukorkoncentrációig. Jegyezzük meg azonban, hogy a becslés sokkal kevésbé pontos, mint az elektrolitok esetében. Így pl. a $0,0012 = m$ érték helyett található az irodalomban szaharózra $0,0009$ -es érték is.

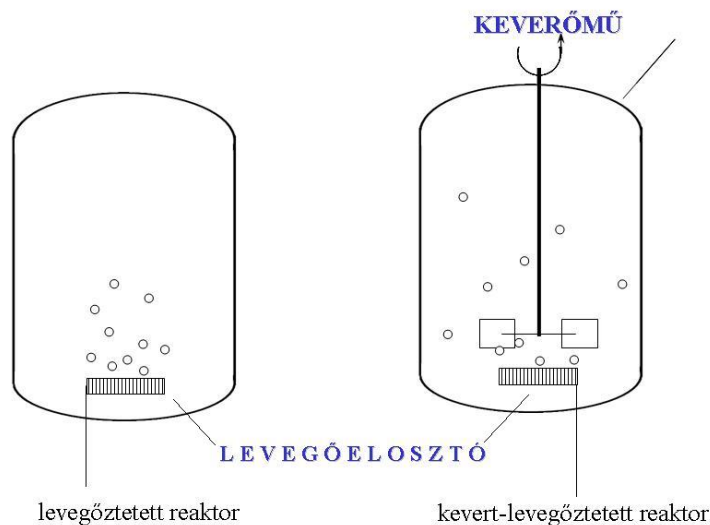
4.5.5. A levegőztetés és keverés fermentációs rendszerekben

A továbbiakban az oxigénabszorpciós viszonyokat tárgyaljuk most már műveleti szempontból: hogyan valósítjuk meg egy fermentációs rendszer levegőellátását. Keressük azokat az alapvető megoldásokat és összefüggéseket, amelyeknek ismeretében a jó levegőellátás megvalósítható.

A fermentációs rendszerek oxigénellátását alapvetően két módon valósíthatjuk meg, amint a 4.79. ábra szemlélteti. A bioreaktorokban elhelyezett levegőelosztón keresztül *komprimált levegőt* fúvatnak a fermentáléba, s miközben a buborékok a rendszeren áthaladnak, megtörténik az oxigénabszorpció (és a CO_2 -deszorpció). A másik alapvető típus esetében az előbbieken kívül mechanikus keverést is alkalmaznak. Bármilyen aerob bioreaktor e két levegőztetési típusba sorolható. A következőkben először a nem kevert, majd a kevert reaktorok oxigénátadási viszonyait tanulmányozzuk.

Két paraméter az, amit vizsgálni fogunk, a K_L és az a .

Megvizsgáljuk, hogy milyen tényezők (fizikai és hidrodinamikai tulajdonságok) befolyásolják ezeket, és az alapvető – legtöbbször empirikus – összefüggések segítségével miként lehet értéküket becsülni.

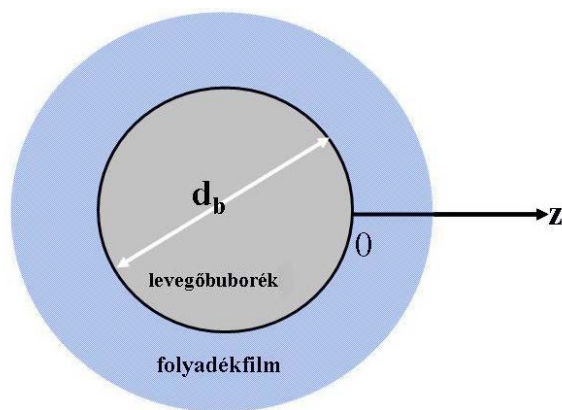


4.79. ábra: Az oxigénellátás technikai megvalósítása

4.5.5.1. Oxigénátadás buborékokból, K_L és a becslése (nem kevert reaktorok)

A buborék gáz/folyadék határfelületére (g/f) felírható a helyi oxigénfluxus a Fick-törvény segítségével a 4.80. ábra értelmezése szerint, amelyen z a folyadék főtömege felé irányuló koordinátát jelenti és a hajtóerőt, azaz a koncentrációgradienst a buborék felületén számoljuk⁷⁸.

⁷⁸ Azaz itt a Fick-törvény egydimenziós változatát használjuk.



4.80. ábra: Buborékból történő anyagátadás egydimenziós modellje

$$\frac{dC}{dt} = -D_{O_2} \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z=0}, \quad (4.288)$$

másrészt egységnyi felületre vonatkozóan az oxigénfluxus $J = k_L (C^* - C)$. E két kifejezés egyenlővé tétele után k_L fejezhető a következő formában:

$$k_L = -\frac{1}{C^* - C} D_{O_2} \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z=0} \quad (4.289)$$

Ez az egyenlet könnyen normalizált formára hozható, ha bevezetjük az alábbi dimenziómentes változókat:

$$\bar{C} = \frac{C}{C^*} \quad \text{és} \quad \bar{z} = \frac{z}{d_b},$$

ahol d_b a buborék átmérője. Ezek szerint a dimenziómentes tömegátadási koefficiens (a Sherwood-szám) egy differenciálegyenletet ad:

$$Sh = \frac{k_L d_b}{D_{O_2}} = -\frac{1}{1 - \bar{C}} \left(\frac{\partial \bar{C}}{\partial \bar{z}} \right)_{\bar{z}=0} \quad (4.290)$$

Stúdiumunk kereteit meghaladná e differenciálegyenlet megoldását megkísérelni, mindenesetre a g/f határfelület közelében, a folyadékfilmben a megoldás a következő függvénykapcsolat alakját ölti:

$$\bar{C} = f(\bar{z}, Sh, Sc, Gr) \quad (4.291)$$

A dimenziómentes tömegátadási tényezőre pedig a

$$Sh = g(Sc, Gr) \quad (4.292)$$

függvénykapcsolat kapható. A függvénykapcsolat tényleges alakja nagyon sok tényezőtől függ, megállapítása adott hidrodinamikájú rendszerre sok-sok kísérleti munka alapján és a dimenzióanalízis felhasználásával történhet. A következőkben többször hivatkozunk az anyagátadás leírásában általánosan használt különböző dimenziómentes csoportokra, ezért tekintjük át a 4.31. táblázatot, amely a legfontosabb ilyen csoportokat tartalmazza általános és az oxigénátadással kapcsolatos speciális alakjukban. Megtalálhatjuk itt a használt dimenziómentes kritériumok definíció szerinti értelmezésének egy változatát is⁷⁹.

A leszálló vagy felszálló buborékokból történő oxigénátadásra (s jegyezzük meg: hasonlóan cseppekre és szilárd részecskékre is) vonatkozó szakirodalomban a különböző kísérleti berendezések esetén tapasztalható más-más hidrodinamikai viszonyokra található korrelációk sokszor nem csupán a

⁷⁹ Egy másik definíciórendszer szerint ezek a kritériumok a figyelt rendszer egy-egy időállandójának hányadosai.

Sc és Gr kritériumokat, hanem esetenként a Re és/vagy Pe kritériumokat is tartalmazzák. Ezekben az esetekben – ha a buboréksebességet alkalmas módon fejezzük ki – az összefüggések szintén a fenti általános $Sh = g(Sc, Gr)$ alakra hozhatók (lásd első példánkat).

A szakirodalomban számtalan különböző korreláció található, és nem könnyű a dolgunk, ha ezek közül választani kívánunk saját speciális viszonyaink leírására. Ezért e helyütt csak néhány fontosabb speciális eset és összefüggés értelmezésére térünk ki, és emellett összefoglaló táblázatban (4.32. táblázat) megadjuk a legtöbbször előforduló és leghasználhatóbb kifejezéseket. Ugyanígy egy összefoglaló táblázat (4.33. táblázat) tartalmazza a buboréksebességekre és a buborékméretekre vonatkozó legfontosabb korrelációkat. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a táblázatok együtt használandók, tehát pl. adott hidrodinamikai feltételek esetén választott $Sh = \dots$ összefüggéshez meg kell keresni a használható d_b és v_b összefüggéseket is!

Néhány, különböző hidrodinamikai viszonyokra talált, és más-más szempont szerint érdekes összefüggést kicsit részletesebben is megvizsgálunk.

a) Különállóan felszálló, merev határfelülettel jellemezhető (nem forgó) gázbuborékok esetén, amelyek olyan reaktorokban fordulhatnak elő, amelyekben kicsiny buborékok képződnek a levegőelosztón (például zsugorított kerámia- vagy fémszűrőn) és a fermentálé felületaktív anyagokat tartalmaz, valamint a légbuborékok felszállási sebessége igen kicsi, a következő korrelációt találták megfelelőnek:

$$Sh = 1,01 \cdot Pe^{\frac{1}{3}} = 1,01 \cdot \left(\frac{v_b d_b}{D_{O_2}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4.293)$$

4.31. táblázat: A tömegátadási számításokban alkalmazott dimenziómentes csoportok

REYNOLDS-SZÁM $Re = \frac{\text{tehetetlenségi erő}}{\text{belső súrlódási erő}}$	$\frac{dvp}{\mu}$	$\frac{d_b v_b \rho_1}{\mu_1}$
PECLET-SZÁM $Pe = \frac{\text{konvektív komponensáram}}{\text{konduktív komponensáram}}$	$\frac{dv}{D}$	$\frac{d_b v_b}{D_{O_2}}$
SCHMIDT-SZÁM $Sc = \frac{\text{momentum diffúzió}}{\text{tömeg diffúzió}}$	$\frac{\mu}{\rho D}$	$\frac{\mu_1}{\rho_1 D_{O_2}}$
FROUDE-SZÁM $Fr = \frac{\text{centrifugális erő}}{\text{gravitációs erő}}$	$\frac{v^2}{gL}$	–
GRASHOF-SZÁM (Archimédész szám) $Gr = \frac{\text{felhajtóerő}}{\text{belső súrlódási erő}}$	$\frac{d^3 \rho g \Delta \rho}{\mu^2}$	$\frac{d_b^3 \rho_1 g (\rho_1 - \rho_g)}{\mu_1^2}$
SHERWOOD-SZÁM $Sh = \frac{\text{buborékátmérő}}{\text{filmátmérő}}$	$\frac{kd}{D}$	$\frac{k_1 d_b}{D_{O_2}}$

Jelölések: d, L – jellemző geometriai méret
 v – jellemző sebesség
 μ – dinamikai viszkozitás
 D – diffúziós állandó
 ρ – sűrűség
 g – nehézségi gyorsulás
 k – anyagátadási tényező
 b index a buborékra, 1 a folyadékfázisra utal

4.32. táblázat: Korrelációk a tömegátadási tényező becsléséhez

Korrelációk	Megjegyzések
Analitikus összefüggések	
$k_1 = D_{O_2} / \rho$	Kétfilmelmélet (Lewis és Whitman, 1924)
$k_1 = 2\sqrt{\frac{D_{O_2}}{\pi\theta}}$	Folyadékbehatolási elmélet (Higbie, 1935)
$k_1 = 2\sqrt{D_{O_2}s}$	Felületmegújulási elmélet (Danckwerts, 1951)
Buborékok stagnáló környezetben $Sh = 2$	$Re = Gr = 0$ merev vagy mozgó buborékfelület (Frossling, 1938)
$Sh = 1,1(Sc \cdot Gr)^{\frac{1}{3}}$	$Re = 0$
Merev felületű mozgó buborékok, szabadon fel- vagy leszálló buborékok, csepegtető test, töltött oszlopok	
$Sh = 0,99 Re^{\frac{1}{3}} Sc^{\frac{1}{3}}$	$Re < 1$, kúszó áramlás (Levich, 1962)
$Sh = 1,01 Pe^{\frac{1}{3}} = 0,39 Gr^{\frac{1}{3}} Sc^{\frac{1}{3}}$	$Re < 1$, $Pe \gg 1$ (Levich, 1962)
$Sh = 2 + 0,57 Re^{\frac{1}{2}} Sc^{0,35}$	$Re \gg 1$ (Griffith, 1960)
$Sh = 0,95 Re^{\frac{1}{2}} Sc^{\frac{1}{3}}$	$10 < Re < 10^4$
$Sh = 2 + 0,75 Re^{\frac{1}{2}} Sc^{\frac{1}{3}}$	Összefoglaló korreláció egy sor empirikus és elméleti összefüggés alapján közelítve (Rowe, Glaxton és Lewis, 1965)
$Sh = 2 + 0,31 Gr^{\frac{1}{3}} Sc^{\frac{1}{3}}$	$d_b < 2$ mm (Calderbank és Moo-Young, 1961)
$Sh = 0,13 Re^{\frac{3}{4}} Sc^{\frac{1}{3}}$	Kevert reaktorra, turbulens áramlási viszonyokra (Calderbank és Moo-Young, 1961)
Mozgó felületű, mozgó buborékok	
$Sh = 0,65 Pe^{\frac{1}{2}}$	$Re < 1$, $Pe \gg 1$ (Levich, 1962)
$Sh = 0,65 Pe^{\frac{1}{2}} \left(1 + \frac{Re}{2}\right)^{\frac{1}{2}}$	$10 < Re < 100$ (Hadamard, 1911)
$Sh = 1,13 \left(1 - \frac{2,9}{Re^{\frac{1}{2}}}\right) Pe^{\frac{1}{2}}$	$100 < Re < 1000$ (Hadamard, 1911)

4.32. táblázat folytatása

Korrelációk	Megjegyzések
$Sh = 1,13Pe^{\frac{1}{2}}$	Re >1000 (Higbie, 1935)
$Sh = 0,65 \left[1 - \frac{4n(n-1)}{2n+1} \right]^{\frac{1}{2}} Pe^{\frac{1}{2}}$	Pszudoplasztikus folyadékra (n: hatvány-törvényindex, lásd 4.5.7. fejezet) (Hirose, Moo-Young, 1969)
$Sh = 1,79 \left[\frac{(3E^2 + 4)^{\frac{2}{3}}}{E^2 + 4} \right] Pe^{\frac{1}{2}}$	Nagy, kalap alakú buborékokra, viszkózus folyadékokban E = buborékszélesség/buborékmagasság, rendszerint 3,5. (Calderbank, Lochiel, 1964)
$Sh = 0,42Sc^{\frac{1}{2}}Gr^{\frac{1}{3}}$	d > 2,5 mm Newtoni folyadékra (Calderbank, Moo-Young, 1961)
$Sh = 0,65(1 - 3,24m)Pe^{\frac{1}{2}}$	Pszudoplasztikus folyadékokra m = (n-1)/2 (Bhavarijn, Mashelkar, Blanch, 1978)

4.33. táblázat: Korrelációk a buboréksebesség és buborékméret számításához

Korrelációk	Megjegyzések
$v_b = \frac{\rho_l g}{18\mu_l} d_b^2$	Merev felületű kis buborékok $Re < 1$
$v_b = \frac{\rho_l g}{16\mu_l} d_b^2$	Mozgó felületű buborékok elasztikus folyadékokban
$v_b = \left[\frac{\rho_l g}{K} \frac{2^{n+1}}{X_n} \left(\frac{4\pi}{3} \right)^{\frac{2-n}{3}} \right]^{\frac{1}{n}} V_B^{\frac{n+1}{3n}}$	Buborékok pszeudoplasztikus folyadékokban (lásd 3.4.7. fejezet) n = hatványtörvényindex, K = konzisztenciaindex $X_n=24$, kúszóáram, szférikus, merev felületű buborékok $X_n=16$, kúszóáram, szférikus, mozgó felületű buborékok $X_n=48$, $Re > 1$, szférikus, mozgó felület V_B = buboréktérfogat (Schügerl, 1977)
	Kis gázáramlási sebesség ≈ 1 cP viszkozitás
$d_b = 0,19d_o^{0,48} Re_o^{0,32}$	Mérsékelten nagy gázáramlási sebesség, vizes oldatok, levegőtető lyukátmérő $d_o = 0,1-1$ cm Re_o : lyukra vonatkozó Re -szám $Re_o = \frac{4Q\rho_g}{\pi d_o \mu_g}$, ahol Q gáztérfogatáram
$d_b = 0,18d_o^{0,5} Re_o^{0,33}$	$Re_o < 1000$
$\frac{d_b}{d_o} = 3,23 \left(\frac{4\rho_l Q}{\pi\mu_l d_o} \right)^{-0,1} \left(\frac{Q^2}{d_o^5 g} \right)^{0,21}$	1–1000 cP látszólagos viszkozitású, pszeudoplasztikus folyadékokra is használható, a gázsebesség egészen a hangsebességig terjedhet

A fenti megszorítások a hidrodinamikai viszonyokra vonatkozó $Re < 1$ és $Pe \gg 1$ feltételrendszer teljesülése esetén érvényesülnek.

Vizsgáljuk meg e példán, mit is jelent esetünkben ez a feltételrendszer!

$$\frac{v_b d_b}{D_{O_2}} \gg 1 \gg \frac{v_b \rho_l d_b}{\mu_l} \quad (4.294)$$

$$\frac{\mu_l}{\rho_l D_{O_2}} = Sc \gg 1 \quad (4.295)$$

Vagyis a két kritériumra tett megszorítás egyszerismind egy újabb kritériumra is megszorítást jelent.

(Egyébként vizes oldatokban a $\mu/\rho = \nu$ kinematikai viszkozitás értéke 10^{-2} cm²/s nagyságrendű, a D_{O_2} pedig 10^{-5} cm²/s nagyságrendű, tehát $Sc \approx 10^3 \gg 1$ valóban.)

Vegyük észre továbbá, hogy $Pe \gg 1$ kritérium azt jelenti, hogy itt a buborékok közelítőleg dugóáramban mozognak felfelé.⁸⁰

Ugyancsak az a) példánknál maradván próbáljuk a $Sh = 1,01 \cdot Pe^{1/3}$ összefüggésről bebizonyítani, hogy valóban felírható $Sh = g(Sc, Gr)$ alakban is. Ehhez meg kell határoznunk a buborék felszállási sebességét. Kis buborékok esetén a buborékok felszállási sebessége jól közelíthető a Hagen–Poiseuille-egyenlettel, amely a terminális buboréksebességet adja meg:

$$v_t = \frac{d_b^2 \Delta \rho g}{18 \mu} \quad (4.296)$$

Ezt v_b helyébe írva

$$Sh = 1,01 \left(\frac{d_b^3 \Delta \rho g}{18 \mu D_{O_2}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4.297)$$

összefüggést kapjuk, amely azonos átalakítások sorával a következő alakúvá tehető:

$$Sh = 1,01 \left(\frac{d_b^3 \rho \Delta \rho g}{18 \mu^2} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\mu}{\rho D_{O_2}} \right)^{\frac{1}{3}} = 0,39 Gr^{\frac{1}{3}} Sc^{\frac{1}{3}} \quad (4.298)$$

Megemlítjük még, hogy sokszor a $Sc \cdot Gr = Ra$ (Raileight) számot találjuk meg az empirikus összefüggésekben, így az a) esetet leíró összefüggést három különböző formában is felírhatjuk:

$$Sh = 1,01 Pe^{\frac{1}{3}} = 0,39 Gr^{\frac{1}{3}} Sc^{\frac{1}{3}} = 0,39 Ra^{\frac{1}{3}} \quad (4.299)$$

b.) Az előző példánk egyenként, egymástól függetlenül felszálló, tehát egymás mozgására hatást nem gyakoroló buborékokkal operáló esete a valóságban, legalábbis a fermentációs gyakorlatban ritka.

A legtöbb laboratóriumi és ipari levegőztetett reaktorban a buborékok csoportokban, fűrtökben mozognak fel vagy/és le, és a buborékok egymással is kölcsönhatásban vannak (hatnak egymás mozgására). CALDERBANK és MOO-YOUNG erre az esetre, attól függően, hogy mekkora a buborékok átmérője, kétféle buborékmozgást és ennek megfelelően két különböző összefüggést adott meg. Az úgynevezett kritikus buborékátmérő, azaz $d_b = 2,5$ mm alatt, illetve felett a

$$Sh = \frac{k_L d_b}{D_{O_2}} = 0,31 Gr^{\frac{1}{3}} Sc^{\frac{1}{3}} \quad (4.300)$$

$$Sh = \frac{k_L d_b}{D_{O_2}} = 0,42 Gr^{\frac{1}{3}} Sc^{\frac{1}{2}} \quad (4.301)$$

összefüggések írják le az oxigénátadási viszonyokat.

Kis buborékok a következő esetekben alakulhatnak ki:

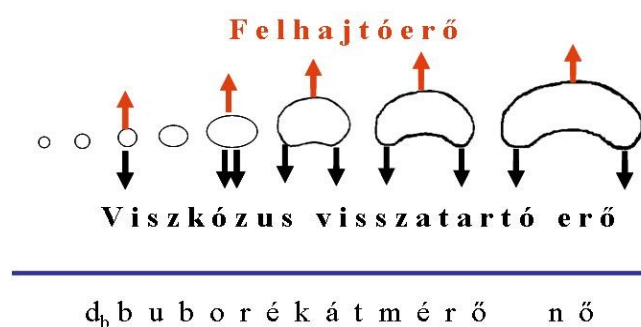
- levegőztetett reaktorban, amelyben hidrofil oldott anyagok vannak,
- nagyon kis lyukátmérőjű tálcán át történő levegőztetésnél,
- zsugorított kerámia vagy fémszűrőn át történő levegőztetéssel működő buborékolónák esetében.

⁸⁰ A Pe értelmezését és kapcsolatát a keveredési viszonyokkal a 4.6.1. fejezetben tárgyaljuk.

Nagy buborékok az alábbi esetekben valószínűek:

- tiszta vizet tartalmazó reaktor és
- szitatányéros buborékkolonnáknak esetén.

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a (4.300) és (4.301) egyenletek nem csupán a konstans értékében különböznek, hanem a Sc-szám kitevőjében is, s ez a két esetben eltérő hidrodinamikai viselkedésre is utal. E buborékmérettől függő buborék alak- és mozgásváltozást a buborékátmérettől függően szemlélteti az 4.81. ábra. Míg a kicsiny buborékok merev határfelülettel jellemezhetők és mozgásuk egyenes vonalú, miközben rendszerint forgó mozgást végeznek a saját tengelyük körül, addig amikor nő a buborékátmérő, egyre inkább deformálódik a buborék gömb alakja, és egészen nagy buborékoknál kalap vagy gomba formájú lesz, és felszállás közben nem egyenes vonalú, hanem imbolygó mozgást végez és nem forog. Ez a két véglet teljesen eltérő viselkedést jelent, érthető tehát a különbség a két egyenletben. Ne felejtjük el ugyanakkor, hogy a 2,5 mm nem valamiféle cezúra. A kicsiny és a nagy buborékok viselkedése közötti átmenet fokozatos, 2,5 mm körül egyik egyenlet sem írja le tökéletesen a rendszert, csak ettől a határértéktől kellően távol.



4.81. ábra: A buborékok deformálódása méretük növekedésével

Visszatérve a kis buborékok esetére, tételezzük fel, hogy a buborék (vagy környezete) nem mozog, ekkor (4.300)-ból $k_L=0$ adódnék. Természetes, hogy ez nem lehet igaz, hiszen ha van hajtóerő, az oxigéndiffúzió meg fog indulni. Ezt felismerve módosították a (338) egyenletet a következő formára:

$$\text{Sh} = \frac{k_L d_b}{D_{O_2}} = 2 + 0,31 \text{Gr}^{\frac{1}{3}} \text{Sc}^{\frac{1}{3}} \quad (4.302)$$

így most már, ha a buborék nem mozog, $\text{Sh}=2$ lesz, azaz $k_L = \frac{2D_{O_2}}{d_b} > 0$ értéket kapunk, amely megfelel az áramlás által elő nem segített diffúzió értékének. (Vegyük észre, hogy itt $k_L \propto D_{O_2}$, mint a klasszikus kétfilmelméletnél is.)

Ha a lokális k_L (és ezzel K_L) értékét valamilyen módon meg tudjuk becsülni, az adott konkrét bioreaktor oxigénátadási viszonyainak leírásához még az anyagátadási felület értékét is meg kell határoznunk. Hogyan történhet ez számítással?

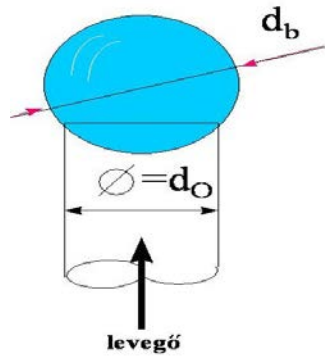
Induljunk ki abból az egyszerű esetből, amelyet a 4.82. ábra szemléltet, azaz egyetlen d_0 átmérőjű kis lyukú csövön keresztül préseljük át a levegőt, és a csővégen képződnek a buborékok. Feltétele ennek a képnek, hogy a levegőáramlás sebessége igen kicsiny legyen. A buborék születésekor a lyukról történő leválás pillanatában egyensúly van a felhajtóerő és a lyuk kerületén a felületi feszültség által kifejtett visszatartó erő között, tehát

$$\frac{d_b^3 \pi \Delta \rho g}{6} = \pi d_0 \sigma, \quad (4.303)$$

ahol σ a felületi feszültség.

Az egyenletből a buborék átmérője kifejezhető, és ennek alapján felülete kiszámítható. A buborékátmérő és a buborék felülete sorrendben

$$d_b = \left(\frac{6\sigma d_o}{g\Delta\rho} \right)^{\frac{1}{3}} \quad f_{\text{egy buborék}} = \pi d_b^2 \quad (4.304)$$



4.82. ábra: Buborékképződés lyukon

Ahhoz, hogy a teljes anyagátadási felületet megadhassuk, tudnunk kell, hogy a rendszerben egyidejűleg mennyi buborék van jelen, ez pedig a buborékok tartózkodási idejének figyelembevételével lehetséges.

E tartózkodási idő felszálló buborékok esetében

$$t_b = \frac{H_L}{v_b}, \quad (4.305)$$

ahol t_b – a buboréktartózkodási idő,
 H_L – folyadékmagasság,
 v_b – buboréksebesség.

Könnyen belátható, hogy v_b nem állandó, hanem változik, miközben a buborék a lyuktól a felszín felé halad. Általában jó közelítésként a buborék végsebességet (a folyadékfelszínen történő szét-pattanáskor mérhető sebességet) szokás figyelembe venni.

Ha feltesszük, hogy n db egyforma levegőztető csövünk (lyuk) van, amelyeken egyenként q a keresztülhaladó levegő térfogatárama, könnyen felírhatjuk az egységnyi térfogatra vonatkozó anyagátadási felületet:

$$a = \frac{1}{V} nqt_b \frac{\pi d_b^2}{\frac{\pi d_b^3}{6}} = \frac{nqt_b}{V} \frac{6}{d_b}$$

teljes buboréktérfogat a reaktorban egy buborék felülete
egy buborék térfogata
egy buborék fajlagos felülete

(4.306)

ahol V = a teljes térfogat (lé és buborék) és $nq=Q$ a levegőztetés térfogatárama.

Az nqt_b/V mennyiség nem más, mint a gázvisszatartás (hold up) értéke, így végül is az anyagátadási felületre a következő összefüggést kapjuk:

$$a = H_0 \frac{6}{d_b}, \quad (4.307)$$

ahol H_0 = gáztérfogat/teljes térfogat, a hold up.⁸¹ A hold up értelmezéséhez nézzük meg a 4.3. videót, amelyen csak egy levegőztetett reaktor (air lift) látszik tiszta vízzel feltöltve, majd a levegőztetés elindítása után vegyük észre, hogy a vízszint megemelkedik. Ezt a térfogatnövekményt az egyidejűleg a rendszerben tartózkodó buborékok össztérfogata okozza. Ha leállítjuk a levegőztetést, a vízszint visszaesik az eredetire. Ez a szintmagasság-változás is alkalmas a hold up számítására.

Ne felejtjük el, hogy a fenti kép túlegyszerűsített. Nem vettük például figyelembe, hogy a buborékok térfogata változik felfelé haladtukban, egyrészt a belőlük a folyadék főtömege felé történő anyagtranszport, másrészt a hidrosztatikai nyomás csökkenése miatt. Egy bioreaktorban lévő buboréktömeg egy eloszlást mutat, mindenféle méretű buborék egyszerre van jelen a rendszerben. A teljes buboréktérfogat megállapítására kísérletesen fotómódszereket szoktak igénybe venni, az elkészült fotón összegzik és átlagolják a buborékok méretét.⁸² Továbbá gömb alakú buborékokat tételeztünk fel, holott azok méretüktől függően változtatják alakjukat.

A (4.307) összefüggés azonban indifferens ezen elhanyagolásokra, tehát általánosan alkalmazható.

Mint látható, k_L és a meghatározása számítással igen nehéz feladat, mivel ezeket igen sok, a folyadék tulajdonságaitól, a készüléktől és az áramlási viszonyoktól függő paraméter befolyásolja. Ezért is legtöbbször $k_L a$, illetve $K_L a$ értékéről beszélünk, s ezt nem számítással, hanem különböző mérési módszerekkel kísérletesen határozzuk meg. E mérési módszerekre vonatkozóan utalunk ezen tárgy laborgyakorlataira, illetve a 4.8.3.1. alfejezetre.

Ha megvizsgáljuk a (4.307) összefüggést, választ adhatunk arra a gyakorlati kérdésre, hogy hogyan növelhető egy bioreaktorban az anyagátadás felülete? Ez nyilván a hold up növelésével történhet, ami viszont egyrészt a levegőztetés sebességének (térfogatáramának) emelésével, másrészt a buborékok méretének csökkentésével érhető el. Utóbbit csak egy levegőztetett rendszerben a levegőelosztó lyukátmérőinek csökkentésével érhetjük el. Más a helyzet egy kevert-levegőztetett reaktor esetén, ekkor a buborékméretet a keverés intenzitásával lehet csökkenteni. Eddig csupán azt a levegőztetési esetet vizsgáltuk, amikor mechanikus keveréssel nem segítik az oxigénabszorpció folyamatát.

A következőkben a keveréssel, annak funkcióival általában, valamint az oxigénátadási viszonyokra gyakorolt hatásával fogunk foglalkozni.



4.3. videó: A hold up értelmezése levegőztetett reaktorban

4.5.5.2. Oxigénátadás kevert reaktorban

Az aerob fermentációk esetén a legelterjedtebb fermentortípus a kevertetett-levegőztetett reaktor. Ezt a klasszikus keverős fermentort leginkább a gyógyszeripar alkalmazza, de a legtöbb laborberendezés is ilyen kivitelű.

⁸¹ A hold upra a szakirodalom egy másik definíciót is használ: $H_0' = \text{gáztérfogat/folyadék térfogat}$. Ebben az esetben a (4.307) egyenlet más alakú lesz $a = \frac{H_0'}{H_0' + 1} \frac{6}{d_b}$.

⁸² Erre az úgynevezett Sauter-átlagot használják: $d_b^{\text{átlag}} = \frac{\sum n_i d_{bi}^3}{\sum n_i d_{bi}^2}$, amelyben n_i a d_{bi} átmérőjű buborékok száma.

Túlegyszerűsítés lenne, ha a keverést csupán a levegőztetés/oxigénátadás szempontjából tekintenénk, ezért mindenekelőtt vizsgáljuk meg általában a keverés funkcióit.

A keverés szerepe, funkciói a következők:

- energiabevitel a folyadékba,
 - a levegőztető gáz diszpergálása a folyadékban,
 - a gáz- és folyadékfázis elválasztása,
 - a fermentlé oldott és nem oldott komponenseinek jó elkeverése.
- Az első funkció a legfontosabb, lényegében azt jelenti, hogy *a folyadékot állandó mozgásban kell tartani*, nem utolsósorban a másik három funkció betöltése érdekében. A bevitt mechanikai energia hővé alakul, ezért állandóan pótolni kell. Az energiaátadási funkció – mint a későbbiekben látjuk majd – igen fontos, mivel éppen az egységnyi fermentlé térfogatba bevitt energia határozza meg elsődlegesen az oxigénabszorpciós viszonyokat. E szempontból tehát a bevitt energiát növelni kell. Másrészt, mivel gazdasági szempontokat is figyelembe kell vennünk, egy lehetséges minimumra is törekednünk kell.
- Szintén energiaemésztő folyamat a gáz diszpergálása a folyadékban, de megjegyzendő, hogy a buborék- képzésnél elvesző mechanikai munka sokkal kisebb, mint a folyadék mozgatásakor hővé alakuló energia. A gáz diszpergálási keverő-funkció lényegében két folyamatot jelent. Egyrészt *buborékképzést*, mégpedig minél kisebb buborékok képzését. Ráadásul a *felületet újra meg újra meg kell újítani*, hiszen pl. felületaktív anyagok vonhatják be a buborékokat, ezáltal csökkentve a k_L értékét, ezenkívül a buborékok egyesülhetnek (koaleszcencia jelensége), csökkentve ezáltal az anyagátadási felület nagyságát. Másrészt a *buborékokat egyenletesen el kell oszlatni* a rendszerben megfelelő nagy hold up kialakítása céljából.
- A gázszeparációval kapcsolatos keverő funkció igen komplex kérdéskör. Itt lényegében a „használt” buborékok eltávolításáról van szó, másrészt a képződő anyagcsere-termékeket (CO_2) tartalmazó buborékok eltávolításáról, amely fordított irányú, de az oxigénabszorpcióhoz teljesen hasonló összefüggésekkel leírható anyagátadási folyamat. A nagy buborékok eltávolítása igen egyszerű, de a kicsiny gázbuborékok szeparációja extrém módon nehéz feladat.
- A keverőelem negyedik funkciója a jó keveredéssel kapcsolatos. A tápoldat valamennyi oldott és szuszpenzióban lévő komponensét, valamint természetesen a gázbuborékokat is egyenletesen szét kell oszlatni a reaktorban. Erre azért van feltétlenül szükség, hogy a különböző anyagátadási folyamatok mindenütt egyforma sebességgel folyjanak, és a biológiai történések sebességeit a lehető legkisebb mértékben korlátozzák.

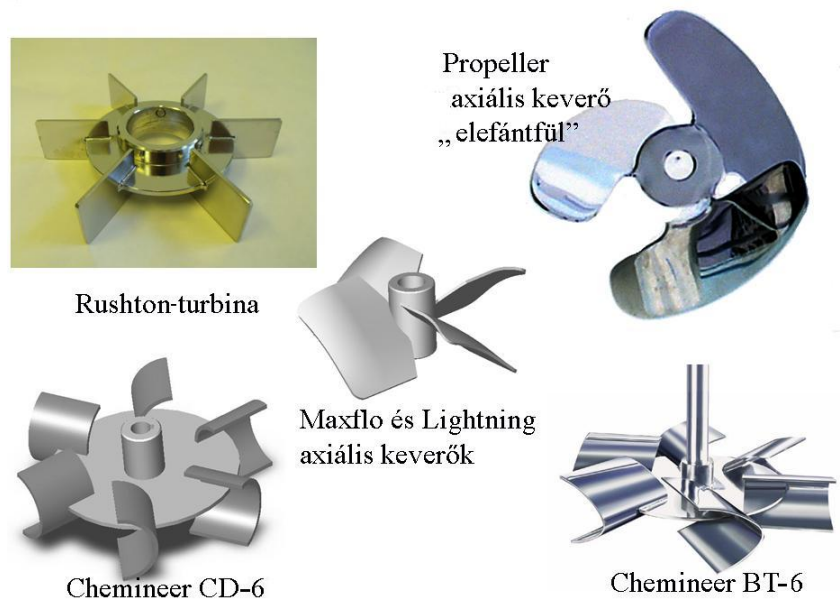
A laboratóriumi és üzemi léptékű klasszikus kevert-levegőztetett reaktorok, fermentorok esetén leggyakrabban használt keverőtípus az egyenes lapátú nyitott turbinakeverő (a szakirodalomban leggyakoribb elnevezése: flat blade turbinakeverő, vagy Rushton-turbinakeverő), ezért e fejezet további részében legfőképpen erről lesz szó. Rajta kívül kevésbé elterjedt keverőtípusokat is láthatunk még az 4.83. ábrán, a reaktorokkal foglalkozó 4.6. fejezet pedig néhány speciális megoldást is bemutat.

Az 4.84. ábrán a Rushton-turbinára, illetve a kevert-levegőztetett bioreaktorokra leginkább jellemző geometriai viszonyokat láthatjuk kisméretű laboratóriumi fermentorokra vonatkozóan.

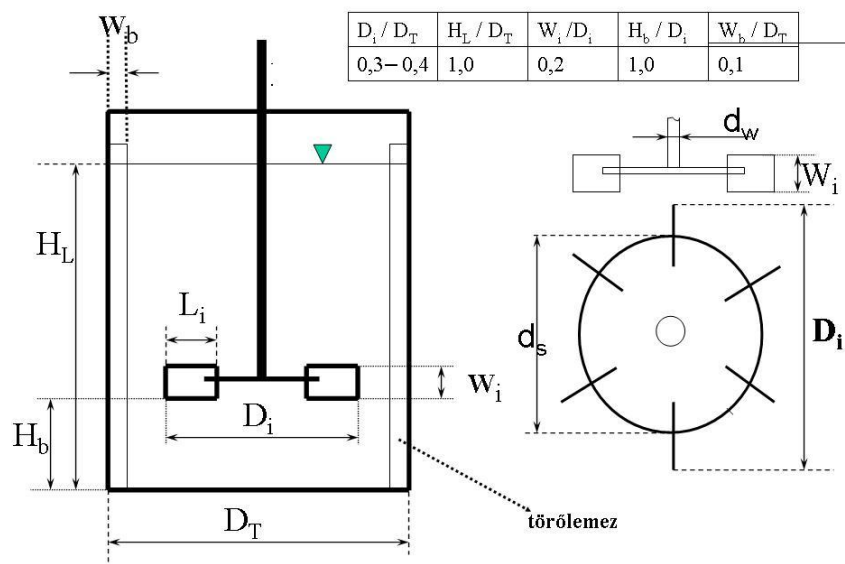
Megjegyezzük, hogy a 10 literes léptéktől az ipari, néhány 100 m^3 -es léptékig a táblázat fő arányai helyesek, kivéve a H_L/D_T arányt, amely általában 2-3:1 értékűvé válik ezeknél a méreteknél. Ennek megfelelően a $H_L/D_T > 1$ esetében a keverő tengelyre több keverőelemet szerelnek, az alábbi tapasztalati szabályokat figyelembe véve (4.85. ábra):

$$\text{keverőelemek közötti távolság: } D_i < H_i < 2D_i \quad (4.308)$$

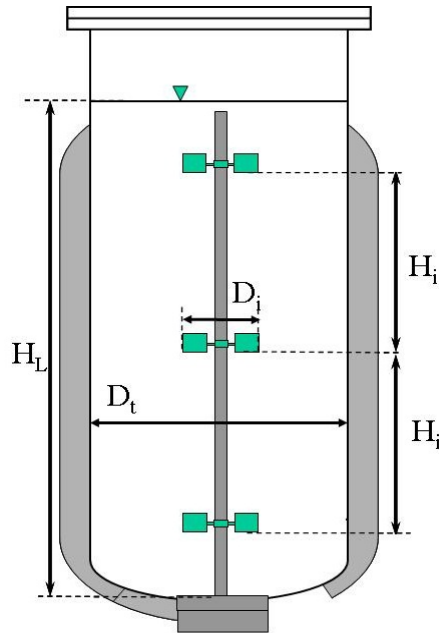
$$\text{keverőelemek száma: } \frac{H_L}{D_i} - 1 > n > \frac{H_L}{D_i} - 2 \quad (4.309)$$



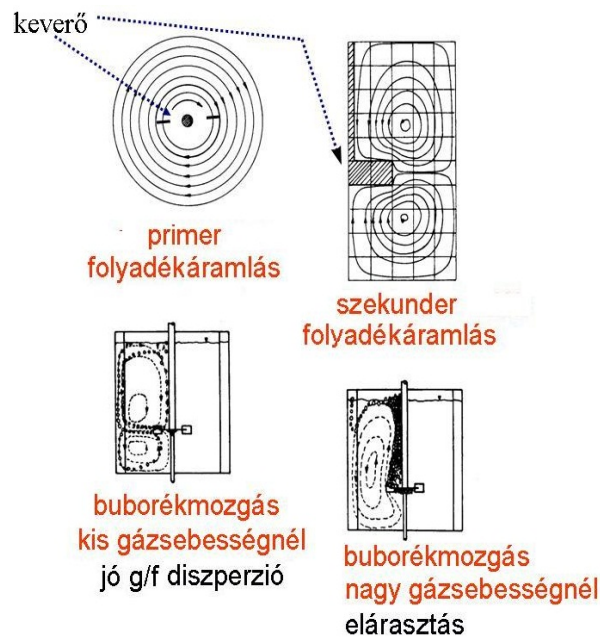
4.83. ábra: Keverőtípusok



4.84. ábra: Standard fermentor geometriai arányai



4.85. ábra: Több keverő elemmel ellátott bioreaktor



4.86. ábra: Primer és szekunder folyadékáramlás és buborékmozgás kevert bioreaktorban

A buborékok képződéséért kisebb légssebességeknél a keverőelem mögötti csökkent nyomású térben kialakuló csavarörvények, ill. nagyobb légssebességeknél a keletkező örvénylapok felelősek (lásd a 4.13. animációt). A keletkezett buborékoknak a fermentorban történő egyenletes eloszlását (valamint az általános keverési funkciót betöltését) a kialakuló primer és szekunder áramlások biztosítják. Az ábrán jól megfigyelhető a kialakuló áramlási kép, valamint az ennek következtében létrejövő buborékmozgás profilja is (4.86. ábra), valamint az is, hogy egy adott keverő- fordulatszám esetében csak bizonyos szintig emelhető a levegősebesség, ugyanis a nagy légssebességeknél a levegő elárasztja a keverőt, azaz felaprítatlanul és elkeveretlenül halad át a reaktoron.



4.13. animáció: A buborékképződés mechanizmusa

A keverő elsődleges funkciójaként az energiabevitelt, azaz a folyadékmozgás létrehozását említettük. Ennek megfelelően nézzük meg ezt a teljesítményfelvételt kvantitatíve. Ismert, hogy (nem levegőztetett) keverős reaktorban a keverő által felvett teljesítmény a keverő, illetve a készülék kiképzésétől, geometriai viszonyaitól, a kevert folyadék anyagi tulajdonságaitól (ρ) és a hidrodinamikai viszonyoktól függ (lásd a Vegyipari műveletek stúdiumát)

$$P = A D_i^5 N^3 \rho \text{Re}^m \text{Fr}^n \left(\frac{W_i}{D_i} \right)^\alpha \left(\frac{D_T}{D_i} \right)^\beta \left(\frac{H_L}{D_i} \right)^\gamma \dots, \quad (4.310)$$

ahol ρ – a sűrűség,

N – a keverő fordulatszáma.

Ebben az összefüggésben Re a keverési Reynolds-számot jelenti,

$$\text{Re} = \frac{D_i \cdot N D_i \rho}{\mu} = \frac{N D_i^2 \rho}{\mu} \quad \left(\text{vö.: } \text{Re} = \frac{dv\rho}{\mu} \right) \quad (4.311)$$

Fr pedig a keverési Froude-szám, amely az alábbi összefüggéssel számítható ki:

$$\text{Fr} = \frac{(D_i N)^2}{g D_i} = \frac{D_i N^2}{g} \quad \left(\text{vö.: } \text{Fr} = \frac{v^2}{gL} \right) \quad (4.312)$$

Adott, tehát állandó geometriájú bioreaktor esetén a teljesítménykifejezés egyszerűbb lesz:

$$P = A' D_i^5 N^3 \rho \text{Re}^m \text{Fr}^n \quad (4.313)$$

Leggyakrabban a Re és Fr kritériumoktól való függést, illetve egy keverő jellegzetes teljesítményfelvételi tartományát a dimenziómentes (újabb kritérium, amely az anyagátadás leírásában jelentős) ún. teljesítményszámra (vagy Ne =Newton-számra vagy Eu =Euler-számra) adják meg:

$$N_P = \frac{P}{D_i^5 N^3 \rho} = A' \text{Re}^m \text{Fr}^n \quad (4.314)$$

A valóságban a Fr -számtól való függés kiküszöbölhető, ha olyan reaktorokat alkalmazunk, amelyekben áramlástörő lemezek vannak beépítve. Ekkor ugyanis a folyadékfelszínen nem fog kialakulni folyadéktölcsér (hiszen Fr nem más, mint a centrifugális és gravitációs erő hányadosa, ezek egyensúlya teszi lehetővé a folyadékelemek tölcserfelületen történő elhelyezkedését).

A 4.87. ábrán a kevert reaktorokra alkalmazható N_P - Re összefüggéseket mutatjuk be, mind törőelemekkel mind azok nélküli keverésre. Szembetűnő, hogy nagyobb Re -számok tartományában a törőlemezek meglehetősen növeli a keverési energiaszükségletet, mégis a nyugodtabb folyadékfelszín érdekében a fermentorokat rendszerint ellátják ezekkel az elemekkel. (Kivétel a szövettenyésztésre használt keverős reaktor, ahol az amúgy is rendkívül kis megengedhető keverősebesség mellett nem

alakul ki folyadék- tölcser.) Az áramlástörő elemekkel ellátott reaktorra korlátozva tárgyalásunkat, vizsgáljuk meg a 4.87. ábrát. Láthatóan az Re -szám értékétől függően 3 jól elkülöníthető áramlási tartomány ismerhető fel. Ezekre természetesen az N_p - Re összefüggés is más és más:

Lamináris tartomány: $0 < Re \leq 10$.

$$N_p = A' Re^{-1} \quad P = A' N^3 D_i^5 \rho \frac{\mu}{ND_i^2 \rho} = A' \mu N^2 D_i^3 \quad (4.315)$$

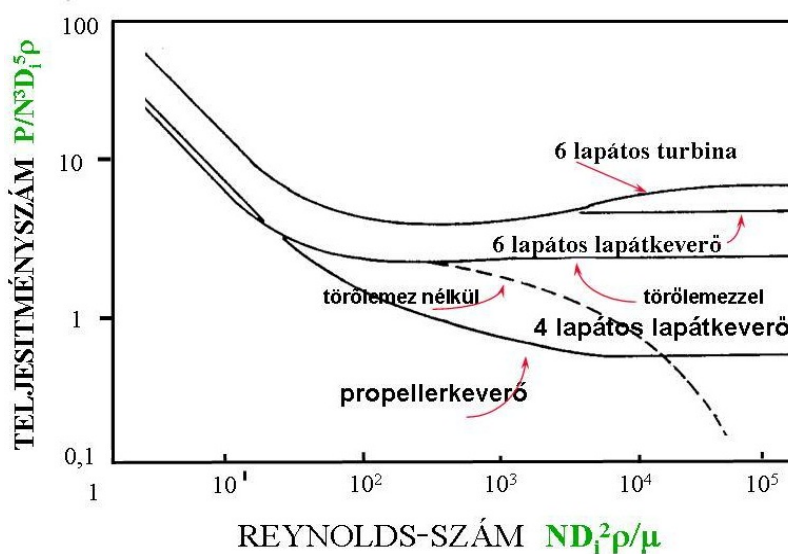
Átmeneti tartomány: $10 < Re < 10^2 - 10^3$:

$$N_p = A Re^{-1} - \text{től} \quad N_p = A Re^0 - \text{ig} \text{ változik.} \quad (4.316)$$

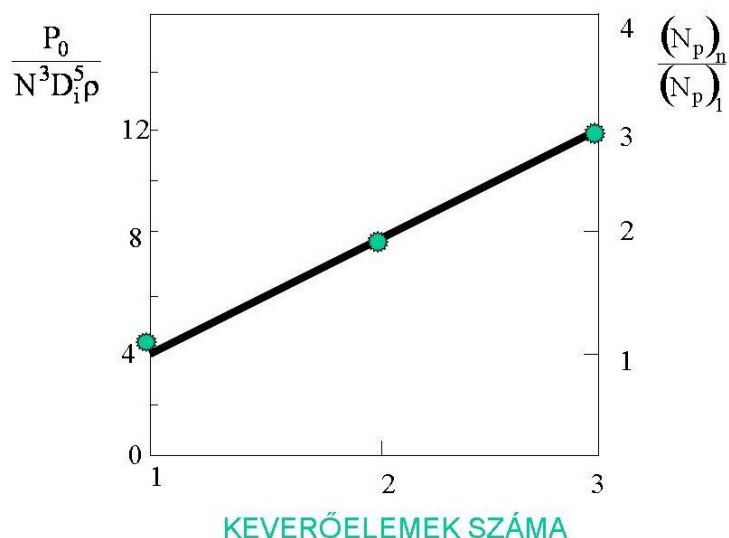
Turbulens zóna: $10^2 - 10^3 \leq Re$.

$$N_p = A', \quad \text{azaz} \quad P = A' D_i^5 N^3 \rho \quad (4.317)$$

A teljesítményfelvétel természetesen megnő, ha a keverőtengelyre több keverőelemet szerelnek egymás fölé. A fentebbiekben megadott szabályok betartása esetén a növekedés lineáris, amint azt egy 4 m³-es fermentorra a 4.88. ábra szemlélteti.



4.87. ábra: N_p - Re összefüggés különböző keverőkre (newtoni folyadékok esetén)



4.88. ábra: A teljesítményszám függése a keverőelemek számától (a tapasztalati elhelyezési szabály betartása esetén)

Természetesen a fermentáció során a keverés nem tiszta folyadékban történik, mivel a bioreaktort levegőztetik is. Az így létrejövő gáz-folyadék diszperzió jelentősen csökkenti a keverő által felvett energiát. A gáz-folyadék diszperzió sűrűsége ugyanis kisebb, mint a tiszta folyadéké, mégpedig annál nagyobb mértékben, minél nagyobb a levegőztetés mértéke.

Utóbbi mérésére bevezették a dimenziómentes **levegőztetési számot** (Na), amelynek függvényében a levegőztetés körülményeinek hatása a keverőtelsítmény felvételére jól tanulmányozható. A levegőztetési szám definíciója az alábbi.

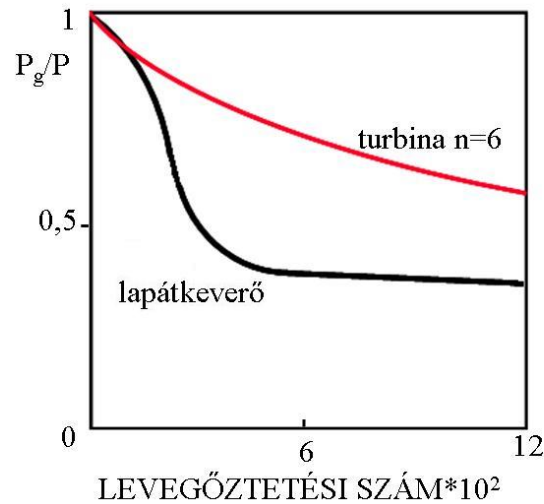
$$Na = \frac{\text{látszólagos felületi (lineáris) légsebesség}}{\text{keverő kerületi sebessége}} = \frac{\frac{F \text{ m}^3 / \text{s}}{D_i^2 \pi \text{ m}^2}}{ND_i \pi \text{ m} / \text{s}} = \frac{F}{ND_i^3} \quad (4.318)$$

Ebben a kifejezésben a keverő által súrolt felület szerepel a számlálóban, a 4 elhagyása is tudatos, ui. lényegtelen dimenzionális szempontból.

Jegyezzük meg, hogy a lineáris légsebességet nem a teljes fermentor keresztmetszetére, hanem a keverő által súrolt felületre számítjuk. Azt találták, hogy a

$$\frac{P_g}{P} = f(Na), \quad (4.319)$$

vagyis a levegőztetett, ill. nem levegőztetett esetben szükséges keverési energia aránya a levegőztetési szám függvénye. A függvény lefutása függ a keverő kialakításától, ezért a 4.89. ábrán keverőtípustól függő görbéket láthatunk. Valamennyi görbe közel azonos határértékhez tart az Na növekedése esetén, ez a határérték 0,3–0,4 értéknél van. Itt tulajdonképpen a következő tranziensről van szó: kis légsebességeknél jó g/f diszperzió jön létre, más szóval a keverő képes a bevezetett levegőt felaprózni (az a anyagátadási felületet növelni), míg nagy légsebességek esetén az úgynevezett elárasztási (flooding) jelenség lép fel, azaz olyan, mintha a keverő levegőben forogna, nem alakul ki jó g/f diszperzió, a gáz felaprítás és elkeverés nélkül áramlik át a rendszeren (lásd a 4.86. ábrát is).



4.89. ábra: P_g/P függése a levegőztetési számtól

Az ábra görbéiből láthatóan éppen a leginkább használatos nyitott turbínakeverők esetén legkedvezőbb a kép, itt növelhető leginkább a levegősebesség anélkül, hogy elárasztást észlelnénk. Jegyezzük meg, hogy a 4.89. ábra szerinti görbék egy adott keverő-fordulatszámhoz tartoznak. Minden fordulatszámhoz más-más lefutási görbe tartozik, azaz minden fordulatszámnál különbözik az a levegőztetési tartomány, amelyen belül működtethető a reaktor anélkül, hogy elárasztás lépne fel. A kevert/levegőztetett reaktorban történő buborékképzést és elosztatást követhetjük a 4.4. videón. Adott levegőztetési sebesség mellett, alacsony fordulatszám az elárasztást mutatja: a buborékok aprítatlanul és elkeveretlenül haladnak át a reaktoron. Amint nő a fordulatszám, a buborékképzés megindul, a buborékok követik a kialakuló áramvonalakat. Nagy fordulatszámon olyan kicsik a buborékok, hogy a lé optikai megjelenése is megváltozik, azaz a mindenütt jelen lévő kicsiny buborékok fénytörése a fermentleveket opállossá teszik. Ez felel meg a jó gáz/folyadék diszperzióknak.



4.4. videó: Buborékképzés és elosztatás kevert levegőztetett reaktorban

Miután a keverés szerepével, teljesítményigényével és annak a levegőztetés hatására bekövetkező változásával megismerkedtünk, célszerű megnézni most már, hogy egy kevert-levegőztetett reaktorban hogyan lehet megbecsülni az oxigénabszorpciós koefficiens, a $K_L a$ -t, illetve megvizsgálni, hogy a $K_L a$ mitől és hogyan függ.

Keverős reaktorok eredő térfogati oxigénabszorpciós koefficiensének ($K_L a$) becslésére a szakirodalom egy sor összefüggést ad meg, nehéz azonban olyan, általánosan használható kifejezés megadása, amelynek használata helyettesíthetné az adott bioreaktor oxigénabszorpciós viszonyainak kísérletes tanulmányozását (lásd 4.8.3.2. fejezet).

Vízhez közeli anyagi tulajdonságokkal (ρ , μ , D_{O_2}) jellemezhető fermentlevekre alkalmazhatjuk Calderbank összefüggését az anyagátadási felület, az a becslésére.

$$d_b = 4,15 \frac{\sigma^{0,6}}{\rho^{0,2} \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4}} H^{0,5} + 0,0009 \quad [m] \quad (4.320)$$

ahol σ a fermentlé felületi feszültsége,
 ρ a sűrűsége,
 H_0 a gáz hold up,
 d_b az átlagos buborék átmérő.

Ebből következik $a = \frac{6H_0}{d_b}$ felhasználásával és a 0,0009[m] elhanyagolásával, hogy az anyag-átadási felület egységnyi térfogatban:

$$a = 1,44 \frac{\left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,4} \rho^{0,2}}{\sigma^{0,6}} H^{0,5} \quad [\text{m}^{-1}] \quad (4.321)$$

Azaz keverős reaktorokban az a az egységnyi térfogatba bevitt keverőteljesítménytől függ. Értelmszerű, hogy a gáz hold up annál nagyobb, minél nagyobb a levegőztetési sebesség, így a fenti kifejezés elterjedtebb formája is igaz (feltéve ρ és σ állandóságát, amely adott fermentlénél elfogadható), vagyis hogy

$$a \propto \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,4} v_s^{0,5}, \quad (4.322)$$

ahol v_s az úgynevezett felületi lineáris légsebesség, ami definíció szerint az alábbi:

$$v_s = \frac{F_4}{D_T^2 \pi} \quad [\text{m}^3 / \text{m}^2 \text{s}] \quad (4.323)$$

Ez a felületi lineáris légsebességet a teljes készülék-keresztmetszetre definiálta, szemben a levegőztetési számmal használttal, ahol a keverő által súrolt keresztmetszet szerepel a definícióban.

Ugyanakkor turbulens áramlási viszonyokra (lásd 4.32. táblázatot) találták megfelelőnek a

$$\text{Sh} = 0,13 \text{Sc}^{\frac{1}{3}} \text{Re}^{\frac{3}{4}} \quad (4.324)$$

kifejezést, ahonnan

$$k_L \propto N^{\frac{3}{4}} \quad (4.325)$$

érték adódik, azaz az eredő anyagátadási tényező a keverő fordulatszámának 3/4-ik hatványával arányos. Az eredő oxigénabszorpciós tényezőnek, tehát a és k_L szorzatának az értékére kissé eltérő összefüggést találtak megfelelőnek, amelyben N nem a 3/4-dik, hanem 0,5- ödik hatványon szerepel:

$$K_L a \propto \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,4} v_s^{0,4} N^{0,5} \quad (4.326)$$

Ez az összefüggés laboratóriumi léptékű fermentorokra érvényes. Általánosan inkább a

$$K_L a \propto \left(\frac{P_g}{V}\right)^{\alpha} v_s^{\beta} N^{0,5} \quad (4.327)$$

alakban írható, amely kifejezésben α és β mérettől függő állandók, előbbi 0,3 és 0,95 között, utóbbi pedig 0,5–0,67 között található a különböző kutatók által a különböző kevert bioreaktorokra kapott összefüggésekben⁸³.

4.5.6. K_{La} függése a környezeti paramétereiktől

Az előző alejezetekben megismertük azokat az alapvető összefüggéseket, amelyek az oxigén-abszorpciós koefficiensnek a különböző levegőztetési paramétereiktől (buboréknagyság, keverőfordulatszám, gázsebesség) való függését írják le. Minthogy a megismert összefüggések tartalmazzák a fermentálé jellemző fizikai állandóit (ρ , μ , σ , D_{O_2}), könnyű belátni, hogy mindazon környezeti paraméterek, amelyek ezeket befolyásolják, a K_{La} értékét is befolyásolni fogják.

A hőmérsékletnek K_{La} -ra gyakorolt hatását az alábbi összefüggéssel lehet leírni:

$$\frac{(K_{La})_{T^\circ}}{(K_{La})_{20^\circ}} = 1,024^{(T-20^\circ)} \quad (4.328)$$

A hőmérséklet növelése tehát *növeli* K_{La} értékét. Emlékeztetünk azonban arra, hogy C^* csökken a hőmérséklet növekedésével, ezért az oxigénátadás sebességi viszonyainak (egy reaktorra jellemző OTR-nek) hőmérséklettől való függését a két ellenkező hatás eredője határozza meg.

A tápoldatokban oldott tápanyagkomponensek megváltoztatják a lé fizikai tulajdonságait, a tápsóoldatokban mért K_{La} értékek általában kisebbek a tiszta vízben mérhetőknél, mégpedig a szokásos tápoldatok esetén

$$\frac{(K_{La})_{\text{tápoldat}}}{(K_{La})_{\text{víz}}} = \alpha_k \quad (4.329)$$

szerint, ahol α_k általában 0,8–0,85 tartományban mozog.

Az oldott sók hatása az ionerősség ismeretében pontosabban becsülhető, mivel érvényes az alábbi empirikus összefüggés:

$$\frac{(K_{La})_{\text{tápoldat}}}{(K_{La})_{\text{víz}}} = \alpha = 1 - 3,78 \cdot I \quad (4.330)$$

ahol I az ionerősség.

Összefoglalóan tehát várható, hogy egy tápoldatban a tiszta vízhez képest jelentősen kisebb az oxigén-abszorpciós koefficiens, ez akár 50–60 százalékra esést is jelenthet.

A fermentációk során a káros habzás elkerülésére gyakran alkalmaznak kémiai habzásgátló szereket. Ezek a felületaktív anyagok irányítottan helyezkednek el a gáz/folyadék határfelületen, csökkentik a felületi feszültséget, és így csökkentik a buborékok átmérőjét (lásd a (4.321) összefüggést), ezáltal növelik az anyagátadási felület, a nagyságát. Emiatt K_{La} értékére növelő hatásuk van. Ugyanakkor azonban, mivel a határfelületen irányítottan elhelyezkedő „mervé” stagnáló felületaktív anyagfilm jön létre, amely egyrészt a folyadékelemek mozgását gátolja, másrészt növeli a buborék folyadékoldali ellenállását (ez a kettő akár ugyanazt is jelentheti), mintegy megnövelve a stagnáló folyadékfilm vastagságát, ezért K_{La} értéke csökkenni fog felületaktív anyagok jelenlétében.

Végredményben a két ellentétes hatás eredője határozza meg, hogy egy adott felületaktív anyag jelenlétében csökken-e vagy növekszik K_{La} értéke.

⁸³ A (4.326) és (4.327) egyenletekben P_g/V egysége LE/m^3 , V_s pedig m/h dimenzióban használatos.

A fermentlé viszkozitásának szintén igen jelentős hatása van az oxigénabszorpciós viszonyokra. Ez a hatás olyan kifejezett és annyira komplex, hogy a következő alfejezetben részletesen foglalkozunk a fermentlevek reológiájának kérdésével.

4.5.7. Fermentlevek reológiai viselkedése

Ismert, hogy egy fluidum belső súrlódása a következő összefüggés alapján definiálható mennyiség:

$$\tau = -\mu\dot{\gamma}, \quad (4.331)$$

ahol τ a fluidumra ható nyírófeszültség (erő/felület) $\left[\frac{\text{kg} \cdot \text{m}}{\text{s}^2} \right] \left[\frac{1}{\text{m}^2} \right] = \left[\frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}^2} \right]$

$\dot{\gamma}$ a nyírósebesség, ami nem más, mint a fluidum erőhatásra merőlegesen mért sebességgradiense $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}} \cdot \frac{1}{\text{m}} = \text{s}^{-1} \right]$, és

μ a fluidum dinamikai viszkozitása $[\text{kg}/\text{m} \cdot \text{s} = \text{Pa} \cdot \text{s} = 10\text{P} = 1000 \text{ cP}]$.

A két következő táblázatban, azért, hogy némileg közelebb kerüljön hozzánk a nyírósebesség fogalma, illetve a viszkozitások tényleges nagysága, néhány, a mindennapi életben előforduló nyírósebességet és néhány köznapit anyag viszkozitását mutatjuk meg.

4.34. táblázat: Mindennapi életben előforduló nyírósebességek

keverők vágás késsel forgó, kent alkatrészek	100–10 000 s ⁻¹ ≈5·10 ⁶ s ⁻¹ 10 ⁷ –10 ⁸ s ⁻¹
--	--

4.35. táblázat: Néhány newtoni fluidum viszkozitása 20 °C-on

víz	10 ⁻³ Pa·s
tej	1,4·10 ⁻³ Pa·s
20%-os cukoroldat	2,0·10 ⁻³ Pa·s
glicerin	10 ⁻¹ ·Pa·s

Newtoni fluidumok esetén μ dinamikai viszkozitás állandó érték, tehát a 4.90. ábra szerinti 1. *folyásgörbe* egyenes. A nem newtoni fluidumokra az jellemző, hogy a

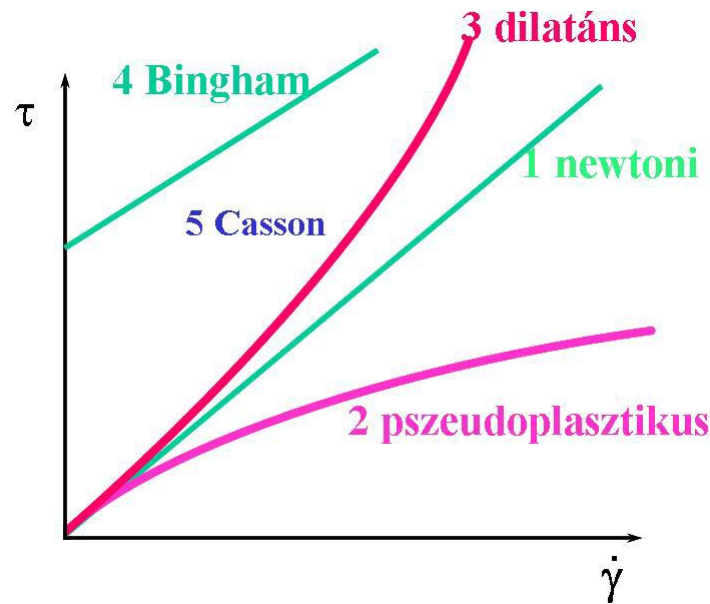
$$\tau = f(\dot{\gamma}) \quad (4.332)$$

folyásgörbéik a newtoni folyadékokétól eltérőek. A leggyakrabban előforduló nem newtoni reológiai karaktereket a következőkben foglalhatjuk össze (4.90. ábra).

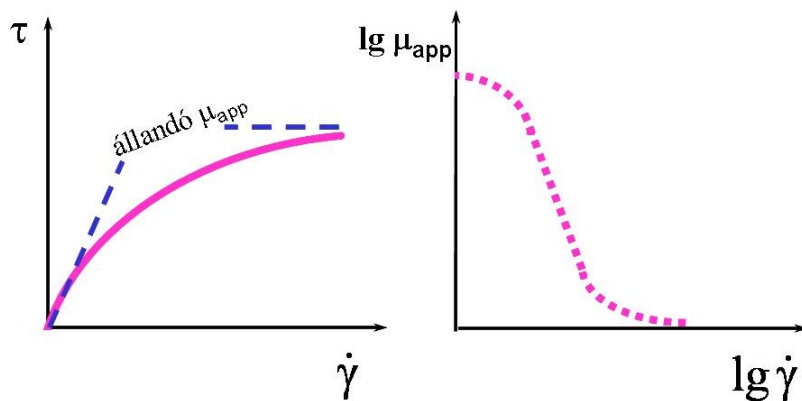
Pszudoplasztikus fluidum-pszudoplaszticitás esetén (4.90. ábra 2. görbe) a folyásgörbe lehajló, csak nagyon kis és nagyon nagy nyírósebességek esetén jellemezhető állandó viszkozitással. Tulajdonképpen csak *látszólagos viszkozitásról* van értelme ilyen fluidumoknál beszélnünk, mivel a viszkozitás függ a nyírósebességtől (4.91 ábra):

$$\tau = -\mu_{\text{app}}\dot{\gamma}, \quad (4.333)$$

ahol μ_{app} a látszólagos viszkozitás (Pa·s, cP).



4.90. ábra: Folyásgörbék



4.91. ábra: Pseudoplasztikus fluidum folyásgörbéje, és a látszólagos viszkozitás függése a nyírósebességtől

A pseudoplasztikus reológiai karakter $\tau = f(\dot{\gamma})$ függvényét többféleképpen lehet matematikailag modellezni. Legelterjedtebb megközelítés az ún. hatványtörvény, amely szerint:

$$\tau = -K\dot{\gamma}^n, \quad (4.334)$$

ahol K az ún. konzisztenciaindex és

n az ún. hatványtörvényindex, amely pseudoplasztikus anyagokra $n < 1$ értékű.

Ugyancsak a hatványtörvénnyel írható le a **dilatáns reológiai karakter**, amelyet a 4.90. összefoglaló ábra 3. görbéje szemléltet, ekkor n értéke 1-nél nagyobb.

Fermentlevek esetében is gyakran tapasztalható, hogy a fluidum csak egy bizonyos nyírófeszítés esetén kezd el folyadékként viselkedni, további nyírásakor azonban már newtoni folyadék módjára vagy pseudoplasztikusként viselkedik. Az ilyen reológiai karaktert **BINGHAM-plasztikus** viselkedésnek nevezzük [Bingham-test], az utóbbi esetben a fluidum **Casson-reológiát** követ. (4.90. ábra 4. és 5. görbék). Ekkor a (4.334) általánosabb alakja érvényes:

$$\tau = \tau_y - K\dot{\gamma}^n, \quad (4.335)$$

amelyben τ_y a határnyíró-feszültség és
K pedig az ún. plasztikus viszkozitás vagy rigiditás.

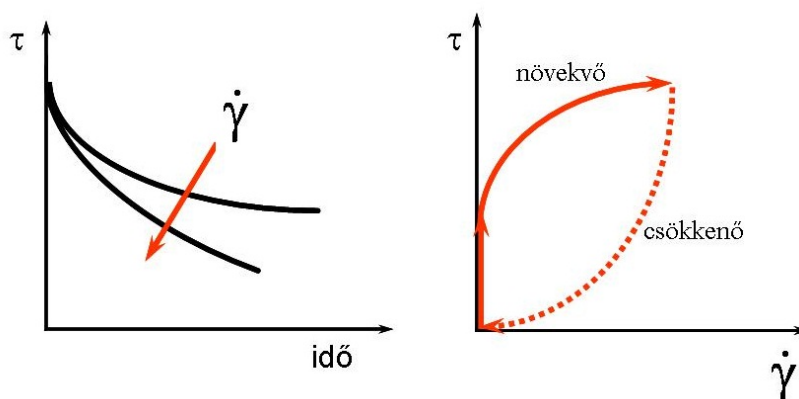
Végeredményben mind a newtoni, mind a nem newtoni reológiai karakterek jellemezhetőek a hatványtörvény általános alakjával (4.36. táblázat).

4.36. táblázat: A hatványtörvény paramétereit különböző reológiai viselkedésű fluidumokra

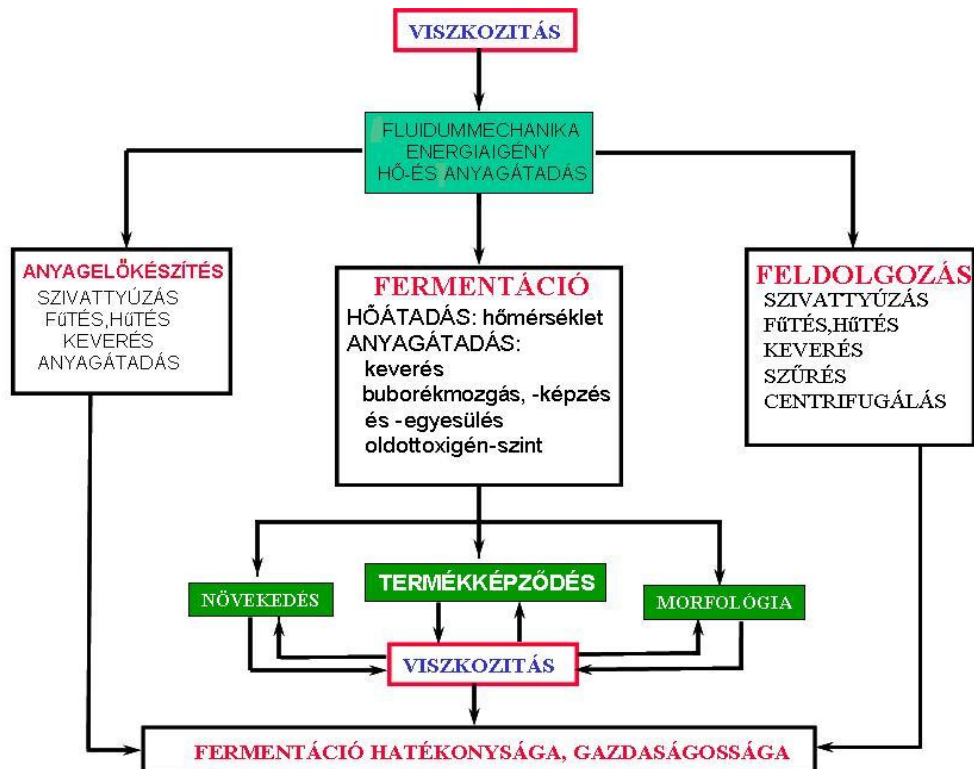
	τ_y	K	n
Newtoni	0	μ	1
Pszeudoplasztikus	0	konzisztenciaindex	<1
Dilatáns	0	konzisztenciaindex	>1
Bingham	$0 < \tau_y < \tau$	plasztikus viszkozitás	1
Casson	$0 < \tau_y < \tau$	plasztikus viszkozitás	<1

Sok esetben előfordul időfüggő viszkozitás is fermentlevek esetében, ekkor a nyírás időtartama befolyásolja a látszólagos viszkozitás értékét. Ha adott időpontban az ilyen fluidum **dilatáns** viselkedésű, akkor *reopektikus*, ha **pszeudoplasztikus**, akkor *tixotrópos* reológiai karakterrel van dolgunk.

Időfüggő viszkozitás esetén találkozhatunk a hiszterézis jelenségével is, amikor más folyásgörbe jellemzi a fluidumot növekvő és más csökkenő nyírósebességek esetén (4.92. ábra).



4.92. ábra: Időfüggő viszkozitás és hiszterézis



4.93. ábra: A reológiai viselkedés jelentősége a fermentációs műveletekben

A fermentlevek reológiai viselkedésének komplex hatása van a fermentációra, illetve valamennyi fermentációs műveletre komplex hatása van a viszkozitásnak, a sterilizéstől kezdve a termékfeldolgozás műveletéig. E kérdéskörrel áttekintő képet nyújt a 4.93. ábra, amelyen feltüntettük azokat a fizikai és biológiai történéseket, illetve műveleteket, amelyeket közvetlenül vagy áttételesen befolyásolnak a reológiai viszonyok, illetve amelyek visszahatnak a reológiai viselkedésre.

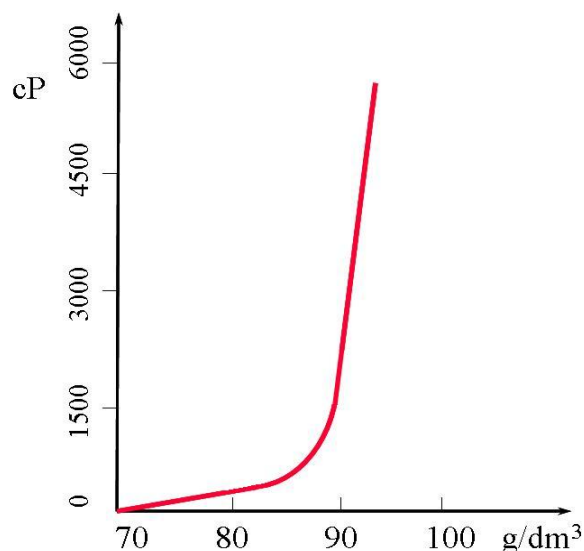
A fermentlevek nagy viszkozitásának és extrém reológiai viselkedésének több oka lehet. Legkevésbé gyakori a szubsztrát okozta viszkozitásnövekedés, ennek csak akkor van jelentősége, ha a szubsztrát történetesen valamilyen oldott polimer (keményítő).

A mikrobakoncentráció növekedése a fermentáció során növeli a fermentlé viszkozitását. Egysejtű mikroorganizmusok fermentlevei általában newtoni karaktert mutatnak még viszonylag nagy sejtkoncentráció mellett is. Baktériumok és élesztők szuszpenzióira alkalmazható a módosított Einstein-egyenlet:

$$\frac{\mu_{\text{fermentlé}}}{\mu_{\text{táptalaj}}} = 1 + \frac{5}{2} \Phi + b\Phi^2 \quad (4.336)$$

ahol b empirikus állandó (6–8 közötti) és
 Φ a szuszpendált sejtek térfogata/össztérfogat.

Pékélesztőre vonatkozó viszkozitás-sejtkoncentráció görbét mutat be a 4.94. ábra, amelyen látható, hogy még igen nagy, 80 g/dm^3 sejtkoncentrációk esetén is csekély a viszkozitásnövekedés. Ugyanakkor 100 g/dm^3 felett a newtoni karakter pszeudoplasztikussá alakul.



4.94. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* sejtuszpenzió viszkozitása

Gyakran a fermentlé nagy viszkozitását, illetve nem newtoni viselkedését a fermentáció során képződő extracelluláris termékek, pl. bizonyos poliszacharidok, mint a dextrán, leván, xantán okozzák. Utóbbi fermentáció esetén a fermentlé 2% termékconcentrációnál igen viszkózus és Bingham-plasztikus viselkedésű. Felfordított edényből nem folyik ki, mert a gravitáció okozta nyírófeszültség nem elegendő a folyáshoz, azaz szilárd testként viselkedik. De ha keveréssel nyírjuk, azonnak folyni kezd, amint azt a 4.5. videó mutatja.

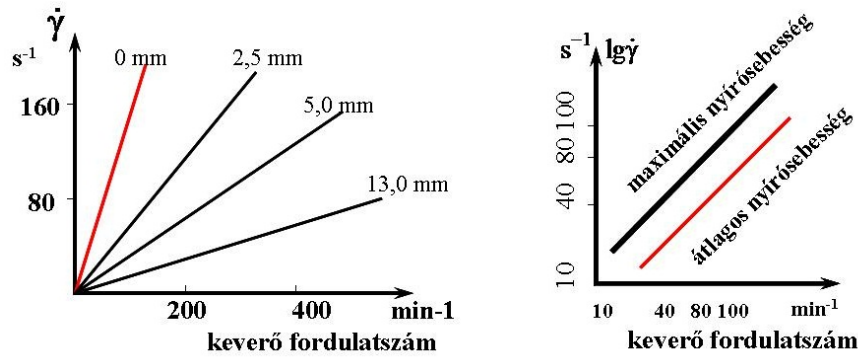


4.5. videó: Bingham-plasztikus viselkedés

Bizonyos mikrobák a fermentáció során nemkívánatos felületi poliszacharidokat, nyálkaszerű anyagokat választanak ki, amelyek viszkozitásnövelő hatásuk révén rontják a sejtfeldolgozás műveleti hatékonyságát. Megfigyelték, hogy például a tápoldat megfelelő megválasztásával (N-forrás) ez a nyálkaképződés eliminálható.

A fonalas baktériumok és fonalas gombák fermentációjakor a leggyakrabban pseudoplasztikus, esetenként Bingham-plasztikus viselkedés figyelhető meg.

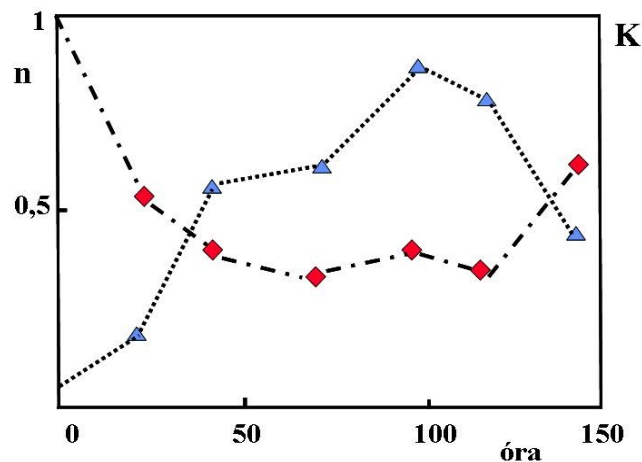
Ennek oka az, hogy a növekvő micéliumok mintegy határozott fonalszerkezetet alakítanak ki a fermentlében. Minthogy a gyógyszeripari, főleg antibiotikum-fermentációk nagy többsége ilyen fonalas mikroorganizmusok (gombák vagy *Actinomiceták*) tenyésztésén alapszik, érthető, hogy a reológiai kérdést főleg az antibiotikum- és enzimfermentációkkal kapcsolatban tanulmányozták a legbővebben. Képzeljünk el egy pseudoplasztikus viselkedésű micéliumos fermentációt, amelyet keverős gyógyszeripari reaktorban hajtanak végre. A keverőelemek sebessége és a keverőelemektől való távolság függvényében (4.95 ábra) pontról pontra változik a fermentlére ható nyírósebesség a reaktorban, tehát pontról pontra változik a látszólagos viszkozitás értéke is. Ennek megfelelően az átkeveredés, az oxigénellátottság, a hőátadás is függvénye lesz a keverőtől mért távolságnak.



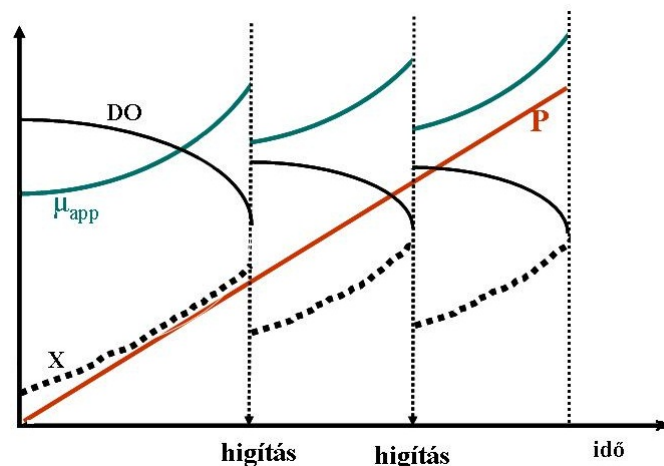
4.95. ábra: Nyírósebesség a keverő-fordulatszám és a keverőtől való távolság függvényében, átlagos nyírósebesség

Az átlagos nyírósebesség kb. a fele lesz a maximálisnak az egész fermentorra vonatkoztatva, amiből következik, hogy a keverőtől távol nagyon könnyen alakulhatnak ki olyan *holt terek*, amelyekben semmiféle hő- és anyagátadási folyamat nem megy végbe. Az ilyen holt terekben vagy csak csekély mértékben átkevert területeken a hőmérséklet megemelkedik, az oxigénellátottság romlik, az anyagcseretermék CO_2 nem távozik el a fermentléből, a pH-szabályozó ingrediens adagolása lokálisan drasztikus pH-változásokhoz vezethet.

Nagyon gyakran micéliális fermentáció során az időben is változik a reológiai viselkedés. A 4.96. ábrán egy *Endomyces sp.* glükóamiláz fermentációjának reológiai képe látható. Figyeljük meg, hogy a kezdetben newtoni táptalajon a növekedés során a fermentlé pszeudoplasztikussá válik, n értéke egyre kisebb, miközben a konzisztenciaindex nő, majd a fermentáció vége felé ismét megközelíti a newtoni viselkedést, és látszólagos viszkozitása csökken.



4.96. ábra: *Endomyces sp.* glükóamiláz fermentációjának reológiai képe. A reológiai karakter változása a fermentáció során



4.97. ábra: A fermentlé vízzel való hígítása javíthat a termelésen

A nem newtoni fermentlevek látszólagos viszkozitásának az oxigénabszorpciós koefficiensre gyakorolt hatását gyakran a (4.327) összefüggés módosításával adják meg:

$$K_L a = k \left(\frac{P_{fg}}{V} \right)^\alpha v_s^\beta N^{0,5} \mu_{app}^\gamma, \quad (4.337)$$

amelyben γ értéke méretfüggő és $-0,7$ és $1,0$ között mozog. Végül megemlítjük, hogy gyógyszeripari fermentációk során sokszor úgy küzdik le a viszkozitásnövekedés okozta oldottoxigén-szint romlását, hogy a tenyészetet steril vízzel hígítják. 10%-os térfogathígítás akár az oldottoxigén-szint 20–50%-os növekedését és ezzel további termékképzést tesz lehetővé. Egy ilyen antibiotikum-fermentáció kvalitatív képét mutatja a 4.97. ábra.

A levegőztetéssel és keveréssel kapcsolatban megszerzett tudásunkat ellenőrizzük a 4.14. animáció és a 4.15. animáció feladatainak megoldásával.



4.14. animáció: Öellenőrzés: levegőztetés, oxigén



4.15. animáció: Öellenőrzés: levegőztetés

4.5.8. A nyírás hatása a tenyészetre

Láttuk, hogy fonalas baktériumok és gombák micéliumos növekedésekor a fermentlének bizonyos szerkezete alakul ki, amely nem newtoni viselkedésűvé változtathatja a fermentlevet. E nem newtoni viselkedéssel megnövekedett gondot jelent a jó keveredési viszonyok, anyag- és hőátadási körü-

mények biztosítása. Felmerül a kérdés, miért nem növelhető akkor minden határon túl a keverő fordulatszáma és így a nyírás (vagyis csökkenthető a látszólagos viszkozitás). Ennek két oka van: az első gazdasági, hiszen bár a teljesítménybevitel fokozása ténylegesen javítja az anyag- és hőátadási viszonyokat, azonban megnövekednek az energiaköltségek. A másik ok a sejtek fizikai károsodása, amelyet a megnövekedett nyírás okoz, pl. a fonalak feltöredezésén keresztül. Ez egyszersmind további létulajdonság-romláshoz vezet, hiszen a sejtöredékekből egy sor, például a feldolgozási műveleteket nehezítő anyag kerülhet a fermentlébe.

Sok fonalas gomba nemcsak micéliumos, hanem ún. göbös (pelletes) formában is képes növekedni (lásd a 4.4.3.3. alfejezetet). E göbök bizonyos tenyésztési körülmények hatására létrejövő, micéliumokból felépült gömbhéjszerkezetet jelentenek, amelyeknek mérete néhány tizedtől 5–10 mm-ig változhat. Az ilyen pelleteteket tartalmazó fermentlevek (ugyanolyan sejt koncentrációnál) newtoni viselkedésűek, és sokkal kisebb viszkozitásúak, mint fonalas növekedés esetén. Gyakran a göbös növekedés kedvezőtlen a fermentációra, de pl. az oldott oxigén-szintre érzékeny citromsav-fermentáció (*A. niger*) során sokkal kedvezőbb a göbös, mint a fonalas morfológia. Az ilyen göbös morfológiájú mikroorganizmusok igen érzékenyek a keverő okozta nyírásra. Úgy találták, hogy a nyírás két módon is ronszolhatja a göböket. Egyrészt a pelletátmérő csökkentésén keresztül hatva a göbök felületéről micéliumrészek, pellikulumok szakadoznak le, másrészt a göbök közvetlen szétesésén keresztül.

A „göbökopási” folyamat a következő kinetikával írható le:

$$\frac{dD_p}{dt} = -k_c (ND_i)^{5,5} D_p^{5,7}, \quad (4.338)$$

ahol D_p a pillanatnyi pelletátmérő.

Tehát a göb felületének nyírás által okozott kopása igen erősen függ a keverő méretétől (D_i) és a fordulatszámától (N), valamint a göbmérettől is.

A göbszétesési folyamat pedig elsőrendű kinetikát követ:

$$\frac{dn}{dt} = -k_r n, \quad (4.339)$$

ahol n a göbkoncentráció (db/térfogat) és k_r arányossági tényező, amely igen erősen függ a keverés körülményeitől, amit a (4.340) egyenlet bizonyít:

$$n = n_0 \exp\left(-\alpha \left[D_p^{3,2} N^{6,65} D_i^{8,75} \right] t\right) \quad (4.340)$$

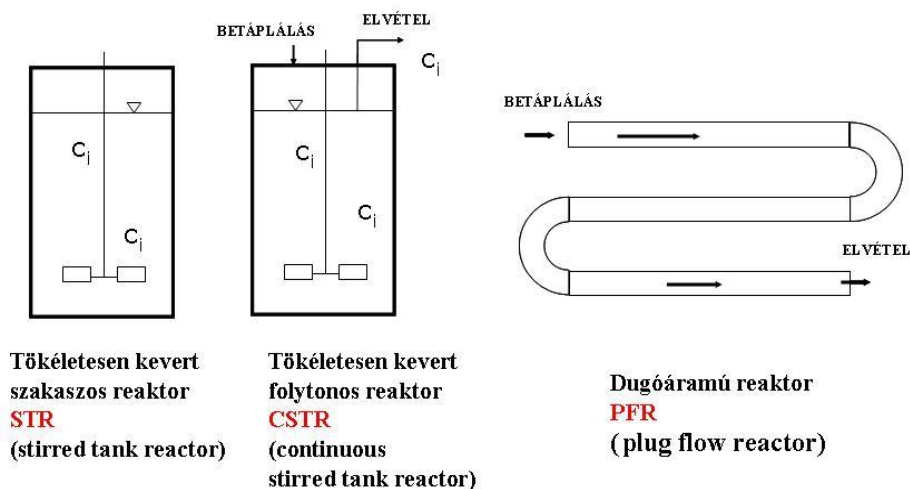
Itt említjük meg, hogy szuszpenziós növényi és különösen állati szövettenyészetek rendkívül érzékenyek a nyírásra. Utóbbiak esetében a szokványos kevert/levegőztetett és csak levegőztetett bioreaktorok emiatt nem is mindig alkalmazhatóak, a keverést, de még a levegőbevezetést is, az eddigiekben tárgyaltaktól sokszor eltérően valósítják meg.

4.6. Bioreaktorok

4.6.1. Néhány fontosabb reaktorteknikai alapfogalom

Az ideális bioreaktoroknak alaptípusai a működtetés szempontjából kétféleképpen lehetnek, szakaszos és folytonos működtetésű reaktorok. Utóbbiak dugóáramú vagy tökéletesen kevert reaktorok lehetnek a bennük áramló fluidum keveredési viszonyai alapján.

Tökéletesen kevert reaktorokban bármely folyadékkelem a reaktor valamennyi pontján azonos (sem anyag-, sem hőgradiens sehol sem észlelhető a reaktorban), dugóáramú reaktorban pedig a folyadékkelemek a szomszédos elemekkel anyag- és hőcserélődéstől mentesen haladnak végig a reaktor hosszán. A dugóáram úgy is elképzelhető, mint egy-egy elemi szakaszos reaktor végighaladása a reaktor hossza mentén. Ezen alaptípusokat a 4.98. ábra mutatja be.



4.98. ábra: Ideális reaktorok típusai

A fenti reaktortípusoktól a valóságban igen sok eltérés lehet, aminek oka lehet például a fluidum-elemek csatornáknak történő áramlása, a visszakeveredés a fluidumelemek között, stagnáló (nem kevert) régiók megléte a reaktorban, stb.

Reaktorok igen fontos jellemzői a tartózkodási idő, illetve a tartózkodásiidő-eloszlások (folytonos reaktorokban). Evvel a kérdéssel a kemosztát folytonos fermentációval foglalkozó alfejezetben részletesen foglalkoztunk ([4.4.5.1.1. alfejezet](#)).

Evidens, hogy a reaktorba belépő fluidumelemek különböző utakon haladnak, különböző ideig is tartózkodnak tehát a rendszerben. Lényegében egy belépő fluidumelemnek hármass esélye van:

- vagy azonnal kilép a reaktorból,
- vagy végtelen ideig benne marad,
- vagy valamilyen határozott ideig tartózkodik a reaktorban.

Ezen tartózkodási időket egy eloszlással, a tartózkodásiidő-eloszlással jellemezhetjük⁸⁴. Ez az E függvény, ami a tartózkodásiidő-eloszlás függvény sűrűségfüggvénye (lásd a (4.192) egyenletet). Nyilvánvaló, hogy a hármass esély figyelembevételével

$$\int_0^{\infty} E(t) dt = 1, \quad (4.341)$$

vagyis valamennyi ideig (beleértve a zérust is) minden folyadékkelem tartózkodik a rendszerben, vagy másképpen fogalmazva, végtelen idő alatt valamennyi folyadékkelem elhagyja a rendszert.

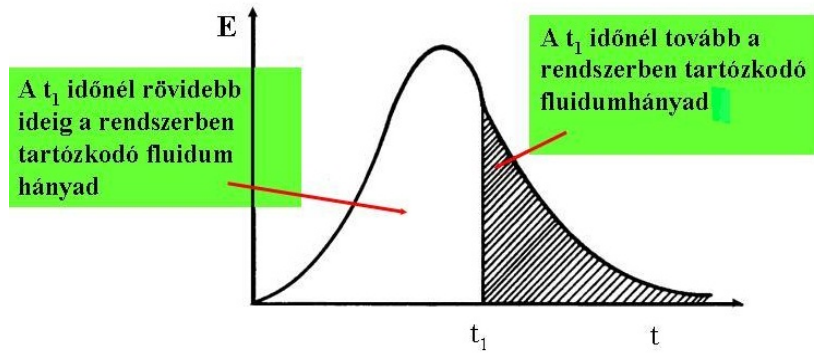
Ha t és $t + dt$ közötti időtartamig a rendszerben tartózkodó folyadékhányad, azaz t és $t + dt$ időtartamba eső „korú” folyadékhányad dF , akkor a t_1 időnél „fiatalabb” folyadékhányad,

$$F_{0,t_1} = \int_0^{t_1} E(t) dt, \quad (4.342)$$

míg végül a t_1 -nél idősebb fluidumhányad (lásd 4.99. ábra)

$$F_{t_1,\infty} = \int_{t_1}^{\infty} E(t) dt. \quad (4.343)$$

⁸⁴ angol nyelvű irodalomban RTD = residence time distribution

4.99. ábra: Az E függvény értelmezéséhez

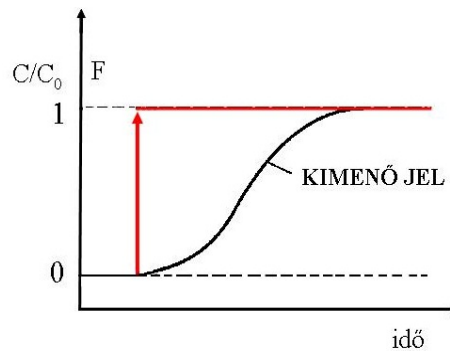
Az E függvény alkalmas a reaktorban történő nem ideális áramlási viszonyok jellemzésére is. Az E függvény (amely a tartózkodásiidő-eloszlás sűrűségfüggvénye), illetve az F függvény (a tartózkodásiidő eloszlásfüggvénye) kísérleti meghatározása egyszerű „tracer” technikával megvalósítható.

E módszernél valamilyen zavarást végzünk a reaktorba bemenő anyagáramban, majd a rendszer válaszát vizsgáljuk e zavarásra.

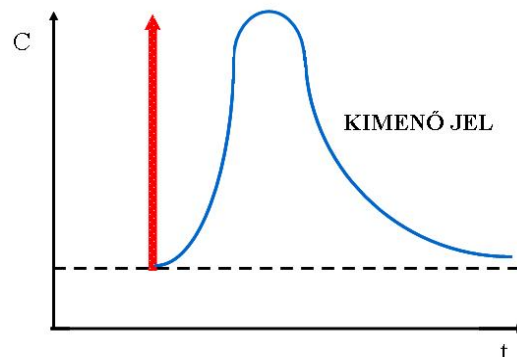
A leginkább használt, legegyszerűbb zavarások: az egységugrás-, illetve az impulzuszavarás (ezeken kívül véletlenszerű és ciklikus zavarásokat is szoktak alkalmazni).

Egységugrás-zavarás esetén valamely „tracer” bemenő koncentrációját pillanatszerűen C -ről C_0 -ra változtatjuk, majd ezen az értéken tartva, a reaktorból kilépő áramban mérjük a C koncentrációt.

C/C_0 -t ábrázolásban a válaszfüggvényt nyerjük, amelyet F görbének nevezünk.

4.100. ábra: Ideális egységugrás, F függvény meghatározása

Dirac-féle δ függvény

4.101. ábra: Ideális impulzuszavarás, C görbe meghatározása

Ideális impulzuszavarás esetén az ún. C görbét nyerjük, ha normalizáljuk a koncentrációértékeket az alábbiak szerint:

$$\int_0^{\infty} C dt = \int_0^{\infty} \frac{C}{Q} dt = 1, \quad \text{ahol} \quad Q = \int_0^{\infty} C dt \quad (4.344)$$

Az ábrázolt C tehát C/Q minden időpontban.

Zárt edényre (ahol a be- és kilépő ponton nincs visszakeveredés (lásd később), az F , C és E görbék között az alábbi összefüggések állnak fenn:

$$C = E, \quad (4.345)$$

vagyis az impuluszavarásra adott normalizált válaszfüggvény éppen megadja a tartózkodásiidő-eloszlás sűrűségfüggvényét. Másrészt a kétféle „tracer” módszer közötti kapcsolat a következő:

$$F = \int_0^t E(t) dt \quad \text{és} \quad \frac{dF}{dt} = E \quad (4.346)$$

A tartózkodásiidő-eloszlás sűrűségfüggvényét tehát megkaphatjuk, ha deriválunk egy kísérletileg meghatározott $F(t)$ függvényt. Más szóval az egységugrás-zavarás válaszfüggvényének deriváltja egy impuluszavarásra kapott válaszfüggvénnyel egyenlő.

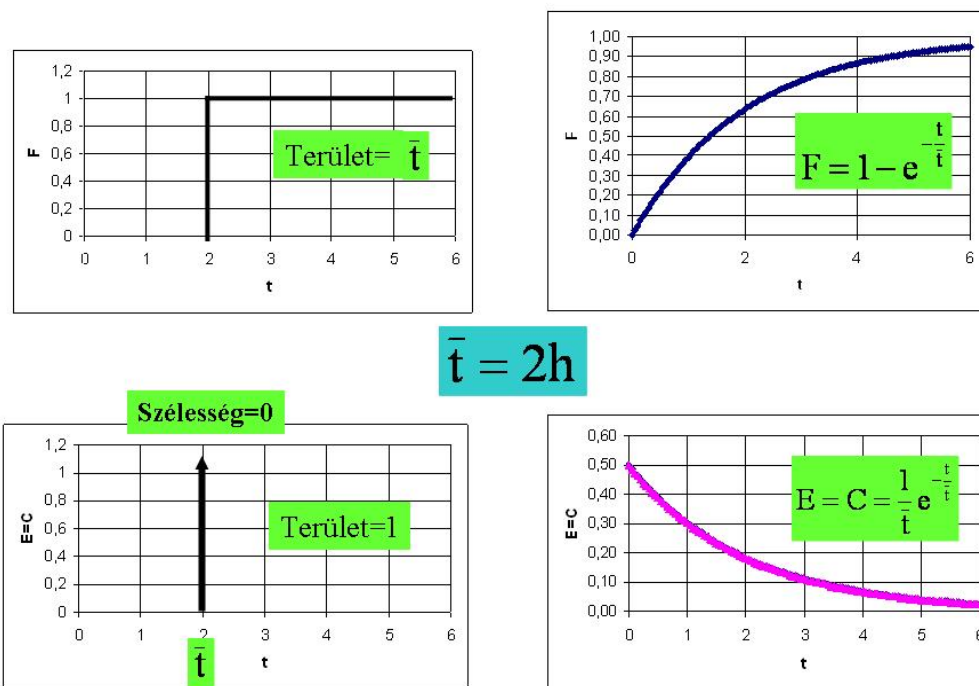
Az átlagos tartózkodási idő definiálásával további relációk fedezhetők fel:

$$\bar{t} = \frac{V}{f} \quad \text{és} \quad \text{kemosztátnál} \quad D = \frac{f}{V} = \frac{1}{\bar{t}}, \quad (4.347)$$

ahol f a térfogatáram a V állandó térfogatú reaktorba és reaktorból. Ekkor levezethető, hogy

$$\bar{t} = \bar{t}_C = \bar{t}_E. \quad (4.348)$$

A reaktorok két szélső ideális esetére, az ún. dugóárammal jellemezhető reaktorra és a tökéletesen kevert reaktorra a 4.102. ábrán látható grafikus képek nyerhetők a fenti függvények ábrázolásával.



4.102. ábra: Ideális reaktorok E és F függvényei

Egy eloszlás várható értékét a középértékfüggvény, vagyis az eloszlásfüggvény első momentuma adja meg, ez az átlagos tartózkodási idő:

$$m_1 = \bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} t C dt}{\int_0^{\infty} C dt} \quad (4.349)$$

Ha kísérletesen határozzuk meg a görbét, rendszerint nem folytonos görbét, hanem diszkrét pontok sorozatát kapjuk, ekkor az átlagos tartózkodási idő a következőképpen számítható:

$$\bar{t} \cong \frac{\sum_{i=0}^n t_i C_i \Delta t_i}{\sum_{i=0}^n C_i \Delta t_i} \quad (4.350)$$

Az eloszlás szórásnégyzete a második momentum segítségével számítható ki, ami diszkrét pontjaival megadott görbe esetén szintén megadható a következőképpen:

$$\sigma^2 = m_2 - m_1^2 = \frac{\int_0^{\infty} t^2 C dt}{\int_0^{\infty} C dt} - \bar{t}^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - \bar{t})^2 C dt}{\int_0^{\infty} C dt} \quad \text{és} \quad \sigma^2 \cong \frac{\sum (t_i)^2 C_i \Delta t_i}{\sum C_i \Delta t_i} - \bar{t}^2 = \frac{\sum (t_i - \bar{t})^2 C_i \Delta t_i}{\sum C_i \Delta t_i} \quad (4.351)$$

4.6.1.1. A tartózkodási idő eloszlásfüggvény alkalmazásai

Az RTD sok hasznos információt nyújt egy folytonos reaktorról, annak áramlási, keveredési viszonyairól. Az E és F függvényeket fel lehet használni az ideális viselkedéstől való eltérés mértékének becslésére (a reaktorviselkedés diagnosztizálására). Tekintsük például az ideális CSTR megismert E és F függvényeit. Az ezeknek az egyenleteknek megfelelő elméleti görbét összehasonlítva az adott rendszerekre kísérletesen kimért E vagy F görbékkel, elképzelést alkothatunk az aktuális rendszer keveredési viszonyairól.

Az ideálistól való eltérések gyakran jól megállapítható okokra vezethetők vissza, csupán a görbék szemrevételezése alapján is. Ehhez tekintsük az alábbi 4.103. ábrát, amelyen feltüntettük az ideális viselkedést és két gyakran előfordulható okot a nemideális viselkedésre.

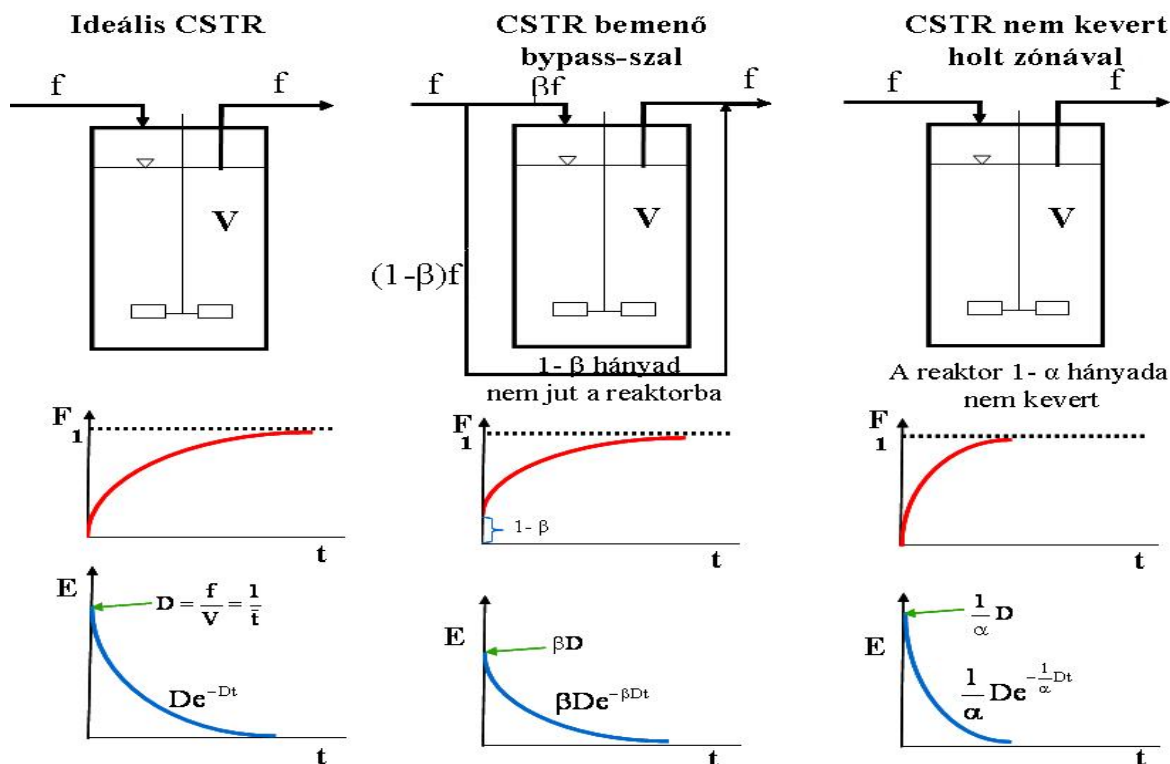
A középső ábrán olyan nem ideális viselkedés látható, amikor a tracer azonnal megjelenik a kimenő áramban, azaz a rendszer úgy viselkedik, mintha a bemenő térfogatáram egy része kikerülne a reaktort. A jobb oldali esetben pedig az ideálisnál gyorsabb a kimenő áram homogénné válása, azaz nem kevert térfogathányad van a reaktorban, mintegy csökkent az effektív reaktortérfogat.

Az ideálistól eltérő keveredési viszonyok természetesen befolyásolják a reaktorban lejátszódó (bio)kémiai, enzimes, „növekedési” reakciók lefutását is.

Magának a „reakciónak” a lefutása egy reaktorban azonban nem csupán a reaktor fentiekben vázolt makrokeveredési viszonyaitól függ.

Az úgynevezett mikrofluidumok esetében, amelyek szabadon keveredő egyedi molekulákból állnak, mind *makro*, mind *mikro* szinten megvalósulhat a tökéletes keveredés CSTR-ben. Vannak azonban ún. makrofluidumok is, amelyekben kis, 10^{12} – 10^{18} molekulát tartalmazó csomagocskák vannak jelen (illetve úgy viselkedik a fluidum, mintha ilyenek lennének), és ezek egymással sohasem keverednek tökéletesen, még kevert reaktorban sem. A két szélső eset elnevezése: maximális vagy

teljes keveredés (complete mixedness), illetve teljes szegregáció (complete segregation). A két szélső eset között a mikrokeveredés igen változatos esetei jelenhetnek meg. Sajnos erről az RTD révén már nem nyerhetünk felvilágosítást.



4.103. ábra: Eltérések az ideális viselkedéstől

Teljes szegregáció esetével állunk szemben pl. a hősterilizálás esetén (részletesen lásd a [4.7. fejezetet](#)), ekkor az egyes sejtek egymástól független csomagocskákat jelentenek, úgy viselkednek, mint sok-sok szakaszos reaktor egy folytonos áramban.

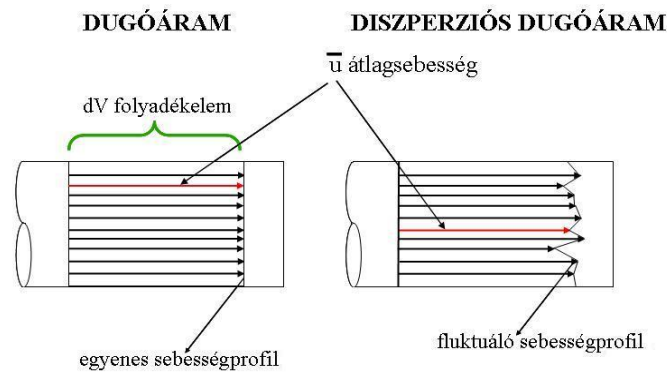
Legyen ilyen komplett szegregáció esetén egy rendszer i -edik komponensének koncentrációja a t időpontban $c_{ib}(t)$ egy adott szakaszos reaktorban⁸⁵, amelynek kiindulási összetétele ugyanaz, mint a vizsgálni kívánt folytonos reaktoré. A folytonos esetben $E(t)dt$ jelenti a kifolyóban megjelenő fluidumelemeknek azt a hányadát, amelynek tartózkodási ideje t volt, így ezekben éppen $C_{ib}(t)$ lesz az i -edik anyag koncentrációja. Mindezen fluidumelemeknek koncentrációit összeadva kapjuk meg a folytonos reaktorból távozó fluidumban az i koncentrációját, azaz

$$C_i = \int_0^{\infty} C_{ib}(t) E(t) dt. \quad (4.352)$$

4.6.1.2. Diszperziós modell

Ideális dugóáram esetén egy fluidumelem nélkül halad végig a csőreaktorban, hogy a szomszédos fluidumelemekkel bármiféle anyagkicserélődési folyamat lezajlana. A valóságban azonban gyakorta a szomszédos fluidumelemek között van valamiféle anyagkicserélődés, az áramlás frontvonala nem egyenes, azaz az egymás mellett mozgó fluidumelemek sebessége különböző, ezt visszakeveredésnek (backmixing) vagy axiális diszperzióknak nevezzük (4.104. ábra).

⁸⁵ A b index a szakaszos kifejezés angol megfelelőjére – batch – utal.



4.104. ábra: Dugóáram és axiális diszperzió

Ebben az esetben a tartózkodási idő eloszlásfüggvénye természetesen már nem írható le egyszerűen az átlagos tartózkodási idő értékkel. Az ilyen nem ideális viselkedés leírására szolgál a diszperziós modell és a sorbakapcsolt tökéletesen kevert reaktorokkal történő modellezés.

Először foglalkozunk a diszperziós modellel. A fluidumelemek hosszirányú (axiális) diszperziójára a Fick-törvény analógiájára írható fel az ún. axiális diszperziós modell:

$$\text{Fick-törvény a molekuláris diffúzióra:} \quad \frac{\partial c}{\partial t} = \Psi \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (4.353)$$

ahol Ψ a diffúziós állandó.

$$\text{Az axiális diszperzióra analóg módon:} \quad \frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad (4.354)$$

ahol D az axiális diszperziós koefficiens.

Célszerű dimenziómentes formában felírni a modellt. Ehhez vezessük be a $z = x/L$ mennyiséget, ami a csőreaktor hosszirányában mért koordinátájának a csőhosszal (L) történő osztásával keletkeztethető, és a $\Theta = \frac{t}{\bar{t}} = \frac{t\bar{u}}{L}$ dimenziómentes időt, amelyben \bar{u} az átlagsebesség. Ezekkel a bevezetésekkel a diszperziós modell a következő lesz. Ez most már az ideális dugóáramhoz *hozzáveszi* a diszperzió okozta torzulást, sebességfluktuációt is.

$$\frac{\partial C}{\partial \Theta} = \left(\frac{D}{\bar{u}L} \right) \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - \frac{\partial C}{\partial z} \quad (4.355)$$

Ideális dugóáram esetén ugyanis $\bar{u} \frac{dc}{dz} = \frac{dc}{dt}$, ami egyenértékű az $\bar{u} = \frac{dz}{dt}$ kifejezéssel.

Fenti differenciálegyenletben D/uL a reaktor (csőreaktor) diszperziós száma, amely minősíti a diszperzió mértéket. Reciproka az ún. (axiális) Peclet-szám. Ezek mértéke minősíti a diszperzió, a visszakeveredés fokát. Ha a diszperziós szám kicsi, nullához tart, azaz $D/uL \rightarrow 0$, ami ugyanaz, mint $Pe \rightarrow \infty$, akkor elhanyagolható a visszakeveredés, azaz ideális dugóárammal állunk szemben. Ha viszont $D/uL \rightarrow \infty$, vagy ami avval ekvivalens, $Pe \rightarrow 0$, akkor nagyon nagy a visszakeveredés, az eset megközelíti a tökéletesen kevert reaktort.

Ha a Pe elég nagy, vagyis D/uL elég kicsi, akkor a diszperziós modellből következő C_Θ függvény az alábbi lesz:

$$C_{\Theta} = \frac{1}{2\sqrt{\pi\left(\frac{D}{\bar{u}L}\right)}} \exp\left[-\frac{(1-\Theta)^2}{4\left(\frac{D}{\bar{u}L}\right)}\right] \quad (4.356)$$

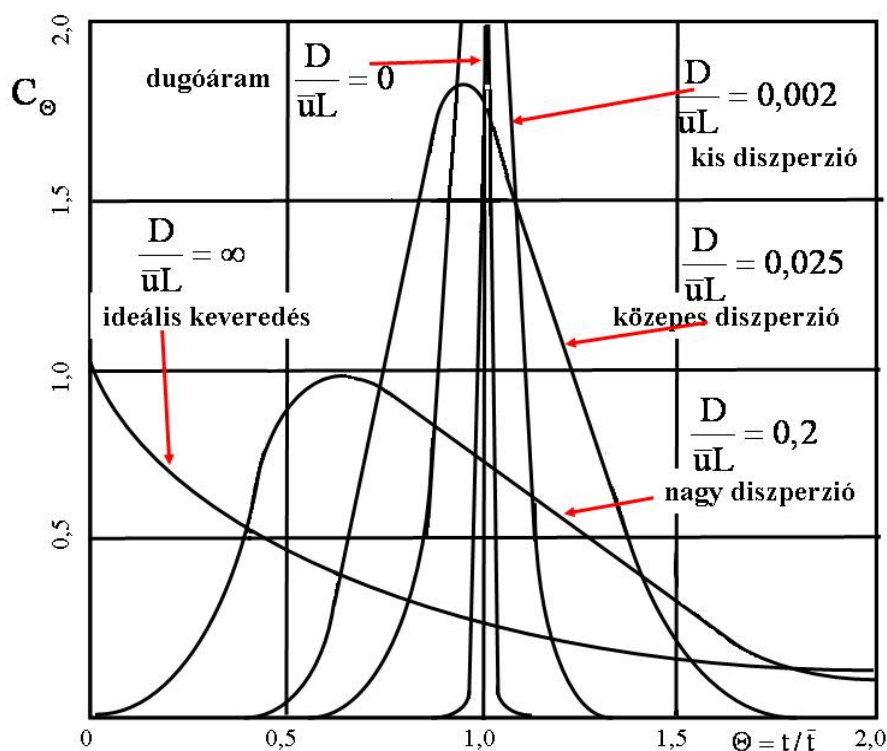
Ez egy Gauss-féle vagy normáleloszlás-függvénycsaládot reprezentál, amelynek középértéke (átlagos tartózkodási idő) $\bar{\Theta}_C = \frac{\bar{t}_c}{t} = 1$, szórásnégyzete pedig $\sigma^2 = 2\left(\frac{DL}{\bar{u}^3}\right)$.

Jegyezzük meg, hogy a diszperziós szám, ill. a Pe szám az egyetlen paramétere a görbének, vagyis a diszperziós modell egyparaméteres.

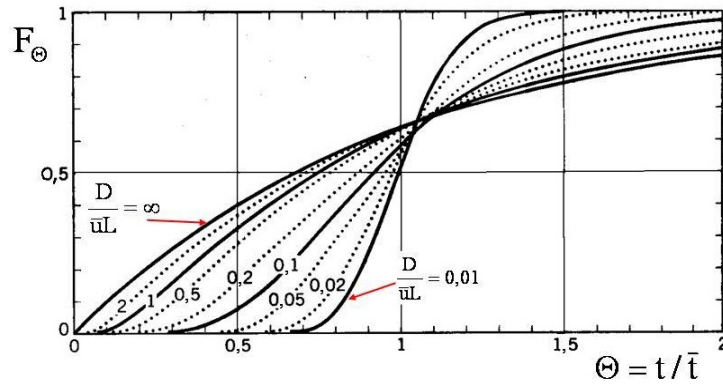
Ha Pe elég kicsi, vagyis $D/\bar{u}L$ elég nagy, azaz távol vagyunk az ideális dugóáramtól, akkor szintén $\bar{\Theta}_C = \frac{\bar{t}_c}{t} = 1$, de a szórásnégyzet más lesz:

$$\sigma_{\Theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\Theta^2} = 2\frac{D}{\bar{u}L} - 2\left(\frac{D}{\bar{u}L}\right)^2 \left[1 - e^{-\frac{\bar{u}L}{D}}\right] = \frac{2}{Pe} \left[1 - \frac{1}{Pe} (1 - e^{-Pe})\right] \quad (4.337)$$

Ekkor a görbesereget a következő, a 4.105. ábra szemlélteti, amely nem szimmetrikus, mint a Gauss-görbe, viszont jól értelmezhető rajta a két ideális viselkedés és a közöttük történő átmenet is. Ha ugyanebben az esetben az F-görbét ábrázoljuk, a kapott görbesereg a 4.106. ábra szerinti lesz.



4.105. ábra: Keveredési viszonyok a Pe szám függvényében: C-görbe

4.106. ábra: Keveredési viszonyok a Pe szám függvényében: F -görbe

4.6.1.3. Ideális reaktorkaszád

Gyakran lenne kívánatos egy biotechnológiai folyamat megvalósítására csőreaktor alkalmazása, ugyanakkor különböző okok miatt ez nem lehetséges (lásd pl. 6-APA előállítás: 3.7.4. alfejezet). Ilyenkor sorba kapcsolt kevert reaktorokkal lehet megközelíteni a dugóáramú viselkedést.

A reaktorkaszád-modell minden olyan esetben használható, ha a diszperziós modell is használható, illetve nem vagyunk túl távol az ideális dugóáramtól.

A dimenziómentes idő definíciószerűen az i -edik sorba kötött reaktorra $\Theta_i = \frac{t}{\tau_i}$, ami a tankonként változó (tatható) tartózkodási idő, míg a teljes rendszerre is definiálható egy tartózkodási idő, ami $\Theta = \frac{t}{\tau}$, és az összes, N db tartályreaktorra vonatkozik. Tekintsünk egy ilyen kaszádöt, amelynek első reaktorába/-ből a térfogatáram legyen f (m^3/s), és térfogata pedig legyen V_1 (m^3). A 0 . időpontban injektáljunk a reaktorba egy nyomjelzőt, amelynek koncentrációja, miután egyenletesen eloszlott a reaktorban, legyen C_0 . Bármely időben az anyagmérleg a következőképpen adható meg:

A tracer eltűnésének sebessége = bemenet – kimenet

Az első reaktorra:

$$V_1 \frac{dC_1}{dt} = 0 - fC_1 \quad (4.338)$$

$$\int_{C_0}^{C_1} \frac{dC_1}{C_1} = -\frac{1}{\tau_1} \int_0^t dt \quad \frac{C_1}{C_0} = e^{-\frac{t}{\tau_1}} \quad (4.339)$$

és úgyszintén igaz, hogy

$$\tau_1 E_1 = e^{-\frac{t}{\tau_1}}. \quad (4.340)$$

A második reaktorra

$$V_2 \frac{dC_2}{dt} = f \frac{C_0}{\tau_1} e^{-\frac{t}{\tau_1}} - fC_2 \quad (4.341)$$

integrálás után

$$\tau_2 E_2 = \frac{t}{\tau_2} e^{-\frac{t}{\tau_2}}. \quad (4.342)$$

N db reaktorra, amelyek összes térfogata $V_R = NV_i$, a következő kifejezések nyerhetők:

$$\begin{aligned} \bar{t}E &= \left(\frac{t}{\bar{t}}\right)^{N-1} \frac{N^N}{(N-1)} \exp\left(-\frac{tN}{\bar{t}}\right) & \bar{t} &= Nt & \sigma^2 &= \frac{\bar{t}^2}{N} \\ \bar{t}_i E &= \left(\frac{t}{\bar{t}_i}\right)^{N-1} \frac{1}{(N-1)} \exp\left(-\frac{t}{\bar{t}_i}\right) & \bar{t}_i &= \frac{\bar{t}}{N} & \sigma^2 &= N\bar{t}_i^2 \end{aligned} \quad (4.343)$$

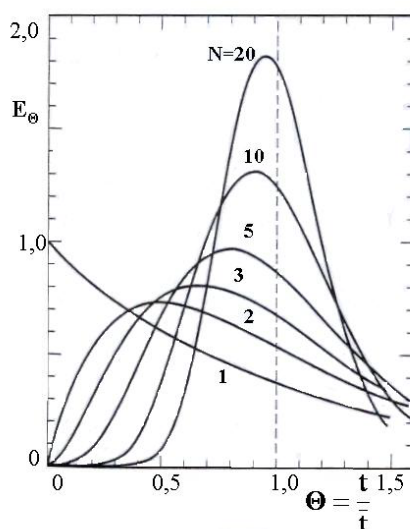
Egy ilyen reaktorkaszád tartózkodási idő eloszlás- és sűrűségfüggvényét ábrázolja a 4.107. ábra.

A grafikonokból látható, hogy a reaktorkaszád növekvő N esetében egyre inkább megközelíti a dugóáramú viselkedést. A fentieket úgy is felírhatjuk, hogy az egyes reaktorok sűrűségfüggvényének N -edik hatványa adja meg a teljes rendszer sűrűségfüggvényét:

$$\mathbf{E}(t, \bar{t}, N) = \mathbf{E}_i(t, \bar{t}_i)^N \quad (4.344)$$

Ha a kaszkád egyes reaktorai nem egyforma térfogatúak, akkor pedig az egyes elemek szorzatát kell képezni.

$$\mathbf{E}(t, \bar{t}, N) = \mathbf{E}_1(t, \bar{t}_{i1}) \cdot \mathbf{E}_2(t, \bar{t}_{i2}) \cdot \mathbf{E}_3(t, \bar{t}_{i3}) \dots \mathbf{E}_N(t, \bar{t}_{iN}) \quad (4.345)$$



4.107. ábra: Egyenlő térfogatú reaktorokból álló kaszkád tartózkodási idő eloszlásfüggvényei

4.6.1.4. Diszperziós modell és reakció

Amennyiben egy diszperziós modellel jellemezhető reaktorban (bio)kémiai reakció játszódik le, annak az áramlási, illetve keveredési viszonyokra gyakorolt hatása is figyelembe veendő. Így például elsőrendű kibernetikájú reakció esetére – ilyen például a hőpusztulás – felírva a viszonyokat, a következő összefüggés használható:

$$\frac{n(L)}{n_0} = \frac{4y \exp\left(\frac{Pe}{2}\right)}{(1+y)^2 \exp\left(\frac{Pe \cdot y}{2}\right) - (1-y)^2 \exp\left(-\frac{Pe \cdot y}{2}\right)}, \quad (4.346)$$

ahol $y = \left(1 + \frac{4Da}{Pe}\right)^{\frac{1}{2}}$, amelyben $Da = \frac{k \cdot l}{\bar{u}} = k\bar{t}$, az elsőrendű reakció DAMKÖHLER-száma vagy reakciószáma.

Ha a dugóáramhoz eléggé közeli viszonyok jellemzik a reaktort, akkor a kifejezés egyszerűsödik:

$$\frac{n(L)}{n_0} = \exp\left(-Da + \frac{Da^2}{Pe}\right), \text{ ha pedig ideális dugóáram feltételezhető, akkor } \frac{n(L)}{n_0} = \exp(-Da).$$

(Lásd a sterilizéssel foglalkozó [4.7. fejezetet](#).)

4.6.2. Aerob fermentációk bioreaktorai

4.6.2.1. Tartályreaktorok

Az aerob fermentációkhoz alkalmazott tartályreaktoroknak két fő típusa van (lásd a 4.79. ábrát). Az egyikben csupán levegőbevezetés történik a reaktorba valamilyen alkalmasan megválasztott levegőztető-levegőelosztó rendszer segítségével, a másikban az előbbieket mellett mechanikus keverést is alkalmaznak. Valójában e két alaptípusnak igen sok változata terjedt el a gyakorlatban. Ma már rendkívül sok, az alaptípusokba besorolható, valamint egyéb elveket felhasználó bioreaktort is alkalmaznak a fermentációs iparokban. E sokféleség teljes körű megismerése messze túlhaladná e jegyzet kereteit, ezért arra törekedtünk, hogy csak néhány jellemző bioreaktor-csoportot, ill. egyedi aerob fermentációs berendezést mutassunk be. E reaktorok többsége olyan, amelyeket valóban használnak üzemi fermentációs célokra, néhány azonban csak kísérleti üzemi léptékben (pilot plant) megvalósult fejlesztés.

Közismert, hogy a legelterjedtebb aerob fermentor hosszú évtizedeken át az elsősorban gyógyszeripari fermentációk céljaira felhasznált kevert-levegőztetett reaktor volt. Felmerül a kérdés, hogy milyen tényezők, milyen célok vezették a bioreaktorgyártók konstruktöreit újabb és újabb reaktor-típusok kifejlesztésére.

Amíg a hagyományos gyógyszeripari fermentációk domináltak a fermentációs iparokban, addig a néhány 100 m³-es maximális térfogatú kevert-levegőztetett reaktorok minden tekintetben kielégítették a bioreaktorokkal szemben támasztható speciális igényeket, amelyek a következőkben foglalhatók össze:

- Finom diszperzió mind a gáz- és folyadékfázis, mind a szubsztrátok vonatkozásában (jó keveredési viszonyok).
- Jó anyag- és hőátadási tulajdonságok.
- Biztonságos, steril üzem mód lehetősége.
- Mechanikai stabilitás.
- Minél egyszerűbb konstrukció, üzem mód, ill. üzemeltetés.
- Jó „számíthatóság”, azaz a tervezés és méretnövelés szempontjából ismerni kell a rendszert.

A 1970-es években, elsősorban az [SCP](#) fermentációs technológiák kidolgozásakor a gazdaságos üzem méret kérdése előtérbe került, a néhány 100 m³-es fermentorok helyett akár néhány 1000 m³-es reaktorok is szükségessé váltak. Például az angol ICI 2300/1560 m³-es reaktort épített metanol alapú SCP előállítására. Ráadásul erre az időre tehető az ún. nem konvencionális szubsztrátok felhasználása iránti érdeklődés növekedése is (cellulóz, szénhidrogének: metán, paraffinok, alkanolok: metanol, etanol). Ha csupán a reaktorok méretnövekedését tekintjük is, nyilvánvaló, hogy valamennyi fenti követelmény nem teljesülhet a keverős reaktorok esetén. Például a mechanikai stabilitás nem képzelhető el több ezer köbméteres keverős reaktorok esetében. Ugyanígy az új szubsztrátok is felvetnek egy sor problémát a hagyományos keverős reaktorok alkalmazásakor.

Tekintsünk példaként egy hipotetikus [SCP](#) üzemet, amelyben metanol C-/energiaforrást használnak fel folytonos kemosztát technológiában. Egy ilyen eljárás akkor lehet gazdaságos, ha a fermentáló mikrobakoncentrációja 2–2,5% körüli, és pl. $D=\mu=0,2\text{h}^{-1}$ hígítási sebességet alkalmaznak. Ilyen körülmények között a folyamat produktivitása $J=Dx=0,2\text{h}^{-1}\cdot 25\text{kg/m}^3=5\text{kg/m}^3\text{h}$. Ha a metanolra vonatkozó eredő hozam $Y_{X/S}=0,5$, akkor ez 10 kg/m³h metanol felhasználást jelent. Az adott mikrobára jellemző Y_O oxigénhozam alapján becsülhető a reaktor szükséges OTR-értéke. Például

$Y_O=0,53$ kg sejt/kg oxigén oxigénhozam esetén ez az oxigénátadás igény $9,4 \text{ kgO}_2/\text{m}^3\text{h}$. Ilyen oxigénátadás biztosan nem érhető el egy hagyományos gyógyszeripari reaktorban. Láttuk, hogy a fermentáció során képződő metabolikus hő becsülhető az oxigénigény alapján. Példánk szerint ez azt jelenti, hogy a képződött és elvonandó metabolikus hő mintegy $(9,4 \text{ kgO}_2/\text{m}^3\text{h}) \cdot (518 \text{ kJ/mol}) \cdot (1000/32 \text{ mol/kg}) = 152000 \text{ kJ/m}^3\text{h}$ ($=42,2 \text{ kWh/m}^3\text{h}$). Ez az igen nagy hőmennyiség a hagyományos duplikátoros, ill. a fermentor belsejébe szerelt csökígyós hűtőfelületeken a szokásos maximum $\Delta t=10^\circ\text{C}$ mellett nem igen vonható el. Az ilyen intenzív, nagy oxigénigényű fermentációs technológiák során tehát lényegesen meg kell növelni a hőátadási felületet és/vagy az eredő hőátbocsátási tényezőt. Csupán ezek a szempontok is elegendőek, hogy megértsük, miért volt olyan intenzív fejlődés a múlt század utolsó negyedében ezen a területen.

Igaz, hogy mára a kiváltó alapvető okok – azaz az [SCP](#) fejlesztések – megszűntek, belépett ugyanakkor egy új terület, amelynek szintén nagy reaktorok jelentik a gazdaságos mérettartományát. Ez a fehér biotechnológiával kapcsolatos ipari fermentációk területe, itt 200–400 köbméteres reaktorok felhasználásával érhetőek el gazdaságos eredmények. Ilyen alkalmazások a bioetanol (anaerob), a tejsav (részben aerob), az ecetsav (aerob), a borostyánkősav (aerob), az 1,3-propándiol (aerob) stb. fermentációk.

A 4.37. táblázat Chisti művéből idézve⁸⁶ a különböző típusú nagyléptékű fermentációk aerob bioreaktoraival szemben támasztott legjellemzőbb igényeket, illetve működési tartományokat foglalja össze.

4.37. táblázat: Bioreaktorokkal szemben támasztott igények a technológia szempontjából

Sejttömeg	kg/m ³	„Termékes” fermentációk		Szennyvíztisztítás
		10-50		5
		Fonális gombák	Baktériumok	Vegyes tenyészet
Oxigénigény	kg/m ³ ·óra	0,5–5	0,5–5	<0,5–1
K_{La}	h ⁻¹	50	500	10–20
Viszkozitás	Pa·s	0,1–1,5	<0,1	<0,1
Metabolikus hőtermelés	kW/m ³	3–15	3–15	0,03–0,15
Teljesítményfelvétel	kW/m ³	3–15	<5	0,02–0,05

Ebben a jegyzetben legfőképpen a micéliális, illetve bakteriális és élesztőfermentációk bioreaktoraival foglalkozunk, a szennyvíztisztítás reaktoraik csak érintőlegesen jelennek meg.

A bioreaktorok logikus csoportosítása igen nagy számuk, illetve változatosságuk miatt nagyon nehéz feladat. Érdemi összehasonlításukat nehezíti az a tény, hogy gyakran csak a laboratóriumi, ill. kísérleti üzemi léptékekre találhatók meg az ehhez szükséges adatok (üzemi titok), ráadásul az összehasonlítás alapjául szolgáló kvantitatív jellemzőket gyakran ismeretlen vagy nem összehasonlítható körülmények között mérték ki.

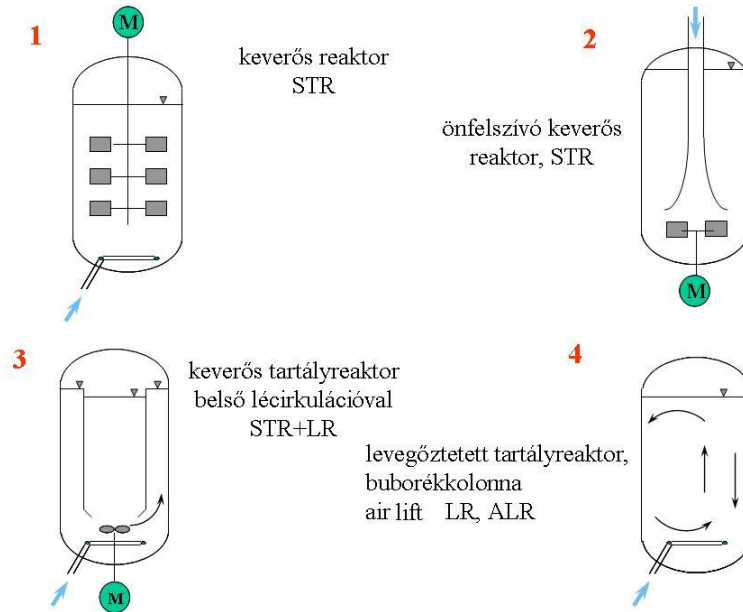
Láttuk, hogy az oxigénátadás szempontjából nagy jelentősége van az egységnyi térfogatba bevitt energiának a keverős reaktorok esetén, de ez ugyanilyen fontos kérdés a csak levegőztetett reaktoroknál is. Az energiabevitel szempontjából a következő esetek különböztethetők meg:

- energiabevitel mechanikusan mozgatott belső reaktorelemekkel (keverős reaktor),
- energiabevitel külső folyadékszivattyúval,
- energiabevitel a komprimált gázzal.

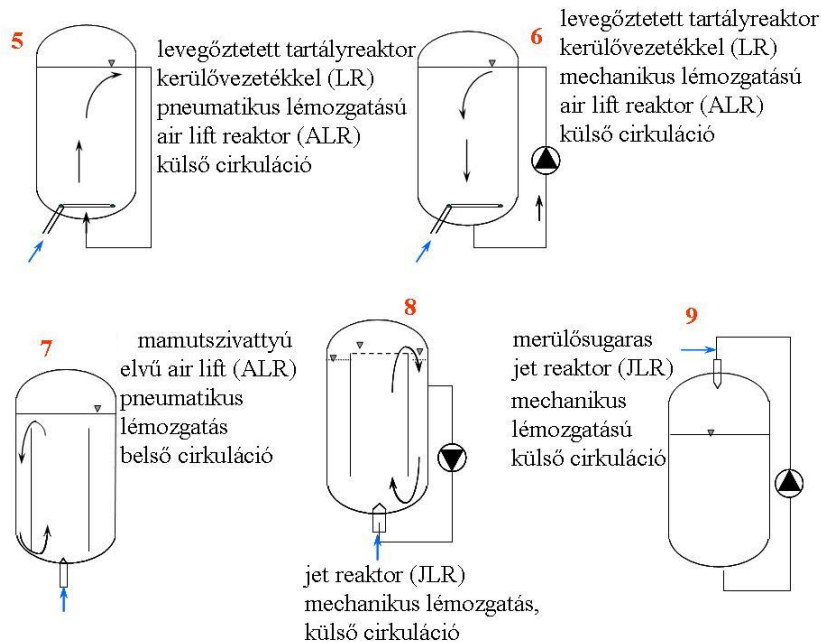
Keverős reaktorok (STR, stirred tank reactor) esetén elsősorban az első és harmadik módon történik az energiaátadás, míg a reaktorok másik fő csoportja, a **lécirkulációs** vagy hurokreaktorok (LR, loop reactor) esetén főleg a második és/vagy a harmadik energiaátadási mód jellemző. Utóbbi reaktorcsoportnál a lécirkuláció helye szerint beszélhetünk **belső** vagy **külső** lécirkulációról, a lémozgatás megvalósulása szempontjából pedig **pneumatikus** és **mechanikus** fermentálé- cirkulációról.

⁸⁶ Chisti, M. Y.: Airlift Bioreactors, Elsevier, London 1989.

Mielőtt az egyes reaktortípusokat és egy-egy jellemzőt részletesebben ismertetnénk, tekintsük át a 4.108. és 4.109. ábrát, amelyeken sematikus ábrázolással feltüntettük a legjellemzőbb reaktortípusokat.



4.108. ábra: Tartályreaktorok 1.



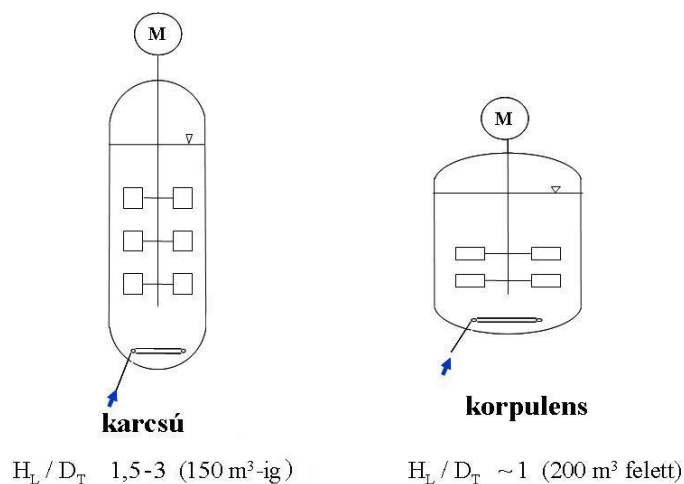
4.109. ábra: Tartályreaktorok 2.

4.6.2.1.1. Keverős bioreaktorok (STR)

A keverős reaktorokkal, a hagyományos kevert gyógyszeripari fermentorokkal a [4.5. fejezetben](#) részletesen foglalkoztunk. Ezeket használják fel elsősorban a gyógyszeripari (antibiotikum), valamint az ún. finomfermentációs iparokban (enzimek, nukleotidok, aminosavak, modern biotechnológiai termékek előállítása mikrobákkal (rekombináns idegen fehérjék) stb. előállításánál).

A kevert reaktorok néhány előnyös tulajdonsága meg is határozza felhasználási területüket:

- Sok célú felhasználásra alkalmasak, flexibilisek. Bennük szakaszos, félfolytonos, rátáplálásos szakaszos és folytonos fermentációk is megvalósíthatóak, ezért az ilyen fermentorok esetén viszonylag könnyű a termékváltás, ugyanabban a reaktorban különböző fermentációs technológiák is realizálhatók.
- Széles fermentléviszkozitás-tartományban, $\mu \geq 2$ Pa.s viszkozitású és nem newtoni fermentlevek esetén is felhasználhatók. Így fonalas mikroorganizmusok, valamint poliszacharid fermentációk megvalósítására szinte kizárólag ilyen reaktorokat alkalmaznak.
- A legismertebbek mind az anyagátadás, mind a méretnövelés összefüggései vonatkozásában is. Hátrányos jellemzőik között az alábbiak a legfontosabbak:
- viszonylag kis, néhány 100 m^3 térfogatú fermentorok esetén valósíthatók meg. Régebben e mérethatárt $100\text{--}150 \text{ m}^3$ -ben jelölték meg, ma ismerünk $350\text{--}450 \text{ m}^3$ -es keverős reaktorokat felhasználó fermentációs technológiákat is. Az előbbieket karcsú, nagy magasság/átmérő arányú reaktorokat alkalmaznak, míg a nagyobbaknál tömzsi, korpulens reaktoralakok a jellemzőek, amint a 4.110. ábra szemlélteti.
- Az előző kérdéssel összefügg az a korlátjuk, hogy csak mintegy 2 VVM^{87} levegőztetés valósítható meg maximálisan e reaktorokban. Nagyobb értékeknél a keverő "megszalad" (ez az elárasztás), olyan mintha levegőben forogna, a gázbuborékok diszpergálás nélkül haladnak át a reaktoron.
- A hőelvonás problémát okoz különösen nagyobb reaktoroknál, mert a reaktorok térfogatának növekedésével a fajlagos felület csökken, és így csak korlátozott nagyságú hőátadó felület építhető be. Bizonyos méret felett csak a fermentlé külső hőcserélőn történő átvezetésével oldható meg a hőelvonás.
- A kevert bioreaktorokban elérhető OTR-érték viszonylag alacsony, típustól függően $2\text{--}5 \text{ kgO}_2/\text{m}^3\text{h}$, és az oxigénátadás energiaigénye is magas, szintén típustól függően $0,8\text{--}2 \text{ kg O}_2/\text{kWh}^{88}$ tartományba esik.
- A keverő hajtóműtengelyét (mind alsó, mind felső meghajtás esetén úgy kell a fermentortérbe vezetni és csapágyazni, hogy a steril működés feltételei biztosítva legyenek. Régebben ezt úgy oldották meg, hogy két tömszelencét, ill. ajaktömítést alkalmaztak, amelyek közé gőzt vezettek, és ez a gőzzár biztosította a sterilitást. Ma a legelterjedtebb steril tengelyvezetést a csúszógyűrűs megoldás jelenti (lásd a 4.7.6. alfejezetet). A steril tengelyvezetés szükségessége a keverős reaktorok esetén fokozott gondot okoz a készülékek üzemeltetése és karbantartása során.

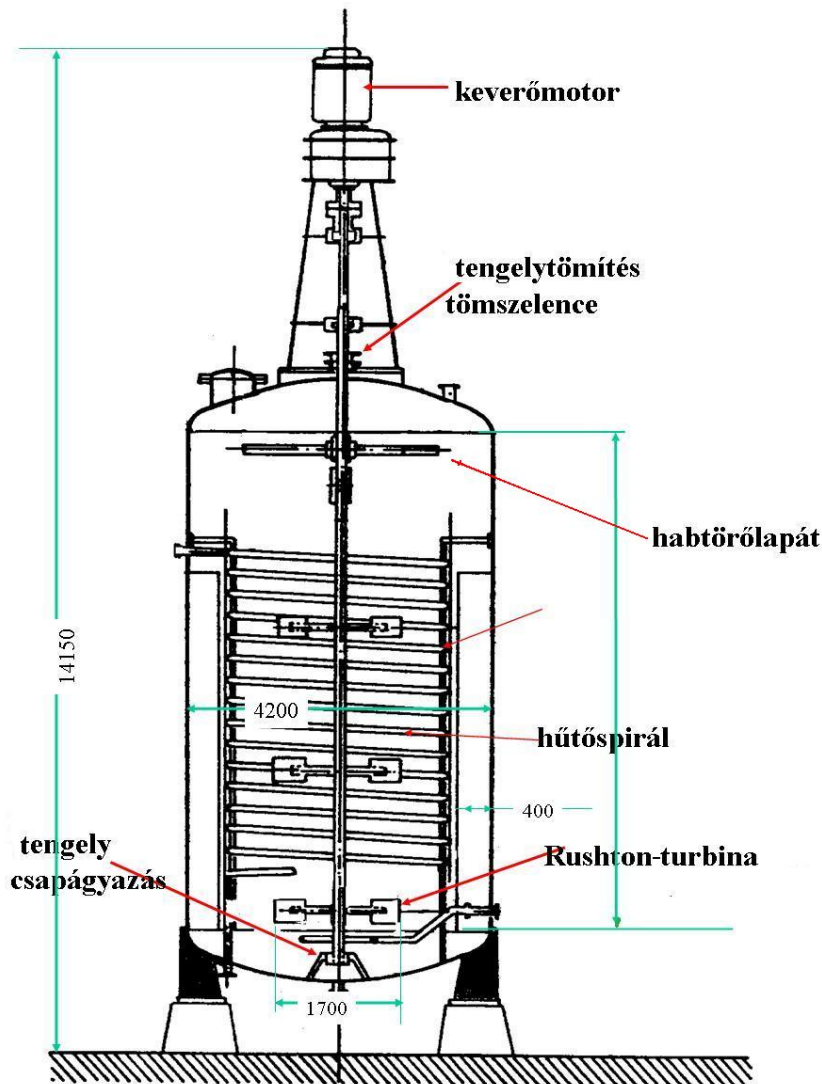


4.110. ábra: Karcsú és korpulens reaktor

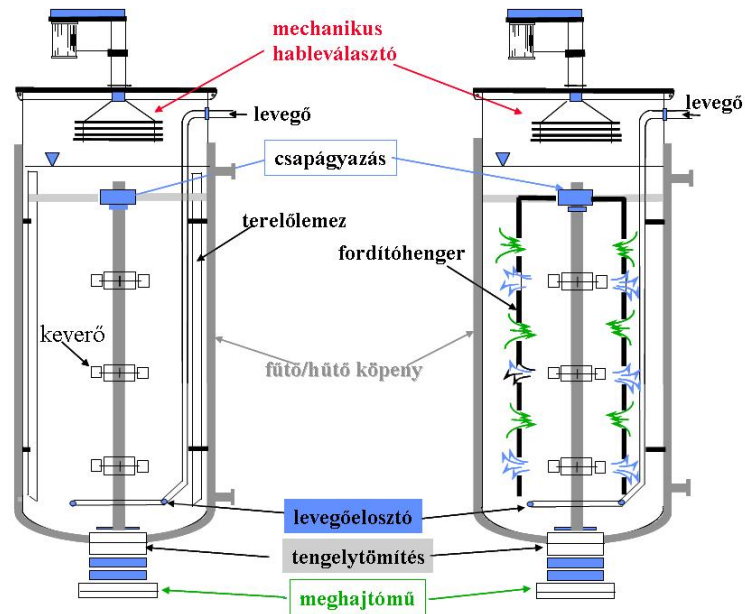
⁸⁷ A VVM a fermentációs gyakorlatban alkalmazott legelterjedtebb megadása a levegőztetés mértékének, az egységnyi fermentlé-térfogatba bevitt levegőtérfogat percenként (volume/volume/min, $\text{m}^3/\text{m}^3\cdot\text{perc}$).

⁸⁸ Ez az OTR mellett a második legfontosabb jellemzője a levegőztetés hatékonyságának, ez az ún. energia-fajlagos, ami megadja, hogy egy kWh energiabevittel mennyi oxigénoldódás érhető el.

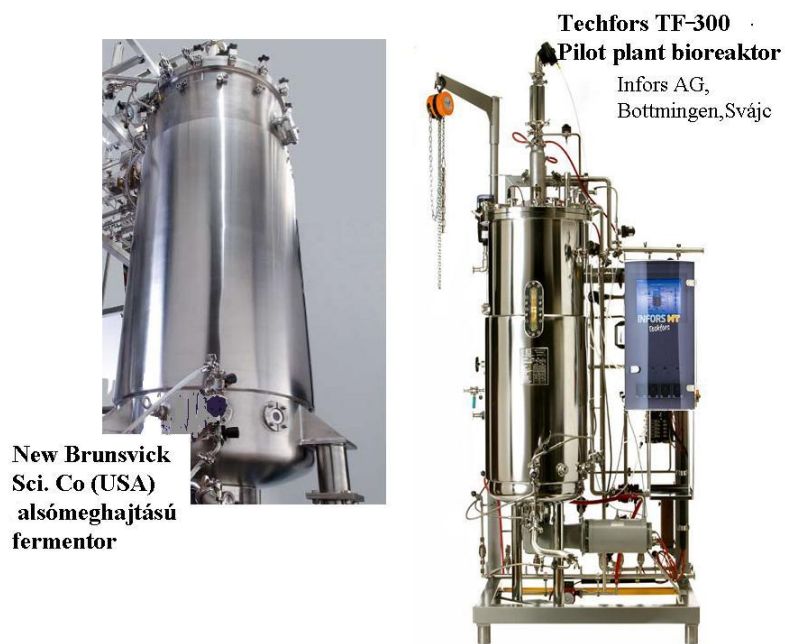
A gyógyszeriparban legelterjedtebben alkalmazott keverős fermentor tipikus öspéldáját mutatja be a 4.111. ábra. Ilyeneket használtak az 1950–60-as években. Ezek szerkezeti anyaga rendszerint még a savaknak nem eléggé ellenálló és sok iont leadó, és ezért sokszor a mikrobaszaporodást befolyásoló szénacél volt. Ezekben a reaktorokban legtöbbször az egyenes lapátú, nyitott turbinakeverőket használták fel keverőelemekként, és még tömszelencés tengelytömítéseket alkalmaztak. Az oxigénátadás hatékonysága e fermentorokban elsősorban a keverősebesség, illetve a levegőáramlási sebesség függvénye, a levegőelosztó kialakításának (amely általában lyuggatott csőlíra vagy egyszerű fúvóka) kisebb jelentősége van. A gyógyszeripari fermentoroknál a karcsú H_T/D_T 1,5–3 méretarány dominál, míg a többszáz köbméteres keverős reaktoroknál ez az arány 1 körüli. A modern kevert levegőztetett reaktorok megtartották az őstípus fontosabb jegyeit, de szerkezeti anyagukat (rozsdamentes acél), a tengelytömítést (csúszógyűrű) és a változtatható fordulatszámú keverőt tekintve eltérnek a régi típusoktól. Ilyen modern keverős reaktorokat láthatunk a 4.112a–4.112d. ábrákon.



4.111. ábra: Az 1950–60-as évek kevert/levegőztetett fermentora

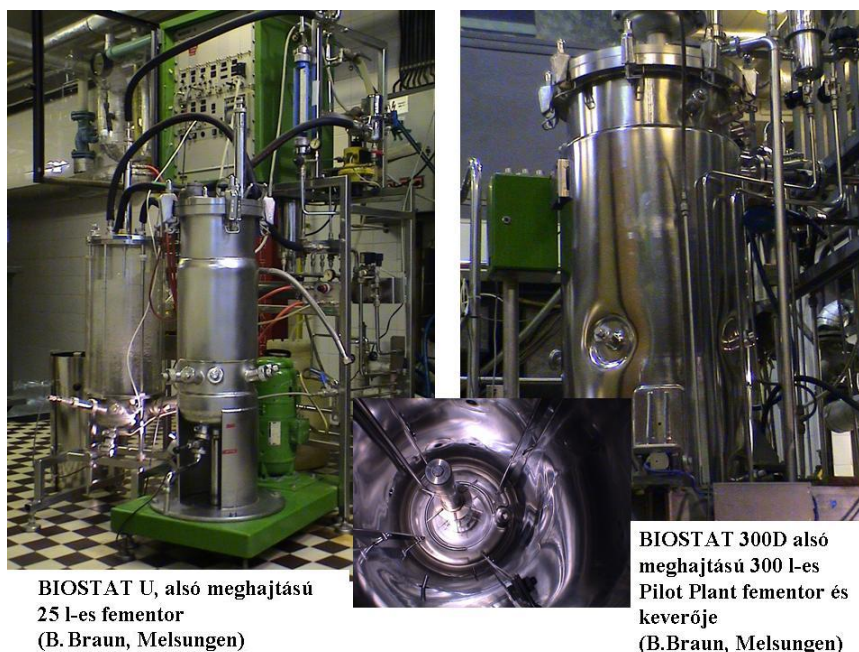


4.112a. ábra: „Standard” keverős fermentor és fordítóhengeres változata⁸⁹

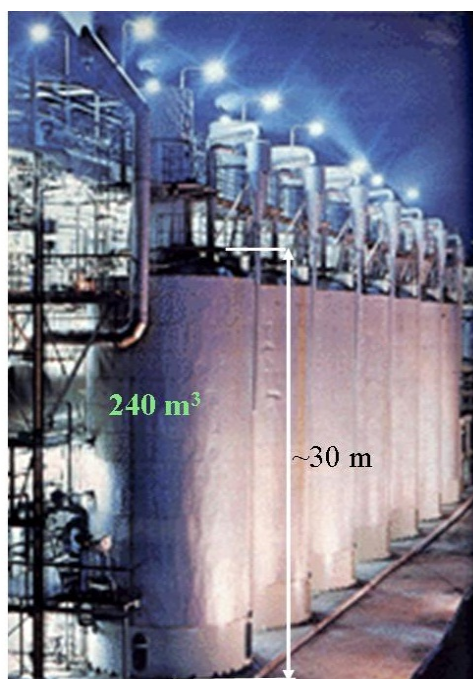


4.112b. ábra: NBS-termelő és Infors kísérleti üzemi léptékű alsómeghajtású keverős fermentorok

⁸⁹ Ez a két reaktor eredetileg a svájci Chemap cég invenciója volt. A cég ma nem létezik, a reaktorokat átvette a B. Braun cég. Gyakorlatilag a ma használt alsómeghajtású fermentorok standardját reprezentálják.



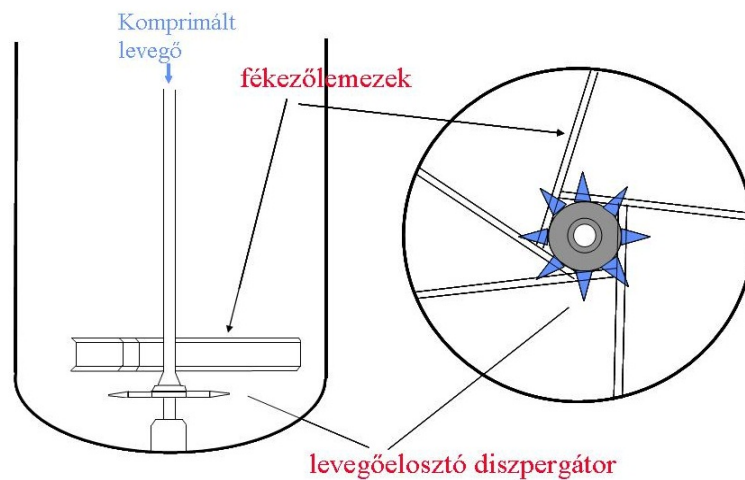
4.112c. ábra: Nagylaboratóriumi és kísérleti üzemi léptékű B. Braun alsómeghajtású fermentorok



4.112d. ábra: 240 köbméteres üzemi fermentorok nátriumglutamát technológiában, Japán

A gáz/folyadék diszperzió, a keveredési viszonyok, ill. az oxigénátadás javítása céljából a keverős reaktoroknak egy sor továbbfejlesztett változatát is ismerjük. Így a 4.113. ábrán a klasszikus Vogelbusch-fermentor látható (VB-EB4), amelynél a komprimált levegőt a csőből kialakított keverőtengelyen vezetik a készülék alján levő keverőelemekbe. Az elemek oldalán kiképzett nyílásokon (hasíték) a forgási irányban levő oldalon történik a levegőbuborékok kiáramlása, amelyeket azután a gyorsan forgó keverőelemek finoman diszpergálnak a fermentlében. Azért, hogy megakadályozzák a teljes fermentlének a keverővel való együttforgását, és hogy a turbulenciát fokozzák, a keverőelemek felett egy fékező lemezrendszert alakítottak ki. E reaktorban a levegő térfogatáramától és a keverési sebességtől függően 3,6–4,1 kg O₂/m³.h OTR érhető el 1–4 kgO₂/kWh

energiafajlagossal⁹⁰, és körülbelül 20% kihasználtsággal. E rendszerrel legfeljebb 6 m magas és 220 m³ térfogatú reaktorok készíthetők. Vogelbusch rendszerű berendezéseket elsősorban a pékélesztő előállítására használják.

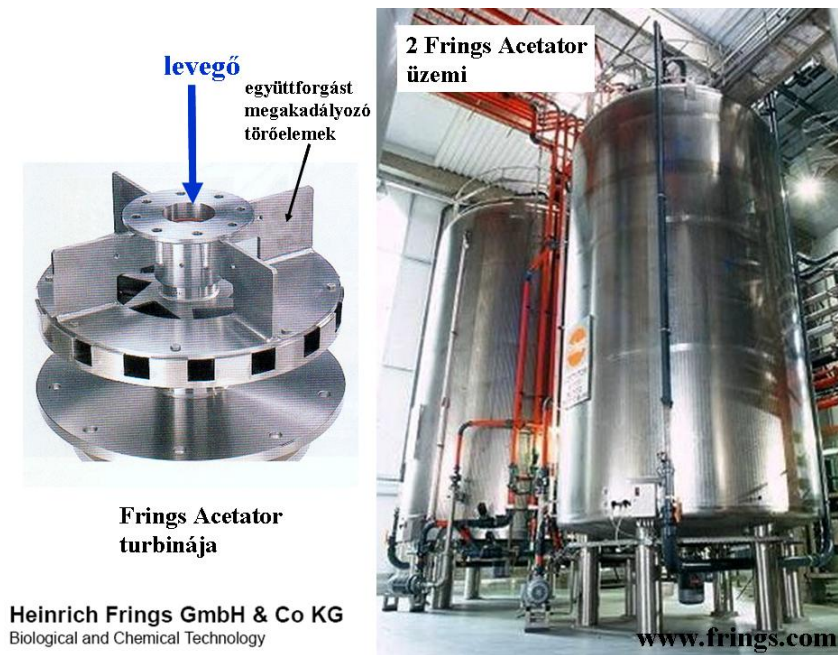


4.113. ábra: Vogelbusch levegőztető

A valódi (azaz zárt házban üzemelő) turbinakeverőket alkalmazó fermentorok esetében kétféle megoldás ismert. A felső légbeszívású reaktoroknál a turbina önbeszívó, tehát a levegőztetéshez nem szükséges komprimált levegő felhasználása, míg az alsó légbefúvásúaknál természetesen komprimált levegőt kell felhasználni. Az előbbi esetre példát mutat be a 4.114. ábrán látható FRINGS acetátor, amelynek turbinakeverő rendszerét és üzemi reaktorát láthatjuk. Ilyen reaktorokat szintén elsősorban élesztőgyártási céllal, valamint alkoholból történő ecetgyártásra használnak fel (innen ered a neve).

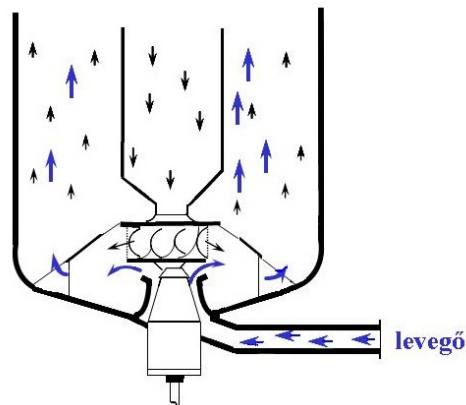
E fermentor csak 0,3–1 VVM levegőztetésre képes, és az elérhető OTR a turbina fordulatszámától függően jellemzően 2–2,5 kgO₂/m³.h., de mértek 5 kg O₂/m³.h OTR-t is 100 m³-es reaktor esetében 2,2 kgO₂/kWh energiafajlagossal. Az önbeszívó, valódi turbinás reaktorok esetében a reaktor mérete limitált, maximálisan 5 méter magas, és így körülbelül maximálisan 150 m³ térfogatú lehet. Jellemző az igen magas oxigénkihasználás, akár 35–45% is lehet.

⁹⁰ Az energiafajlagos az OTR mellett a másik fontos jelzőszáma egy levegőztetőnek: mennyi oxigén vihető be a rendszerbe egységnyi energiabevittel. A harmadik jellemző az oxigénkihasználás, ami megadja, hogy a rendszerbe bevezetett oxigénnek milyen hányada hasznosul, azaz oldódik valóban a fermentlében.



4.114. ábra: FRINGS keverőrendszer és üzemi fermentor képe

Alsó légbeszívású turbinakeverő rendszert alkalmaz a 4.115. ábrán látható Electrolux⁹¹ gyártmányú fermentor, amely mintegy átmenet a belső léccirkulációjú hurokreaktorok felé, hiszen ebben egy fordítóhengert alkalmaznak a kényszeráramlás kialakítására.

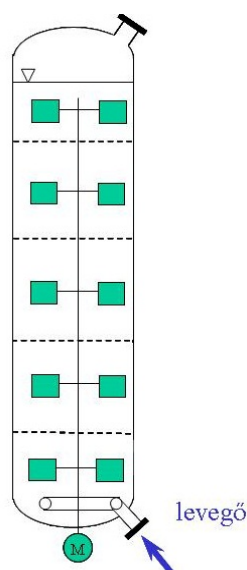


4.115. ábra: Alsómeghajtású valódi turbina-keverőrendszer (Electrolux)

A keverés funkcióival foglalkozva megállapítottuk, hogy annak egyik legfontosabb feladata a jó gáz/folyadék diszperzió, azaz a nagymennyiségű kis átmérőjű buborék előállítása. Ez a primer gázelosztás ún. nem koaleszkáló (buborékegyesülést nem elősegítő) fermentlevek esetén elegendő, az elsődlegesen képződött buborékok áthaladva a rendszeren egyesülés nélkül hagyják el azt. Koaleszkáló fermentleveknél azonban a buborékegyesülés nagymérvű lehet, ami csökkenti a gáz hold up értékét, és ezáltal rontja az oxigénátadást. Ennek megakadályozására gyakran olyan elemeket építenek a reaktorokba, amelyek az egyesült buborékokat újra felaprózzák, azaz elősegítik a másodlagos gázdiszperziót. Ilyen megoldásokat láthatunk a 4.112a. ábrán, ahol olyan fordítóhengert építettek a reaktorba, amely mind a keverőelemek síkjában, mind két keverőelem középvonalában nyílásokat tartalmaz speciális keveredési, ill. áramlási képet – a fermentlé kényszeráramlását – létrehozva, amely

⁹¹ A svéd Electrolux cég bioreaktor-gyártására jelenleg már nem található utalás, a cég utóda a szintén svéd NOVAFERM, ami gyárt alsómeghajtású mágneses keverős fermentorokat.

elősegíti a buborékok újraeloszlását. A 4.116. ábrán pedig egy szitatányéros keverős reaktor látható, amelyben a szitatányérok buborékaprító hatásával érik el ugyanezt a hatást.

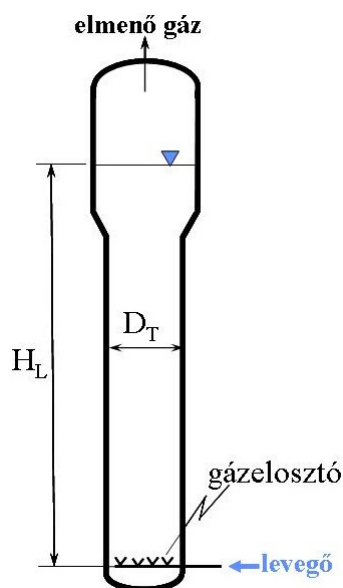


4.116. ábra: Szitatányéros fermentor

4.6.2.1.2. Hurokreaktorok (LR)

A mechanikus keverést nem alkalmazó aerob bioreaktorok konstrukciós szempontból legegyszerűbb formája a buborékkolonna (4.117. ábra), amelyben a levegőztetés megvalósítása a készülék alján elhelyezett gázelosztón történik. Ezzel a típussal részletesen nem foglalkozunk, a következőkben a pneumatikus lémozgatású hurokreaktorokra elmondottak ugyanis jórészt érvényesek e típusra is. Annyit érdemes megjegyeznünk, hogy a buborékkolonnák oxigénátadása elsősorban a gázelosztó kiképzésétől, ezen keresztül a buborékok nagyságától függ (lásd később). Az egyszerű buborékkolonnák esetében a $H_L:D_T$ arány 3-tól akár 20-ig is terjedhet, jellemző OTR-tartományuk 1–4 kg $O_2/m^3.h$ igen jó energiatartalommal: 1,5–2,5 kg O_2/kWh .

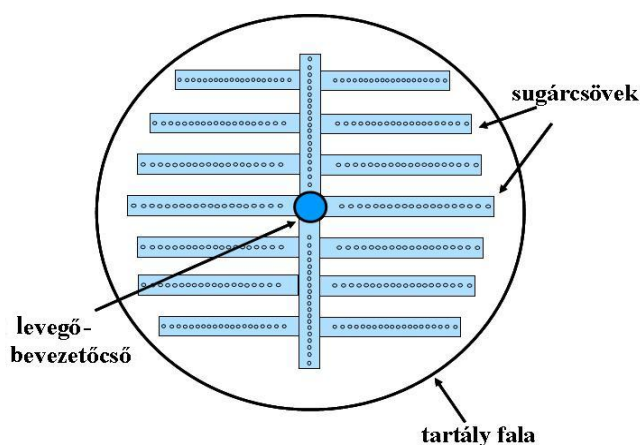
A buborékkolonnák egy ősből megvalósulása az úgynevezett sugárcsöves levegőztető, amelynél a felül bevezetett levegőztető cső a fermentortartály alján egy perforált csőrendszerre oszlik szét, amint a 4.118. ábra vázlatosan mutatja. Ezekre a fermentorokra jellemző, hogy nem túl magasak, azaz a fenti aránytartomány alján van $H_L:D_T$ arányuk. Ma is alkalmazzák őket a pékélesztőgyártásban.



4.117. ábra: Buborékkolonna



4.117a. ábra: Egyszerű air lift reaktor (B.Braun, BIOSTAT)



4.118. ábra: Sugárcsöves reaktor

A valódi hurokreaktorok alaptípusát a 4.109. ábra 5. rajza szemlélteti, valamint a 4.117a. ábra. Működés közben az utóbbit a 4.6. videóklipen láthatjuk. Ez a levegőztetett tartály ebben az esetben belső léccirkulációjú pneumatikus elvű hurokreaktor, amelyben a folyadékmozgás hajtóerejét a reaktortér gáz/folyadék diszperziójának a kerülővezetékben levő buborékszegény folyadéknál kisebb sűrűsége szolgáltatja. A folyadék főtömegében felszálló buborékok jó része ugyanis a fermentlé felszínén szétpattan, így $\rho_{\text{főtömeg}} < \rho_{\text{kerülővezeték}}$ alakul ki.

E reaktort és a hasonló felszálló buborékmozgással jellemezhető hurokreaktorokat airlift vagy léglift reaktoroknak is nevezik.



4.6. videó: Airlift reaktor működése

A hurokreaktorok (beleértve az egyszerű buborékkolonnát és a sugárcsöves reaktort is) számos előnnyel bírnak a kevert reaktorokkal szemben. Ezek az előnyök a következők:

- Könnyebb a sterilitás fenntartása, mivel nincs keverőtengely-bevezetés.
- Nagyon nagy fermentorok is készíthetők, ui. nincs motorméret, keverőtengelyhossz és ezek súlya okozta felső statikai határ.
- Hűtési igény 20–35%-kal kisebb, mert nincs mechanikus energeiabevitel (természetesen pneumatikus úton van energeiabevitel itt is).
- Mivel nincs keverőmű, nincs erőátvitel, kevesebb acélfelhasználás jellemzi, ezért olcsóbb a bioreaktor.
- A meghajtó motor, áttétel, csapágyazás és tömítés fenntartási költségei hiányoznak.
- A változtatható levegőztetésű reaktor olyan, mint egy változtatható keverésű, de motor és meghajtási zaj nélkül. Tehát csendesebbek is.
- A légkompresszorok akár gőzmeghajtásúak is lehetnek: ez költséghatékonyságot növelhet, illetve rövid áramszüneteknél sincs kiesés az oxigénellátásban.

E reaktorok esetében az oxigénátadás elsősorban a folyadéktulajdonságoknak, a folyadékmozgás intenzitásának és a buborék hold up-nak a függvénye. A folyadéktulajdonságok tekintetében a hurokreaktorok jellemzője az, hogy csak kis viszkozitású ($< 2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$), elsősorban newtoni viselkedésű fermentlevek kezelésére alkalmasak, ezért elsősorban egysejtű mikrobák tömegtenyésztésére használják fel őket (élesztőfermentáció, SCP-fermentáció).

A folyadékmozgatás szempontjából belső vagy külső léccirkulációjú hurokreaktorokról beszélhetünk, amelyekben felfelé vagy lefelé történő elsődleges buborékmozgást hoznak létre. A levegő-bevezetés megvalósítása, ill. az energiaátadás céljából az air lift rendszerű hurokreaktorok (ALR) esetén ún. statikus levegőelosztókat alkalmaznak. Ezekre jellemző, hogy a komprimált levegőt lehetőleg minél kisebb méretű lyukakon vezetik át, hiszen a hold up fordítottan arányos a buborék-átmérővel.

A levegő nyomásesése az air lift rendszerekben

$$\Delta p = \Delta p_s + \Delta p_h, \quad (4.347)$$

ahol Δp_s a levegőelosztón mérhető nyomásesés,
 Δp_h a levegőztető feletti fermentlé hidrosztatikai nyomása.

A Δp_s függ a statikus levegőelosztó lyukméretétől. Minél kisebb lyukak lennének kedvezőek az oxigénátadás szempontjából, de ekkor a gázbevezetés energiaigénye igen megnő Δp_s növekedése miatt. Az ilyen reaktoroknál nagy folyadékmagasságot alkalmaznak (H_L/D_T arány akár 20 is lehet), hogy C^* növekedése kedvezően befolyásolja az OTR értékét, ez azonban szintén az energeiabevitel növelését igényli. Láthatóan tehát e reaktortípusok esetén is az egységnyi térfogatba bevitt energei-értéknek van döntő hatása a jó oxigénátadásra. Ez az érték az air lift reaktorok esetében

$$\frac{P_g}{V} = \frac{F\rho_g}{V} \left(\frac{\alpha V_0^2}{2} + \frac{RT}{M} \ln \frac{P_0}{P} \right), \quad (4.348)$$

ahol F a gázsebesség (m^3/s),
 ρ_g a gáz sűrűsége,
 $\alpha \sim 0,06$ a gáz kinetikus energeiájának ekkora hányada adódik át a folyadéknak a gázelosztón, azaz mindösszesen 6%-a.
 V_0 a lineáris gázsebesség a levegőelosztón és
 P_0 a bemenő levegő nyomása a levegőelosztónál, és P a légköri nyomás,
 $M=29$, a levegő móltömege.

A hurokreaktorok egy másik csoportjánál ún. dinamikus gázelosztókat alkalmaznak, az ilyen reaktorokat *jet* hurokreaktoroknak nevezzük (JLR). Itt a fentiekén kívül többletenergia-bevitel is történik. Nem elsősorban a gáz, hanem a folyadéksugár kinetikus energiája az, ami a gázelosztást, ill. az anyagátadást meghatározza. Ebben az esetben tehát az előző egyenlet energiakifejezéséhez hozzá kell számítanunk a folyadéksugár-energiát is, ami a következő kifejezéssel adható meg:

$$\frac{P_L}{V} = \frac{8}{\pi V} \frac{F_L^3}{D_N^2} \rho_1, \quad (4.349)$$

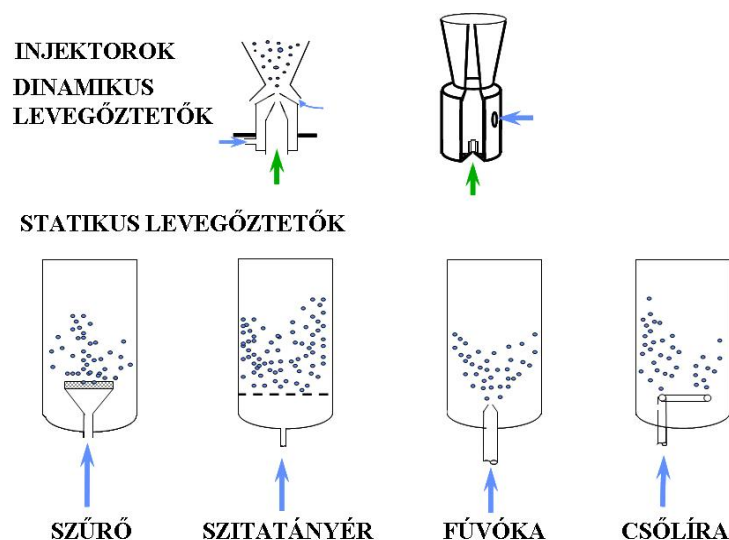
amelyben F_L a folyadéksugár térfogatárama és D_N a folyadéksugár injektor átmérője.

Mindkét alaptípusnál (ALR és JLR) a gáz hold up az anyagátadás elsődleges meghatározója. Azt találták, hogy a hold up

$$H_0 \propto u_g^n, \quad (4.350)$$

ahol u_g a **lineáris** gázsebesség.

Kis gázsebességnél (<0,05 m/s), ha tehát statikus levegőelosztót alkalmaznak, akkor úgynevezett buborékos áramlás jön létre, és n 0,7–1,2 közötti értékű, míg nagy gázsebességeknél (>0,05 m/s), vagyis dinamikus levegőelosztók, ill. 1 mm-nél nagyobb lyukú statikus levegőelosztók esetén (például a sugárcsöves esetben is) úgynevezett „habzó” turbulens buborékmozgás alakul ki, és n 0,5–0,7 között lesz. Minél nagyobb a gázsebesség, annál kevésbé növelhető tehát a hold up a gázsebesség növelésével. A statikus és a dinamikus levegőelosztók néhány példáját mutatja be a 4.119. ábra.



4.119. ábra: Air lift és jet reaktorok dinamikus és statikus levegőelosztói

Igen intenzív levegőztetést biztosít az ICI által egysejtfehérje előállítására kialakított ún. Pressure Cycle Reactor (4.120. ábra), amely külső cirkulációjú air lift reaktor. A 40 m³-es berendezésben 1000 tonna **SCP**-t tudtak előállítani évente metanol szubsztrát felhasználásával. Az 5–15 kg/m³.h OTR-értéket az intenzív cirkuláció és a nagy magasság okozta nagy hidrosztatikai nyomás biztosítja.

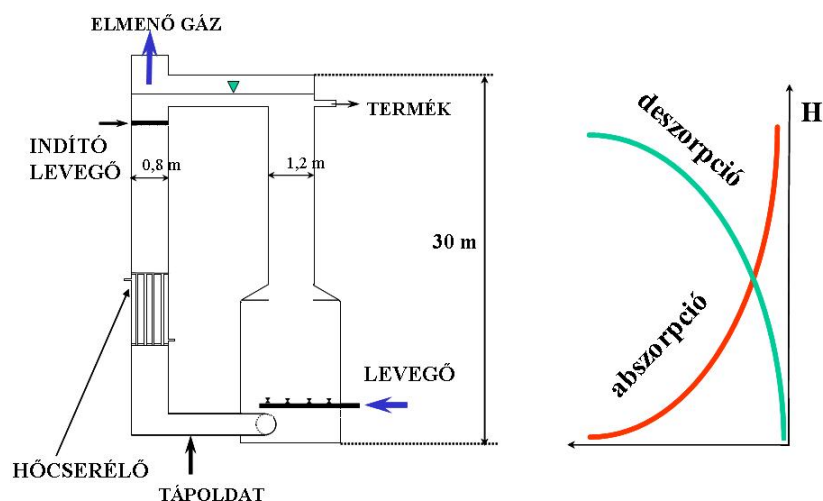
A készülék alján adagolhatók a friss tápanyagok, ahol a legnagyobb az oxigén abszorpciója, míg a deszorpció a készülék tetején a legnagyobb, és így itt szabadul fel az áramló fermentléből a széndioxid legnagyobb része. Az eredetileg pilot plant léptékűnek szánt reaktort később (1980-as évek vége) Fusarium gombának humán táplálkozás célú tenyésztésére alkalmazták. (QUORN)

Az ICI belső cirkulációjú PCR-át is kifejlesztette (4.121. ábra), amelynek hasznos térfogata 2300 m³, és amelyben 70 000 t/év **SCP** volt előállítható metanolbázison. (ennek a terméknek PRUTEEN volt a kereskedelmi neve). A 60 m magas készülék 55 m magasságig van feltöltve

fermentlével. Az áramlási viszonyok és az oxigénátadás javítása céljából a készülékben 19 szitatányért helyeztek el, amelyek a gázbuborékok intenzív rediszperzióját biztosítják. Ezek nélkül ugyanis a hosszú buborékút alatt erőteljes lenne a buborékegyesülés (α csökken, az oxigénátadás romlik). Mivel ilyen hatalmas térfogatban igen nehéz gyorsan és egyenletesen eloszlatni az átalakítandó C-/energiaforrást, ezért mintegy 1000 (!) helyen adagolják egyidejűleg a szubsztrátot a reaktorcső mentén. A PCR igen jó oxigénátadását elsősorban a kedvező áramlási viszonyok (buboréksebesség: 0,015–0,03 m/s; léforgatási idő: 6–30/h; lésebesség: 0,2–1 m/s), másrészt az oxigénoldhatóságot növelő 5–6 bar hidrosztatikai nyomás biztosítja. Az oxigénátadás mértéke $8 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{h}$, amelynek energiaigénye is kedvező, csupán mintegy $0,3 \text{ kWh/kgO}_2$ értékű. A készülék méreteit jellemzi, hogy 2–10 perces cirkulációs idejű a folyadékmozgás.

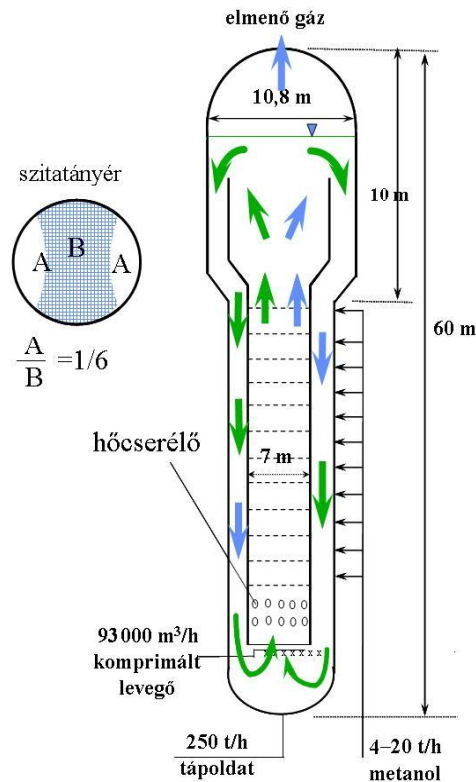
Egy valóban extrém méretű hurokreaktort mutat be a 4.122. ábra. Ezen az ICI Deep Shaft reaktorát (amelyet időnként Vertical Shaft néven találhatunk a szakirodalomban) ábrázoltuk, amelyet biológiai szennyvíztisztítás céljaira fejlesztettek ki. A reaktorcső 136 m hosszúságú és átmérője 0,5 m alatti (földbe ásva „állították fel” Ithacában az USA egy szennyvíztisztító telepén).

Működése teljesen hasonló a PCR-hoz, kivéve, hogy ebben a levegő nagy részét a lefelé áramló ágba vezetik. A cirkuláció megindításához és stabilizálásához a külső, felfelé áramló ágba is vezetnek kevesebb mennyiségű levegőt. A buborékok nagy tartózkodási ideje, a nagy nyomás és a turbulencia jó oxigénátadást biztosít, amelyet mintegy $2 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{h}$ OTR-érték jellemez. A bevezetett oxigénnek több mint 90%-a ténylegesen oldódik a fermentlében, és az energiafajlagos mintegy $3 \text{ kgO}_2/\text{kWh}$. Összehasonlításként megemlítjük, hogy a szokásos eleveniszapos szennyvíztisztítóknál az oxigén- hasznosulás csak 10% körül van. Egy ilyen reaktorral megtisztítható egy kb. 50 000 lakosú város kommunális szennyvize. Hagyományos módszerekkel több *ha* területű szennyvíztisztító telepre lenne szükség.⁹²

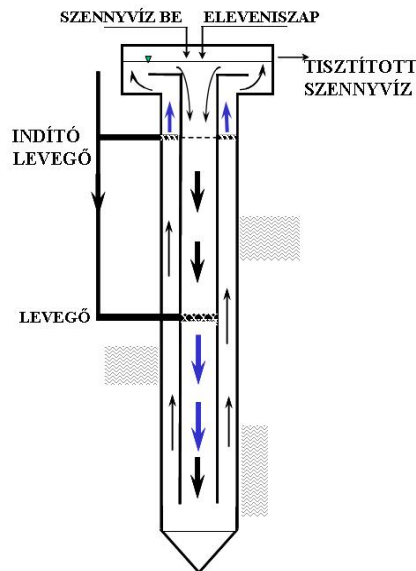


4.120. ábra: Pressure Cycle Reactor (pilot plant méret)

⁹² Az ICI 1990-től ZENECA néven működött, „nagy-biotechnológiai” tevékenységével valószínűleg felhagyott. A 2300 m^3 -es reaktorban a Pruteen-termelés hamar abbamaradt, később PHA-termelésre használták (BIOPOL), de ennek a biopolimernek a gyártását is átvette 1999-ben a MONSANTO. 2006-ban még a mérnöki teljesítmény csúcsai között említik. Jelenleg nem sikerült az eredetileg az angliai billighami üzemben felállított PCR nyomára bukkanni, feltehetőleg lebontották. Szennyvíztisztító Deep Shaft reaktorok ma is működnek.



4.121. ábra: Az ICI Pressure Cycle reaktora metanol alapú SCP gyártásra

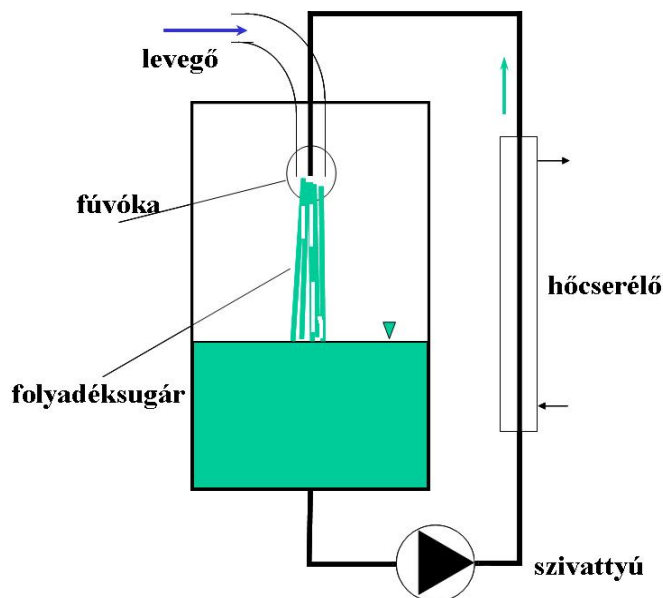


4.122. ábra: Deep Shaft PCR szennyvíztisztításra

Külső léccirkulációjú mechanikus lémozgatású jet reaktor a Vogelbusch IZ reaktora (4.123. ábra) és a magyar gáz/folyadék érintkeztetési szabadalom alapján működő HTPJ (High Turbulence Plunging Jet) merülő sugaras bioreaktor. Utóbbinak steril üzemű prototípusa a BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén lett felállítva 1987-ben.

Az IZ reaktor esetében speciális keringető szivattyút alkalmaznak a változó sűrűségű gáz/folyadék diszperzió szállítására. Ebbe egy szeparátorrészt építettek a fermentlé gáztartalmának

csökkentésére. A készülék tetejére felnyomott lé egy fúvókán (amelyhez a friss levegő hozzávezetése is történhet, de „önfelszívó” módon is üzemelhet) szabad sugár formájában ömlik ki és csapódik be a folyadék főtömegébe. A berendezés nagy előnye az elérhető $12 \text{ kgO}_2/\text{m}^3\cdot\text{h}$ OTR, amely sejttömegtenyésztésre is alkalmassá teszi. A külső cirkulációs körbe épített csököteges hőcserélő biztosítja a metabolikus hő elvezetését.



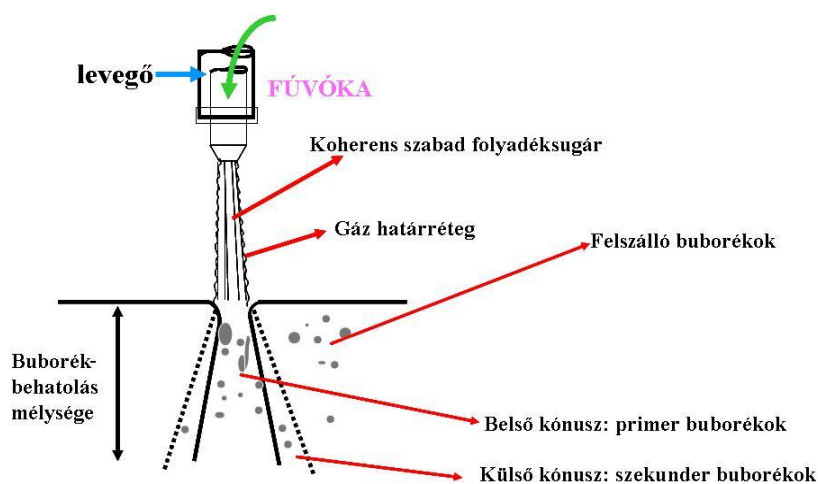
4.123. ábra: Merülő sugaras Vogelbusch IZ reaktor

A merülő sugaras fermentorok legfontosabb jellemzője és az oxigénátadást meghatározó paramétere a fúvóka és a folyadékfelszín közötti távolság, a folyadéktartály geometriai kialakítása, a fúvóka kiképzése és átmérője, a kialakuló folyadéksugár átmérője és sebessége, valamint a sugárnak a fúvókától a folyadékfelszínig történő kiszélesedése, felbomlása. Valamennyi ilyen reaktorban az oxigénátadás három régiója különböztethető meg:

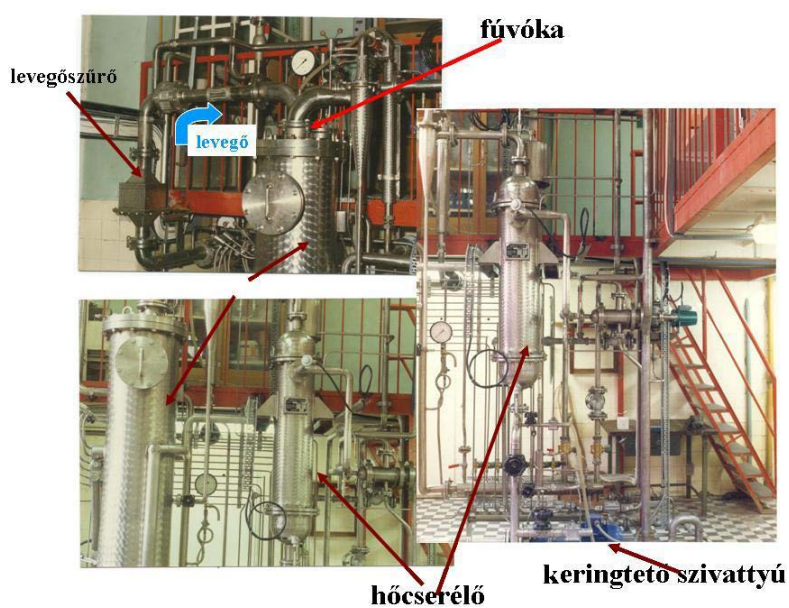
- a gázfázison keresztülhaladó szabad folyadék sugárba történő anyagátadás,
- anyagátadás a folyadék felszínén, és
- buborékból történő oxigénátadás a folyadék főtömegében.

Miközben a szabad folyadéksugár eléri a folyadékfelszínét, bizonyos mértékben felbomlik, felülete felborzolódik, és a sugárfelszín közelében levő gázmolekulákat magába zárja, illetve felgyorsítja, és így nagymennyiségű gázt visz a folyadékfelszín alá. Így tulajdonképpen a harmadik hatás az oxigénátadás meghatározója e reaktorokban. A magyar berendezésre (300 literes, Pilot Plant léptékű változatának fotói a 4.125. ábrán láthatók) különösen jellemző a kis átmérőjű koherens folyadéksugár, valamint az, hogy a becsapódó sugár a folyadék belsejében kavitációs (folyadék-nyomás-ingadozás, pulzálás) hatások révén nagymennyiségű kis átmérőjű buborékot hoz létre. Azt találták, hogy a merülő sugaras reaktorokban a keveredési idő kisebb, mint a folyadéktartályban mérhető átlagos tartózkodási idő, így e reaktorok igen jól átkeverték. Mindezek a tényezők biztosítják az igen intenzív oxigénátadást. A magyar HTPJ berendezésben vizes modellrendszerben $35\text{--}55 \text{ kgO}_2/\text{m}^3\cdot\text{h}$ OTR is elérhető.

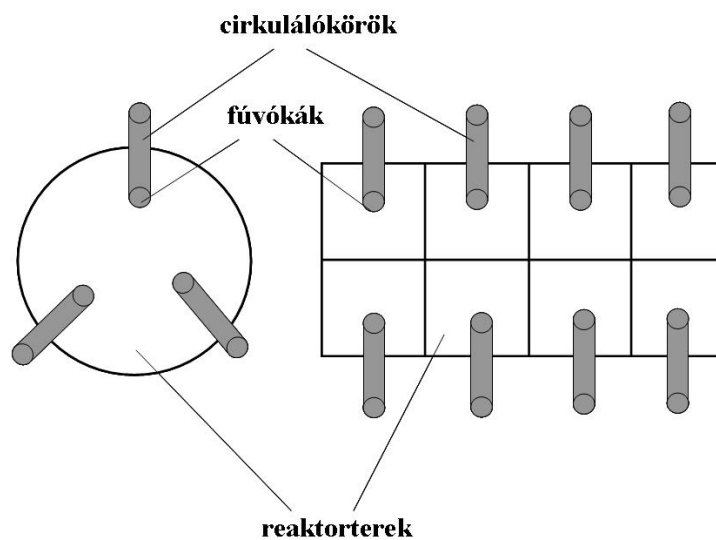
A merülő sugaras levegőztetési elv nagy előnye különösen szennyvíztisztítási célra történő felhasználás esetén, hogy a reaktorok korlátlan méretűek lehetnek, lehetséges pl. egy több ezer m^3 -es reaktor palástja mentén körben több fúvóka, ill. cirkuláltató kör elhelyezése, vagy nagyobb levegőztetett kádak esetében a szegmensenkénti levegőztetés (172. ábra).



4.124. ábra: Folyadékbehatolás és buborékképződés a merülő sugaras reaktorban



4.125. ábra: 300 literes HTPJ reaktor a BME MGKT Tanszéken



4.126. ábra: Merülő sugaras levegőztetők elhelyezése nagy reaktorok esetén

4.6.2.2. Oszlopreaktorok, csőreaktorok

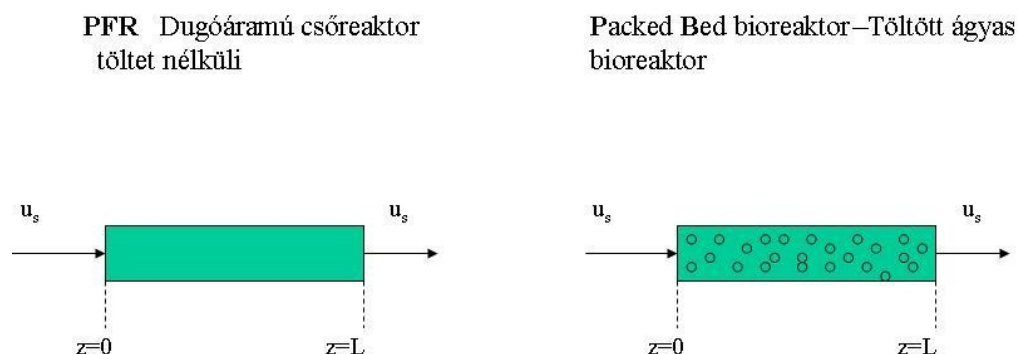
A tartályreaktorok jelentik a biotechnológiában használt reaktorok leginkább használt és legtöbbet tanulmányozott típusát. A biológiai eljárások között azonban számos olyan rendszer ismeretes, amelyeket dugószerű áramlással jellemezhetünk. A dugóáramlású reaktorokban a fluidum- részecskék hosszanti (horizontális) irányban nem keverednek az áramlás során, ez az egyik fő különbség a STR és a PFR között. Ezért általánosságban nem tökéletesen kevert rendszerként írhatóak le. A beáramló közeg összetétele a tengely mentén egy bizonyos koncentráció- gradiensnek megfelelően változik. A rendszer tehát, amint azt láttuk, hasonló egy végtelen sok elemből álló kevert tartályos rendszerhez, ahol az elemek között az áramlás folyamatos.

Korábban a csőreaktorok alkalmazása a bioeljárásokhoz nagyon nehéznek, ha nem egyenesen lehetetlennek tűnt, különösen az aerob folyamatok esetében, ahol a levegőztetés miatt a vissza-keveredés szerepét jelentősnek gondolták. Azonban a kémiai reakciók viselkedésének törvényei analógiájára megfogalmazott elméleti megfontolások a PFR-ok számos lehetséges előnyére mutattak rá. A dugóáramú reaktorok egyszerű berendezések, jól meghatározott áramlással, holt terek nélkül, ezért viszonylag könnyebben méretnövelhetők. Számos biotechnológiai eljárásban jól alkalmazhatóak, így rögzített enzimes, bizonyos egyszéjtfehérje és antibiotikum, valamint poliszacharid előállításoknál és szennyvíztisztítási eljárásoknál, valamint olyan komplex folyamatok esetében, amelyek esetében inhibíció vagy katabolit represszió lép fel. Ezeknél a PFR-k alkalmazása esetenként kedvezőbb hozamot és magasabb konverziót eredményezhet, mint kevert tartályreaktorok esetén. A tartály falára lerakódó szilárd részek (fálnövekedés, szilárd szubsztrátok, polimer metabolitok), a mechanikusan kevert tartályokban kialakuló erős nyíróerők hatására bekövetkező esetleges sejtkárosodások és a habzás nem jelentkezik dugóáramú reaktoroknál. A dugószerű áramlású folytonos reaktorok bizonyos egyszerű növekedési folyamatoknál kedvezőbbek, mint a folytonos kevert tartályreaktorok, különösen komplex kinetika (S- és P-inhibíció) és bizonyos termékformák esetén (pl. ahol a sejtek öregedésével számolni kell).

Érdemes megemlíteni, hogy a csőreaktorok a természetben elterjedtek, ezeknél gyakran a folyadék áramlásával párhuzamosan zajlik a reakció (pl.: folyók, kapillárisok, növényi és állati szervezet szállító rendszerei: érrendszer, nyirokrendszer). Habár a természet a technológiától eltérő optimalizálási stratégiát követ, azért ez az analógia jól mutatja a csőreaktorok térhódításának lehetőségeit a jelen és a jövő biotechnológiájában.

A csőreaktorok esetében hátrányokkal is számolnunk kell. Ilyen hátrány az, hogy kereskedelemben nemigen kaphatóak, előállításuk komplikáltsága ez idáig gátja volt a dugóáram elméletének ipari alkalmazása előtt. Ez különösen igaz az aerob tenyésztésekre, mivel itt intelligens berendezésre van szükség a dugószerű áramlás és a jó levegőztetés egyidejű megvalósításához. Továbbá a pH konstans értéken tartása is nehézségeket okoz. Ezen túlmenően, biztosítani kell a rendszerből kimosódott mikrobák folyamatos pótlását vagy visszavezetését is, azaz állandóan újra kell oltani a rendszert. Ezek a hátrányok ahhoz vezettek, hogy a csőreaktorok nem terjedtek el az iparban annyira, mint a folytonos kevert tartályreaktorok.

A csőreaktoroknak két alapvető típusa van: a töltet nélküli csőreaktor és a töltött ágyas csőreaktor (oszlopreaktor is lehet) amint a szemlélteti. ábra szemlélteti.



4.127. ábra: Töltet nélküli és töltött csőreaktor

Ha u_s a lineáris felületi sebesség, azaz a csőben áramló fluidum térfogatáramának és a csőkeresztmetszetnek a hányadosa, akkor felírhatjuk a sejttömeg-növekedést kifejező konstitutív egyenletet:

$$r_x = \frac{d(u_s X)}{dz}, \text{ amelyben } u_s = \frac{F}{A} \quad (4.351)$$

u_s = lineáris felületi sebesség, A = a reaktor keresztmetszete, F = a térfogatáram a reaktorban.

A szubsztrát fogyására is felírhatjuk a konstitutív egyenletet:

$$-r_s = \frac{d(u_s S)}{dz} \quad (4.352)$$

Abban az esetben, ha u_s = állandó, azaz az áramló fluidum sűrűsége állandó, akkor

$$r_x = u_s \frac{dX}{dz} \text{ és } -r_s = u_s \frac{dS}{dz}. \quad (4.353)$$

Bevezetve a dimenziómentes (karakterisztikus) idő fogalmát (θ), felírható, hogy

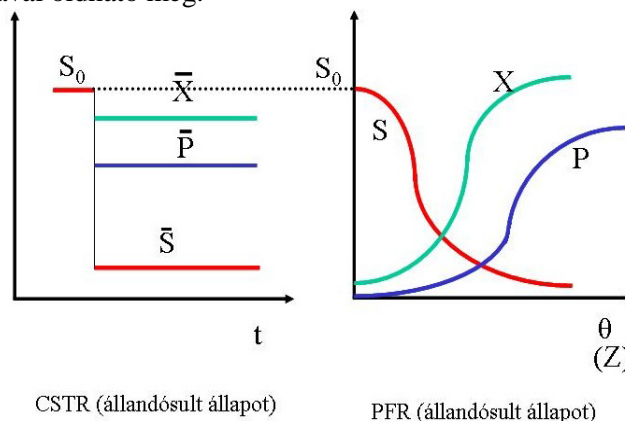
$$\Theta = \frac{z}{u_s}, \quad r_x = \frac{dX}{d\Theta}, \quad -r_s = \frac{dS}{d\Theta}. \quad (4.354)$$

A kezdeti és végső peremfeltételek az alábbiak, amelyekkel, ha a konstitutív egyenleteknek valódi tartalmat tudunk adni, meg lehet oldani a mérlegegyenleteket:

$Z = 0$	$Z = L$
$\theta = 0$	$\theta = L / u$
$X = X_0$	$X = X_f$
$S = S_0$	$S = S_f$

Ha összehasonlítjuk a szubsztrátkoncentráció, mikrobakoncentráció és a termékkoncentráció változását az időben az ideális csőreaktor és a folytonos üzemű kemosztát kevert reaktor esetén, azt állapíthatjuk meg, hogy az ideális kevert tartályreaktornál a kezdeti szubsztrátkoncentráció pillanatszerűen lecsökken a végső kilépési koncentrációra. A csőreaktor esetén ez nem így van, hanem a kezdeti koncentráció szép lassan egy folytonos függvény szerint csökken le a végső kilépési koncentrációra a cső hossza (az ábra szerint a karakterisztikus idő) függvényében. (4.128. ábra). Ezért olyan fermentációk esetén, amikor szubsztrátinhibíció lép fel, akkor nyilván a CSTR, ha pedig termék-inhibíció jellemzi a rendszert, akkor a PFR az ideális reaktormegoldás.

Az egyik alapvető probléma a tenyésztéses csőbioreaktorok alkalmazásánál a sejtpopuláció biztosítása a bioreaktor bemenetén, azaz a folyamatos újraoltás. Ez a reaktorból kilépő tenyészet részleges visszatáplálásával oldható meg.



4.128. ábra: Szubsztrát- és termékkoncentráció-változás CSTR és PFR rendszerben

A töltött oszlopreaktoroknak elsősorban a rögzített enzimes technológiák esetében van jelentősége, és ez ráadásul folyamatosan növekszik. Fermentációs rendszerek esetében például csak a szennyvíztisztítás területén találunk, illetve bizonyos rögzített sejtes átalakítások esetén. *Ilyen értelemben az itt következők csak részben képezik ennek a főfejezetnek a tárgyát, az enzimes reaktorokhoz is értelemszerűen rendelhetők lennének.*

Értelemszerű, hogy a töltött ágyas reaktoroknál a fluidum tengely menti áramlási sebessége nagymértékben függ a töltet minőségétől és attól, hogy az egyes töltetselemek között mekkora szabad tér áll rendelkezésre az áramláshoz. Így a töltött oszlopoknál az áramlási sebesség nagyobb lesz, mint az „üres” csőreaktoroknál. A töltött csőre, illetve oszlopra felírhatunk egy ε hézagterefogat-tényezőt, amely definíció szerint:

$$\varepsilon = \frac{\text{szabad reaktortérfogat}}{\text{teljes reaktortérfogat}} = 1 - \frac{\text{teljes részecsketérfogat}}{\text{teljes reaktortérfogat}}$$

Definiálhatjuk a v_i hézagközötti fluidumsebességet is, ahol a V/L nem más, mint az oszlop keresztmetszete, ekkor

$$v_i = \frac{F}{\varepsilon \cdot \frac{V}{L}} \quad (4.355)$$

Definiálhatjuk továbbá a τ tartózkodási időt, amelyben viszont V/F a lineáris lésebességet jelenti:

$$\tau = \varepsilon \cdot \frac{V}{F} \quad (4.356)$$

Az ε jellemző értékei immobilizált sejtek, gömbölyű hordozók esetén 0,4 körüli. Oldott enzim esetén ugyanez az érték 1. Ezek után feltételezve, hogy egy rögzített enzimes rendszert vizsgálunk, és az enzim követi a Michaelis–Menten-kinetikát, felírható a töltött oszlopra a reakció sebessége:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot S_i}{K_m + S_i}, \quad (4.357)$$

ahol S_i : a lokális szubsztrátkoncentráció valamely Z helyen,
 v_{\max} : a maximális reakciósebesség egységnyi katalizátor-térfogatra vonatkoztatva,
 v : a reakciósebesség egységnyi katalizátor-térfogatra vonatkoztatva,
 K_m : Michaelis–Menten-állandó.

A σ szubsztrátkonverzió és V_{\max} ebben az esetben (vö. a 2.71 sz. egyenlettel):

$$\delta = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (4.358)$$

$$V_{\max} = \frac{v_{\max}(1 - \varepsilon)}{\varepsilon}$$

Egy adott konverzió eléréséhez szükséges tartózkodási idő tehát:

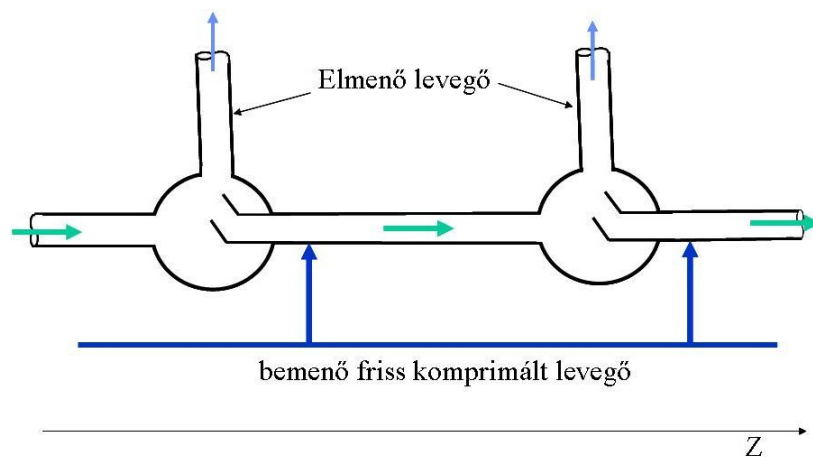
$$\frac{1}{D} = \frac{\delta(K_M + S_0(1 - \delta))}{V_{\max}(1 - \delta)} \quad (4.359)$$

Fermentációs rendszerben természetesen (4.357) helyett a megfelelő konstitutív egyenletekből kell kiindulni.

Az aerob rendszerekben a dugószerű áramlás létrehozásának bonyolultsága miatt egy $N_{eq} \geq 5$ elemes CSTR kaszkád rendszerrel is közelíthetjük a dugószerű áramlási tulajdonságokat.

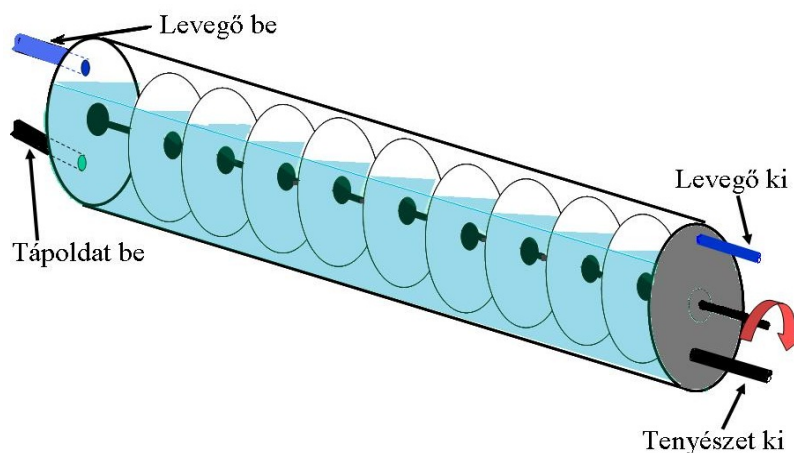
Az alábbiakban néhány csőreakortípust mutatunk be vázlatosan.

A folyókban vagy hosszú nyitott csatornákban (a szennyvízkezelési technológiák oxidáló tavai vagy csatornái) fellépő áramlás analógiájára egyszerű csőtekercecset vagy spirális csöveket alkalmaznak. Például bizonyos söripari technológiákban a nagy konverzió és a jó minőség elérése érdekében az élesztővel érintkezés helyén kívánatos sörcefregradientt hozták így létre. Néhol döntött (emelkedő) csöveket is alkalmaznak. Ezt az egyszerű csőrendszert némileg bonyolultabb változatában, a gázvezetőekkel ellátott csőreaktor mutatja a 4.129. ábra, amelyet élesztő termelésére használtak. A rendszerbe a levegőt vagy oxigént injektorokkal vagy venturi csöveken keresztül juttatják be minden szekció elejénél (ilyen értelemben ez egy jet reaktor), míg a CO_2 -ot és az el nem használt oxigént légeltávolító szivattyúkkal veszik el. A turbulens áramlást a csőrendszer hosszúsága (kb. 250m) biztosítja.



4.129. ábra: Gázvezetőekkel ellátott levegőztetett csőreaktor

Szennyvíz aerob kezelésre fejlesztették ki a biofilmmel működő „biodisc” reaktort. A készülék egy sor egymáshoz közel elhelyezett tárcsát tartalmaz, amelyeket közvetlenül a folyadék felszíne felett egy tengelyhez erősítettek. Így a biológiai iszap egységnyi területe felváltva merül alá a folyadékba a tápanyagok felvételéhez, és emelkedik ki a légtérbe felvett komponensek oxidálásához (4.130. ábra).



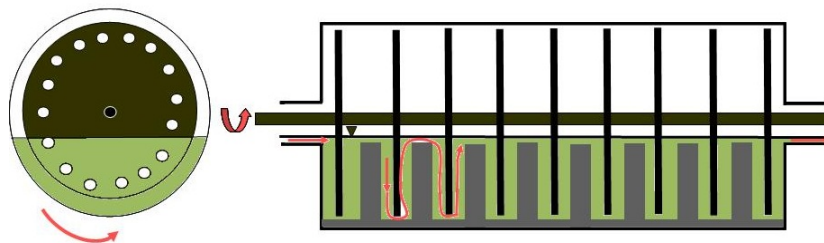
4.130. ábra: „Biodisc” csőreaktor

Ezeket a forgó tárcsás csőreaktorokat nagyon régen alkalmazzák az iparban. Különböző cégek gyártották, különböző névvel, mint például RBC (rotating biological reactor), RBS (rotating biological surface) stb.

Néhány tipikus adatot az alábbiakban adunk meg egy ipari berendezésre, hogy fogalmat alkothassunk egy ilyen ipari berendezés méreteiről:

Fordulatszám: 2–5 min⁻¹
 Tárcsaátmérő: 1,72 m
 Térfogat: 3,65 m³
 Töltött térfogat: 1,58 m³
 Összes tárcsafelület: 414 m²
 Mikroba által képzett film vastagsága: 0,3–1,6 mm

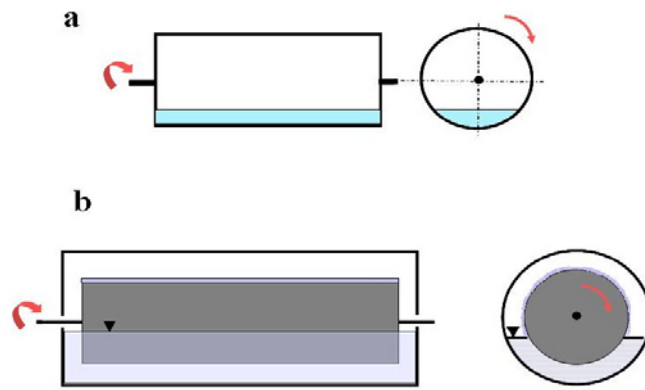
Ehhez hasonló kivitelű reaktor a biofilm nélküli, fonalagomba-fermentációk megvalósítására alkalmas ún. többkéscs reaktor (*Multiple Blade Horizontal Reactor – MBHR*) (4.131. ábra). A cső kilenc hengeres rekeszből áll, amelyek a végüknél kapcsolódnak össze, de amelyek a szomszédaitól egy-egy tányérral vannak elválasztva. Az elválasztó tányérok felső részén egy-egy túlfolyó nyílás van. A fermentor minden egyes rekeszében függőlegesen forognak a tengelyre rögzített lyuggatott tárcsák (a „késcs”), amelyek egyszersmind a terelőlemezek. A forgó késcs és a tányérok kényszeráramlást és megfelelő keveredést hoznak létre és csökkentik a lerakódások mértékét.



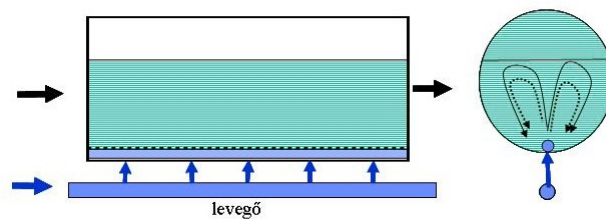
4.131. ábra: MBHR csőreaktor

A következő, 4.132a. ábrán bemutatott első reaktor a vízszintes forgóreaktor (*Horizontal Rotary Reactor – HRR*), amely terelőlemez nélküli forgódobbal rendelkezik, melyet eredetileg az oxigénátadási sebesség pontos mérésére terveztek. A HRR-t a BIOENGINEERING AG (Svájc) fejlesztette ki és *rotaschon* reaktor-nak is nevezik. Az ábra másik reaktorában (b) egy forgó henger ragadja fel a folyadékot, és vékony film alakjában keni el, ez a „vékonyréteges reaktor” (*Thin-Layer Turbular Reactor*), amelyet Danckwerts a folyadékmegújulási elméletének igazolására használt. Ennek szintén volt, illetve lehet biotechnológiai alkalmazása, mivel itt csak kis habzás tapasztalható. Ezeknek további változatai is elterjedtek, amelyekben mechanikus elemekkel segítik elő az oxigénátadást.

A 4.132. ábrán látható pneumatikusan levegőztetett csőreaktor a biológiai szennyvíztisztításhoz tervezték. Az ilyen reaktoroknak speciális tulajdonsága, hogy nincsenek benne mechanikus alkatrészek, és hogy a levegőt vagy oxigént a reaktor teljes hosszán adagolják. Ennek köszönhetően a levegő/oxigén mennyiségét a fogyasztásnak megfelelően lehet beállítani, amivel az oxigénlimit elkerülhető.



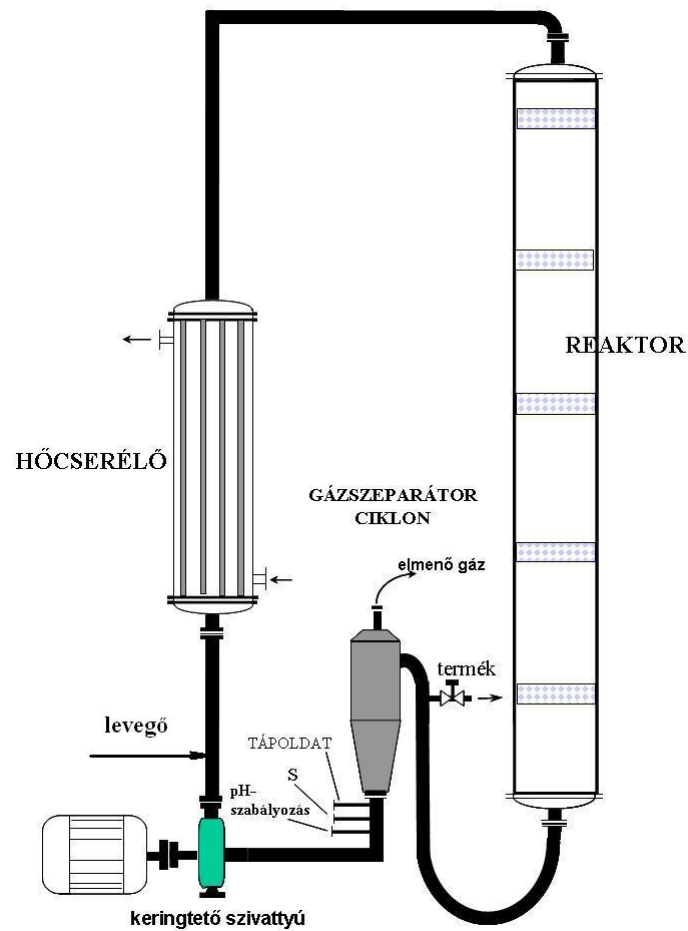
4.132. ábra: Vízszintes forgó (a) és vékonyréteges (b) csőreaktor



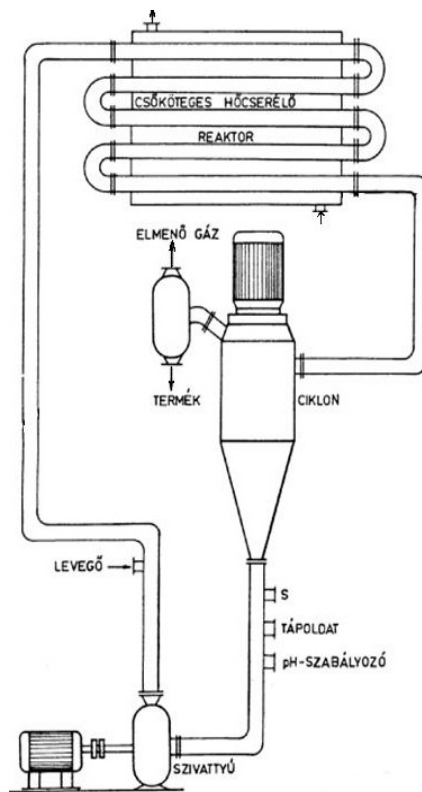
4.133. ábra: Pneumatikusan levegőztetett vízszintes csőreaktor

A hurokreaktorok és egyben csőreaktorok egészen speciális, csak kísérleti célokra megvalósult, igen intenzív oxigénátadást biztosító példáját mutatja be a 4.134. ábra, amelyen igen nagy $H_L:D_T$ arányú csőreaktor (*Tubular Loop Reactor – TLR*) látható, amelyben szitatányérok biztosítják a gáz/folyadék diszperzió megújítását. Egyben jet hurokreaktor is. Az 50 l-es berendezésben a fermentlevet centrifugálszivattyú cirkuláltatja. A levegőbevezetés a szivattyú után elhelyezett fűvókán történik, a hőelvonás pedig a csőköteges hőcserélőben. A centrifugálszivattyúba ciklonban buborékmentesített fermentlé kerül. E berendezésben 20–40 kgO₂/m³h oxigén- abszorpció-sebességet sikerült elérni. Úgy találták, hogy a hagyományos STR-hoz hasonlóan viselkedik, ha szakaszos technikával üzemeltetik. A TLR az aerob rendszerekben közelíti a dugószerű áramlást az egy ciklus alatt rendelkezésre álló levegő jobb kihasználásával 22 m-es csőhossz esetén kb. 2–3 m/s-os folyadékáramlási sebesség mellett. Egyértelmű, hogy egy ilyen recirkuláltatott reaktort CSTR-nek kell tekintenünk a folyadékfázisban lévő szubsztrátok szempontjából, ha a visszaforgatási arány magas.

A 4.135. ábrán egy hasonló csőreaktor látható, amelynek az az érdekessége, hogy a reaktorcső maga a hőcserélő is. Ebből is csak nagylaboratóriumi léptékű 34 literes készülék született, amelyben azonban igen magas 30–50 kg O₂/m³h OTR-értékeket tapasztaltak.



4.134. ábra: Csőreaktor (JLR), amely hurokreaktor is egyben



4.135. ábra: Csőreaktor, hurokreaktor (JLR) speciális hőcserélővel

4.6.2.3. Aerob bioreaktorok összehasonlítása

Amint a fejezet bevezetőjében említettük, a rendkívül sokféle levegőztetési rendszer csoportosítása és összehasonlítása nehéz feladat. Az összehasonlítás gátja elsősorban az, hogy kevés jellemző adat áll rendelkezésre, valamint az egyes hozzáférhető adatokból sem derül ki mindig, hogy a jellemző értékeket milyen körülmények között határozták meg. Mégis legalább tájékoztatás céljából érdemesnek tartottunk néhány összehasonlító táblázatot e helyütt közölni.

A 61. táblázat néhány reaktortípus gázsebesség, fajlagos anyagátadási felület és gázvisszatartási értékeire nyújt tájékoztatást. A 62. táblázatban a méretekre, a $K_L a$ és OTR értékére, valamint az energiaigényre és a fermentálé viszkozitástartományára kaphatunk felvilágosítást, míg a 63. táblázat egy sor bioreaktor energiafajlagosát mutatja be. Az egyes reaktorneveknél előforduló többféle, esetleg nagyságrendjében is különböző adat is azt jelzi, hogy egyrészt a típusnév jelenthet különböző tényleges reaktort is, ill. egy reaktor esetén a számbavett adatok függenek a meghatározás, az üzemieltetés körülményeitől.

4.38. táblázat: Gáz/folyadék érintkeztetők (aerob bioreaktorok) jellemzői

LEVEGŐZTETÉS TÍPUSA	FERMENTORTÍPUS	GÁZFÁZIS	GÁZ-SEBESSÉG ms^{-1}	a m^{-1}	H_O %
lyuggatott tányér	Pressure Cycle	diszperz	0,6	50	50–90
töltött oszlop	csepegtetőtestes (szennyvíztisztítás)	folytonos	0,9	16	90
buborékkolonna	-	diszperz	0,02	7	8
STR	-	diszperz	0,06	25	15

4.39. táblázat: Aerob bioreaktorok összehasonlítása

TÍPUS	μ Pa.s	Mechanikus teljesítmény-bevitel kW/m^3	Teljesítmény-bevitel levegővel kW/m^3	$K_L a$ h^{-1}	OTR $\text{kg/m}^3\text{h}$	V_{\max} m^3
STR (flat blade)	>2	2–5	4,5	200	3	450
STR (turbina)	<2	3	(1)	720	5	80–160
Levegőztetett tartály kerülővezetékekkel		(1)	3	2–300	6	400
Buborékkolonna			2,5 5 1	160 400 3–4000	6 6	500
Pressure Cycle			5	400	8 5–15	2300
Merülőszugaras	<0,1	3,5	1	600	4,5–12	300
Szitatányéros			3,5	300–1000	5	80
JLR	<0,1	1,5	3,5	700	8	200
JLR (mammutszivattyú)	<0,1		3,5	350	7	400
JLR (csőreaktor)					30–50	

4.6.3. Újabb tendenciák a bioreaktorok területén

Az előző alfejezetekben megismert bioreaktorok – és ez különösen a klasszikus kevert-levegőztetett fermentorok esetében igaz – uralták a biotechnológiai kutatás és az ipari termelés területét az elmúlt 50–60 évben. Ma azonban újabb tendenciák észlelhetők ezen a területen is, amelyekre az jellemző, hogy az alkalmazott méretek egyre kisebbek (a kutatóreaktorok területén), valamint elterjedtek az eldobható, egyszer használatos reaktorrendszerek.

Mint minden területen, a bioreaktorok területén is a miniatürizálás az egyik tetten érhető tendencia. Ennek szükségességét a rendkívül rohamosan fejlődő törzsfeljesztési technikák, illetve a biokatalizátorok tömeges és gyors első szkriningjének (ez egy technológia kifejlesztésének első lépcsője) igénye vetette fel. Százával és ezrével kell vizsgálni törzseket minél gyorsabban a jobb termelés, illetve a tenyésztési körülmények első durva optimalítása céljából. Ezeket HTP (high through put), azaz nagy áteresztőképességű módszereknek nevezzük.

Eddig a legkisebb tenyésztési méretnek a rázott lombikos technika bizonyult. Ennek nagy hátránya, hogy jelentősen eltérnek benne a tenyésztési körülmények a nagyobb reaktorokéitól. Így rendszerint sokkal kisebb például az oxigénátadás sebessége, és így gyakran oxigénlimit alakul ki. Minél kevesebb azonban a hasznos térfogata egy rázott lombiknak, annál jobb lesz az oxigénátadás. A legnagyobb $K_L a$ -t rázott lombikban 50 ml-es léptékben mérték 560 h^{-1} értékkel, amikor 450 min^{-1} -es rázatási sebességet alkalmaztak, és a létérfogat mindössze 2 ml volt (!). További hátrány, hogy rázott lombikban csak szakaszos üzemmód lehetséges, és a mintavételezés a tenyészet megzavarásával jár. Mára kialakítottak 16 párhuzamosan működő rázott lombikból álló „műszerezett” rendszert, amelyben rátáplálásos szakaszos tenyésztést pH-szabályozással meg lehetett valósítani úgy, hogy a pH-elektrodákat be lehetett szerelni a rázott lombikba. Ez azonban körülbelül a maximuma, amit ezzel a tenyésztési technikával és csak korlátozott párhuzamos (16) egyidejű alkalmazásával el lehet érni.

A modern mikrotiter lemezes technikával azonban szinte korlátlanra vált az egyidejűleg igen kis léptékben futtatható kísérletek száma, így megvalósulhatott a htp-módszerek elterjedése.

Különböző, 24, 48 vagy akár 96 lyukú mikrotiter lemezeket használnak ma már mikrobák tenyésztésére. Ezeket is ráztatják (mint a rázott lombikokat), azonban még nagy sebességnél és kilendülésnél is csak kis tölcser alakul ki (a lyukakban lévő folyadék nagy felületi feszültsége miatt), ami gátja a jó oxigénátadásnak. 96 lyukú mikrotiter lemezzel maximum $144 \text{ h}^{-1} K_L a$ érték érhető el, $300\text{--}1000 \text{ min}^{-1}$ rázógépfordulatszám-tartományban. Ezért kialakítottak ún. mély lyukú lemezeket, mégpedig szögletes falúakat (azaz egy kis hasáb a bioreaktor) az áramlás megtörése és a megengedhető fordulatszám növelése céljából. Ezekben $800 \text{ h}^{-1} K_L a$ -t is elértek, ami igen jó oxigénátadást jelent.

Az oxigénátadáson kívül a nagy felület/térfogat arány miatti bepárlódás is gondot okoz, ezért a lemezeket befedik az oxigénre áteresztő, de a párákra nem áteresztő fóliával.

A pH- és DO-mérés kérdését is megoldották fluoreszcens szenzoroknak a lyukak fenekére történő rögzítésével (lásd a 4.8. fejezetet). Ez viszont új problémát vetett fel: csak lassabban lehetett a ráztatást végezni a fotométer miatt, így romlott az oxigénellátás. Ezt úgy oldották meg, hogy a fotométer is a rázógépre van szerelve, annak forgásával együtt forog. Továbbra is megoldatlan a szubsztrátok tenyésztés közben történő adagolása ebben a tenyésztési technikában.

Más megközelítésként az eddig megismert bioreaktorok tényleges lekicsinyítése eredményeként kifejlesztettek igazi mini kevert levegőztetett reaktorokat is. Egy ilyen például a 16 mm átmérővel rendelkező minifermentor, amelyben egy tengelyen három 7 mm átmérőjű egyenes lapátú nyitott turbinakeverő van, amelyet akár $15\,000 \text{ min}^{-1}$ fordulatszámú motorral hajtanak meg. Ebben csak a folyadék felületéről történő levegőbeoldódással csak 36, de egy miniatűr levegőelosztón keresztüli 1 vvm -es levegőztetéssel már $400 \text{ h}^{-1} K_L a$ értéket is elértek.

A törekvés ezekkel a mini reaktorokkal az, hogy minél nagyobb számú ilyen (és ehhez hasonló) reaktor párhuzamosan működtetése legyen megvalósítható, mégpedig jó levegőztetéssel, jó műszerezettséggel, és a tenyésztés közben szükséges adagolási lehetőségek megoldásával. Egy ilyen, 48 db tíz egynéhány milliliteres reaktort tartalmazó blokk képe látható a 4.136. ábrán. Az ilyen műszerezett mini reaktorok már alkalmasak lehetnek a technológiafejlesztés második lépcsőjének, az eljárás optimalítása (pl. tápoldat optimalítása) sorozatkísérleteinek megvalósítására.



4.136. ábra: Minifermentor blokk folyadékkezelő automatikával (robot)

A miniaturizálás mellett napjainkban jellemző másik bioreaktor-fejlesztési trend az eldobható, egyszer használatos bioreaktorok elterjedése. Ma már a kereskedelemben kapható egy sor különböző elven működő egyszer használatos bioreaktor, akár néhány száz literes léptékig is, amelyeknek közös vonása, hogy a reaktor maga egy műanyag „zsák”, amelynek levegőztetése, kevertetése a legkülönbözőbb módokon valósulhat meg. Így vannak ún. hullámkeveredésű (wave agitated) rendszerek, de vannak eldobható kevert/levegőztetett és air lift reaktorok is. Ezeket elsősorban emlős sejtek tenyésztésének céljára fejlesztették ki, ezért e jegyzet kereteiben részletesen nem foglalkozunk velük.

Megjegyezzük, hogy tulajdonképpen ebbe a kategóriába kell sorolnunk az üreges szál (hollow fiber) reaktorokat is, amelyeket alapvetően enzimes, de sokszor sejtes technológiákban is felhasználnak.

4.7. A sterilizálás és dezinficiálás műveletei

4.7.1. Bevezetés

A sterilizálás az egyik legfontosabb művelet minden biotechnológiai eljárás során, és a hétköznapi élet egy sor területén is jelentőséggel bír: az élelmiszerek egy részének csírámentességét (tej, sör, bor stb.), a gyógyszerkészítmények és gyógyászati eszközök sterilitását (injekciók, infúziók, protézisek, oxigén stb.), az egyes kozmetikai készítmények és az ivóvíz csírátlantítását, a szennyvíztisztítás utáni tisztított víz fertőzőanyag-mentesítését, és úgyszintén egy biotechnológia végső előntendő hulladékainak és vizeinek csírámentességét különböző sterilizációs eljárásokkal biztosítjuk. Ugyanakkor a fermentációs tápoldatok oltás előtti élőcsíra-mentesítése az egyik legfontosabb előkészítő művelete a fermentációs alapanyagoknak. Biztonságos végrehajtása legalább olyan fontos, mint az optimális mikrobanövekedés és termékképződés biztosítása vagy a termék hatékony kinyerése. Egy-egy rosszul mikrobamentesített tápoldatsarzs mind kis léptékben (kutatás-időveszteség), mind nagy léptékű ipari fermentáció esetén (időveszteség, anyagveszteség, gazdasági kár) tetemes veszteséget okoz.

Mínthogy tárgyalásunk a biotechnológiai eljárásokra irányul, a sterilizálás műveletét a tápoldat sterilizálásán keresztül, valamint a bioreaktorok steril üzeme néhány aspektusának megvilágításán keresztül mutatjuk be, és végül kitérünk az aszeptikus üzemelést lehetővé tevő néhány dezinficiálási módszer ismertetésére is. Nyomatékosan hangsúlyozzuk azonban, hogy az alább ismertetettek nemcsak a fermentációk, hanem minden terület sterilizációs eljárásainál érvényesek és használható ismeretek (élelmiszerek, kozmetikumok stb.).

Csírámentesítésre elvileg a következő módszerek használhatók:

fizikai módszerek:

- mechanikai módszerek, szűrés (gázok és folyadékok csírátlantására)
- elektromágneses besugárzás: UV, röntgen és gammasugárzás (helyiségek és fluidumok csírátlantására)
- hőhatás;

kémiai módszerek: dezinficiálás.

A kérdéskörrel kapcsolatban szükséges három alapfogalom tisztázása. **Sterilizésnek** nevezzük az adott rendszerben lévő (fertőző) mikroorganizmusok elpusztítását. Ennek a definíciónak a fenti módszer-felsorolás minden eleme eleget tesz, kivéve a szűrést, mert az csupán eltávolítja a mikrobákat, de nem pusztítja el, a szűréssel történő kezeléseket ennek ellenére rendszerint sterilizésnek nevezzük (levegő sterilizése stb). Ugyanígy kis kiegészítésre szorul a dezinficiálás fogalma, hiszen (mint majd látjuk) nemcsak mikrobicid, azaz ölé hatású szereket, hanem például mikrobiszta-tikumokat (szaporodást gátló szereket) is alkalmazunk.

Amikor sterilizésről beszélünk, az **aszzeptikus** fogalmát is érinteni kell. Ez a csíramentes állapotr utal, annak fenntartása a célja. A mikrobák távoltartása a rendszertől jelenti az aszeptikus, steril működést.

A fogalomkör harmadik eleme az **elszigetelés** vagy izolálás, **kontéinment**⁹³. Ez azt jelenti, hogy a működtetett biotechnológiai rendszerben felhasznált mikrobákat benn tartjuk a rendszerünkben, nem engedjük, hogy azok a környezetbe kikerüljenek. Ennek fokozott jelentősége van akkor, ha patogén mikrobákkal dolgozunk, vagy ha génmanipulált organizmust tenyésztünk. Ilyen esetekben a biológiai biztonság igen szigorú előírásait kell betartani.⁹⁴

A fentiekben felsorolt eljárások közül valamennyit kisebb-nagyobb mértékben, különböző esetekben (laboratóriumi léptékben, élelmiszeriparban) valóban alkalmazzák csíramentesítési célra, a fermentációs iparban tápoldat-csíramentesítés céljára azonban szinte kizárólag a hővel történő élő sejt elpusztítást, a hősterilizést használják fel. A továbbiakban sterilizés alatt ennek megfelelően a hővel történő csíramentesítést értjük és azzal foglalkozunk részletesen.

4.7.2. **Mikrobák hőpusztulásának törvényszerűségei**

Ismert tény, hogy a különböző fajokhoz tartozó mikroorganizmusok számára növekedésük szempontjából egy-egy széles hőmérséklet-tartomány jelent lehetőséget és egy szűk hőfokintervallum-optimumot (4.137. ábra). Az optimum hőmérséklet felett a generációs idő nő, a mikroba egyre kedvezőtlenebb hőmérsékleti viszonyok közé kerül. Az ábra szerinti $\mu=0$ pontoknak megfelelő hőmérséklet felett előbb-utóbb a pusztulás is elkezdődik, és még a termotoleráns mikrobákról is elmondható, hogy 80–90 °C-on már mérhető sebességgel pusztulnak. E hőhatásra bekövetkező pusztulás kiváltó oka egy vagy több, az életműködéshez elengedhetetlen enzimfehérje hődenaturálódása, illetve a citoplazmamembrán és a többi membránszerkezet irreverzibilis dezintegrálódása, hődenaturálódása.

A hőpusztulással kapcsolatban néhány általános megállapítás megjegyzésre érdemes:

- A hőérzékenység függ a mikroba fajtájától (lásd 4.138. ábra).
- Egy speciesz esetén a vegetatív sejtek sokkal érzékenyebbek a hőhatásra, mint a „kondenzált létformájú” (csökkent szabad víztartalmú)⁹⁵ baktériumspórák.
- A hőérzékenység adott speciesz vegetatív formája esetén több tényezőtől függ, például az adott sejt előéletétől, korától: az exponenciális növekedési fázis sejtei érzékenyebbek a stacionárius fázis sejteinél.
- Valamennyi sejt szenzitívebb nedves, mint száraz hővel szemben.
- A hőérzékenység (a hőpusztulás) nő a hőmérséklet emelkedésével,
- A hőérzékenység függ a mikrobasetet hordozó közeg (tápoldat, porszem, edény falának felülete) tulajdonságaitól, tápoldatok esetén a tápoldat pH-jától, viszkozitásától, ozmózisnyomásától, védőkolloidok jelenlététől.

⁹³ Az angolszász szakirodalom szakkifejezése: containment.

⁹⁴ Például: **OECD**-direktíva: Recombinant DNA Safety Considerations (1986)

EC Council Directive on the Contained use of GMOs (1990)

⁹⁵ Az endospórák hőreisztaenciáját megérthetjük, ha arra gondolunk, hogy a denaturáció az oldott fehérje konformációváltozása, azaz a molekula hőmozgása következtében előálló nem természetes konformáció kialakulása. Víztmentes, illetve csökkent víztartalmú esetben a molekula hőmozgása és így más konformáció létrejötte korlátozott.

Adott hőmérsékleten (és adott egyéb körülmények között) egy speciesz hőpusztulása elsőrendű kinetikát követ:

$$\frac{dN}{dt} = -kN, \quad (4.360)$$

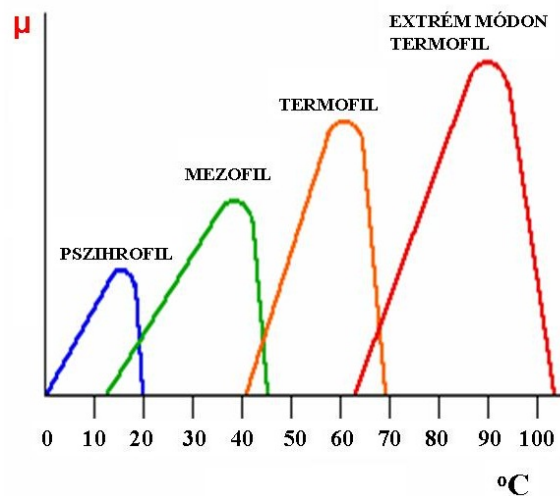
ahol N az élő csíraszám [db/cm^3], k az ún. hőpusztulási sebességi állandó [min^{-1}]⁹⁶.
Állandó k esetén (állandó hőmérsékleten) a (4.360) egyenlet integrálható:

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kt$$

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = \int_{N_0}^N d \ln N = - \int_0^t k dt \quad \rightarrow \quad \{ \quad (4.361, 4.362)$$

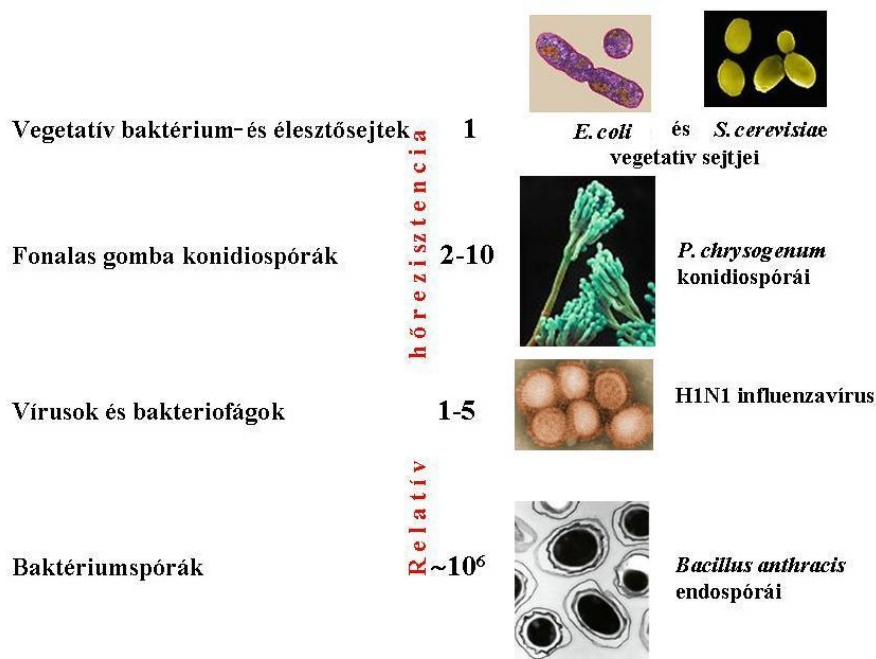
$$N = N_0 e^{-kt}$$

Ha tehát a túlélők számát a hőkezelési idő függvényében ábrázoljuk, egy exponenciális görbét nyerünk, amely a 4.139. ábra szerint – megfelelő kísérleti módszer esetén – a hőpusztulási sebességi állandó értékének meghatározására is alkalmas. Vegyük észre, hogy a görbe aszimptotikusan közelíti meg az abszcisszát, tehát a zérus túlélő koncentrációt soha sem éri el.

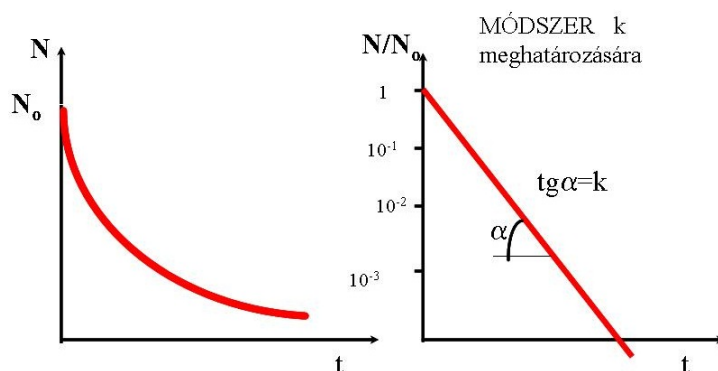


4.137. ábra: Mikrobák növekedéshőmérséklet-tartományai

⁹⁶ Thermal decay constant



4.138. ábra: Mikrobacsoportok relatív hőtűrő képessége



4.139. ábra: A hőpusztulás exponenciális lefutása. A hőpusztulási sebességi állandó meghatározása

Mint említettük, a hőmérséklet növekedése növeli a mikrobák hőérzékenységet, s ez a hőpusztulás kinetikájában úgy nyilvánul meg, hogy k maga is a hőmérséklet függvénye (többek között).

E hőmérsékletfüggést az Arrhenius-egyenlettel írhatjuk le:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (4.363)$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

ahol A egy empirikus állandó,
 E_a a hőpusztulás látszólagos aktiválási energiája [KJ/mol]⁹⁷.

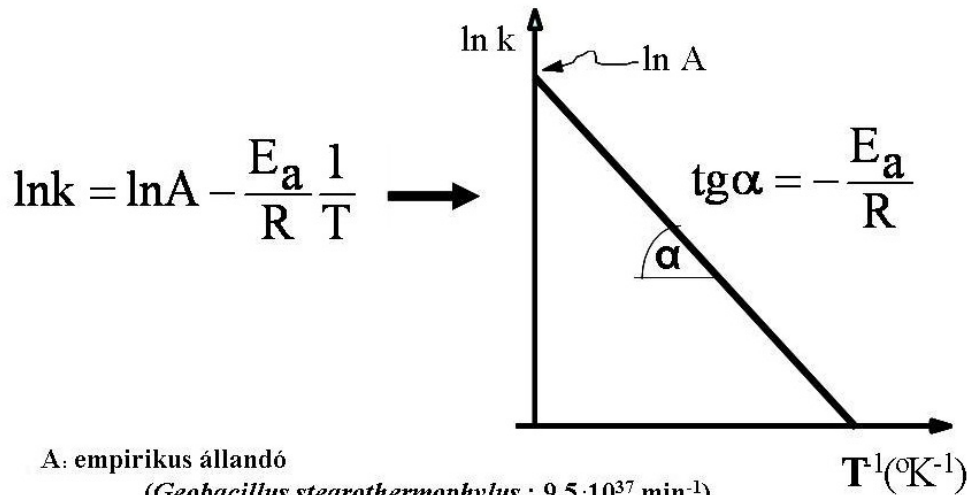
A (4.363) egyenlet a szokásos $\ln k - 1/T$ ábrázolásban egyenest ad, amelynek segítségével az állandói meghatározhatóak (4.140. ábra).

Néhány mikroorganizmus esetében a 4.7. táblázat szolgáltat a k hőpusztulási sebességi állandóra és az E_a látszólagos aktiválási energia értékeire tájékoztató adatokat. A 4.8. táblázat néhány táp-

⁹⁷ A KJ/mol mértékegység formalitás, nincs köze a 4.3.1. fejezetben tanult mikroba mol-hoz!

oldatkomponens hőhatásra végbemenő átalakulási, illetve bomlási reakciójának aktiválási energiáját közli, és ez felhívja a figyelmet arra, hogy sterilizálás során számolni kell a cukrok és N-tartalmú anyagok közötti reakciókkal, és főként néhány hőérzékeny vitamin, bioszanyag bomlásával is. Ezért érthető, hogy sterilizálási feladatoknál adott hőmérsékleten mindig a biztonságos, de minimális hőkezelési idő beállítása a cél.

Módszer az Arrhenius-egyenlet konstansainak meghatározására



A: empirikus állandó

(*Geobacillus stearothermophilus* : $9,5 \cdot 10^{37} \text{ min}^{-1}$)

E_a : hőpusztulás látszólagos aktiválási energiája [KJ/mol]

(*Geobacillus stearothermophilus* : 70 kcal/mol)

4.140. ábra: A hőpusztulási sebességi állandó hőfokfüggése Arrhenius szerint

Az Arrhenius-egyenlet alapján tehát, ha két hőmérsékleten ismerjük k értékeit, tetszőleges közbenső hőmérsékletre is ki lehet számítani azt. Vigyázni kell azonban minden extrapolációval, mivel sem A , sem E_a nem függetlenek a hőmérséklettől. Nagy hőfokintervallumban a 4.140. ábra görbéje emiatt elhajolhat. Vagyis nem minden esetben a 4.139. ábra szerinti ideális hőpusztulási görbét kapjuk, sokszor a k adott hőmérsékleten a kezelési időnek is függvénye. Az ideális esettől való eltéréseket a 4.141. ábrán szemléltetjük. A nem logaritmusos hőpusztulás magyarázatára sokféle próbálkozás történt. Értelmezték például baktériumspórák esetén a spóracsírázással, rossz mérési technikákkal, a pusztulás történéseinek egymásutánosságával.

Utóbbi esetet a következő séma szemlélteti:



Vagyis a hőrezisztens spóra k_R sebességi állandóval jellemezhető folyamatban előbb szenzitív spórává alakul, majd k_{SZ} sebességű folyamatban pusztul el. A séma szerinti differenciálegyenletek a következőképpen írhatók fel, ha mindkét lépésre elsőrendű kinetikát tételezünk fel:

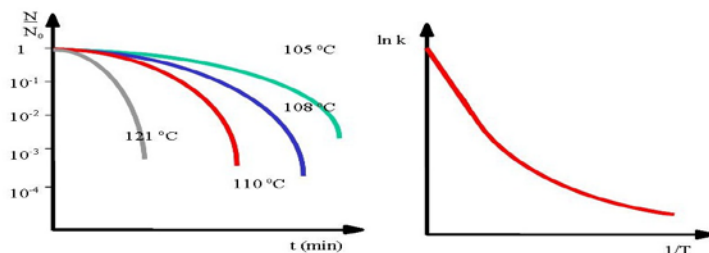
$$\frac{dN_R}{dt} = -k_R N_R \quad (4.364)$$

$$\frac{dN_{SZ}}{dt} = k_R N_R - k_{SZ} N_{SZ} \quad (4.365)$$

A (4.364, 4.365) egyenletrendszer megoldása a következő alakú:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{k_R}{k_R - k_{SZ}} \left[\exp(k_{SZ}t) - \frac{k_{SZ}}{k_R} \exp(-k_R t) \right], \quad (4.366)$$

amelyben $N = N_R + N_{SZ}$ bármely időben. Ez a modell sokszor jól magyarázza a 4.141. ábra szerinti N/N_0 -t görbék ideálistól való eltéréseit.



4.141. ábra: Eltérések az ideális hőpusztulási kinetikától

4.7. táblázat: Néhány mikroba hőpusztulásának Arrhenius-állandói

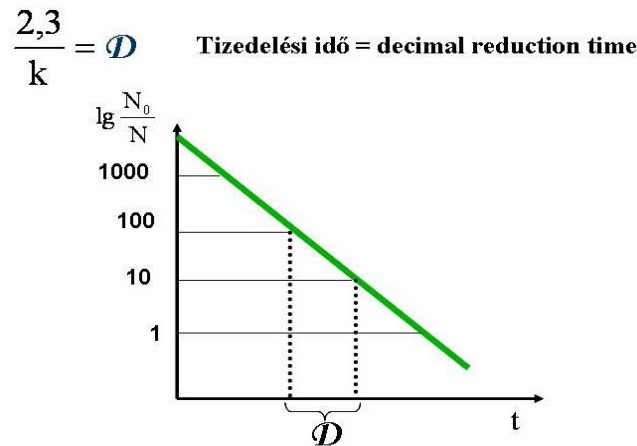
MIKROBA	T [°C]	k [min ⁻¹]	E _a [KJ/mol]
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetatív)	110	27	310
<i>Bacillus subtilis</i> (spórák)	121,1	3	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (spórák)	104	0,051	283
	125	6,06	283
	130	17,52	283
<i>Clostridium botulinum</i> (spórák)	104	0,42	344
Hemoglobin (hődenaturáció)	68	6,3·10 ⁻³	312

4.8. táblázat: Táploldatkomponensek hőbomlásának látszólagos aktiválási energiája [kJ/mol]

Szénhidrátok és fehérjék közötti reakció (Maillard-reakció)	130,6
B ₁ -vitamin bomlása	87,9
B ₂ -vitamin bomlása	98,8

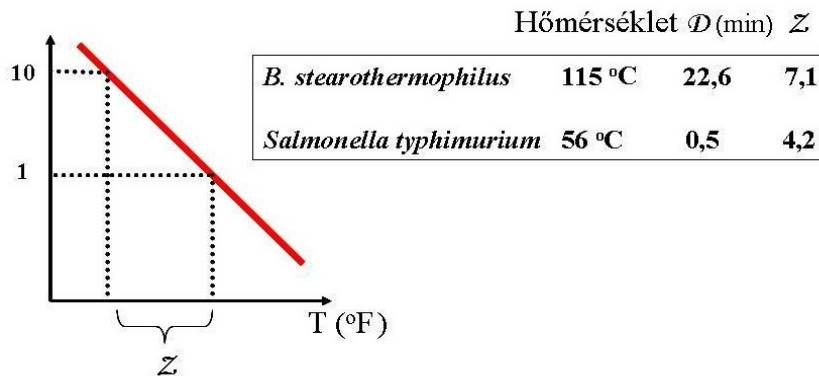
A hőpusztulási sebesség reciproka az átlagos élettartam. A tizedelési idő fogalmát a 4.141. ábra értelmezi: az az idő, ami alatt az élő sejtszám egy tizedére csökken.

Bigelow definiált egy z értéket, amit a 4.143. ábra magyaráz.



4.142. ábra: A tizedelési idő értelmezése

$$\lg \mathcal{D}_2 - \lg \mathcal{D}_1 = \frac{1}{Z} (T_1 - T_2) \quad \text{BIGELOW}$$



4.143. ábra: Bigelow módszerének értelmezése

4.7.3. A hőpusztulás valószínűségi értelmezése

Az előzőekben felvázolt kinetikai leírás nagyon nagy számú hőkezelendő mikrobaspórá esetén a hőpusztulás folyamatának helyes képét adja. Minél kisebb azonban a kiindulási csíraszám, annál nagyobb eltérések tapasztalhatók e megközelítéstől. Ennek oka az, hogy a hőpusztulás valójában egy olyan sztohasztikus folyamat, amelyben az egyedi csírák eltérően viselkednek, s a teljes populációt csak eloszlásfüggvényekkel lehet leírni.

Definíció: egy csíra élettartama alatt azt az adott hőfokon értelmezett időtartamot értjük, amely alatt a csíra még életben marad.

Minden sejt, baktériumspóra adott körülmények között jellemezhető egy élettartamértékkel, következésképpen egy populáció (spóraszuszpenzió) ezen élettartamok eloszlásával jellemezhető. Természetesen a populáció élettartam-eloszlását jellemezhetjük az átlagélettartammal is:

$$\bar{t} = \frac{1}{N_0} \sum_{i=1}^{\infty} N_i t_i \quad (4.367)$$

ahol: \bar{t} populáció átlagélettartama,
 N_0 az élő csírák kezdeti száma,
 N_i a t_i élettartamú csírák száma.

Könnyen belátható, hogy t reciproka megadja a populációt jellemző \bar{k} átlagos hőpusztulási sebességi állandót:

$$\frac{1}{t} = \bar{k} \quad (4.368)$$

Tekintsünk egy olyan hőpusztulási folyamatot, amelynél a sterilizáló edényben a hőmérséklet mindenütt azonos, növekedés nincs⁹⁸, az egyes csírák sorsa független a környezetükben levő többi csírától. Ilyen helyzetben, valószínűségszámítási megfontolások alapján levezethető, hogy annak valószínűsége, hogy adott t időpontban a túlélők száma éppen N (ahol $N = 0, 1, 2, \dots, N_0$), binomiális eloszlást követ, és a következőképpen fejezhető ki:

$$P_n(t) = \binom{N_0}{N} [p(t)]^N [1-p(t)]^{(N_0-N)} \quad (4.369)$$

ahol $p(t)$ annak a valószínűsége, hogy egy csíra az adott t időpontban még túlélő. A $p(t)$, felhasználva a \bar{k} sebességi állandót, kifejezhető $p(t) = e^{-\bar{k}t}$ formában. Ezt (4.369)-be helyettesítve a következő

$$P_N(t) = \frac{N_0!}{(N_0-N)!N!} (e^{-\bar{k}t})^N (1-e^{-\bar{k}t})^{(N_0-N)} \quad (4.370)$$

kifejezést nyerjük a $P_N(t)$ valószínűségekre.

A fentiek alapján mekkora annak a valószínűsége, hogy már valamennyi mikrobacejt elpusztult egy t időpontban? Vagyis $P_N(t)$ értékét keressük $N=0$ esetben. A keresett valószínűség (4.370) alapján:

$$P_0(t) = (1 - e^{-\bar{k}t})^{N_0} < 1, \quad (4.371)$$

vagyis (4.371) semmilyen t esetén sem 1, más szóval mindig 0-nál nagyobb annak a valószínűsége, hogy legalább egy túlélő csíra marad:

$$1 - P_0(t) = 1 - (1 - e^{-\bar{k}t})^{N_0} > 0 \quad (4.372)$$

Ha $N \gg 1$ (ami természetesen sterilizációs feladatoknál mindig igaz), akkor (4.372) közelítése az alábbi kifejezéssel történhet:

$$1 - P_0(t) \cong 1 - e^{-N} \quad (4.373)$$

amelyben $N = N_0 e^{-\bar{k}t}$.

Hangsúlyozzuk tehát, hogy tökéletes sterilizáció nem érhető el, még igen hosszú sterilizációs idő elteltével sem, amint az a (4.371–4.373) egyenletek alapján belátható. Így a sterilizációs feladatok megoldásánál, sterilizációs technológiák tervezésénél arra kell törekednünk, hogy a túlélés valószínűsége igen kicsiny legyen. A biotechnológiai iparokban általában az $1 - P_0(t) = 10^{-2} - 10^{-4}$ értékeket fogadják el a sterilizáció (vagy sterilitás) kritériumának.⁹⁹ Ha például $1 - P_0(t) = 10^{-3}$, ez azt

⁹⁸ Ami nyilvánvaló, hiszen valószínűleg 100 °C feletti hőmérsékleten vannak a sejtek. Ez a feltételezés csak a matematikai precizitás miatt szükséges.

⁹⁹ A gyógyászati iparokban ez a kritérium szigorúbb, általában $10^{-6} - 10^{-8}$, míg az élelmiszeriparban akár 10^{-12} is lehet.

jelenti, hogy $1-10^{-3}=0,999$ annak a valószínűsége, hogy valamennyi mikroba elpusztult, más szóval valószínű, hogy csak minden ezer sterilizációból egy nem sikerül, azaz túlélő(k) marad(nak) a rendszerben.

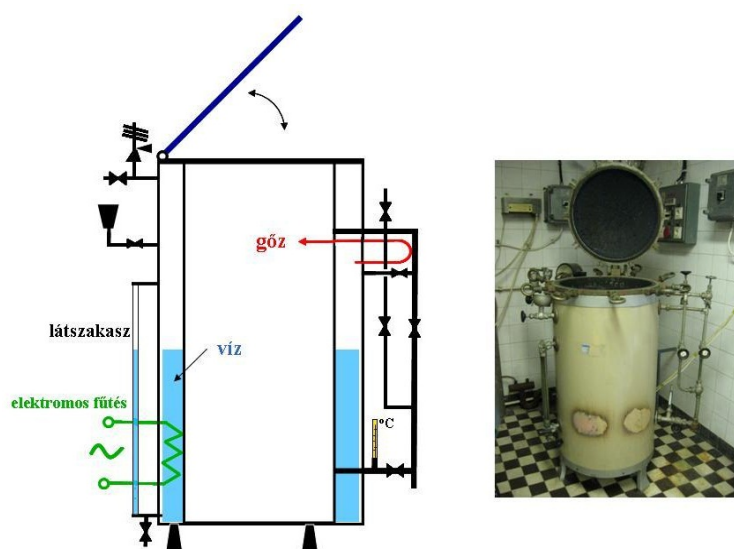
Vegyük tekintetbe továbbá, hogy

$$1 - P_0(t) = 1 - e^{-N_0 e^{-kt}} \approx N_0 e^{-kt} \cdot 10^0, \quad (4.374)$$

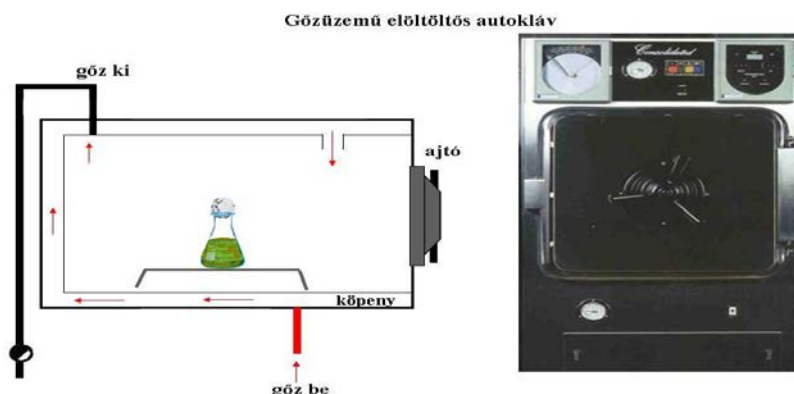
miszerint a sterilizálás kritériuma egyszerűsége a végső élő csíraszámot adja meg.

4.7.4. A sterilizálás technikai megvalósítása

Laboratóriumi léptékben a száraz hővel történő sterilizációt ún. hőlégsterilizátorokban (szárítószekrényekben) végzik $140-160\text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten. Ez a módszer alkalmazható száraz üvegáru, palackok, lombikok, pipetták stb., illetve fémárúk hősterilizálására. Nedves hővel ugyanezeket az eszközöket, illetve a kismennyiségű tápoldatokat és táptalajokat (kémcső, Petri-csésze, rázólabdik, laborfermentor stb.) autoklávokban gőzzel sterilizálják, általában $121-123\text{ }^\circ\text{C}$ -on, jellemzően 20–45 percig. Ilyen elektromos fűtésű laboratóriumi autoklávokat mutat be a 4.144. és 4.145. ábra.



4.144. ábra: Hagyományos laboratóriumi sterilizáló autokláv



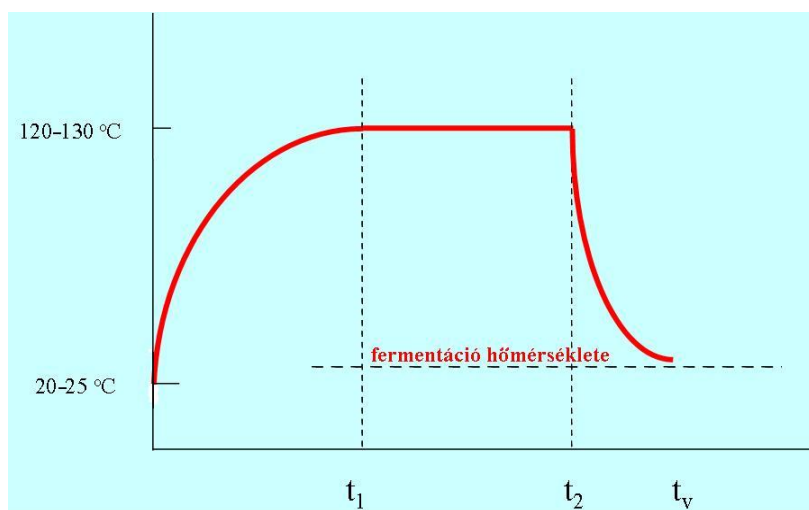
4.145. ábra: Modern laboratóriumi autokláv

¹⁰⁰ (4.374) a $e^{-x} \sim 1-x+\dots$ sorfejtés szerint közelíthető.

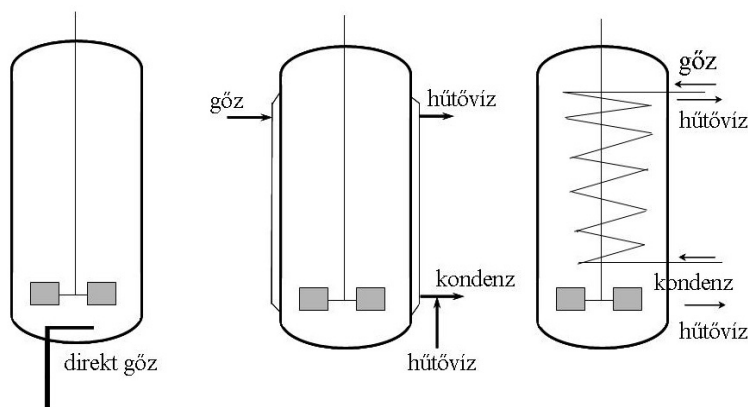
4.7.4.1. Fermentációs tápoldatok szakaszos sterilizációja

A hőpusztulás törvényszerűségeinek megismerése után foglalkozunk most a tápoldat-sterilizáció gyakorlati megvalósításával. A fermentációs tápoldatok sterilizálására a néhány tíz liter-néhány tíz köbméteres mérettartományban gyakorlatilag kizárólagosan a fermentorban *in situ* történő hősterilizációt alkalmazzák. Ekkor a tápoldatot magában a fermentorban készítik elő, majd felmelegítik a hősterilizáció hőfokára (hagyományosan 121, illetve 123 °C), a kívánt ideig ezen a hőmérsékleten tartják, majd lehűtik a fermentáció hőmérsékletére (4.146. ábra). A fűtés és hűtés megoldása a fermentor konstrukciójától függ, néhány példát a 4.147. ábra szemléltet.

Mivel a fűtés és hűtés időtartama összemérhető a hőtartás időtartamával (mindegyik függ a fermentor méretétől és a hőközlés-hőelvonás módjától, valamint a tápoldattól), ezért az ezen időtartamok alatti hőpusztulást is figyelembe kell vennünk a biztonságos, de minimális tartási idő meghatározásánál.



4.146. ábra: Hőbehatolási görbe szakaszos sterilizációnál



4.147. ábra: Szakaszos sterilizáció fűtési-hűtési megoldásai

A pusztulás mértékének kiváló jelzőszáma a kezdeti és végső csíraszám hányadosának logaritmusai. Ezért az egyes szakaszokban történt hőpusztulások a következők:

hőpusztulás a fűtés alatt:

$$\ln \frac{N_0}{N_1} = \int_{t_0}^{t_1} k dt = \nabla_f$$

hőpusztulás a hőntartás alatt:

$$\ln \frac{N_1}{N_2} = k_{\text{tartás}} \cdot (t_2 - t_1) = \nabla_{\text{tartás}}$$

hőpusztulás a hűtési szakasz alatt:

$$\ln \frac{N_2}{N_v} = \int_{t_2}^{t_v} k dt = \nabla_h$$

Az egyes szakaszokban történt hőpusztulások értelemszerűen, de matematikailag is nyilvánvalóan összegeződnek:

$$\nabla = \nabla_f + \nabla_{\text{tartás}} + \nabla_h$$

(4.375)

$$\ln \frac{N_0}{N_v} = \ln \left(\frac{N_0}{N_1} \cdot \frac{N_1}{N_2} \cdot \frac{N_2}{N_v} \right) = \ln \frac{N_0}{N_1} + \ln \frac{N_1}{N_2} + \ln \frac{N_2}{N_v}$$

A (4.375) egyenletek alapján bármiféle szakaszos sterilizációs problémát meg tudunk oldani, ehhez csupán a 4.146. ábra szerinti, az adott fermentorra, illetve tápoldatra érvényes hőbehatolási görbét, valamint a rendszerben előfordul(hat)ó legellenállóbb baktériumspóra hőpusztulási sebességi állandójának hőfokfüggését kell ismernünk. Szakaszos sterilizációnál a felfűtési, tartási és hűtési szakasz hozzájárulása a sterilizációhoz tipikusan a következő lehet egy ipari szakaszos sterilizációnál:

$$\frac{\nabla_f}{\nabla} = 0,2 \quad \frac{\nabla_{\text{tartás}}}{\nabla} = 0,75 \quad \frac{\nabla_h}{\nabla} = 0,05$$

Láthatóan valóban összemérhetők a fűtés, tartás és hűtés sterilizációhoz való hozzájárulásai, különösen a felfűtés alatti mikrobapusztulás számottevő.

4.7.4.2. Fermentációs tápoldatok folytonos sterilizációja

A fentiekben láttuk, hogy a szakaszos tápoldat-sterilizáció esetén a felfűtési és hűtési szakaszok összemérhető hosszúságúak a tartási szakasszal, a teljes sterilizációs ciklus hosszú időt, 60–180 percet vesz igénybe. A sterilizációhoz szükséges idő ráadásul nő a fermentortérfogat növekedésével, mivel a hőátadási viszonyok egyre romlanak. A fermentortérfogat az átmérővel köbösen növekszik, míg a palást felülete csak négyzetesen, s a fermentortérbe, illetve a palástra szerelt hőátadó felület sem növelhető minden határon túl. Van tehát egy fermentor-mérethatár, amely felett szakaszos tápoldat-sterilizáció egyáltalán nem képzelhető el, hiszen a hosszú felfűtési-tartási-hűtési idők a fermentorkihasználást nagyon lerontanák (kg termék/fermentor m³.év).

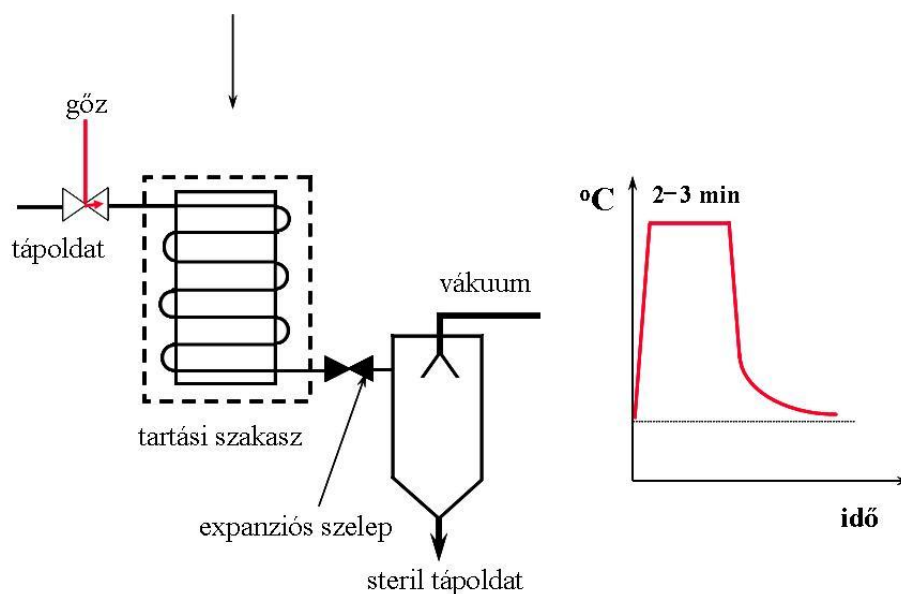
E problémák folytonos tápoldat-sterilizáció esetén kiküszöbölődnek, ráadásul a folytonos sterilizáció további előnyökkel is rendelkezik a szakaszos sterilizációval szemben:

- Nagyobb hőmérsékleten (130–150 °C) végezhető a rövidebb idejű sterilizáció, és ez növeli a sterilizáció biztonságát, és kíméletesebb a tápoldatkomponensek hőbomlása szempontjából,
- A folytonos folyamat reprodukálható, egyforma minőségű steril tápoldatot szolgáltat (ez bizonyítottan növeli a fermentációs hozamot),
- A rövidebb idő alatt kisebb mértékű a tápoldatkomponensek bomlása,
- Nem kell keverni a sterilizáció alatt, azaz a keverés energiaszükséglete kiesik a költségtényezők közül.
- Fehérjéket és cukrokat külön lehet sterilizálni, azaz a tápoldat barnulása elkerülhető.
- A folytonos sterilizáló berendezések és maga a művelet könnyen szabályozhatók, automatizálhatók.

Hozzáteesszük még, hogy a fermentációs folyamatok is – ahol lehet – a folytonosítás irányában fejlődnek, s nehezen elképzelhető egy folytonos fermentáció kiszolgálása steril tápoldattal szakaszos tápoldat-sterilizéssel.

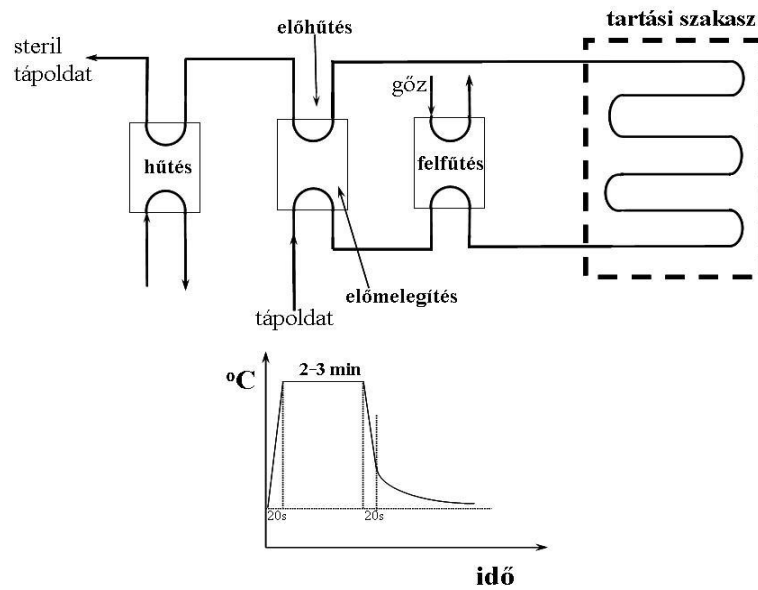
A legelterjedtebb folytonos tápoldat-steriliző berendezéseket a következő 4.148–4.151. ábrák mutatják. Jegyezzük meg, hogy ezen esetekben a fő különbségek a fűtési-hűtési szakasz hőcserélőinek megoldásában vannak, de minden esetben szükséges a megfelelő tartási szakasz beiktatása is.

A 4.148. ábrán látható rendszer a pillanathevítő-pillanathűtős folytonos steriliző megoldás. A tápoldatot előmelegítik, majd a pillanathevítőbe kerül, ami egy keverőszelep, amelybe direkt gőzt injektálnak, s ahol a tápoldat hőmérséklete szinte pillanatszerűen felemelkedik a sterilizési hőmérsékletre (130–140°C). A tápoldat ezután 2–3 percig a tartási szakasz szigetelt csőkégyóján halad keresztül, majd expanziós szelepen át a pillanathűtőbe kerül, ahol az expanzió során elpárolgó víz látens hője pillanatszerűen lehűti 80 °C körüli hőmérsékletre. A fermentáció hőfokára történő hűtés egyszerű hőcserélőben a hideg, nem steril tápoldattal történik.



4.148. ábra: Gőzinjektoros folytonos tápoldat-steriliző

A 4.149. ábra megoldása a *lemezes hőcserélős* folytonos steriliző berendezés, amely lényegében három lemezes hőcserélőből és a tartási szakasz csőkégyójából áll. Itt a fűtés indirekt módon, de szintén gőzzel történik, a másik két hőcserélő funkciója az előmelegítés és a lehűtés. Az itt bemutatott változat esetén is jellemző az energiatakarékos fűtés és hűtés és ezek rövid ideje (lásd a 4.148. ábra hőmérséklet-idő diagramját). A lemezes hőcserélők képe a 4.150. képen látható. Ez felépítése miatt nem a legkedvezőbb a fermentációs tápoldatoknál, mivel azokban rendszerint könnyen kiülepedő szilárd részek is vannak, amelyek a lemezelemek beömlési és kiömlési pontjain keletkező sebességváltozások miatt könnyen kiülepednek (az áramlás iránya lemezenként kétszer megváltozik) és eltömíthetik a lemezeket. Ez inkább a homogén fluidumok (víz, tej, sör stb.) sterilizése esetén a jó megoldás.

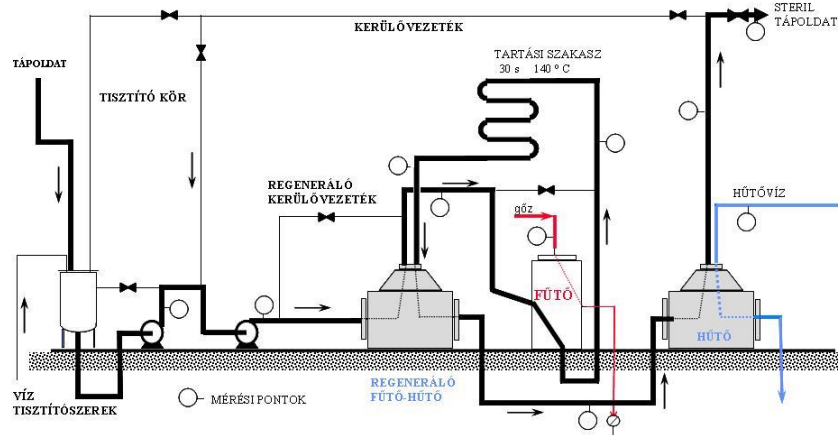


4.149. ábra: Lemezes hőcserélős folytonos tápoldat-sterilizáló

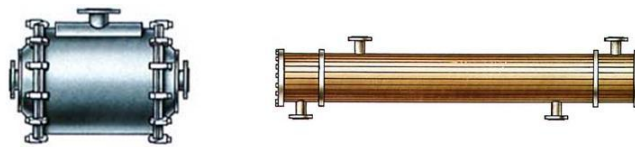


4.150. ábra: Lemezes hőcserélő

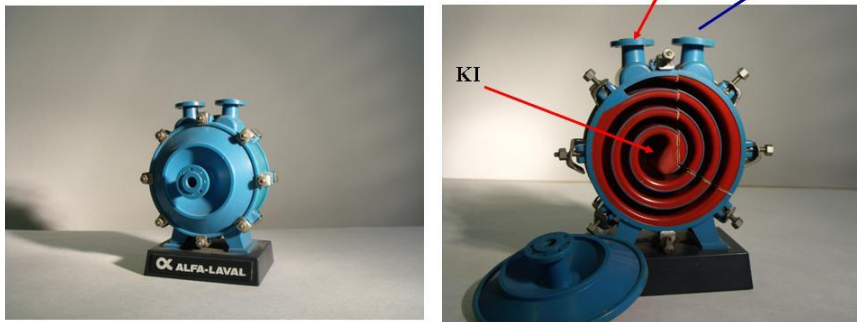
A 4.151. ábrán egy spirális hőcserélővel ellátott változat technológiai kapcsolását láthatjuk, a 4.152. ábra magát a spirális hőcserélőt mutatja, míg a 4.153. ábra egy üzemi szerelő állomás fényképe. Ezt azért dolgozták ki, mert e spirális hőcserélőkben törésmentes az áramlás, így biztonságosabb az üzemelés, sokkal kisebb a kiülepedés és eltömődés veszélye.



4.151. ábra: Spirálisöves hőcserélős folytonos tápoldat-sterilizáló kapcsolása



Különböző spirális hőcserélők



Spirális hőcserélő modellje és a szétszerelt modell

4.152. ábra: Spirálisöves hőcserélők



4.153. ábra: Spirálisöves folytonos üzemi sterilizáló állomás

A bemutatott megoldásoknál közölt hőmérséklet-idő diagramokból nyilvánvaló, hogy a felfűtési-lehűtési szakaszokban töltött idő csak 1-2%-a a tartási szakaszban való tartózkodási időnek, ezért folytonos tápoldat-sterilizálás esetén csupán a tartási szakaszban történő hőpusztulást kell figyelembe venni:

$$\ln \frac{N_0}{N_v} = k\Delta t = k \frac{L}{\frac{w}{q}} \quad (4.376)$$

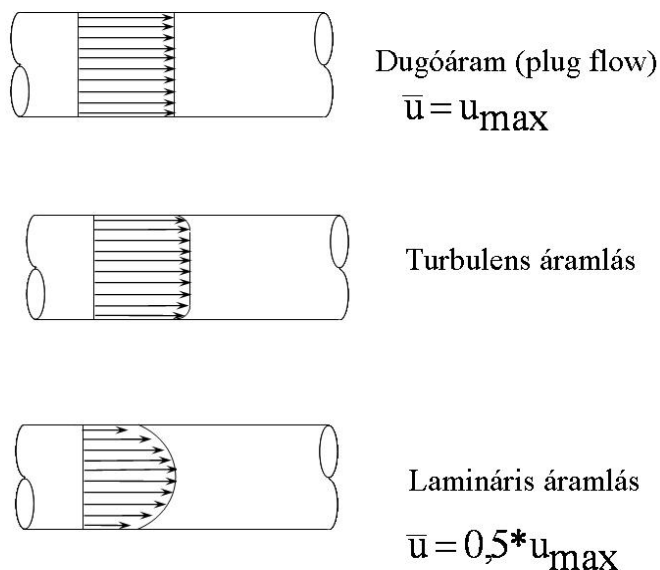
ahol: L a tartási szakasz hossza [m],
 w a tápoldat térfogatárama [m^3/min],
 q a tartási szakasz csőkeresztmetszete [m^2].

Ha azonban a fenti módon számítanánk a tartási csőszakasz hosszát, igen nagy hibát követnénk el. A tartási szakaszon átáramló tápoldatnak ugyanis nem minden térfogateleme tartózkodik ugyanannyi ideig a rendszerben. Lamináris áramlási viszonyok esetén az átlagsebesség (\bar{u}) a maximálisnak (u_{\max}) csupán fele, turbulens esetben pedig mintegy 82%-a. Mindkét áramlási profil esetén tehát a csőfal közelében haladó folyadék rész (baktériumspóra!) tovább, a cső közepén haladó pedig kevesebb ideig lesz kitéve a hőhatásnak. Csupán dugóáram esetén fogadható el biztonságosnak a fenti számítási mód (lásd a 4.154. ábrát). A gyakorlatban azonban a dugóáram nem mindig valósítható meg, ezért a szükséges tartási szakasz a tartózkodásiidő-eloszlás, ill. a diszperziós modell segítségével határozható meg (tervezhető) biztonsággal.

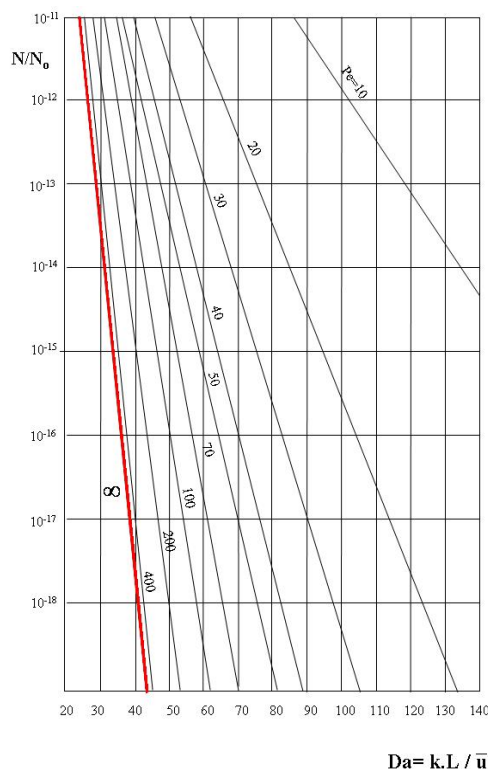
Ha a diszperziós modellt (4.6. fejezet) a sterilizálásra alkalmazzuk (ne felejtjük el, hogy a hőpusztulás elsőrendű kinetikát követ), a tartási szakaszra érvényes a már tárgyalt alábbi összefüggés:

$$\frac{N(L)}{N_0} = \frac{4y \cdot \exp(\text{Pe} / 2)}{(1+y)^2 \exp\left(\frac{y\text{Pe}}{2}\right) - (1-y)^2 \exp\left(-\frac{y\text{Pe}}{2}\right)} \quad (4.346)$$

A Da és Pe számok, mint paraméterek, függvényében a fenti egyenletet nomogram formájában ábrázolva a 4.155. ábrát kapjuk, amely hasznos segítséget nyújt a folytonos tápoldat-sterilizálás számításánál. Az ábrából látszik, hogy minél nagyobb a Pe szám, vagyis minél inkább dugószerű az áramlás a tartási szakasz csővezetékében, annál rövidebb tartási szakasszal lehet elérni a kívánt sterilitást.



4.154. ábra: Sebességprofilok különböző típusú áramlások esetén



4.155. ábra: Nomogram folytonos sterilizők számításához

Más szóval a steriliző rendszert úgy kell tervezni és/vagy üzemeltetni, hogy minél kisebb legyen a tápoldat áramlás közbeni diszperziója. A dugóáramtól való kis eltérés esetén ($1/Pe$ kicsi) a fenti egyenlet használhatóbb alakot ölt, egyszerűsödik:

$$\frac{N(L)}{N_0} = \exp\left(-Da + \frac{Da^2}{Pe}\right) \quad (4.377)$$

Ha pedig $Pe = \infty$, azaz dugóáram jellemzi az áramlási viszonyokat, akkor

$$\frac{N(L)}{N_0} \exp(-Da) = \exp\left(-k \frac{L}{\bar{u}}\right) = \exp(-k\bar{t}), \quad (4.378)$$

ami megfelel az egyszerű átlagsebességgel történő számításnak. A valóságban Pe 0 és ∞ közötti értéket vesz fel, ilyenkor az eredeti egyenletet, illetve a nomogramot alkalmazzuk. A diszperziós modell alapján történő számításhoz (a nomogram használatához) ismernünk kell k , L és D értékét.

A k értéke ugyanaz érvényes, amit a szakaszos rendszer számításánál elmondottunk: az előfordulható legellenállóbb mikrobaspórát kell feltételeznünk, vagy kísérleti adatokra kell támaszkodni.

Az átlagsebesség és L csőhossz tervezési paraméterek, ismertek, vagy éppen ezek meghatározása a cél. A D axiális diszperziós koefficiens meghatározása az egyedüli probléma, itt irodalmi adatok segíthetnek. Például Levenspiel 1958-ban közzétett egy összefüggést grafikus formában, amelyben kör keresztmetszetű csövekben áramló fluidumok axiális diszperziós koefficienseit adta meg a különböző áramlási viszonyok függvényében. E diagram jól alkalmazható a tervezési számításoknál.¹⁰¹

Ha a tápoldatnak a tartási szakaszban mérhető áramlási viszonyai nem reprezentálhatók a fenti diszperziós modellel (ezt alkalmas „tracer” technikával kapott válaszfüggvények alakjának elemzéséből megállapíthatjuk), akkor az általános tartózkodásiidő-eloszlás koncepciója alkalmazható.

¹⁰¹ O. Levenspiel: Chemical Reaction Engineering, J.Wiley, N. Y. 1999. 310. oldal, 13.15. ábra.

A fertőző mikrobákat tartalmazó tápoldattal átáramoltatott sterilizáló, mint reaktor, igen szegregált típust képvisel, hiszen az előlki kívánt sejtek, illetve spórák valóban kis – egymástól teljesen független – csomagocskákat jelentenek a hőbehatás (tehát a reakció, a pusztulás) szempontjából. Így feltéve, hogy sem a tartási szakasz belépési, sem kilépési pontján nincs az élő sejteknek visszaáramlása (s ezt bátran feltételezhetjük), írható, hogy

$$N = \int_0^{\infty} N_{sz}(t)E(t)dt, \quad (4.379)$$

ahol $E(t)$ a sterilizáló reaktor (a tartási szakasz) tartózkodásiidő-eloszlás függvénye, N_{sz} pedig a túlélő mikrobák száma egy megfelelő szakaszos reaktorban, vagyis

$$N_{sz}(t) = N_0 e^{-kt}, \quad (4.380)$$

aminek alapján most már

$$\frac{N}{N_0} = \int_0^{\infty} E(t)e^{-kt} dt. \quad (4.381)$$

Ennek az egyenletnek konkrét esetben történő megoldásához segítség, ha utalunk arra, hogy a jobb oldala nem más, mint az $E(t)$ függvény Laplace-transzformáltja (ahol $k=s$, a Laplace-transzformáció paramétere).

A tápoldatok hősterilizálásának áttekintése során láttuk, hogy szakaszos és folytonos sterilizálás esetén milyen szempontokat és hogyan kell érvényesíteni a hatékony sterilizációs művelet megtervezése során. Mindezekhez azonban hozzátesszük kiegészítésként, hogy – különösen folytonos sterilizációs művelet esetén – gazdasági szempontokat is figyelembe kell venni. Nem mindegy ugyanis, hogy a fűtéshez milyen hőmérsékletű gőzt alkalmazunk, milyen a sterilizálás hőmérséklete, mennyire szigorú sterilizációs kritériumot választunk.

Láttuk, hogy ezek közvetlenül befolyásolják a művelet hatékonyságát, de tudni kell azt is, hogy közvetlenül és legtöbbször fordított értelemben befolyásolják egy sterilizáló telep évi működési költségeit is. Így tehát a sterilizálás nem csupán biológiai-kémiai hatásai, de gazdasági értelemben is optimalizálható fermentációs művelet.

4.7.5. Dezinficiálás

A kémiai fertőtlenítést dezinficiálásnak nevezzük. A fertőtlenítő hatás fokozatait az alábbiakban foglaljuk össze: csíraszámcsökkentő hatás (szanációs effektus)

- baktériumszaporodást gátló hatás (bakteriosztatikus hatás)
- gombák szaporodását gátló hatás (fungisztatikus hatás)
- baktériumölő hatás (baktericid effektus)
- fungicid hatás (gombaölő effektus)
- spóraölő hatás (sporocid effektus)
- vírusinaktiváló hatás (virucid effektus)
- gombaelemeket pusztító hatás (fungicid effektus)
- parazitákat pusztító hatás (parazitocid effektus)

Antiszeptikumoknak nevezzük azokat a dezinficiáló ágenseket, amelyek emberre kevésbé veszélyesek, a bőr- és nyálkahártya-irritáció kisebb mértékű, ezért akár bőrre is alkalmazhatóak (de nem ehetőek meg!). Ezek közé a dezinficiensek közé tartoznak például az alkoholok, a Hg-sók, az ezüstnitrát, I_2 -oldat és a különböző detergensek.

Ezzel szemben a valódi **dezinficiálószer**ek azok, amelyek megölik a mikrobákat, de spóráikat nem feltétlenül. Ezek az emberi szövetekre sem veszélytelenek, elsősorban élettelen felületek, padló,

falak stb. kezelésére alkalmazzák őket. Ezek közé tartoznak a hipokloritok, a CuSO_4 , a kvaterner ammónium vegyületek, a formalin és a fenolok.

A legfontosabb kémiai dezinficiáló hatóanyagok a következők:

Etilénoxid
Ózon
Alkoholok
Fenol
Formaldehid
Glutáraldehid
Guanidinek
Hidrogénperoxid
Jodofórok
Klór és klórvegyületek
Kvaterner ammónium vegyületek
Ortoftálaldehid
Percetsav

A fenol és a formaldehid klasszikus dezinficiensek, előbbi a 19. század végétől forradalmasította a steril kórházi praxist, durva környezetszennyező hatása miatt (nagyon nehezen bomlik le) ma nemigen alkalmazzák. A formaldehid az egyik univerzális dezinficiens, masszív mikrobiális vagy bakteriofág fertőzések esetén alkalmazzák, formalin oldat vagy paraformaldehidből felszabaduló formaldehid gáz formájában.

Gázsterilizésre az **etilénoxidot** (ETO) használják. Ennek forráspontja $10,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, azaz szobahőmérsékleten gáz halmazállapotú. Mint alkilező szer, reagál a fehérjék aminosavaival, a DNS-sel, akadályozza a reprodukciót. Úgynevezett zárt gázsterilizátor készülékekben alkalmazzák. Mivel az emberi egészségre is ártalmas, sterilizálás után gondos kilevegőztetés szükséges a gáznymok eltávolítására.

Műanyagba csomagolt edények, mint eldobható műanyag Petri-csészék, pipetták, injekciós fecskendők, és tűk, valamint egyéb orvosi felszerelések sterilizálására alkalmazzák.

Szintén főként gázsterilizésre használják az **ózont**, de oldatban is alkalmazzák.

Előállítását oxigénből történik elektromos mező (kisülések) alkalmazásával, amely először atomjaira bontja, majd háromatomos ózonná alakítja át. Elsősorban víz (ivó- és szennyvíz), valamint élelmiszerek (hús, tojás) dezinficiálására alkalmazzák. Ma jellemzően palackozott vizek, illetve uszodák vizének fertőtlenítésére használják klór helyett, például Los Angeles a világ legnagyobb ózonosvíz-kezelő üzemét üzemelteti.

Az ókor óta ismert bizonyos **nehézfémek**, mint a réz, higany és ezüst dezinficiáló hatása: sebesüléseket réz- vagy ezüstlemezekkel fedtek be a fertőzések elkerülésére, a vizet ilyen edényekben tartották tartósítási céllal, stb. Mind sóiknak, mind a fémeknek maguknak van csíraölő hatása. Az ezüstöt finom hidroszol formájában ma is alkalmazzák még belsőleg is. A higanyvegyületek a 19. század végén bizonyos bakteriális fertőzések egyedüli gyógyszerének bizonyultak. Ezek a nehézfémek igen kis koncentrációban is hatnak, innen a hatásuk elnevezése: oligodinámiás hatás.¹⁰²

Szintén sok-sok éve ismert az **alkoholoknak**, elsősorban az etanolnak és az izopropanolnak a dezinficiáló hatása. Érdekes módon mindkét alkohol 70%-os töménység esetén a leghatékonyabb. Hatásuk a fehérjedenaturálásban nyilvánul meg, valamint a membránlipidek oldásában.

Egy sor oxidálószer is alkalmas dezinficiálószerként. Ilyenek a klórtartalmú vegyületek, a hidrogénperoxid és a percetsav.

¹⁰² Carl Nägeli (1893) írta le először az oligodinámiás hatást. A görög oligo=kevés és a dynamis= erőtéljes, azaz igen kis koncentrációban ható kifejezésekből.

A **klór** vízben az alábbi reakcióban hipoklórossavvá alakul, a hipoklórossav pedig pH-tól függően disszociál hipoklorid anionokká. Utóbbiak nem aktívak, csak a disszociálatlan hipoklórossavnak van csíraölő hatása, ezért a víz klórozása rendkívül pH-érzékeny művelet: alacsonyabb pH kedvez a disszociáció visszaszorulásának.



A NaOCl viszont 9-nél magasabb pH-n hatékony. A kalciumhipoklorit (klórmész) szintén hatékony dezinficiálószer. Ma gyakran nem ezeket, hanem klórleadó szerves klórvegyületeket alkalmaznak.

A Na-diklór-izocianurátot például semleges pH-n 0,5–1% töménységű oldat formájában használják.

A klórdioxidot (ClO_2) protozoák ellen is használják.

Antiszeptikumként a szintén erős oxidálószer jódot (jód tinktura: 2% I_2 70%-os alkoholban) is használják.

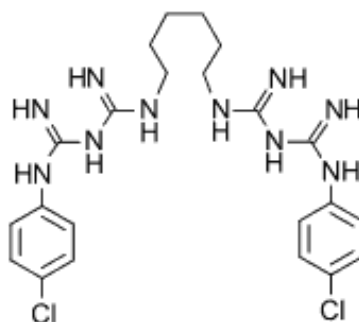
A **hidrogénperoxidot** 4%-os, a perecetsavat 3%-os oldat formájában alkalmazzák. Mindkettő erős oxidálószer, a vízben oxigénfelszabadulás közben bomlanak, ez az oxigén felelős a csíraölő hatásért.

A **kvaterner ammóniumvegyület** detergensnek a sejtmembránt roncsolva fejtik ki hatásukat. Ilyen vegyületeket alkalmaznak mint benzalkónium-klorid, alkil-dimetilbenzil-ammónium-kloridok keverékei, polivinilpirrolidon-jodid alkoholos oldata, Na-lauriléter-szulfát stb. Ezek is antiszeptikumok, kéz fertőtlenítésére is alkalmasak.

A **glutáraldehid** sporicid, baktericid, virucid és fungicid hatású 2%-os lúgos pH 8,3 oldatban. Hatását a fehérjék szerkezetének dezintegrálásával éri el, aldehid csoportjai rendkívül reakcióképesek.

A **klórhexidin** (4.156. ábra) is kémiai antiszeptikum. Klórhexidin-diglukonát formájában alkalmazzák leginkább. Elpusztítja a gram-pozitív és gram-negatív mikrobákat is, emellett nagyobb hígításban bakteriosztatikum is (0,05%). A klórhexidin is a sejtmembrán roncsolásán keresztül fejt ki hatását. Nagy koncentrációban emberre is ártalmas (szemtől, fültől távol kell tartani), ugyanakkor 0,005–0,006%-os koncentrációban kontaktlecsék steril eltartására használják.

A β -Propiolakton egy karcinogén¹⁰³ dezinficiálószer, amelyet széleskörűen alkalmaztak vérplazma, különböző vakcinák, sebészeti berendezések, enzimek és fermentációknál laborbioreaktorok kémiai sterilizálására. Vízzel hidrolizál, és a veszélytelen 3-hidroxi-propionsavvá alakul.



4.156. ábra: Klórhexidin

4.7.6. A bioreaktorok steril működtetésével kapcsolatos gyakorlati szempontok és megfontolások

A sterilizéssel foglalkozó alfejezetünkben eddig a tápoldatok sterilizálásával foglalkoztunk részletesen, egy biotechnológiai folyamatnak, egy fermentációnak azonban ennél lényegesen több sterilizéssel és sterilizálással kapcsolatos aspektusa van. Így szólni kell a bioreaktorok felépítésének a steril működéssel kapcsolatos kérdéseiről és a gázok, jelesül és elsősorban a levegőnek a sterilizálásáról is.

Először a bioreaktor-sterilizálás és steril működés tervezési, üzemeltetési vonatkozásairól szólnunk.

¹⁰³ Ezt a karcinogén hatást nem tekintik bizonyítottnak manapság.

„A gőzsterilizálás alapjai jól ismertek, de egy aktuális, jól működő rendszert megtervezni (és mi tegyük hozzá: üzemeltetni is) mégis nagy kihívás”¹⁰⁴ – írta W. D. Wise, az Eli Lilly Co. munkatársa 30 évnyi sterilizációs üzemi tapasztalattal a háta mögött. Mit tegyünk, és mit ne tegyünk? – tette fel a kérdést, és tapasztalatainak legfontosabb elemeit tömören a következőkben foglalhatjuk össze.

- Minden autoklávban, illetve bioreaktorban történő sterilizálás esetében, akár az üres bioreaktor, akár a tápoldatot tartalmazó bioreaktor sterilizálását végezzük el, a légtelenítéssel kell kezdeni a műveletet.
A telített gőz nyomása ugyanis meghatározza a hőmérsékletet, de ha levegő is van a térben, a nyomás hamis hőmérsékleti értéket sugall, a levegő mintegy hígítja a gőzt. Ezért kilevegőztetés szükséges, a légzsákok kialakulását el kell kerülni. Ennek érdekében a sterilizálás elején ún. „prevákuum” ciklusokat iktatnak be, ekkor a csövekből, porózus alkatrészekből, vattadugóból, gézből stb. eltávolítják a levegőt.
- Minden gőzbevezetéshez a legalacsonyabban fekvő pontján a rendszernek kondenz edényt vagy automatikus (számítógép vezérelte) kondenz lefúvatót kell alkalmazni. Ezekhez több gőzhozzávezetés esetén sem szabad közös elvezető csöveket alkalmazni (pangó, stagnáló kondenz zsákok, azaz fertőzési góccok jöhetnek létre).
- Minden cső a legalacsonyabb pont felé lejtson, mintegy 1%-os lejtéssel, a hőmérőket is a legalacsonyabb pontra kell beszerelni.
- Ne higgyük el, hogy a kicsiny repedések, lyukak esetén a készülékben alkalmazott túlnyomás segít. Sőt, az ún. Venturi-effektus miatt itt inkább beszívás, azaz nem steril levegőnek a rendszerbe szívása történhet.
- Szinte a legfontosabb sterilizációs szabály, hogy a hűtési ciklus kezdetekor azonnal levegő-túlnyomást kell adni a rendszerre, és az állandó nyomást végig fenn kell tartani a hűtési ciklus során. Ellenkező esetben a kihűlő gőz lekondenzálván vákuum keletkezik, és készülékünk vagy annak fűtő köpenye összeroppanhat!
- Bioreaktorok csőterveinek elkészítésénél (vagy elfogadásánál) ügyelni kell a közismert 6D (ma már inkább 2,5D) szabály érvényesülésére.¹⁰⁵ Ez azt jelenti, hogy egy csőből történő leágazásnál, a leágazás hossza nem lehet a csőátmérő hatszorosánál (2,5-szeresénél) nagyobb, mert akkor olyan áramlásmentes vagy csökkent áramlásos holt terek alakulhatnak ki, amelyek stagnáláshoz, tehát fertőzéshez vezethetnek.

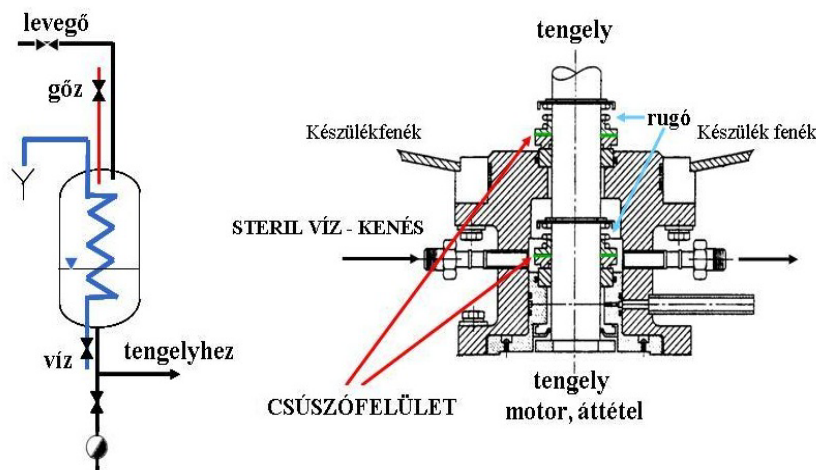
A steril bioreaktor-üzem egyik sarokpontja a keverőtengelynek a reaktorba vezetése, az ehhez alkalmazott tömítés. Ennek különösen az alsó meghajtású keverőknél van nagy jelentősége. Ma szinte kizárólag az ún. csúszógyűrűs tömítéseket alkalmazzák, rendszerint kettőt¹⁰⁶. A dupla csúszógyűrűs tengelytömítés rajza a 4.157. ábrán látható. A csúszógyűrű egyik eleme a tengelyre, a rajta forgó másik eleme a tömítés házában van rögzítve, és egymáshoz rugóval vannak szorítva. A finoman összecsiszolt súrlódó felületek (az egyik fémből, a másik kerámiából vagy fémkarbidból készül) végzik a steril tömítést. A kenés és hűtés, valamint a steril zárás biztosítására a két-két csúszógyűrű közé steril vizet vezetnek, amelyet tiszta gőzből történő kondenzációval állítanak elő és levegő-túlnyomással juttatják a tengelytömítéshez.

A tengelytömítést magát is sterilizálni kell. Amikor üresen történik a készüléksterilizálás, akkor bizonyos ideig gőzt vezetnek a steril víz helyett a két tömítés közötti űrbe, amikor pedig tápoldattal együtt történik a készülék sterilizálása, akkor maga a tömítés is értelemszerűen sterilé válik.

¹⁰⁴ WILLIAM D. WISE, ELI LILLY AND COMPANY: SUCCEED AT STEAM STERILIZATION.
www.chemicalprocessing.com/articles/2005/592.html?page=1 (letöltve:2010)

¹⁰⁵ Ez egy kötelező GMP-szabály is.

¹⁰⁶ Double mechanical seal



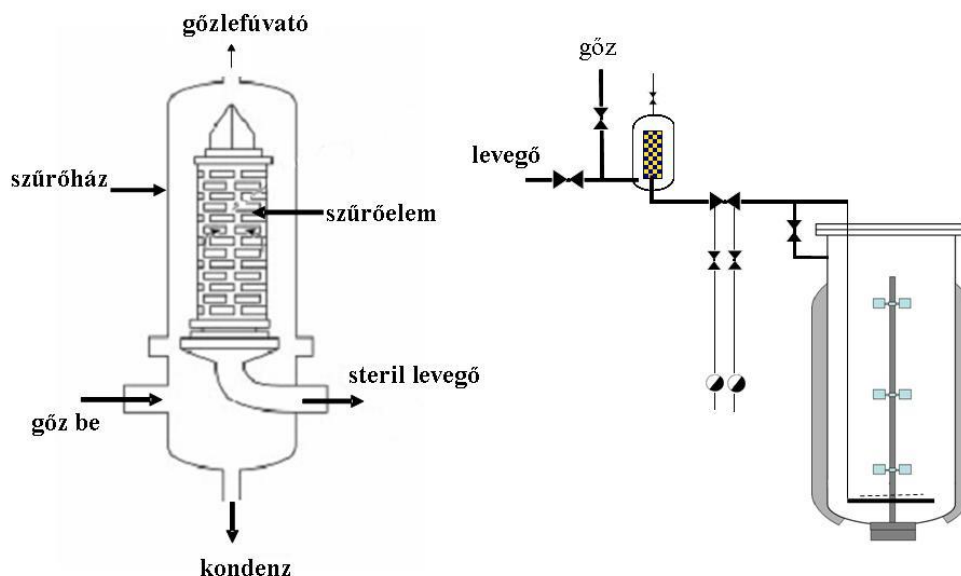
4.157. ábra: Dupla csúszógyűrűs tengelytömítés

A biotechnológiai üzemben több helyütt is alkalmaznak szűrőelemeket, erről és a különböző célokra felhasznált szűrőelemekről tájékoztató összefoglalást nyújt a 4.9. táblázat. A táblázat elsősorban a steril műveletekre, illetve sterilizésre vonatkozóan tartalmaz adatokat. Láthatóan a levegőnek a sterilitásra szűrése a legfontosabb elemek ezeknek: mind a fermentort levegőtető gázt, mind az abból távozó gázt sterilre kell szűrni. Erre a célra a fermentáció hőskorában szén (kokszal) töltött oszlopokat, majd még a 20. század 60–70-es éveiben is szálanyagot (vatta, üvegyapot) töltött oszlopokat alkalmaztak. Ma kizárólag abszolút (tehát nem mélységi) membránszűrőket használunk a levegő steril szűrésére. A cserélhető szűrőelemeket rozsdamentes acél szűrőházakba foglalják, amelyeket, illetve a szűrőket magukat, szintén szűrt tiszta telített gőzzel sterilizálnak. A steril levegőszűrőnek a bioreaktorhoz történő bekötését, a sterilizálás megvalósítását követhetjük a 4.158. ábrán. Meg kell jegyezni, hogy hasonlóan kell bekötni az elmenő levegő oldalon is a steril szűrőket. Laboratóriumi, illetve kísérleti üzemi léptékben egy elmenő levegőszűrő elegendő, üzemben kettőt alkalmaznak sorba kötve, és ha patogén mikrobákkal vagy **GMO**-kkal dolgoznak, akkor a kontéinment szabályainak megfelelően a második szűrő után még egy 500 °C-on működő elektromos égetőt is használni kell.

4.9. táblázat: Szűrők alkalmazása a fermentációs eljárásokban

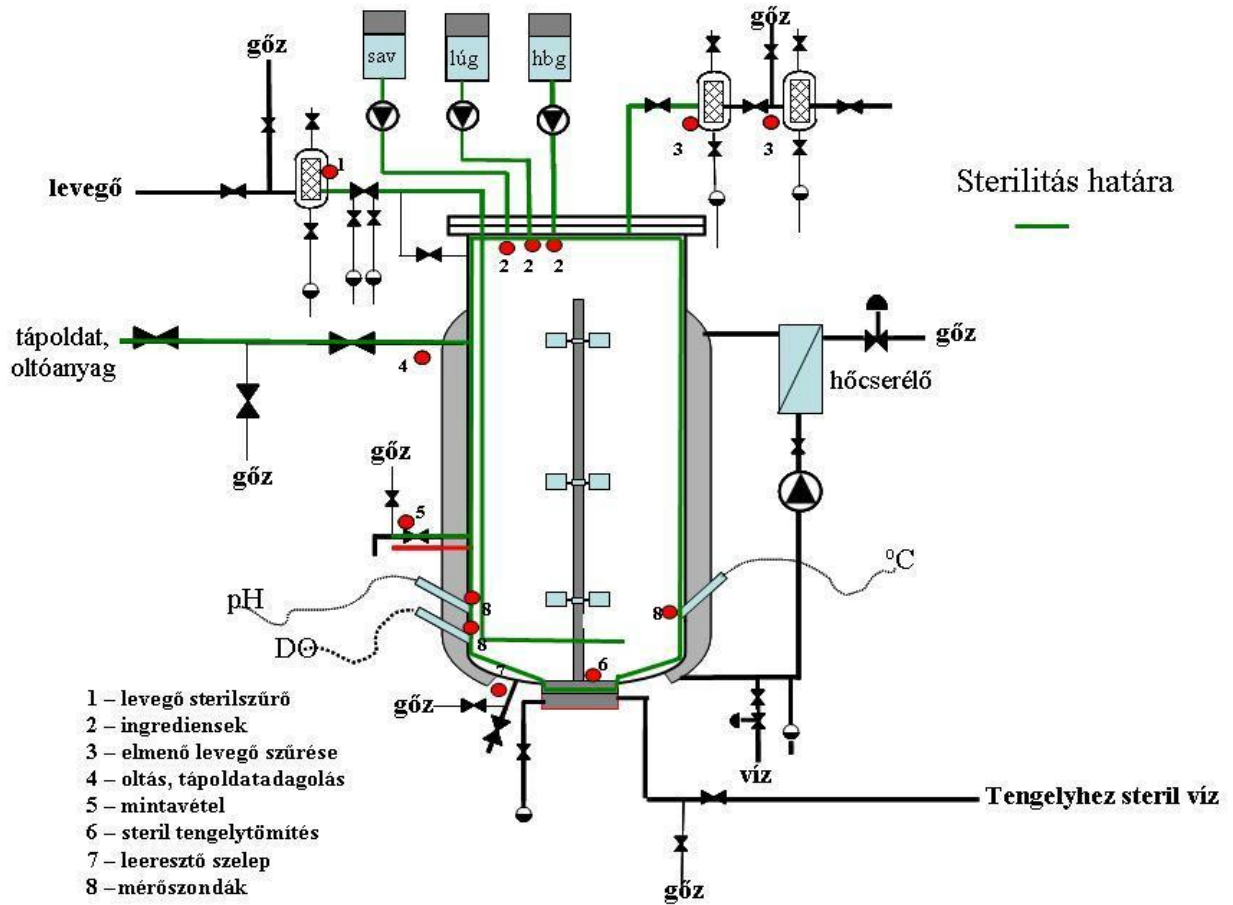
Alkalmazási terület	Szűrőtípus	Abszolút szűrőképesség (μm) ¹⁰⁷
Gőz: készülékek tisztításához és sterilizáláshoz	Porózus rozsdamentes acél	1,2
Levegő előszűrése	Cellulóz szűrőszövet	8,0
Fermentorba bemenő levegő steril szűrése	Hidrofób membrán	0,2
Levegő buborékolatása (levegőelosztó air lifthez)	Porózus rozsdamentes acél	3,0
A távozó gáz előszűrése	Polipropilén szűrőbetét	1,2
A távozó gáz sterilre szűrése (containment)	Hidrofób membrán	0,2
Adalékanyagok, víz és nyersanyagok előszűrése	Polipropilén mélységi (pozitívan töltött), gyantakötéses üvegszál szűrőbetét	1,0
Tartályok kilevegőzése	Hidrofób membrán	0,2

¹⁰⁷ **Abszolút szűrőképességnek** (ami 100%-os eltávolítást jelent) nevezzük annak a legnagyobb (kemény és gömb alakú) részecskének az átmérőjét, amely (már) képes áthaladni a szűrőn, adott vizsgálati körülmények között. Ez a jellemző a szűrő legnagyobb nyílásának, pórusának átmérőjét adja meg.

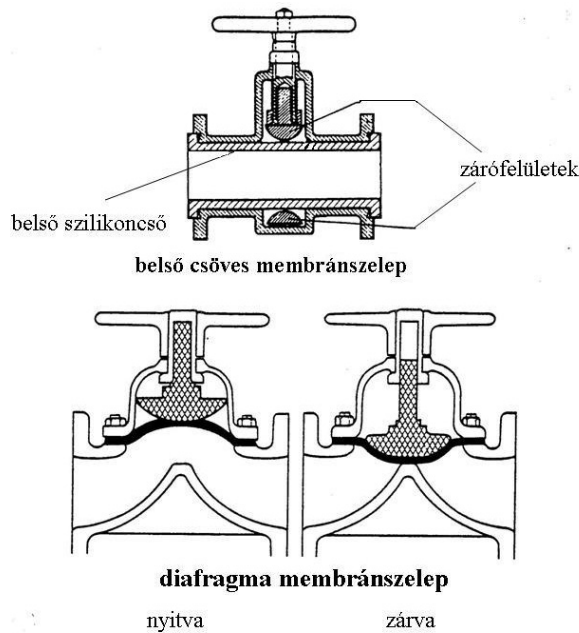


4.158. ábra: Steril levegőszűrő és bekötése a bioreaktorhoz

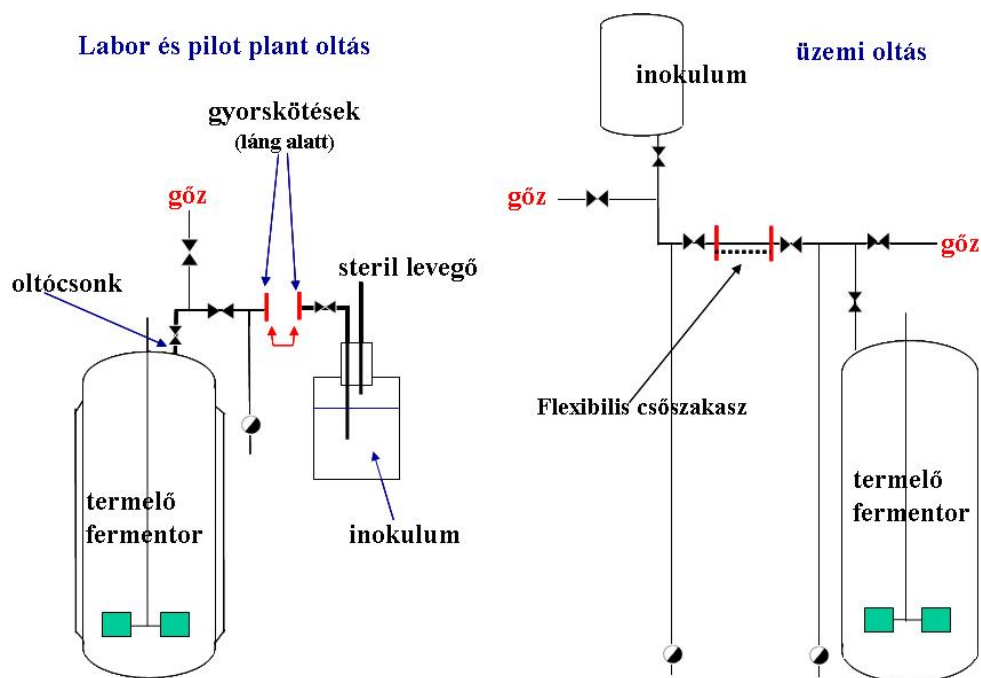
Egy működésben lévő bioreaktoron egy sor úgynevezett forró pont van, amelyek a sterilizálás, illetve a sterilen tartás szempontjából különös odafigyelést érdemelnek. Ezeket röviden a következőkben foglalhatjuk össze, illetve a fogalom megértéséhez tekintsük meg a 4.159. ábrát, amely bemutatja a forró pontokat, illetve a sterilen működő bioreaktor steril működésének határait (a kiemelő zöld vonalon belül minden steril!). Foglalkoztunk már a legkritikusabb ilyen forró pontokkal, vagyis a keverőtengely-tömítéssel és a steril levegő bevezetésével, illetve az elmenő levegő sterilizálásával. Ezekon kívül forró pontoknak számítanak a szenzorok, elektródák csatlakoztatásai a bioreaktorhoz, az ingrediensek, azaz a sav, a lúg, a habzágató olaj és a szubsztrátok adagolási pontjai (tárolótartályok, azok csövezése, szivattyúk és szelepek). Ezekon kívül a forró pontok, illetve kritikus műveletek közé sorolhatjuk a mintavételi pontokat, illetve a bioreaktor tartalmának lefejtését lehetővé tevő rendszert (sterilizálható leeresztő szelep és csatlakozó szerelvényei), és végül az úgynevezett inokulumvonalakat, azaz az előtenyészeteknek a főtenyészet reaktorába juttatását, az oltás megvalósítását. Ezeknek egy-egy korrekt, steril megvalósulását a következő, 4.161. ábrán mutatjuk be, avval a megjegyzéssel, hogy nem csak egyféle jó megoldás létezik. A példákat azért közöljük, hogy figyelmesen végiggondolva azokat, saját gyakorlatunkban ötletekkel, gondolatokkal szolgáljanak tervezés és kereskedelmi rendszerek vásárlása esetén. Különös jelentősége van a sterilen működtetés szempontjából a készülékek anyagának és felületkezelésének, valamint az alkalmazott szerelvényeknek. Ezekkel itt részletesen nem foglalkozunk, csak a sterilen működtethető szelepek leggyakrabban alkalmazott változatait, a membránszelepeket mutatjuk be a 4.160. ábrán. Ezeknek az az előnye, hogy sterilen működtethetők, a szállított fluidum nem érintkezik a szelepporsóval, valamint sima és az áramlást nem megtörő belső felületük meggátolja a szállított anyagban lévő lebegő részek kiülepedését, az eltömődést. Ezért ezeket a szeleptípusokat széleskörűen alkalmazzák a biotechnológiai iparokban (beleértve az élelmiszeripart is).



4.159. ábra: Forró pontok és a steril működés határai



4.160. ábra: Membránszelepek



4.161. ábra: Fermentorok oltása

A bioreaktorok üzemeltetésének egy igen fontos eleme azok megfelelő tisztítása, előkészítése egy következő felhasználásra. A régi kézi tisztítási módszereket mára felváltották az automatikus, illetve automatizálható úgynevezett CIP¹⁰⁸-rendszerek, amelyek a berendezések rendkívül hatékony és állandó minőségű, valamint reprodukálható, azaz rutin eljárásként egy GMP¹⁰⁹-gyakorlat részévé tehető és validálható tisztítási protokollját teszik lehetővé. Egy modern biotechnológiai üzemben a CIP-rendszer csatlakozási pontjait építik ki, és amikor a tisztításra szükség mutatkozik, ezekhez csatlakoztatják a mozgatható CIP-rendszert. Ez egy számítógép által vezérelt algoritmus előre meghatározott programja szerint végzi a tisztítást a tisztító kemikáliákat tartalmazó folyadékok, a gőz, az öblítő folyadékok és tiszta (esetleg steril) vizes öblítések egymás utáni alkalmazásával, megfelelő nyomású és hőmérsékletű fluidumok segítségével. Egy bioreaktor megfelelő tisztításához a reaktorba nagynyomású (de 2,5 barnál kisebb nyomásesésű, hogy az aeroszolképződést megakadályozzák) szórófejeket építenek be, rendszerint egy fedél közeli pozícióba (és néha a keverőelemek alá is), amelyek a készülék faláról, de még a reaktorba beépített különböző elemek rejtett felületeiről (keverőelemek, áramlástörő elemek, benyúló szondarészek) is képesek eltávolítani a rájuk rakódott szennyeződések (táplálajrészecskék, sejtek, habgátló olajok). A CIP-rendszerek vezérlésének az ún. TACT (temperature, action, chemical concentration, time) paraméterek megfelelő beállításával kell gondoskodnia az effektív tisztításról, azaz a megfelelő hőmérséklet, a mechanikai hatás (szórófejen kiáramló anyag ereje), az alkalmazott kemikáliák fajtája és koncentrációjuk, valamint a hatóidő azok a paraméterek, amelyekkel a CIP hatékonysága biztosítható.

A 4.162. és 4.163. ábrán egy CIP-rendszer vázlatát láthatjuk. A bioreaktor szempontjából a CIP-folyadékokkal ellátó csövezésnek, az elosztófejeknek, valamint a CIP-oldatok visszatérő csövezésének van jelentősége, ehhez csatlakoztatható az ún. CIP-konyha (ez az, ami mobil), amelyben a vegyszeroldatok elkészülnek, illetve ahol ezeknek és a visszatérő folyadékoknak a tárolótartályai vannak elhelyezve, a megfelelő mátrix-szeleprendszerrel és szivattyúkkal, valamint hőcserélővel. Egy tipikus¹¹⁰ tisztítási ciklus a következőkből áll:

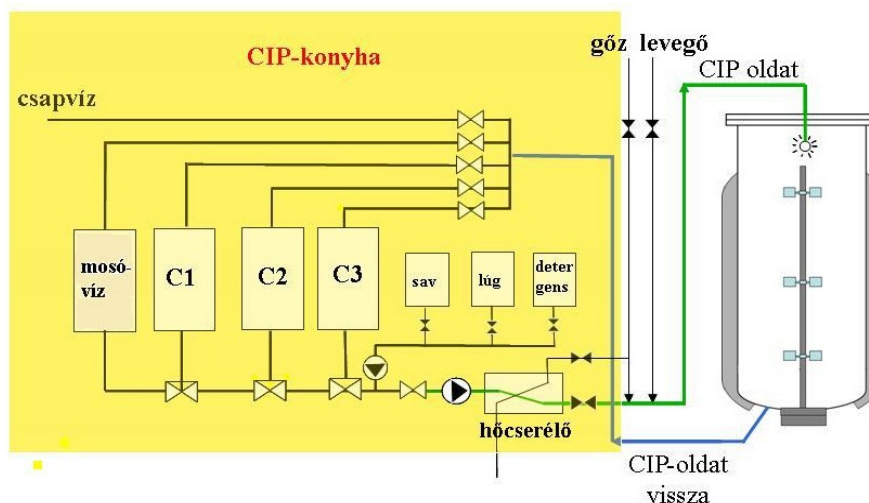
¹⁰⁸ CIP = cleaning in place, azaz helyben tisztítás, a készülék szétszerelése nélkül.

¹⁰⁹ GMP = good manufacturing practice, azaz megfelelő gyártási gyakorlat, a modern üzemenet egyik meghatározó eleme. A követendő eljárások rendszere.

¹¹⁰ Az alkalmazott kemikáliák nagyon függenek a szennyeződések természetétől. Pl. a bemutatottakon kívül klórtartalmú vagy detergens tartalmú oldatokat is alkalmazhatnak.

- tisztítás csapvízzel,
- egy tisztító oldattal történő meghatározott idejű mosás (az oldat cirkuláltatása). Ez rendszerint egy lúg.
- Ugyanez egy savas oldattal,
- öblítés vízzel,
- öblítés desztillált vagy deionizált vagy WFI¹¹¹ vízzel.

Az egyes fázisok között légbefúvással távolítják el a maradék folyadékot. A végső öblítés hatékonyságát a visszatérő folyadék vezetőképességének ellenőrzésével állítják be a kívánt értékre.



4.162. ábra: Egy egyszerű CIP-rendszer felépítése



Bioengineering AG engedélyével
Sagenrainstrasse 7, 8636 Wald, Switzerland

4.163. ábra: A BIOENGINEERING cég CIP-szórófejei

A sterilizéssel kapcsolatban tanultakat ellenőrizzük a 4.16. animáció feladatainak megoldásával.

¹¹¹ WFI = water for injection, a gyógyszeripari gyakorlatban alkalmazott legtisztább, pirogénmentes víz.

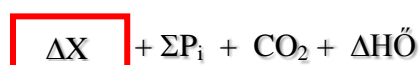


4.16. animáció: Önellenőrzés: sterilizálás

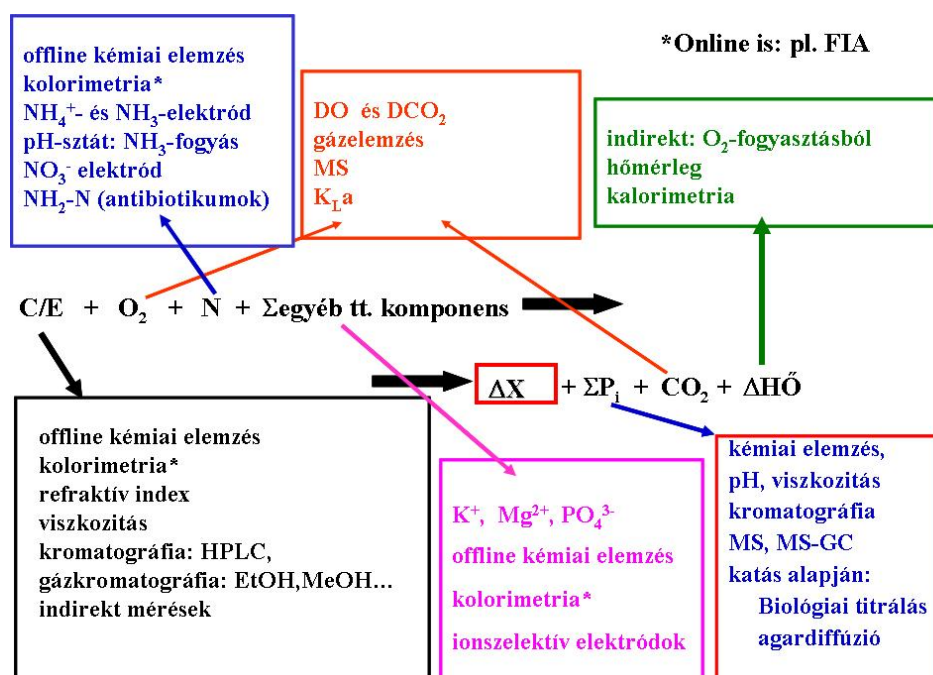
4.8. A bioreaktorokban folyó történések mérése és szabályozásuk elemei

A fermentációs folyamatok követésének, mérésének szükségessége magától értetődő és emiatt az is, hogy szinte lehetetlen a számtalan alkalmazott vagy alkalmazható módszert maradéktalanul ismertetni. Az alábbiakban csak egy rövid áttekintést adunk a leginkább és elterjedten alkalmazott módszerekről, valamint azokról, amelyeket a tárgyhoz kapcsolódó laborgyakorlatokon alkalmazunk.

A fermentációs folyamat az alábbi sémával írható le, és ez megmutatja, hogy méréseink fókuszában miféle, a rendszert jellemző változók vannak. A mérések tehát kiterjednek a séma elemeire: mindig érdekel bennünket, hogy a tenyésztés során hogyan hasznosul a szén-/energiaforrás, aerob esetben az oxigén, a nitrogénforrás és esetenként az egyéb tápoldatkomponensek némelyike is érdeklődésre tarthat számot. A séma jobb oldalán vitathatatlanul a sejt tömeg, illetve sejtszám alakulásának mérése a legfontosabb, illetve termékes fermentációk esetében a termék képződése. De a mikroba gázanyagcseréjének, azaz a szén-dioxid-képződésnek és a mindig kísérő hőképződésnek is nagy a jelentősége, különösen, ha kvantitatív mérlegeket, illetve matematikai modelleket kívánunk készíteni.



A 4.164. ábrán egy áttekintő összeállítást láthatunk az alkalmazott módszerekről a mikroba-növekedés követésének kivételével, evvel ugyanis kissé részletesebben foglalkozunk az alábbiakban.



4.164. ábra: A fermentáció követési módszereinek áttekintése

A fermentáció nyomon követésére használt méréseket többféle szempont szerint csoportosíthatjuk. Aszerint hogy a mikroba tevékenységéről adnak-e felvilágosítást, beszélhetünk *biológiai*, vagy ha csupán a környezet változásait követik, *nem biológiai, azaz fizikai, illetve kémiai változókról*. Biológiai változók a mikrobakoncentráció, a metabolikus sebességek és fajlagos sebességek és a különböző metabolikus kvóciensek, míg fizikai változók a hőmérséklet, a levegőztetés és a keverő sebessége stb. Kémiai változónak tekintjük a szubsztrátok kiindulási és szabályozott koncentrációit, illetve a fermentlé pH-ját vagy az oldott oxigén szintjét (DO).

A változók lehetnek *folytonosak*, illetve *időnkéntiek*, azaz *diszkrét*ek.

Megint más szempont szerint beszélünk *on line*. azaz a folyamatról közvetlenül valós időben információt nyújtó (néha *in line*-nak is említik) változókról, ha pedig a rendszerből (időnként) kivett mintát másutt, a rendszeren kívül analizáljuk, akkor *off line* mérésekről, illetve változókról beszélünk.

Primer mért változóknak vagy *közvetlen változóknak* nevezzük azokat, amelyeknél maga a mért érték az érdeklődésre számot tartó változó. Ilyenek a pH, DO, hőmérséklet, szubsztrát- koncentrációk, növekedési sebesség, stb. *Indirekt, számolt változóknak*¹¹² nevezzük ezzel szemben azokat, amelyek esetében a változó értékét más (direkt vagy indirekt) változókból számítjuk ki. Ilyenek például a respirációs kvóciens, amelyet a szintén indirekt szén-dioxid-képződési és oxigénfogyasztási sebességekből számolunk ki, vagy a hozam, amelyet a mért mikroba- és szubsztrátkoncentráció-változásból lehet kiszámítani. Mind a direkt, mind az indirekt változók lehetnek szabályozókörök inputjai is.

Egy fermentációs folyamat elvárható minimális mérési és szabályozási szintjeként a következők tekinthetők:

Legáltalánosabban mért fizikai változók (minimális mérési *és minimális szabályozási** szintek):

- *hőmérséklet **
- *nyomás **
- *áramlási sebesség (folyadékok, gázok)**
- térfogat és/vagy tömeg
- *keverősebesség **
- *teljesítményfelvétel
- *habszint**
- viszkozitás
- turbiditás

Legáltalánosabban mért kémiai változók:

- *pH **
- elektródpotenciál
- Si.....Pj
- *DO (**)
- DCO₂
- sejtkoncentráció

4.8.1. A mikrobánövekedés követése

A növekedés mérésére igen sok módszert alkalmaznak. Áttekintő összeállítást nyújt erről a 4.165. ábra. Klasszikus és anyagmérleg-készítés szempontjából legfontosabb módszer a szárazanyag- mérés. A fermentléből vett ismert térfogatú mintát membránszűrőn leszűrjük (0,2 µm pórusú membránbaktériumok esetén is megfelelő), desztillált vízzel kimossuk a tápoldatnyomokat, majd tömeg-állandóságig szárítjuk 105 °C hőmérsékleten. A visszamért membrán nettó tömege térfogategységre vonatkoztatva a sz. a.-koncentráció. Alkalmazzuk baktérium és élesztő, valamint fonalas mikrobák esetén is, ha a tápoldat nem tartalmaz lebegő részecskéket.

¹¹² Az angolszász szakirodalom ezeket „gateway sensors” névvel illeti.



4.165. ábra: Sejttömeg- és sejtszámmérési módszerek

Az optikai módszerek alapja az, hogy ha egy sejtszuszpenziót monokromatikus fénnel megvilágítunk, akkor a fény útjába kerülő sejtek azt különböző irányokba szórják. Ha a valamilyen irányban szórt fény intenzitását mérjük, *nefelometriáról*, ha az áteső fény abszorbanációját mérjük, *turbidimetriáról* beszélünk. Utóbbit alkalmazzuk szinte kizárólag. Ha a Lambert-Beer-törvény érvényes, akkor a mért extinkció arányos a sejtkoncentrációval:

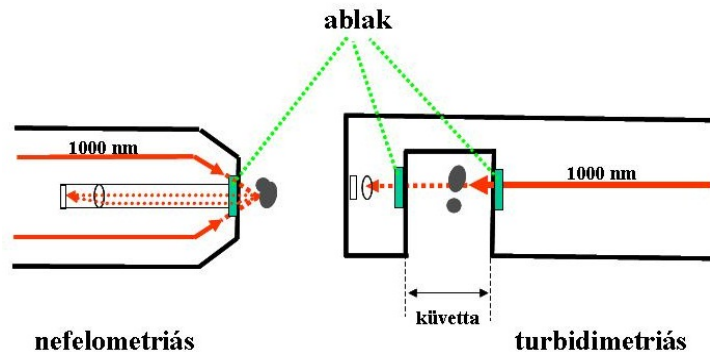
$$\ln \frac{I}{I_0} = -\varepsilon XL, \quad (4.382)$$

amelyben I_0 a megvilágító és I az áteső fény intenzitása, hányadosuk logaritmus az extinkció.

X a mikroba tömeg szerinti koncentrációja és L a fényút hossza, azaz a mérőküvetta szélessége (rendszerint 1 cm), ε pedig a fajlagos fényelnyelés (sejttípusfüggő).

A klasszikus optikai denzitás meghatározás esetében szinte kizárólagosan 600 nm-es fényt alkalmazunk, és optikai denzitásnak, a sejtkoncentráció mértékének definiáljuk a hígítással megszorított extinkció értékét. A fényelnyelést vakkal szemben mérjük, amelynek a sejtmentes fermentlé hasonlóan hígított oldatának illene lennie, a valóságban rendszerint desztillált vízzel szemben mérünk. A 600 nm-en történő off line OD-mérésnél vigyázni kell arra, hogy a sejtszuszpenziót kellő mértékig meghígítsuk, azért, hogy a fenti lineáris összefüggés érvényességi tartományában mérjünk. Ma rendszerint 1, néha 2-es extinkciótartományban is lineáris az összefüggés.

A klasszikus optikai denzitás mérésnek off line módszerével szemben ma már alkalmaznak on line OD-mérő eszközöket is, két ilyennek a felépítését láthatjuk a 4.166. áran. Ezek „elektrod” küllemű szondák, amelyek a fermentorok standart csomjajaiba szerelhetőek, és rendszerint 1000 nm hullámhosszú közeli NIR-fénnel operálnak. Mind áteső, mind tükrözött (azaz nefelometriás) változatú szondák ismertek.



4.166. ábra: On line OD-mérő szondák felépítése

A száloptikák elterjedése szélesre nyitotta az optikai elvű mérési lehetőségek kapuját. A nyolcvanas évek óta olyan fluoreszcenciamérésen alapuló, a reaktorba standard csomópontokon keresztül beilleszthető műszerek is elérhetőek, amelyek egyszerre több hullámhosszú lézertípust bocsátanak a sejtszuszpenzióra, OD-mérésre alkalmasak, de ugyanakkor a sejtartalom bizonyos elemeinek fluoreszcenciamérését is elvégzik. Az alapja ezeknek a detektálásoknak az, hogy a redukált koenzim NADH és NADPH 340–360 nm-en gerjesztve 460 nm-es fluoreszcens fényt emittálnak, amely fény intenzitása arányos az élő sejt koncentrációjával (természetesen befolyásolja a jelet a sejtek fiziológiai állapota is, valamint a tápoldat esetleges zavaró elemei, mint pl. a buborékok).¹¹³

A fluoreszcenciás mérést használják ki akkor is a sejtnövekedés követésére, amikor a sejtek „láthatóvá tételére” génmódosítással beépítik az ún. GFP¹¹⁴-termelő-képességet a sejtekbe, amelyek azután 375 vagy 470 nm gerjesztő fényvel megvilágítva 509 nm-en emittálnak és mérhetőek. Ha ezt a GFP-termelést a haszontermék (fehérje) termelésével kötik össze, akkor a termékképződés előrehaladása követhető ilyen módon.

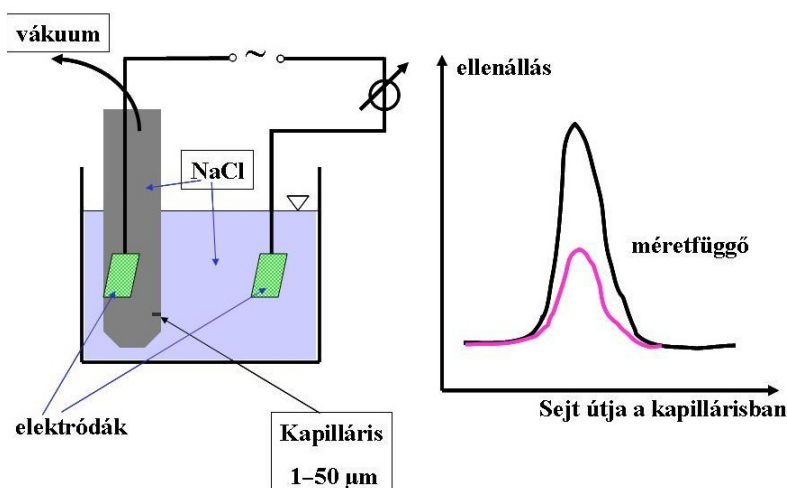
Az optikai szálak, a ledtechnika (megvilágítás) és a miniaturizálás (piciny fotodióda detektorok) mára oda vezettek, hogy rázott lombikokban is lehetséges OD-mérés, sőt a néhány cm³ térfogatú mikrobioreaktorokban és a mikroplate lyukaiban is.

A sejtek egyenkénti megszámlálásának is számos módszere ismert. Csak megemlítve itt az off line mikroszkópos sejt számlálási módszereket (pl. a Bürker-kamrás módszert), az elektronikus részecskeszámlálás módszerét ismertetjük¹¹⁵. A 4.167. ábrán látható a műszer elvi felépítése. A sejteket kényszeráramban egy kapillárison vezetjük át, amelynek két oldalára váltófeszültség van adva. A lyukon (sejtfajtától függően 5–50 µm) áthaladó sejtek ellenállása más, mint a (NaCl) hordozó elektrolité, ezért egy áramcsúcs jelenik meg minden egyes sejt áthaladásakor. Ennek számlálása a sejtszámot, nagyságának diszkriminátorokkal történő szétválogatása pedig a sejtek méreteloszlását képes megjeleníteni. Elvileg csak egysejtű, leginkább élesztő-, kevésbé baktérium- sejtek számlálására alkalmas az eredetileg vérszámolására kifejlesztett módszer. Csak off line mérés lehetséges.

¹¹³ Megemlítjük az áramlásos citometriát (flow cytometry) is, amely rendkívül drága, és ezért a fermentációs rutinban nem elterjedt módszer, amely szintén egyidejűleg egy sor on line optikai: turbidimetriás és fluoreszcens mérésre alkalmas.

¹¹⁴ GFP=green fluorescent protein

¹¹⁵ Eredeti márkanéve, amely módszernévvé is változott: Coulter Counter.



4.167. ábra: Elektronikus részecskeszámláló elvi működése

Sok próbálkozás van egyéb sejttömeg- és sejtszámmérési eljárások kidolgozására is. Így például az ultrahangnak a felhasználásával is fejlesztettek ki módszereket. Ezen modern műszeres sejttömeg-mérési módszerek egyike például az *akusztikus rezonancia denzitometria*. Elve az, hogy ultrahanggal sugározzák be a küvetében lévő sejteket, amelyek rezonanciája a szenzor piezoelektromos cellájában feszültséget gerjeszt, ami mérhető.

Az ép sejtmembránnal rendelkező sejteket úgy tekinthetjük, mint kicsiny kondenzátorokat, amelyek elektromos mező hatása alatt – a membrán nem vezető lévén – feltöltődnek. A kialakuló kapacitanciát mérni lehet (pF/cm egységben): értéke függ a sejt típusától, valamint az élő sejtek koncentrációjától. Olyan „elektrodát” fejlesztettek ki, amely egy standard csonkba beszerelhető testben 4 Pt elektrodát foglal magába. Kis kezdeti sejtkoncentrációnál az elektrodákra adott rádió-frekvenciás mező kicsiny áramot jelez, ahogy nő a sejtkoncentráció, a jel is erősödik, miközben a halott sejtek, valamint a gázbuborékok láthatatlanok az elektrodák számára. Ily módon a rendszer az élő sejttömeggel arányos jelet szolgáltat.¹¹⁶ Előnye az elektrodának, hogy nem nőnek be a sejtek, nagy sejtkoncentrációig lineáris a jel, és egyaránt alkalmazható egy sor sejtípushoz, baktériumok, élesztők, állati és növényi sejtek és rovarok sejtjeire is.

Ma a kereskedelmi forgalomban kaphatók a bioreaktorba standard csonkra beszerelhető *in line mikroszkópok* is, amelyek fluoreszcenciás vagy egyszerű mikroszkópos képeket közvetítenek digitális kamerába, és mind a sejt tartalom, mind a sejtszám, mind a morfológia követésére alkalmasak. Ezek vagy mechanikusan, vagy elektronikusan definiált mérési zónában (lásd a 4.166. ábra második példáját) képesek az összes sejt megjelenítésére.

4.8.2. A hőmérséklet és a pH mérése

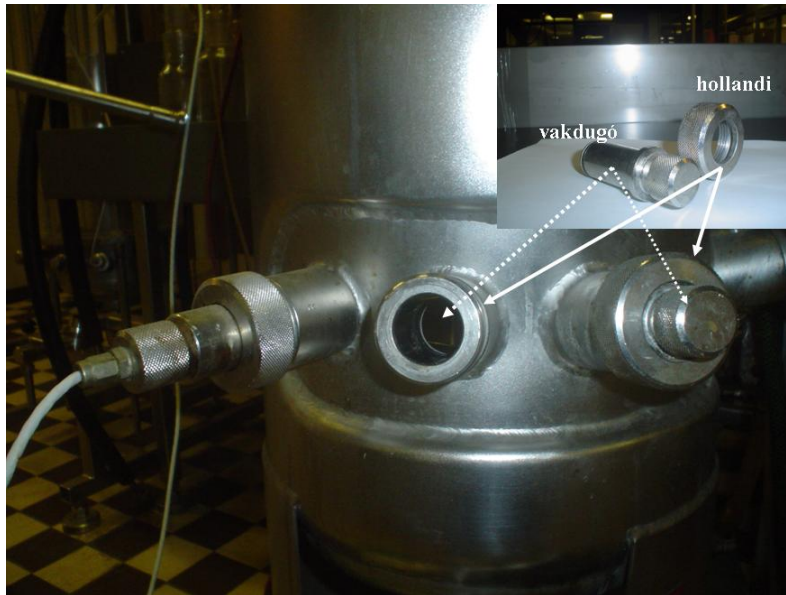
A fermentálé hőmérsékletét szinte kizárólag Pt100¹¹⁷ ellenállás-hőmérőkkel mérjük. A szabályozását pedig a hőátadó rendszerben (rendszerint a reaktor köpenyében) cirkuláltatott hűtővíz gőzzel történő fűtésével és hideg vízzel történő hűtésével (PID-szabályozókkal) oldják meg.

A pH mérésére a 60–70-es évek óta a cserélhető elektrolittal feltöltött, sterilizálható kombinált üveg/kalomel elektrodákat alkalmazzák. Ma inkább egyszer használatos, nem regenerálható, gélformájú elektrolitokkal feltöltött elektrodák használatosak. A pH szabályozását két irányban működő szabályozókkal végezzük, a szabályozók sav vagy lúg ingrediensek adagolását vezérlik.

A hőmérőket, a pH-elektrodákat és a fentiekben említett optikai szondákat stb. ún. standard csonkokba lehet csatlakoztatni. Egy ilyen 25 mm belső átmérőjű csonk, valamint a szondamentes esetben szükséges zárásra alkalmas vakdugó képét mutatja a 4.168. ábra.

¹¹⁶ Biomass Monitor, 2002-ben került piacra, egyszerre négy fermentorban is képes követni a sejtszaporodást.

¹¹⁷ 0 °C-on 100 Ω, 60 °C-on 123,2 Ω ellenállású a Pt.



4.168. ábra: Standard szondaillesztő csomók

4.8.3. Az oldott oxigén koncentrációja és az oxigénabszorpció mérése

4.8.3.1. Oldott oxigén mérése

Az oldottoxigén-szint mérésénél két probléma merül fel: mivel az oxigén egy csekély mértékben oldódó gáz, koncentrációja a fermentlében alacsony, ugyanakkor a koncentráció változásának sebessége (különösen a 4.8.3.2.-ben ismertetendő dinamikus $K_L a$ mérés esetén) nagy, ezért *érzékeny és gyors reakciójú* mérőrendszerre van szükség. Próbálkoztak a múltban többféle módszerrel, például az ún. „tubing” módszerrel. Ennél a fermentlébe egy oxigénre áteresztő (pl. szilikongumi) csövet merítettek, amelyen keresztül N_2 -gázt áramoltattak. Ebbe az oldott oxigént bediffundálva és a gázáramot gázelemzőbe vezetve, lehetséges lett az oldott oxigén szintjének meghatározása. A módszer körülményes, lassú, ezért nem terjedt el.

Az oldottoxigén-szint mérésére ma kétféle amperometriás elvű elektrokémiai rendszert alkalmaznak (4.169. ábra). Az elterjedtebb Clark-elektrod esetében külső feszültségforrással polarizálják a Pt katódot, amely körül helyezkedik el az Ag henger anód. Az elektrolit 3 mol/l KCl-oldat. Az elektródokat, illetve elektrolitot oxigénre áteresztő polietilén-, szilikongumi- vagy teflonmembrán választja el a mérendő közegtől. Állandó polarizáló feszültség (kb 0,6 V), valamint jól definiált membránvastagság és membrán-katód távolság esetén az elektródok között folyó áram erőssége arányos a külső térben mérhető oldott oxigén parciális nyomásával:

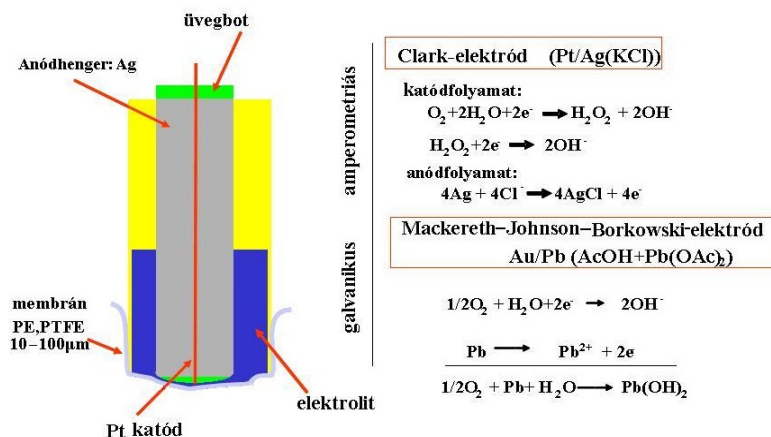
$$I = kD \cdot S \cdot pO_2 / X = nFAS / X \cdot pO_2 \quad (4.382)$$

ahol pO_2 az oldatban lévő O_2 parciális nyomása
 D az oxigén diffúziós állandója a membránban
 S az oxigén oldhatósága a membránban
 X a membrán vastagsága
 F Faraday-állandó ($9,648 \cdot 10^4$ Coulomb/mol)
 A katódfelület

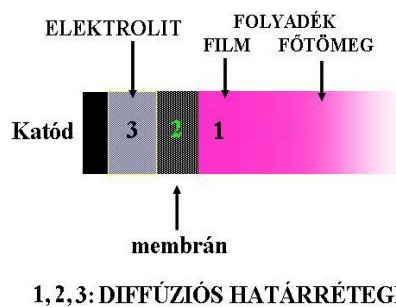
Mivel az elektródban valamennyi többi mennyiség konstans, csak a parciális nyomás változhat, ezért az áramjel a parciális oxigénnyomással lesz arányos.

Az oldott oxigént mérő elektród tehát nem oxigénkoncentrációt mér, hanem az oldott oxigén parciális nyomásával arányos áramjelet szolgáltat. Ezért minden ilyen műszer 0 és 100%-os telítettségi szint közötti értékeket mutat. A továbbiakban azonban továbbra is koncentrációról fogunk beszélni (ami, a Henry-törvény értelmében arányos a parciális nyomással).

A 4.170. ábra tanúsága szerint legalább három diffúziós határreteg jelent ellenállást az oxigénnek a katód felületére jutásakor, ezért érthető, hogy van időkéscése a rendszernek, a mért érték egy előző időpontban érvényes valódi értéknek felel meg. Ismernünk kell tehát az elektród dinamikus viselkedését, az időkéscés mibenlétét, hogy – különösen dinamikus méréseknél – ezt a késést kompenzálhassuk.



4.169. ábra: Oldott oxigént mérő amperometriás elektródok felépítése



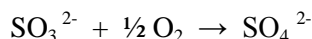
4.170. ábra: Diffúziós határretek az oldott oxigén elektródjában

4.8.3.2. Az oxigénabszorpció sebességének meghatározási módszerei

Szulfitoxidációs módszer

A szulfitmérés során az oxigénabszorpció sebességének mérését egy kémiai reakció sebességének mérésére vezetjük vissza.

Az oxigénabszorpció szempontjából vizsgálni kívánt bioreaktort Na_2SO_3 -oldattal töltjük meg és levegőztetjük (és kevertetjük). Ekkor katalitikus mennyiségű Co^{2+} vagy Cu^{2+} ionok jelenlétében a



reakció játszódik le. Ez a reakció néhány fontos tulajdonsággal rendelkezik:

- Nulladrendű a reakció az SO_3^{2-} ionokra nézve (0,1–1 Na_2SO_3 -koncentráció-tartományban) ha van 10^{-3} – 10^{-4} mol/l koncentrációjú katalizátor.
- Gyakorlatilag irreverzibilis.
- Gyakorlatilag pillanatszerű.

E tulajdonságokból következik, hogy egyrészt amíg szulfitionok vannak jelen, addig az oldott oxigén koncentrációja zérus, másrészt a szulfátosodási reakció sebeségét tehát csak az oxigén-

abszorpció sebessége határozza meg (a reakció sztöchiometriáját is figyelembe véve egyenlő vele!), azaz az r oxidációsebesség

$$\frac{dC}{dt} = K_L a(C^* - C) = K_L aC^* \rightarrow r = K_L aC^* \quad (4.383)$$

Ha tehát megmérjük a reakció sebességét, akkor megmértük az oxigénabszorpció sebességét is.

A reakciósebességet a szokásos módon mérhetjük: a reakcióidő előrehaladtával mintákat veszünk, amelyekben meghatározzuk a még el nem reagált szulfit koncentrációját, majd ezeket az értékeket ábrázoljuk az idő függvényében, és meghatározzuk az egyenes iránytangensét. A fenti egyenlet értelmében ugyanis a sebesség állandó, tehát a koncentrációk az időben egyenes mentén csökkennek. Ezt a meredekséget (reakciósebességet, ami maga az OTR) *mmól oxigén/l·óra*, méginkább *g O₂/l·óra* (vagy régebben *mg SO₂/l·óra*) egységben kifejezve kapjuk az ún. **szulfitszámot**.

Valójában a reakciórendszer viselkedése lényegesen bonyolultabb a fent vázoltnál, többek között mivel a levegőbuborékok gáz/folyadék határfelületén lévő stagnáló folyadékfilmben is van szulfit, tehát ott is folyik az oxidáció, és ez a kémiai reakció mintegy „megszívja” az oxigéndiffúziót a határrétegben, meghamisítva a viszonyokat. Ezt a gyorsító hatást az ún. „enhancement faktorral” szokták leírni. A szulfitszám tehát kissé nagyobb oxigénabszorpciót jelez, mint ami egyszerű vizes oldatban (vagy fermentlében) lenne, azonban arra kiválóan alkalmas, hogy értékeivel reaktorok oxigénátadási viszonyait, és adott reaktor esetén a különböző technológiai paraméterek mellett történő levegőztetés hatásait összehasonlíthassuk.

A szulfitoxidációs módszert csak tisztavizes modellrendszerben lehet használni, tápoldatban és méginkább lélegző tenyészetben nem!

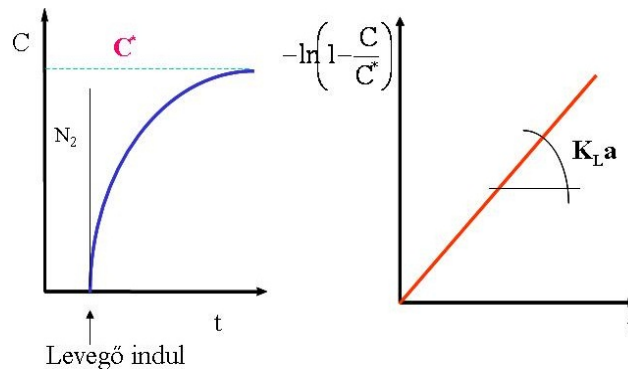
Hasonló módszert fejlesztettek ki az oxigénnek hidrazinnal történő reakcióját felhasználva is, de az kevésbé terjedt el a szulfitmérésnél.

Kilevegőztetési („Gassing out”) módszer $K_L a$ meghatározására

E módszer során N₂-árammal kihajtják az oldott oxigént a bioreaktorban lévő vízből vagy mikrobamentes tápoldatból, majd a N₂-gáz bevezetését megszüntetik, és átkapcsolnak levegőztetésre. Ekkor az átviteli függvény az ismert

$$\frac{dC}{dt} = K_L a(C^* - C)$$

Alakú, és ha folytonosan mérni tudjuk az oldott oxigén koncentrációjának a növekedését a telítődés során, akkor e differenciálegyenlet megoldása rajzolódik elénk (pl. egy kompenzográfon), amelyet az 4.171. ábra mutat. A C -t görbéből a $-\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = K_L a \cdot t$ megoldási forma alapján $K_L a$ meghatározható.

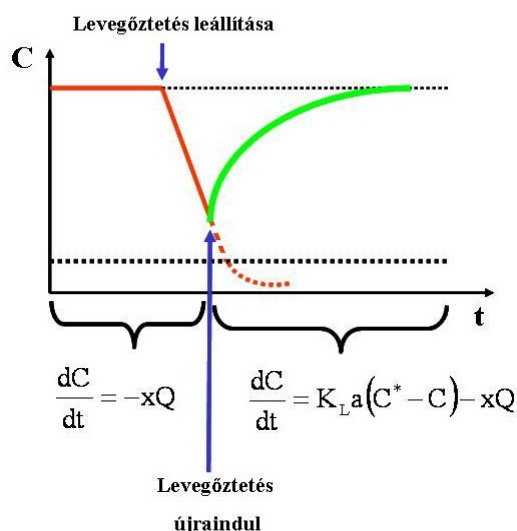


4.171. ábra: A kilevegőztetési $K_L a$ -meghatározási módszer elve

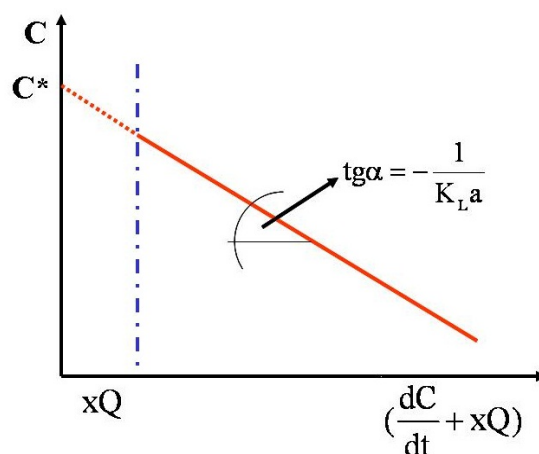
Dinamikus $K_L a$ -meghatározási módszer

A $K_L a$ dinamikus meghatározásának módszerét tenyészetekben történő mérés céljára dolgozták ki. Alapja az, hogy amint az a 4.77. ábrán látható, szakaszos mikrobatenyésztés során mindig dinamikus egyensúly van az oxigénoldódás és a fogyasztás között. Ez az egyensúlyi oldottoxigén- koncentráció az ábra szerinti profil szerint változik minden szakaszos fermentáció során.

Ha a görbe mentén bárhol leállítjuk a levegőztetést a 4.172. ábra szerint (és csak egy csökkentett intenzitással kevertetünk, hogy a fermentáció homogén maradjon), akkor a C egyenes mentén fog csökkenni mindaddig, amíg el nem éri a kritikus oxigénkoncentrációt, ugyanis a felett állandó a fajlagos légzési sebesség, Q_{\max} valamint a mérés rövid ideje miatt az x mikrobátömeg növekedése elhanyagolható. Ebből az egyenesből meghatározható a légzés sebessége, az ugyanis az egyenes meredekségével egyenlő (xQ).



4.172. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás elve tenyészetekben



4.173. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás: linearizálás

A leszálló egyenes mentén bárhol, ha újra visszacsatoljuk a levegőztetést, akkor a teljes differenciálegyenlet érvényes, és az ábrán látható görbe mentén áll vissza az előző egyensúlyi oldottoxigén-szint. A görbe néhány pontjából az alábbi linearizálásnak megfelelő ábrázolást (4.173. ábra) elvégezve, a kapott egyenes reciprokló iránytangense megadja $K_L a$ -értékét.

$$C = -\frac{1}{K_L a} \left(\frac{dC}{dt} + xQ \right) + C^* \quad (4.384)$$

A dinamikus $K_L a$ -mérés előnye, hogy tenyésztés közben nyújt információt a bioreaktor oxigén-átadási viszonyairól. Probléma azonban, hogy az oldott oxigén mérésére használt elektród nem valósidejű jeleket szolgáltat, dinamikus viselkedése miatt mindig késésben van a valósidejű oxigén-szint értékétől. Ennek kiküszöbölése érdekében többféle eljárás is lehetséges.

Az eredeti grafikus módszer is lehetőséget nyújt $K_L a$ -nak az elektród időállandójának ismeretében történő meghatározására.

Ha mérőműszert (mérőerősítőt, esetleg processzorral és természetesen az elektróddal együtt) egytárolós tagként tekintjük (lásd a Folyamatirányítás c. tárgy anyagát is), azaz

$$T \frac{dC'}{dt} + C' = AC, \quad (4.385)$$

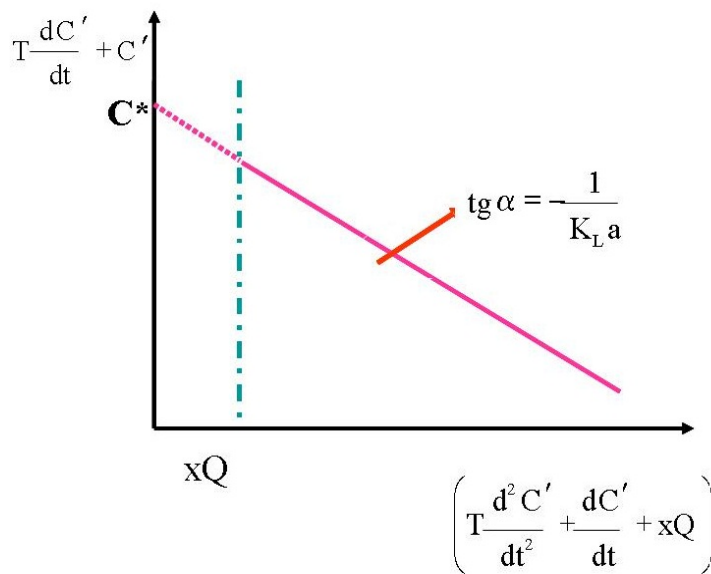
ahol C' a műszer által mért (az oldott oxigén koncentrációjával arányos) jel, C pedig a folyadékban mérhető valódi koncentráció, és T az egytárolós tag időállandója. Esetünkben nyilvánvaló, hogy $A=1$. Deriváljuk ezt az egyenletet:

$$T \frac{d^2 C'}{dt^2} + \frac{dC'}{dt} = \frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) - xQ \quad (4.386)$$

Egyenletek alapján a következő linearizálást és a 4.174. ábrán látható ábrázolást elvégezve $K_L a$ meghatározható.

$$C = T \frac{dC'}{dt} + C' = -\frac{1}{K_L a} \left(T \frac{d^2 C'}{dt^2} + \frac{dC'}{dt} + xQ \right) + C^* \quad (4.387)$$

Ekkor természetesen a kísérletes görbének nemcsak az első, hanem a második deriváltját is meg kell határoznunk, ami már meglehetősen nehézkes.



4.174. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás: linearizálás időállandóval

Egy másik megközelítés szerint a fenti differenciálegyenlet meg is oldható, és a megoldás $C'(0)=0$ és $dC'(0)/dt=0$ kezdeti feltételekkel

$$C'(t) = C^* \cdot \left[1 + \frac{K_L a}{\frac{1}{T} - K_L a} e^{-\frac{t}{T}} - \frac{\frac{1}{T}}{\frac{1}{T} - K_L a} e^{-K_L a t} \right]. \quad (4.388)$$

Ebből a formulából az összetartozó ($t, C'(t)$) adatok birtokában nemlineáris regresszióval a $K_L a$ és T keresett paraméterek elvileg meghatározhatók. Ha azonban jobban megnézzük az egyenletet, azt tapasztaljuk, hogy abban $K_L a$ és $1/T$ teljesen szimmetrikus, azaz felcserélve őket ugyanazt az összefüggést kapjuk. Ez azt jelenti, hogy a regresszió végrehajtása után nem lehet megmondani, hogy melyik becsült érték az $1/T$, és melyik a $K_L a$.¹¹⁸

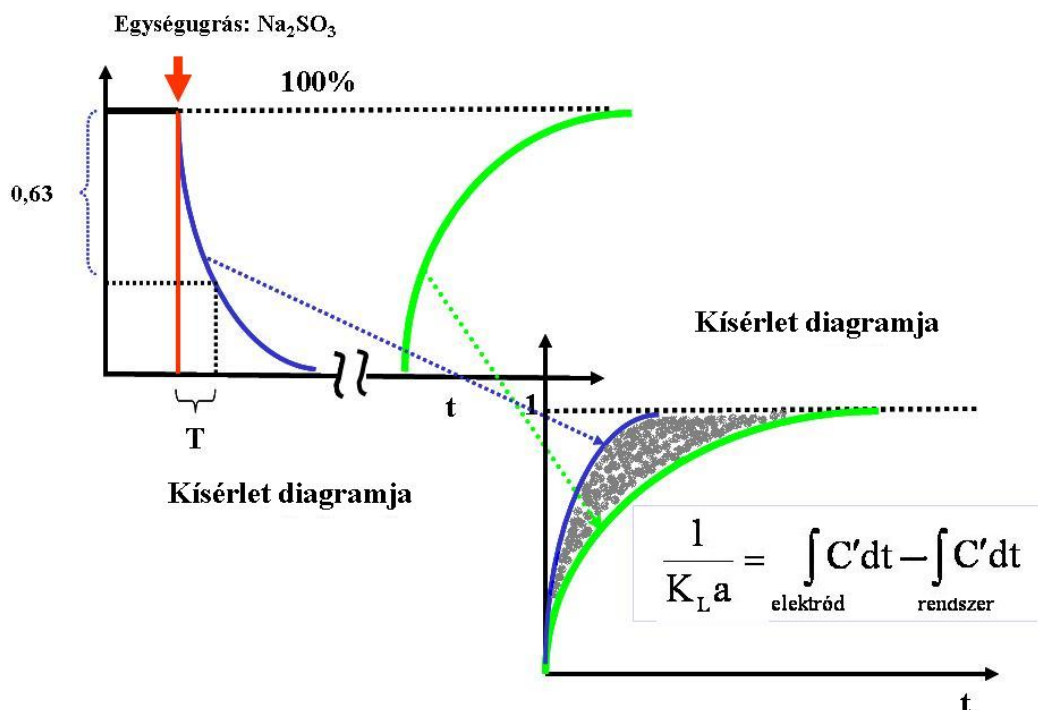
Az előbbi két módszer felveti a kérdést, hogy hogyan határozzuk meg az elektród időállandóját. Erre az egyik ismert módszer az egységugrás-zavarás hatására kiváltott dinamikus válaszfüggvény felvétele. Sajnos nem ismert olyan módszer, amellyel egy $0\% \rightarrow 100\%$ oldott oxigén egységugrás kísérletileg pontosan kivitelezhető, ezért ezt egy $100\% \rightarrow 0\%$ egységugrással helyettesítjük. Ez megoldható, ha a dinamikus módszert egy kissé módosítva a szulfitméréssel kombináljuk.

Kombinált módszer a $K_L a$ meghatározására

E módszerrel a szulfit oxidációs reakció tulajdonságait kihasználva határozhatjuk meg az elektród időállandóját, és egyidejűleg dinamikus módszerrel $K_L a$ -t is meghatározunk. Természetesen a kémiai reakció miatt itt nem lehetnek jelen mikroorganizmusok.

Az oxigénátadás szempontjából vizsgálandó bioreaktort vízzel töltjük meg, és a következő kísérletet végezzük el: indítsuk el a levegőztetést és keverést olyan paraméterekkel, amelyek mellett a $K_L a$ -t meghatározni kívánjuk. Várjuk meg az oxigénnel való telítődést. Ekkor öntsünk a reaktorba szulfitoldatot, amelynek legkisebb hányada is azonnal 0-ra csökkenti az oldott oxigén koncentrációját. Az mindaddig 0 is marad, amíg szulfit ionok vannak a rendszerben. Ha a szulfitszámra kíváncsiak vagyunk, most időnként vehetünk mintákat, és a fent leírt módszerrel meghatározhatjuk a szulfitszámot is. Amikor a szulfit ionok elfogytak, az oldott oxigén koncentrációja elkezd emelkedni az átviteli függvénynek megfelelő görbe mentén.

A két görbét normáljuk, és az elektród-válaszfüggvény $1-C'$ transzformációjával egy koordináta-rendszerben ábrázoljuk, és $0-\infty$ intervallumban integrálva a 4.175. ábrának megfelelően megkapjuk $K_L a$ értékét.



4.175. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás kombinált módszerrel

¹¹⁸ Ez valójában azt jelenti, hogy $1/K_L a$ is időállandó.

4.8.4. A gázanyagcsere mérése

A bioreaktorba levegőztetéssel bekerülő gáz oxigéntartalmának általában kevesebb mint 15–20%-a oldódik, azaz hasznosul, nagyobb része az elmenő gázzal távozik. Az oldódó oxigén helyébe széndioxid kerül, de természetesen nem pontosan akkora moláris mennyiséggel, mint amennyi oxigén elfogy (kivéve, ha az $RQ=1$). Ezért a bemenő és a kimenő levegőáramlási sebesség rendszerint jelentősen különbözik.

Ahhoz, hogy a légzési sebességet, a szén-dioxi-képződési sebességet, valamint az ezekből számítható respirációs hányadost mérni tudjuk, *elvileg* a következőket kell primer módon mérnünk:

bemenő és elmenő levegő térfogatárama,
hőmérséklet és nyomás a bemeneti és a kimeneti ponton,
valamint ugyanott a bemenő, illetve a távozó levegő összetétele.

Az áramlási sebesség mérését régebben rotaméterrel, kijelzős rotaméterrel oldották meg, ma az úgynevezett tömegárammérőket alkalmazzuk.¹¹⁹ Ez egy fűtött csőszakasz (4.176. ábra), amelynek hőmérsékletét állandó értéken tartjuk, és az ehhez szükséges elektromos fűtőteltjesítményt mérjük. Ez arányos a csőszakaszon áthaladó levegő tömegáramával. A műszert rendszerint egy szabályozóval és szabályozószeleppel egybeépítve használjuk.

A gázfázis oxigéntartalmát az oxigén paramágneses tulajdonságain alapuló gázelemzővel mérjük, míg a szén-dioxid-tartalmát infravörös elnyelésével (hővezetésével) követjük. Ezt a kétféle elven működő gázelemző rendszert általában egyesítve, egy műszerként hozzák forgalomba. Ha gazdaságos (több reaktor mérése), a tömegspektrometria is alkalmas a levegőztető gáz összetételének meghatározására.

Nézzük ezek után, hogy hogyan lehet egy gázanyagcsere követő rendszert felépíteni. Tételezzük fel, hogy mind a bemenő levegő jellemzőit, mind a kimenőit mérjük. Azaz mérjük T_1 , p_1 , q_1 és O_{21} , valamint CO_{21} és T_2 , p_2 , q_2 és O_{22} , valamint CO_{22} értékeit, ahol sorrendben a jelölések a hőmérsékletet, nyomást, térfogatáramot és a gázösszetételi értékeket jelentik a bemenő és a kimenő levegőben. Írjuk fel a bemenő légárammal érkező móláramot:

$$O_2^{be} = \frac{p_1 q_1}{RT_1} O_{21} \quad CO_2^{be} = \frac{p_1 q_1}{RT_1} CO_{21} \quad N_2^{be} = \frac{p_1 q_1}{RT_1} (1 - CO_{21} - O_{21}) \quad (4.389)$$

Hasonlóképpen írható fel a kimenő légáram oxigén, szén-dioxid és nitrogén mólárama is:

$$O_2^{ki} = \frac{p_2 q_2}{RT_2} O_{22} \quad CO_2^{ki} = \frac{p_2 q_2}{RT_2} CO_{22} \quad N_2^{ki} = \frac{p_2 q_2}{RT_2} (1 - CO_{22} - O_{22}) \quad (4.390)$$

Megkönnyíthetjük a dolgunkat, ha észrevesszük, hogy a bemenő és a kimenő légáramban a nitrogén mólárama biztosan nem változik (ha már telítődött a fermentáló nitrogénnel). Azaz

$$\frac{p_1 q_1}{RT_1} (1 - CO_{21} - O_{21}) = \frac{p_2 q_2}{RT_2} (1 - CO_{22} - O_{22}) \quad (4.391)$$

Ebből a q_2 kifejezhető:

$$q_2 = \frac{RT_2}{RT_1} \frac{p_1 q_1 (1 - O_{21} - CO_{21})}{p_1 (1 - O_{22} - CO_{22})} \quad (4.392)$$

Ha ezt felhasználjuk a 4.390 egyenletekben, akkor felírhatjuk a légzési sebesség és a szén-dioxid-képződési sebesség értékét:

$$OUR = \frac{p_1 q_1}{RT_1} \left(O_{21} - \frac{1 - O_{21} - CO_{21}}{1 - O_{22} - CO_{22}} O_{22} \right) \quad \text{és} \quad CER = \frac{p_1 q_1}{RT_1} \left(\frac{1 - O_{21} - CO_{21}}{1 - O_{22} - CO_{22}} CO_{22} - CO_{21} \right) \quad (4.393)$$

¹¹⁹ Mass flow meter

¹²⁰ OUR=oxygen uptake rate, CER=carbon dioxide evolution rate, légzési és szén-dioxid-képződési sebesség.

Ebből láthatjuk, hogy a gázanyagcsere sebességi értékeinek követéséhez kevesebb mérési helyre van szükség, mint előzőleg feltételeztük, azaz elegendő minden értéknek csak a bemenő levegő oldalon történő mérése. Ha pedig a respirációs hányadosra vagyunk kíváncsiak, a 4.393 egyenletet osztva a következőt nyerjük, amely szerint RQ mérését a be- és kimenő levegő összetételi adatai meghatározzák:

$$RQ = \frac{CER}{OUR} = \frac{\left(\frac{1 - O_{21} - CO_{21}}{1 - O_{22} - CO_{22}} CO_{22} - CO_{21} \right)}{\left(O_{21} - \frac{1 - O_{21} - CO_{21}}{1 - O_{22} - CO_{22}} O_{22} \right)} \quad (4.394)$$

4.8.5. Nem invazív fluoreszcens módszerek¹²¹

Az utóbbi években, a mikrobioreaktorok és az ún. nagy áteresztőképességű szűrő módszerek elterjedésével láttak napvilágot olyan fluoreszcencián és lumineszcencián alapuló módszerek, amelyek optikai útra terelték nemcsak az optikai denzitás, hanem a pH, az oldottoxigén- koncentráció és az oldott szén-dioxid-koncentráció kis helyigényű, nem invazív és gyors meghatározását.

Az oldott oxigén (sőt a gázfázisú oxigén) optikai mérésének az az alapja, hogy az oxigén dinamikusan kioltja valamely fluorofór fluoreszcenciáját, mégpedig 10 ns-nál nagyobb (néha több száz ns, azaz jól detektálható) félélettartammal. Az oxigén nélkül mért fluoreszcens fény intenzitásának és az oxigén jelenlétében mért fluoreszcens fény intenzitásának hányadosa az ún. Stern–Volmer-egyenlettel adott:

$$\frac{E_0}{E} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [c_{O_2}], \quad (4.395)$$

ahol E_0 és E az oxigén nélküli és az oxigén jelenlétében mért emisszióintenzitás, τ -k az élettartamok ugyanabban a sorrendben. K_{SV} a Stern–Volmer-állandó és c_{O_2} az oxigénszint. A reaktor fenekén egy foltban található a finoman elosztatott fém-ligandum fluorofór komplex (a fém gyakran palládium, platina vagy rubidium, míg a fluorofór például 1,10-fenantroline vagy 2,2'-bipiridin), amely egy oxigénáteresztő polimermembránban van rögzítve, ami megakadályozza a festék kioldódását a fermentlébe. A kapcsolódó műszer ugyanúgy 0–100% közötti értékeket mutat, mint a klasszikus DO-mérő elektródák esetében.

A pH mérése is megvalósult hasonló elveken: fluoreszcens festéket rögzítenek a bioreaktor alján

(pl. 8-hidroxiprén-1,3,6-triszulfonsav nátriumsója vagy szeminafto-rodafluor (SNARF) festéket rögzítenek polimerhez). A festék bázikus és savas formája különböző abszorpciós maximummal rendelkezik, valamint extinkciós koefficiendekkel, míg az emissziós maximumot a pH nem befolyásolja¹²². Méri tehát a két gerjesztési hullámhosszon az emisszió intenzitását, és ezek aránya lesz a pH függvénye. A mérhető pH-tartomány csupán 5,5–8,5 tartomány egyelőre.

Megemlítjük, hogy oldott CO_2 -mérő rendszert is kifejlesztettek.

Ezen eszközök esetében tehát a reaktor fenekére vannak rögzítve a fluoreszcens foltok (érzékelők), míg a megvilágítást biztosító led fényforrások és a fényintenzitást mérő fotodiódák a reaktoron kívül vannak elhelyezve. Ez lehetővé teszi, hogy egyrészt sok reaktorbeli történést lehet lényegében egyidőben követni, másrészt a reaktorok méretének radikális csökkentését, valamint akár rázott lombikok monitorálását is.

Meg kell azonban jegyeznünk, hogy ezek a módszerek elsősorban gyors és nagyszorozható szűrővizsgálatokra alkalmasak, mérési pontosságuk elmarad a hagyományos műszeres módszereikétől. Azaz kinetikai modellezésre, technológiafejlesztésre, optimalásra továbbra is a hagyományos módszerek a javallottak.

¹²¹ Az itt következő leírásnak a FLUOROMETRIX cég Cellstation berendezésének leírása az alapja.

¹²² Olyan érzékelő is van, amelynél a pH az emissziót is befolyásolja.

SZÓJEGYZÉK

Affinitás

Két molekula kötődésének erősségét mérő fogalom. Az enzim affinitását a szubsztráthoz a komplexük disszociációs állandója méri: minél nagyobb az affinitás, annál kisebb a disszociációs állandó.

Aktivátor

Enzimhez kötődő, reakciósebességet növelő ligandum.

Allosztérikus enzimek

Minimum két alegységből álló (kvaterner szerkezettel rendelkező) fehérjék, amelyeknél a kötődő ligandumnak (szubsztrát) az egyik alegységhez kötődésében egy ligandumnak (szubsztrátnak, inhibitornak, aktivátornak) egy másik alegységhez kötődésének erősítő vagy gyengítő szerepe van.

Antioxidáns

Olyan anyag, amely maga válik az oxidáció „áldozatává”, és ilyenképpen megvéd érzékeny fontos anyagokat (C-vitamin, E-vitamin stb.).

Apoenzim

Az enzim molekula fehérjerésze.

Állandósult állapot

Egy változó időbeli állandósága: változási sebessége zérus. Lásd: [steady state](#).

Aszeptikus

Csíramentes állapot, rendszer.

Aszimmetrikus szintézis

Prokirális vegyületből kiinduló bioszintézis. Az alapanyagot enzimesen 100%-ban a kívánt optikai izomerré alakítja át.

Biofinomító

Mezőgazdasági termék vagy melléktermék alapon működő olyan, elsősorban bioeljárásokat alkalmazó üzem, amely az alapanyag minden részét hasznos, hozzáadott értékkel rendelkező terméké alakítja.

Biokonverzió

[Biotranszformáció](#)val rokon kifejezés, egyesek szerint szűkebb értelmű az előbbinél.

Bioleaching

Ércekből a hasznos fém biológiai módszerekkel történő kioldása.

Bioremediáció

Szennyezett (pl. ásványolajjal, kátránnyal, egyéb kemikáliákkal) területek talajának megtisztítása biológiai módszerekkel.

Biotársadalom

~ nek nevezzük azt a társadalmat, ahol az élet minden szegmensét átszövik a biotechnológiák.

Biológiai az alapanyag (évenként megújuló lignocellulóz- és cukorbázis), **biológiai** eredetű az energia (lignocellulóz alapú hőerőművek, bioetanol, biodízel) és **bio** a technológia is.

Biotranszformáció

A→B típusú átalakítás, amelynek során a mikroba, vagy valamely sejt komponense, pl. enzime mint katalizátor nagy konverzióval alakítja át az A vegyületet B-vé.

BOD, BOI

Biológiai oxigén igény (demand), amelyet főképp az ötnapi értékével szoktak jellemezni: BOI₅.

CIP

Cleaning in place = helyben tisztítás.

Denaturáció

Természetellenes konformáció kialakulása. Különböző hatásokra (hőmérséklet, pH, ionerősség, szerves oldószerek) a fehérje harmadlagos szerkezete megváltozik, és a „természetestől” eltérő konformációt vesz fel, akár reverzibilisen, akár irreverzibilisen.

Determinisztikus

Egy:egy meghatározottságú. A független változó adott értékéhez a függvénynek egy (esetleg több, de nem sztohasztikusán terhelt) értéke tartozik.

Dinamikus komplex

Reverzibilis komplex, azaz a kapcsolódás mellett a szétválás sebessége is jelentős.

De novo fermentáció

Egyszerű tápanyagkomponensekből valamely anyagcseretermék „újból” szintézise, melynek során a mikrobatömeg is növekedik.

Domén

Speciális szerkezeti részlete a fehérjemolekulának, amely szerkezetileg elkülönül vagy funkcionálisan megkülönböztethető.

DOWN STREAM műveletek

A fermentációhoz kapcsolódó műveletek, mint a termék izolálása és tisztítása, valamint a fermentáció és a feldolgozás során keletkező hulladékok (szennyvíz, szén-dioxid stb.) kezelése, feldolgozása.

Dugóáramú reaktor

Keveredés nélküli folytonos üzemű reaktor, amelyen keresztül az egymást követő folyadékelemek egymástól elszigetelve (szegregáltan), visszakeveredés nélkül haladnak keresztül (plug-flow).

ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay: antigén vagy antitest meghatározására alkalmazott immunológiai teszt.

Elszigetelés = [kontéinment](#).

Enantiomer felesleg

A két enantiomer koncentrációja különbségének viszonya azok összegéhez, azaz azt méri, hogy egy adott enantiomer az egészhez képest mennyire van túlsúlyban, a termék adott enantiomerre vonatkozó „tisztaságát” adja meg:

$$ee_R = \frac{n_R - n_S}{n_R + n_S}$$

Endoenzim

Olyan depolimerizáló enzim, amely a polimer lánc belsejében, statisztikusan, illetve meghatározott kötéseknél bont

ENDOGEN

= INTRACELLULÁRIS, azaz sejten belüli. Általában: belső, belső eredetű.

Endogén metabolizmus

A fenntartás sajátos formája, amikor a saját tartaléktápanyagok (sejtanyag) szolgálnak energiaforrássul.

Exoenzim

. Olyan depolimerizáló enzim, amely a polimer lácvégéről kezdi a lebontást.

Fedbatch tenyésztés

Rátáplálós szakaszos tenyésztés. Csak betáplálás van, elvétel nincs, a térfogat növekszik.

Flokkulum

Összecsapódott, összetapadt mikrobatömeg, -pehely, amely sok millió-milliárd egyedi sejtet tartalmazhat. Az eleveniszapos biológiai szennyvíztisztítás jellemző mikrobatömeg- megjelenési formája.

Fluxus

Egységnyi felületen egységnyi idő alatt átadott (anyag)mennyiség.

Folding

Aminosavlánc olyan hajtogatódása, ami a katalitikus hatáshoz szükséges harmadlagos szerkezetet kialakítja.

Fosszilis

Ősi földtörténeti korokból származó ásványosult állati és növényi eredetű anyag. Például fosszilis energiahordozó a kőolaj, földgáz és a szén.

Fotolitotróf

Szerveetlen szénforrást és fényenergiát hasznosító organizmus.

Glikémiás index

= GI, arra utal, hogy milyen gyorsan szívódik fel egy adott ételmiszerben lévő szénhidrát a szervezetben. Relatív érték, a glükóz lebomlási sebességére vonatkoztatják.

GLP, GMP

Good Laboratory Practice (Helyes Laboratóriumi Eljárásrend), Good Manufacturing Practice (Helyes Termelési Eljárásrend). A minőségi munka szabályrendszerei, amelyek a minőségi munka céljából követendők és a minőségbiztosítás során számonkérhetőek és számonkérendők.

GMO

Genetikailag manipulált organizmus.

Herbicide

Gyomirtó növényvédőszer.

Heterofermentatív

Több terméket képez fermentációja során: pl. a heterofermentatív tejsavbaktériumok nemcsak tejsavat, hanem ecetsavat, etanolt (lásd a 4.17. ábrát).

Heterotróf

Szerves eredetű szén-/energiaforráson élő organizmus.

Holoenzim

Az apoenzim és a kofaktor együttese.

Homeosztázis

Fiziológiai állandósult állapot = kiegyensúlyozott növekedés, a sejt valamennyi komponense ugyanavval a fajlagos sebességgel változik.

Homofermentatív

Egytermékes anaerob cukorfermentáció, pl. homofermentatív tejsavbaktériumok terméke kizárólag a tejsav (lásd a 4.17. ábrát).

Idiofázis

Fonális mikrobák növekedési szakasza, amelyet a szekunder anyagcsere jellemez, és amelyben rendszerint valamely tápanyag limitál vagy elfogyott, vagy egyéb tényező korlátozza a primer anyagcserét.

Indukált illeszkedés

A ligandum kapcsolódása során az enzimfehérje harmadlagos szerkezete módosul annak érdekében, hogy intimebb kapcsolat jöjjön létre a szubsztrát és az enzim között. A kapcsolódás során mindkettő szerkezete folyamatosan változik, amíg az entrópiacsapda létre nem jön.

Inhibitor

Enzimhez kötődő, reakciósebességet csökkentő ligandum.

In vitro

Laboratóriumi vagy egyéb mesterséges körülmények közötti (pl. tenyésztési) eljárás.

In vivo

Természetes élő rendszerben végbemenő folyamat, avval végzett eljárás.

In numero = in silico

Matematikai szimulációs „kísérleti technika”.

Ionerősség

$I_i = 0,5c_i z_i^2$, ahol c_i az i -edik ion molaritása, z_i ugyanennek a töltése.

IUPAC

International Union of Pure and Applied Chemistry: a nemzetközi kémikus közösség kormányfüggetlen szervezete.

Katalitikus effektivitás

Szinonima: specifikációs állandó = k_{cat} / K_m .

Kemolitotróf

Szerveetlen szénforrást és kémiai energiát hasznosító organizmus.

Kinetikus rezolválás

Racém keverék átalakítása adott enantiomerré úgy, hogy csak az egyik összetevő alakul át, a másik változatlan marad.

Királis centrum

Olyan C-atom, amelyhez négy eltérő csoport kapcsolódik.

Koenzim

Szerves kofaktor, amely kétféle lehet: prosztetikus csoport vagy kosubsztrát.

Kofaktor

Az enzim molekula fehérjerészéhez kapcsolódó nemfehérje molekula, amely azonban szükséges az enzim működéséhez. Ez fémion vagy szerves molekula, azaz koenzim lehet.

Kompetitív inhibitor

Olyan effektor, amely kapcsolódása esetén kizárja a szubsztrátumot az enzimről, ezáltal megakadályozza a katalitikus folyamatot.

Komplett inhibíció

v. teljes inhibíció: az inhibitor 100%-os aktivitáscsökkenést okoz, azaz amelyik enzim molekula inhibitorra kötött, az nem alakít át.

Kontéinment

Benntartás, elszigetelés, izolálás. Mikrobáknak a rendszerben való visszatartása, környezetbe történő kiszabadulásuk megakadályozása. Különös jelentősége van patogén vagy GMO-tenyészetek esetében.

Konszekutív reakció

Reakciósor eleme. Egymást követő reakciók, amelyekben az első reakció terméke a második reakciónak szubsztrátja, a második reakció terméke a harmadik szubsztrátja stb.

Kooperativitás

A kooperativitás az allosztérikus fehérje kismolekula kötésére vonatkozó affinitásának módosítása egy előzőleg megkötött másik kismolekula által. Pozitív és negatív kooperativitásról beszélhetünk.

Kosubsztrát

Nem kovalensen kötődő koenzim, tulajdonképpen második szubsztrát, amelynek a jelenléte elengedhetetlen az enzim működéséhez (néha szinonimaként a koenzim kifejezést használjuk, noha az nemcsak a kosubsztrátot, hanem a kovalensen kötődő prosztetikus csoportot is magába foglalja).

Ligandum

Molekulához (témánkban: fehérjéhez) kötődő idegen molekula (enzim esetében: szubsztrát, inhibitor, aktivátor).

Maláta

Csíráztatott és hőkezelt árpa.

Metabolikus enzimek

Kissé pongyola elnevezése azoknak az enzimeknek, amelyek a metabolit interkonverziókért felelősek. Egyszerű metabolitok enzimeit. Például a glikolízis vagy a pentózfoszfát út enzimeit.

Metabolit

Anyagcsere közti- és végtermék.

Molekuláris kapcsolók

Információátvitelben szerepet játszó speciális fehérjék.

Nano-biotechnológia

Nano- és mikromanipulációs technikák alkalmazása olyan „szerkezetek” előállítására, amelyekkel a biorendszerek mélységükben tanulmányozhatók, illetve felhasználhatók pl. hatóanyag bejuttatására vagy diagnosztikára.

Nemkompetitív inhibitor, ~ inhibíció

Olyan effektor, amely a fehérjéhez máshová kötődve mint annak szubsztrátja, olyan konformáció-változást idéz elő, amely ugyan nem akadályozza meg a szubsztrát kötődését, de a reakció létrejöttét igen.

Newtoni reológiai karakter

Állandó viszkozitású fluidum, amelynél a nyírósebesség és nyírófeszültség közötti függvény (a folyásgörbe) egyenes. Nemnewtoni fluidum esetén az előbbivel ellentétben a nyírófeszültség nem lineáris függvénye a nyírósebességnek, azaz nincs állandó viszkozitásuk, az függ a nyírósebességtől.

Nyugó sejt

= nem szaporodó. A sejtek olyan közegben működnek, amely nem teljes értékű tápoldat, valamilyen, a növekedéshez szükséges komponens hiányzik.

OECD

Organisation for Economic Cooperation and Development, Nemzetközi Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (világszervezet)

Optikai denzitás

Optikai zavarosság, a mikrobanövekedés mérésének optikai módszereivel kapott, mikroba-koncentrációt helyettesítő érték.

Orientációs effektus

Az enzimműködés egyik modellje: a ligandum csak megfelelő térbeli orientáció esetén képes az enzimhez kapcsolódni.

OTR = oxygen transfer rate

Oxigénátadási sebesség [$\text{kg O}_2/\text{m}^3 \cdot \text{h}$]. Ez tenyésztés során mindig egyenlő az oxigén-felhasználási sebességgel.

Parciális inhibíció

v. részleges inhibíció: az inhibitor-kötött enzimmolekula részben megtartja katalitikus hatását, azaz maradék aktivitás mérhető.

Pasztörözés

Olyan élőmikroba-mentesítő eljárás, amelynek során csak a vegetatív sejtek pusztulnak el, a baktériumspórák azonban nem.

Pellet

Mikroba-pellet vagy göböcske: makroszkópikus, azaz szabad szemmel is látható hifaképződmény, amely 1-2 mm-es méretig kompakt, tömör göb, növekvő méretek esetén a belsejében a lizáló sejtekkel folyadék képződik, és azt veszi körül gömbhéj elrendeződésben a hifatömeg.

Permeáz

Sejtbe történő anyagtranszportot segítő átvívó fehérje (könnyített transzport).

Pervaporáció

Fázisváltózással is együtt járó membránművelet: a membrán egyik oldalán oldott folyékony fázisban van, míg a membránon átjutva a másik oldalon gőzfázisban lesz az átmenő anyag.

Platformalkotó vegyület

Olyan alapvegyület, amelyből egyszerű kémiai vagy biológiai átalakításokkal egy sor másik előállítható.

Predátor

Ragadozó

Prey

Zsákmány, préda

PRIMER metabolit

A sejtműködés szempontjából elsődleges fontosságú anyagcseretermék vagy köztes termék, amely elsősorban az energiatermeléssel és a makromolekulák szintézisével kapcsolatos anyagokat jelenti. Ezek a növekedés tropofázisában keletkeznek.

Produktivitás

Időegység alatt egy térfogategységnyi reaktor hasznos térfogatóból előállított termék. Térfogati termelési sebesség. ($\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$)

Prosztetikus csoport

Kovalensen a fehérjéhez kötődő koenzim (FADH₂, hem, Piridoxal-P).

Proximitási effektus

Az enzimhatást magyarázó egyik modell: a szubsztrátnak megfelelően közel kell kerülnie az aktív helyhez, hogy az intim kapcsolat létrejöjjön.

Protomer

Allosztérikus enzim legkisebb katalitikusan már aktív egysége.

Protoplaszt

Sejtfal nélküli mikroba- vagy növényi sejt.

Rátáplálásos szakaszos tenyésztés

= fed batch. Fermentációs technika, amelynél különböző ütemű (állandó sebességű, periodikus, eseményszabályozott stb.) friss tápoldat-betáplálással, de elvétel nélkül (növekvő térfogat mellett) valósul meg a tenyésztés.

Restriktív enzim

„...baktériumokban és kéalgákban előforduló különleges enzimek. Biológiai szerepük a sejtidegen DNS (például a baktériumot megtámadó bakteriofág DNS-e) felismerése és megsemmisítése. A géntechnológia a restriktív enzimeknek azt a tulajdonságát használja fel, hogy a DNS nukleotidsorrendjének bizonyos elemeit (4–8 bázispár hosszúságú, többnyire szimmetrikus szakaszokat) nagy pontossággal felismerik, és ezeknél a szakaszoknál hasítják a DNS mindkét láncát.”¹²³

Reverzió

Mutáns vagy rekombináns mikroba visszaalakulása a vad genotípusá.

Ribozim

Katalitikus hatású RNS.

¹²³ http://www.enc.hu/lenciklopedia/fogalmi/biol_mol/restrickios.htm Magyar virtuális enciklopédia. Venetianer Pál

SCP

Single Cell Protein: mikrobiális egysejtfehérje. A 20. század hatvanas, hetvenes éveiben azt gondolták, hogy a világ fehérjeinségét mikrobiális, elsősorban bakteriális egysejtfehérje tömegtermelésével lehet megoldani.

Steady state

Lásd [állandósult állapot](#).

Suffixum

Toldalék, pl. az enzimek **-áz** képzője.

Száranyag-tartalom

A sejtömeg mérésére szolgáló fogalom: 105 °C-on kiszárított vízmentes sejtömeg.

Szekunder metabolit

Nem primer, nem elsődleges fontosságú anyagcseretermék, a növekedés [idiofázis](#)ában primer anyagcseretermékekből képződik.

Az IUPAC Gold Book definíciója: „[Metabolites](#) which are produced by routes other than the normal metabolic pathways, mostly after the phase of active growth and under conditions of deficiency. The biological significance of many secondary metabolites is not exactly known”.

Sztereoszelektivitás

Az S- és az R-enantiomer átalakítási (képződési) sebességének hányadosa egy racémkeverékből (lásd a 2.76 egyenletet).

Sztohasztikus

Véletlen elemeket tartalmazó (modell esetén: valószínűségi elemeket is tartalmaz).

Szubmerz

Olyan fermentációs eljárás, amelyben a mikrobák a tápoldat belsejében („bemerülve”) szaporodnak.

Ternér komplex

Három összkapcsolódó anyag alkotta komplex, például: két ligandumnak az enzim molekulához kötődésével létrejövő komplex.

Tökéletesen kevert reaktor

Olyan kevert reaktor, amelyben sehol sincsenek koncentráció gradiensek minden időpillanatra.

Tropofázis

Fonális mikrobák növekedési szakasza, amelyet a primer anyagcsere jellemez, ekkor a mikroba korlátolatlanul, kiegyensúlyozottan növekedik.

Turnover number

= váltásszám vagy katalitikus állandó. Megadja az 1 perc alatt (vagy egy s alatt) egy enzim-molekula által átalakított szubsztrátmolekulák számát. Ez a frekvenciája az enzim működésének: hányszor „fogad” és alakít át szubsztrátmolekulát egy perc (vagy egy s) alatt.

Unkompetitív inhibitor, ~ inhibíció

Olyan effektor, amely csak akkor képes az enzimhez kötődni, ha annak szubsztrát kötése már létrejött, ekkor azonban meggátolja az enzimes reakciót (negatív hatású konformációváltást indukálva)

„Umami” íz

Az édes, a sós, a savanyú és a keserű alapízek mellett az ötödik alapíz, amelynek tehát szintén saját érzékelő receptorai vannak. Jellemzően a MSG, a mononátriumglutamát íze.

Upstream műveletek

Azok a fermentációs műveletek, amelyek a tápoldatok elkészítésétől a sterilizáción át, magához a fermentációs folyamathoz vezetnek, és maguk a fermentációs folyamatok során alkalmazott műveletek (oltás, levegőztetés, keverés stb).

Vágási fermentlé, a fermentlé vágása

A szakaszos fermentáció végén az a fermentlé, amelyet a feldolgozásra visznek. A vágás a fermentáció vége.

Váltásszám

Lásd [turnover number](#).

ÁBRÁK, ANIMÁCIÓK, SZIMULÁCIÓK, VIDEÓK, TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

Ábrák

1.1. ábra: A biotechnológia interdiszciplináris.....	6
1.2. ábra: Kapcsolat az alapdiszciplínák és a biotechnológia között.....	6
1.3. ábra: Kenyérkészítés. Egyiptomi sírfestmény, Théba, Kr. e. 1500 körül.....	7
1.4. ábra: Sörkészítés és söráldozat Nin-Harra istennőnek. Monument Blau, agyagtábla, Sumér Birodalom, Kr. e. 2500 körül. (Louvre, Párizs).....	7
1.5. ábra: Antoni van Leeuwenhoek és mikroszkópja.....	8
1.6. ábra: Louis Pasteur (1822–1895).....	8
1.7. ábra: Charles Darwin (1809–1882).....	8
1.8. ábra: Gregor Mendel (1822–1884).....	9
1.9. ábra: Robert Koch (1843–1910).....	9
1.10. ábra: Eduard Buchner (1860–1917).....	9
1.11. ábra: Thomas H. Morgan (1866–1945).....	10
1.12. ábra: Chaim Weizmann (1874–1952).....	10
1.13. ábra: Ereky Károly (1878–1952).....	10
1.14. ábra: Alexander Fleming (1881–1955) átveszi a Nobel-díjat 1945-ben.....	10
1.15. ábra: Edward Lawrie Tatum (1909–1975).....	11
1.16. ábra: Joshua Lederberg (1925–).....	11
1.17. ábra: Watson, Crick és Wilkins.....	11
1.18. ábra: François Jacob (1920–).....	12
1.19. ábra: Jacques Monod (1910–1976).....	12
1.20. ábra: A biotársadalom.....	13
1.21. ábra: A biotechnológiai termékek kereskedelmi értékének és a koncentrációjának összefüggése.....	20
1.22. ábra: De novo fermentáció és biokonverzió.....	21
1.23. ábra: A fermentáció központi szerepe.....	21
1.24. ábra: Fermentációs folyamat megvalósításának feltételei és a kapcsolódó műveletek.....	22
2.1. ábra: Az enzim csökkenti a reakció aktiválási energiáját.....	26
2.2. ábra: Az aktivált átmeneti komplex létrejöttéhez aktiválási energia befektetése szükséges. Energetikailag az a kedvező, ha a szubsztrát és az enzim is változik, miközben létrejön a komplex: indukált illeszkedés.....	28
2.3. ábra: Az izocitrát-dehidrogenáz térszerkezete. A szubsztrátumkötő, illetve aktív hely csak egy kis terület a teljes enzim molekulán.....	29
2.4. ábra: A kulcs a szubsztrátum, a zár az enzim.....	29
2.5. ábra: Orientációs effektus, three-point attachment, az aktív helyen minimum 3 aminosav felelős a megfelelő illeszkedésért: ez a sztereospecifitás alapja.....	30

2.6. ábra: A hexokináz enzim „álkapcsa” rácsukodik a glükóz szubsztrátra.....	31
2.7. ábra: A hexokináz enzim aktív centruma a glükózt megkötő H-hidakkal.....	31
2.8. ábra: Kimotripszin aktív centrumában a szubsztrátum elhelyezkedése	32
2.9. ábra: Kimotripszin kovalens katalízise.....	32
2.10. ábra: A kimotripszin működésének molekuláris mechanizmusa	33
2.11. ábra: A kimotripszin műszubsztrátja és analogonjai	34
2.12. ábra: A glükózoxidáz szisztematikus neve.....	36
2.13. ábra: A Michaelis–Menten enzimkinetika szülői	39
2.14. ábra: A kezdeti reakciósebesség	40
2.15. ábra: A kinetikai egyenlet levezetés nélküli felírását elősegítő eljárás	41
2.16. ábra: A (2.9) egyenlet numerikus megoldása	42
2.17. ábra: A (2.9) valós idejű megoldásai a presteady state-re és a teljes folyamatra	43
2.18. ábra: A M–M és B–H-egyenletek ábrázolása és diszkussziója	44
2.19. ábra: A M–M-egyenlet egy hiperbola transzformációja.....	45
2.20. ábra: Linearizációs módszerek az integrált M–M-egyenlet alapján	45
2.21. ábra: A M–M-egyenlet linearizációi	46
2.22. ábra: V_{max} arányos az enzimbeméréssel: az aktivitás és k_2 meghatározása.....	47
2.23. ábra: K_m illetve K_s közelítőleg a sejtbeli szubsztrátkoncentráció.	48
2.24. ábra: A k_{cat} értéktartományai a különböző enzimtípusokra	49
2.25. ábra: A sarin ideggáz hatása.....	52
2.26. ábra: Az irreverzibilis inhibíció azonosítása	53
2.27. ábra: A kompetitív inhibíció modelljei 1.....	54
2.28. ábra: A kompetitív inhibíció modelljei 2.....	54
2.29. ábra: A kompetitív inhibíció V-S ábrázolása	56
2.30. ábra: A kompetitív inhibíció Lineweaver–Burk-ábrázolása.....	56
2.31. ábra: A szulfagyógyszerek kompetitív inhibitorok	57
2.32. ábra: Példák a kompetitív inhibitorokra	58
2.33. ábra: Nemkompetitív inhibíció Michaelis–Menten- és Lineweaver–Burk-ábrázolása	60
2.34. ábra: A katekin-oxidáz kompetitív és nemkompetitív inhibíciója.....	60
2.35. ábra: Unkompetitív inhibíció.....	62
2.36. ábra: A Glyphosate egy unkompetitív inhibitor	62
2.37. ábra: Lineáris kevert típusú inhibíció ($1 < \alpha < \infty$) ($K_s = K_m$).....	63
2.38. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók kinetikai egyenleteinek összefoglalása.....	64
2.39. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók Lineweaver–Burk-ábrázolása	65
2.40. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók Hanes–Langmuir-ábrázolása	65
2.41. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók Eadie–Hofstee-ábrázolása	66
2.42. ábra: Lineáris reverzibilis inhibíciók Dixon-ábrázolása.....	66

2.43. ábra: A szukcinát dehidrogenáz szubsztrát inhibíciója.....	67
2.44. ábra: A szubsztrátinhibíció sémája.....	68
2.45. ábra: A szubsztrátinhibíció V-S- és Lineweaver–Burk-ábrázolása.....	69
2.46. ábra: A pingpongmechanizmus sémája.....	71
2.47. ábra: Pingpongmechanizmus Lineweaver–Burk-ábrázolása.....	72
2.48. ábra: Random bi-bi és határozott sorrendű bi-bi mechanizmusok Lineweaver–Burk-ábrája	72
2.49. ábra: A Michaelis-féle pH- függvények	75
2.50. ábra: Különböző enzimek pH-optimum görbéi.....	75
2.51. ábra: A hőfokfüggés ábrázolása a hőmérséklet aktiválási és inaktiválási hatásának elkülönítésére.....	77
2.52. ábra: Milyen módszerekkel és hova rögzíthetjük enzimünket?.....	78
2.53. ábra: Enzimirögzítés diazotálással	79
2.54. ábra: Brómcianós enzimirögzítés	80
2.55. ábra: Az enzim fenil-, amino-, szulfhidril csoportjainak alkilezése	80
2.56. ábra: Kémiai rögzítés glutáraldehiddel.....	80
2.57. ábra: Keresztkötések létrehozására alkalmas vegyületek.....	81
2.58. ábra: Üvegfelületre történő enzimirögzítés	81
2.59. ábra: Keresztkötéses immobilizálás glutáraldehiddel.....	82
2.60. ábra: Keresztkötött enzimkristályok(CLEC).....	83
2.61. ábra: Enzimirögzítésre alkalmazott gélképzők.....	84
2.62. ábra: Akrilamid gélbe zárása: poliakrilamid-mátrix készítése	84
2.63. ábra: Triptofán szintáz enzim nem állandó membrán mögé zárása.....	85
2.64. ábra: Üreges szál, UF membrán mögé zárás	85
2.65. ábra: Szubsztrát anyagátadási viszonyok a rögzített enzimszemcsénél	87
2.66. ábra: Gélbe rögzített enzim. A kacsaringósság definiálása.....	90
2.67. ábra: Belső anyagátadási modell	90
2.68. ábra: Belső anyagátadás hatása: S koncentráció profiljának alakulása részecskében	94
2.69. ábra: Szubsztrátmeghatározás végpontig futtatott enzimes reakcióval	98
2.70. ábra: Szubsztrátmeghatározás indikátorreakció segítségével.....	98
2.71. ábra: Enzimfelhasználás indikátorként ELISA eljárásban	99
2.72. ábra: Szubsztrátmeghatározás kinetikai mérés alapján	99
2.73. ábra: Bioszenzorok felépítése.....	100
2.74. ábra: Glükózelektrod felépítése.....	100
2.75. ábra: Potenciometrikus enzimelektrodok felépítése	100
2.76. ábra: Elektronátadó sók	101
2.77. ábra: Enzimes reaktorok.....	101
2.78. ábra: Allostérikus enzim sebesség-szubsztrát koncentráció görbéje	105
2.79. ábra: Effektorok hatása az alloenzimekre.....	106

2.80. ábra: A Hill-koefficiens hatása az alloenzimek kinetikájára	107
2.81. ábra: Lineweaver–Burk-ábrázolás alloenzimek esetén	108
2.82. ábra: Hanes–Langmuir-ábrázolás alloenzimek esetén	108
2.83. ábra: A Hill-egyenlet logaritmikus ábrázolása	109
2.84. ábra: A kooperativitás metabolikus előnye	110
2.85. ábra: T→ R átmenet a szimmetriamodell szerint	110
2.86. ábra: Monod–Wyman–Changeux-modell	111
2.87. ábra: T→ R átmenetek a szekvenciális modell szerint.....	112
2.88. ábra: Koshland–Némethy–Filmer-modell	112
2.89. ábra: ATCáz negyedleges szerkezete	113
2.90. ábra: A transzportfolyamatok fajtái.....	114
2.91. ábra: A könnyített diffúzió kinetikai sémája	118
2.92. ábra: Proton aktív transzport és légzési lánc (kemiozmotikus elmélet)	120
2.93. ábra: A légzési lánc „galváneleme”	120
2.94. ábra: A szekunder aktív transzport fajtái.....	120
2.95. ábra: Specifikus glükóztranszport foszfortranszferáz rendszerrel	121
3.1. ábra: Triptofán pirroláz reakciója.....	124
3.2. ábra: Az ecetsav mint a fehér biotechnológia platform vegyülete	125
3.3. ábra: Glicerín oxidációja	126
3.4. ábra: Szorbit oxidációja.....	126
3.5. ábra: A C-vitamin Reichstein-féle szintézise	127
3.6. ábra: Alternatív 2-keto-L-gulonsav előállítás A.....	128
3.7. ábra: Alternatív 2-keto-L-gulonsav előállítás B.....	128
3.8. ábra: Glükonsav-fermentáció	130
3.9. ábra: Galaktózoxidáz reakciói	130
3.10. ábra: Enantioszelektív redukció (Prelog-szabály)	131
3.11. ábra: Enantiospecifikus oxidáció.....	131
3.12. ábra: Az első és az első iparilag jelentős szteroidátalakítás	132
3.13. ábra: Régióspecifikus hidroxilezés.....	133
3.14. ábra: Dehidrogénezés, kettős kötés kialakítása a szteránvázon.....	134
3.15. ábra: Maltóz transzglykozilezése maltózzal.....	135
3.16. ábra: Dextránszintézis	136
3.17. ábra: Ciklodextrinek szerkezete	137
3.18. ábra: Xantán szerkezete.....	138
3.19. ábra: Aciloinkondenzáció.....	139
3.20. ábra: DOPA enzimes előállítása katekinből.....	140
3.21. ábra: Akrilamid előállítása	140

3.22. ábra: Fumársav-átalakítások.....	141
3.23. ábra: Glükóz-fruktóz átalakítás	142
3.24. ábra: A resolválás általános lehetőségei	143
3.25. ábra: Aszimmetrikus aminosav-szintézis	144
3.26. ábra: Aminosav kinetikus resolválása	145
3.27. ábra: Az aszimmetrikus hidrolízis folyamatábrája	145
3.28. ábra: Nem természetes L-aminosavak előállítása.....	146
3.29. ábra: Lipázkatalizálta aszimmetrikus hidrolízis	147
3.30. ábra: Az amilóz és amilopektin szerkezete	148
3.31. ábra: Az amilóz hélice és az amilopektin klasztere.....	148
3.32. ábra: Egy növényi keményítőszemcse felépítése	149
3.33. ábra: A keményítőbontó enzimek működése	150
3.34. ábra: Keményítőbontás és határdextrin kialakulása	150
3.35. ábra: A keményítő ipari lebontása glükózzá	151
3.36. ábra: A cellulóz homopolimer szerkezete	152
3.37. ábra: A cellulózbontó enzimek működése.....	152
3.38. ábra: A pektin alappolimerének szerkezete	153
3.39. ábra: A teljes pektinlánc szerkezete	154
3.40. ábra: Fleming felfedezése: a penicillin.....	155
3.41. ábra: A penicillin-G szerkezete és lebontó enzimei	155
3.42. ábra: APA-szintézis enzimesen és kémiai módszerrel	156
3.43. ábra: Folytonos APA-előállítás folyamatábrája	157
3.44. ábra: Néhány félszintetikus penicillin- és cefalosporin-származék.....	157
3.45. ábra: A laktóz hidrolízise	158
3.46. ábra: ATP-előállítás adenoizból élesztővel	159
3.47. ábra: A glikolízis vázlatos lépései az ATP-termelő és -fogyasztó lépésekkel.....	159
3.48. ábra: Egy termékes kapcsolt rendszer: mannit előállítása	160
3.49. ábra: Egy termékes kapcsolt rendszer: tercier leucin előállítása	161
3.50. ábra: Kapcsolt rendszer két termékkel glükonsav és mannit előállítására	161
3.51. ábra: Koenzim-regenerálás konzekutív reakcióval: szorbóz előállítása	162
3.52. ábra: NADPH előállítása többszörös koenzim-regenerálással	162
3.53. ábra: Kétszubsztrátos koenzim-regenerálással megvalósított sztereospecifikus biotranszformáció.....	163
3.54. ábra: A szulkatol-előállítás megvalósításának sémája.....	163
3.55. ábra: Proteinázok támadáspont-specifitása.....	164
3.56. ábra: A peptidszintézisben reagáló aminosavak védelme	164
3.57. ábra: Termodinamikai kontroll és az egyensúlyi állandó növelésének módozatai.....	165
3.58. ábra: Termodinamikai és kinetikai kontroll összehasonlítása	166

3.59. ábra: Az aszpartámszintézis folyamata	167
4.1. ábra: Korlátlan exponenciális növekedési görbe	169
4.2. ábra: Szakaszos fermentáció valódi növekedési görbéje.....	170
4.3. ábra: Szakaszos fermentáció növekedési görbéje és elsődleges kinetikai ábrái.....	170
4.4. ábra: Az élő sejtszám változása a szakaszos tenyésztés során	171
4.5. ábra: A növekedési görbe féllogaritmikus ábrázolása.....	171
4.6. ábra: Monod-modell, a fajlagos növekedési sebesség függése a limitáló szubsztrát koncentrációjától.....	172
4.7. ábra: Monod-modell, a K_S és μ_{max} grafikus meghatározási lehetőségei	173
4.8. ábra: Melyik lesz a limitáló szubsztrát?	173
4.9. ábra: Mikrobacsoportok szénforrás- és energiaforrás-igény alapján.....	175
4.10. ábra: A táplálékhasznosulás sémája	177
4.11. ábra: Az anyagcsere legfőbb kulcsvegyületei: ATP, AcCoA, NAD	185
4.12. ábra: A pentózfoszfát anyagcsereút.....	185
4.13. ábra: A cukorlebontás Entner Duodoroff anyagcsereútja.....	186
4.14. ábra: A citrátkör és az anaplerotikus reakciók	186
4.15. ábra: A C-forrás felhasználás anyagcsereútjainak szintjei	187
4.16. ábra: Terminális oxidáció.....	188
4.17. ábra: Homolaktikus és heterolaktikus fermentáció	188
4.18. ábra: Anaerob (fermentatív) NAD regenerálás és anyagcseretermékei	189
4.19. ábra: A maintenance koefficiens grafikus meghatározása	193
4.20. ábra: C-forgalom a fermentáció során.....	196
4.21. ábra: Az oxigénfogyasztás és a metabolikus hőtermelés kapcsolata.....	201
4.22. ábra: $Y_O - Y_{x/S}$ kapcsolata sejttömeg tenyésztés esetén.....	204
4.23. ábra: A matematikai modellezés maga is folyamat.....	207
4.24. ábra: Mikrobacsoportok generációsido-eloszlása.....	213
4.25. ábra: Egy hipotetikus mezofil mikroba fajlagos növekedési sebességének függése a hőmérséklettől $\mu - 1/T$ ábrázolásban	214
4.26. ábra: A MONOD-modell állandóinak meghatározása Muzicsenko szerint	218
4.27. ábra: Szubsztrátinhibíció és Lineweaver–Burk-ábrázolása	218
4.28. ábra: Gaden-féle termékképződési típusok	221
4.29. ábra: Luedeking–Piret-féle termékképződési típusok	222
4.30. ábra: Pontjaikban adott kísérleti „fermentációgörbék”	224
4.31. ábra: $r(\xi)$ bárhol választható a sebességi görbén	225
4.32. ábra: ALE illesztése kísérleti pontokhoz.....	229
4.33. ábra: Felületi fonalas gomba növekedés néhány esete	230
4.34. ábra: Petri-csészén a baktériumok és a fonalas gombák eltérően növekednek	230
4.35. ábra: Penicillium göbös morfológiája	231

4.36. ábra: A Williams-modell numerikus megoldása	236
4.37. ábra: In numero szimulációs kísérlet a Williams-moddal	236
4.38. ábra: Az érett sejtek az éretlenebből keletkeznek, és azok érettekké alakulnak.....	237
4.39. ábra: A cukorkoncentráció hatása az élesztő-anyagcserére (Crabtree effektus).....	242
4.40. ábra: Szakaszos élesztő-fermentáció glükózon: diauxiás növekedés	245
4.41. ábra: Novick és Szilárd „eredeti kemosztát”-ja.....	246
4.42. ábra: Kemosztát folytonos (egylépcsős, homogén, nyílt) rendszer sematikus felépítése.....	246
4.43. ábra: Kemosztát rendszer jellemzőinek függése a hígítási sebességtől.....	249
4.44. ábra: Kemosztát rendszer jellemzőinek függése a betáp limitálószubstrát-koncentrációjától... 	249
4.45. ábra: A folytonos fermentációs rendszer mindig szakaszos rendszerként indul	251
4.46. ábra: Monostabil kemosztát.....	252
4.47. ábra: Többszörös állandósult állapot (szubsztráthinhibíció)	252
4.48. ábra: A térfogatcserék hatása az eredeti anyagmennyiség reaktorban maradó hányadára	254
4.49. ábra: Szakaszos fermentáció működési ciklusai.....	255
4.50. ábra: Elterések a Monod-modell jósolta viselkedéstől 1.	256
4.51. ábra: Elterések a Monod-modell jósolta viselkedéstől 2.	257
4.52. ábra: Folytonos kemosztát tervezése grafikus módszerrel	259
4.53. ábra: Kemosztát felhasználása optimalásra	260
4.54. ábra: Egyáramú többlépcsős kemosztát rendszer	261
4.55. ábra: Többáramú többlépcsős kemosztát rendszer	261
4.56. ábra: Visszatáplálásos (részleges sejtviszatarítás) kemosztát rendszerek.....	262
4.57. ábra: A dialízistenyésztés (integrált fermentációs rendszer) egy lehetséges megvalósítása	263
4.58. ábra: Nutrisztát folytonos fermentációs rendszer felépítése.....	264
4.59. ábra: Turbidosztát folytonos fermentáció elve és felhasználása optimalásra	264
4.60. ábra: Turbidosztát folytonos fermentáció felépítése	265
4.61. ábra: Gradosztát kemosztát rendszer	266
4.62. ábra: Rátáplálásos szakaszos fermentáció képe	268
4.63. ábra: Félfolytonos fermentáció képe	269
4.64. ábra: Versengés a szubsztrátért két speciesz között	271
4.65. ábra: Állandósult állapotok két versengő speciesz esetében	272
4.66. ábra: Periodikus oszcilláció a zsákmány és a ragadozó növekedésében	274
4.67. ábra: A (4.240–4.242) egyenletek megoldása az időben (szimuláció):.....	276
4.68. ábra: A szimuláció ábrázolása fázisdiagramon – kemény oszcilláció.....	276
4.69. ábra: Plazmideloszlás sejtosztódáskor.....	277
4.70. ábra: Plazmidhordozók hányada a generációk számának függvényében.....	281
4.71. ábra: Plazmidos sejtek hányadának változása α függvényében	281
4.72. ábra: A fajlagos légzési sebesség függése az oldottoxigén koncentrációjától.....	285

4.73. ábra: Néhány ipari fermentáció fajlagos oxigénigénye	288
4.74. ábra: Az oxigén buborékból történő abszorpciójának és a mikrobák által történő felvételének folyamatai.....	290
4.75. ábra: Az oxigénabszorpció kétfilmelméletének alapsémája.....	290
4.76. ábra: Az oxigénabszorpció: telítődés és sebességi viszonyok.....	294
4.77. ábra: Egyensúlyi oldottoxigén-koncentráció a fermentációs folyamat alatt.....	295
4.78. ábra: Szakaszos fermentáció képe.....	295
4.79. ábra: Az oxigénellátás technikai megvalósítása.....	299
4.80. ábra: Buborékból történő anyagátadás egydimenziós modellje	300
4.81. ábra: A buborékok deformálódása méretük növekedésével.....	306
4.82. ábra: Buborékképződés lyukon	307
4.83. ábra: Keverőtípusok	310
4.84. ábra: Standard fermentor geometriai arányai	310
4.85. ábra: Több keverő elemmel ellátott bioreaktor	311
4.86. ábra: Primer és szekunder folyadékáramlás és buborékmozgás kevert bioreaktorban.....	311
4.87. ábra: N_p - Re összefüggés különböző keverőkre (newtoni folyadékok esetén)	313
4.88. ábra: A teljesítményszám függése a keverőelemek számától.....	314
4.89. ábra: P_g/P függése a levegőztetési számtól.....	315
4.90. ábra: Folyásgörbék	319
4.91. ábra: Pszeudoplasztikus fluidum folyásgörbéje, és a látszólagos viszkozitás függése a nyírósebességtől.....	319
4.92. ábra: Időfüggő viszkozitás és hiszterézis	320
4.93. ábra: A reológiai viselkedés jelentősége a fermentációs műveletekben.....	321
4.94. ábra: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sejtuszuspenzió viszkozitása.....	322
4.95. ábra: Nyírósebesség a keverő-fordulatszám és a keverőtől való távolság függvényében, átlagos nyírósebesség	323
4.96. ábra: <i>Endomyces sp.</i> glükóamiláz fermentációjának reológiai képe. A reológiai karakter változása a fermentáció során	323
4.97. ábra: A fermentlé vízzel való hígítása javíthat a termelésen.....	324
4.98. ábra: Ideális reaktorok típusai	326
4.99. ábra: Az E függvény értelmezéséhez	327
4.100. ábra: Ideális egységugrás, F függvény meghatározása.....	327
4.101. ábra: Ideális impulzuszavarás, C görbe meghatározása	327
4.102. ábra: Ideális reaktorok E és F függvényei	328
4.103. ábra: Eltérések az ideális viselkedéstől	330
4.104. ábra: Dugóáram és axiális diszperzió.....	331
4.105. ábra: Keveredési viszonyok a Pe szám függvényében: C-görbe.....	332
4.106. ábra: Keveredési viszonyok a Pe szám függvényében: F-görbe	333
4.107. ábra: Egyenlő térfogatú reaktorokból álló kaszkád tartózkodási idő eloszlásfüggvényei.....	334

4.108. ábra: Tartályreaktorok 1.	337
4.109. ábra: Tartályreaktorok 2.	337
4.110. ábra: Karsú és korpulens reaktor	338
4.111. ábra: Az 1950–60-as évek kevert/levegőztetett fermentora	339
4.112a. ábra: „Standard” keverős fermentor és fordítóhengeres változata.....	340
4.112b. ábra: NBS-termelő és Infors kísérleti üzemi léptékű alsómeghajtású keverős fermentorok...340	340
4.112c. ábra: Nagylaboratóriumi és kísérleti üzemi léptékű B. Braun alsómeghajtású fermentorok...341	341
4.112d. ábra: 240 köbméteres üzemi fermentorok nátriumglutamát technológiában, Japán	341
4.113. ábra: Vogelbusch levegőztető.....	342
4.114. ábra: FRINGS keverőrendszer és üzemi fermentor képe	343
4.115. ábra: Alsómeghajtású valódi turbina-keverőrendszer (Electrolux)	343
4.116. ábra: Szitatányéros fermentor.....	344
4.117. ábra: Buborékkolonna	344
4.117a. ábra: Egyszerű air lift reaktor (B.Braun, BIOSTAT)	345
4.118. ábra: Sugárcsőes reaktor.....	345
4.119. ábra: Air lift és jet reaktorok dinamikus és statikus levegőelosztói	347
4.120. ábra: Pressure Cycle Reactor (pilot plant méret).....	348
4.121. ábra: Az ICI Pressure Cycle reaktora metanol alapú SCP gyártásra.....	349
4.122. ábra: Deep Shaft PCR szennyvíztisztításra.....	349
4.123. ábra: Merülősugaras Vogelbusch IZ reaktor	350
4.124. ábra: Folyadékbehatolás és buborékképződés a merülősugaras reaktorban.....	351
4.125. ábra: 300 literes HTPJ reaktor a BME MGKT Tanszéken.....	351
4.126. ábra: Merülősugaras levegőztetők elhelyezése nagy reaktorok esetén.....	351
4.127. ábra: Töltet nélküli és töltött csőreaktor	352
4.128. ábra: Szubsztrát- és termékkoncentráció-változás CSTR és PFR rendszerben	353
4.129. ábra: Gázvezetőkkel ellátott levegőztetett csőreaktor	355
4.130. ábra: „Biodisc” csőreaktor.....	355
4.131. ábra: MBHR csőreaktor.....	356
4.132. ábra: Vízszintes forgó (a) és vékonyréteges (b) csőreaktor.....	357
4.133. ábra: Pneumatikusan levegőztetett vízszintes csőreaktor.....	357
4.134. ábra: Csőreaktor (JLR), amely hurokreaktor is egyben.....	358
4.135. ábra: Csőreaktor, hurokreaktor (JLR) speciális hőcserélővel.....	358
4.136. ábra: Minifermentor blokk folyadékkezelő automatikával (robot)	361
4.137. ábra: Mikrobaák növekedési hőmérséklet-tartományai	363
4.138. ábra: Mikrobacsoportok relatív hőtűrő képessége.....	364
4.139. ábra: A hőpusztulás exponenciális lefutása. A hőpusztulási sebességi állandó meghatározása.....	364
4.140. ábra: A hőpusztulási sebességi állandó hőfokfüggése Arrhenius szerint.....	365

4.141. ábra: Eltérések az ideális hőpusztulási kinetikától	366
4.142. ábra: A tizedelési idő értelmezése	367
4.143. ábra: Bigelow módszerének értelmezése.....	367
4.144. ábra: Hagyományos laboratóriumi steriliző autokláv	369
4.145. ábra: Modern laboratóriumi autokláv	369
4.146. ábra: Hőbehatolási görbe szakaszos sterilizésnél	370
4.147. ábra: Szakaszos sterilizés fűtési-hűtési megoldásai	370
4.148. ábra: Gőzinjektoros folytonos tápoldat-steriliző.....	372
4.149. ábra: Lemezes hőcserélős folytonos tápoldat-steriliző	373
4.150. ábra: Lemezes hőcserélő	373
4.151. ábra: Spirálcöves hőcserélős folytonos tápoldat-steriliző kapcsolása.....	374
4.152. ábra: Spirálcöves hőcserélők.....	374
4.153. ábra: Spirálcöves folytonos üzemi steriliző állomás	374
4.154. ábra: Sebességprofilok különböző típusú áramlások esetén.....	375
4.155. ábra: Nomogram folytonos sterilizők számításához.....	376
4.156. ábra: Klórhexidin.....	379
4.157. ábra: Dupla csúszógyűrűs tengelytömítés	381
4.158. ábra: Steril levegőszűrő és bekötése a bioreaktorhoz.....	382
4.159. ábra: Forró pontok és a steril működés határai.....	383
4.160. ábra: Membránszelepek.....	383
4.161. ábra: Fermentorok oltása	384
4.162. ábra: Egy egyszerű CIP-rendszer felépítése	385
4.163. ábra: A BIOENGINEERING cég CIP-szórófejei	385
4.164. ábra: A fermentáció követési módszereinek áttekintése.....	386
4.165. ábra: Sejttömeg- és sejtszámmérési módszerek.....	388
4.166. ábra: On line OD-mérő szondák felépítése	389
4.167. ábra: Elektronikus részecskeszámláló elvi működése	390
4.168. ábra: Standard szondailllesztő csatlakozások	391
4.169. ábra: Oldott oxigént mérő amperometriás elektródok felépítése.....	392
4.170. ábra: Diffúziós határrejtegek az oldott oxigén elektródjában.....	392
4.171. ábra: A kilevegőztetési $K_L a$ -meghatározási módszer elve	393
4.172. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás elve tenyészetekben	394
4.173. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás: linearizálás.....	394
4.174. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás: linearizálás időállandóval	395
4.175. ábra: A dinamikus $K_L a$ -meghatározás kombinált módszerrel	396

Animációk

2.1. animáció: Sima enzimes reakció	28
2.2. animáció: Önellenőrzés: enzimkinetika 1.	49
2.3. animáció: Önellenőrzés: enzimkinetika 2.	50
2.4. animáció: Kompetitív inhibíció modelljei 1–4.	55
2.5. animáció: Kompetitív inhibíció 5 modellje	55
2.6. animáció: Nemkompetitív inhibíció	59
2.7. animáció: Unkompetitív inhibíció	61
2.8. animáció: Önellenőrzés: inhibíciók	67
2.9. animáció: Szimmetriamodell – oxigén	113
2.10. animáció: Önellenőrzés: allosztérikus enzimek	114
4.1. animáció: E. coli szaporodása – generációs idő	169
4.2. animáció: Növekedési görbe	169
4.3. animáció: 3 növekedési görbe	171
4.4. animáció: Melyik lesz a limitáló szubsztrát?	174
4.5. animáció: Központi aerob anyagcsereutak	187
4.6. animáció: Diauxiás növekedési görbe	239
4.7. animáció: Folytonos rendszer indítása	251
4.8. animáció: Folytonos rendszer tervezése grafikus módszerrel	259
4.9. animáció: Önellenőrzés: fermentációs kinetika	282
4.10. animáció: Önellenőrzés: mikrobiális kölcsönhatások	282
4.11. animáció: Önellenőrzés: fajlagos légzési sebesség	289
4.12. animáció: Szakaszos fermentáció oldottoxigén-profilja	295
4.13. animáció: A buborékképződés mechanizmusa	312
4.14. animáció: Önellenőrzés: levegőztetés, oxigén	324
4.15. animáció: Önellenőrzés: levegőztetés	324
4.16. animáció: Önellenőrzés: sterilizálás	386

Szimulációk

2.1. szimuláció: Egyszerű enzimes reakciók kinetikai viselkedése	43
2.2. szimuláció: M–M-enzimkinetika	47
2.3. szimuláció: Nemlineáris regressziós illesztés saját adatokhoz	47
2.4. szimuláció: Reverzibilis M–M-kinetika	51
2.5. szimuláció: Inhibíciók	67
2.6. szimuláció: Alloenzimek	109

Videók

2.1. videó: Kitozángél készítése	83
4.1. videó: E. coli növekedése	169
4.2. videó: Predáció – lágy oszcilláció	274
4.3. videó: A hold up értelmezése levegőztetett reaktorban	308
4.4. videó: Buborékképzés és elosztatás kevert levegőztetett reaktorban	315
4.5. videó: Bingham-plasztikus viselkedés	322
4.6. videó: Airlift reaktor működése	345

Táblázatok

1.1. táblázat: Fermentált élelmiszeripari végtermékek	14
1.2. táblázat: Biotechnológiai termékek az élelmiszeriparban	15
1.3. táblázat: Nagy mennyiségben termelt mikroba eredetű enzimfehérjék és a termelő mikroorganizmusok	16
1.4. táblázat: Mikrobák termelte nemfehérje polimerek és a termelő mikrobák	16
1.5. táblázat: Mikrobatermék aminosavak és a termelő mikroorganizmusok	17
1.6. táblázat: Szerves savak és a termelő mikrobák	17
1.7. táblázat: Illatanyagok, amelyek mikrobákkal termelhetők	17
1.8. táblázat: Egyéb, vegyes mikroba-termelte vegyületek	18
1.9. táblázat: Antibiotikumok	18
1.10. táblázat: rDNS termékek	19
2.1. táblázat: Az egyszerű és az enzimes katalízis összehasonlítása	27
2.2. táblázat: Az enzimek csoportjai az EC alapján	37
2.3. táblázat: Néhány enzim kinetikai állandói	49
2.4. táblázat: A különböző rögzítési módszerek összehasonlítása	86
2.5. táblázat: Effektív diffúziós állandók gélekben	94
2.6. táblázat: Enzimek, amelyeket végtermékként, közvetlenül alkalmazunk	95
2.7. táblázat: Segédanyagként felhasznált enzimek	95
2.8. táblázat: Élelmiszeriparban felhasznált enzimek	95
2.9. táblázat: Néhány, mikroba eredetű enzim alkalmazása a környezetvédelemben	96
2.10. táblázat: Mikroba eredetű enzimek alkalmazása a kémiában, vegyiparban	96
2.11. táblázat: Néhány, terápiás célokra alkalmazott enzim és enzimkészítmény	97
2.12. táblázat: Szubsztrátok és termékek transzportja sejtekbe, sejtekből	115
2.13. táblázat: Molekulák permeabilitási koefficiensei és megoszlási hányadosai. A megoszlási hányadosokat olivajban mérték (Nielsen–Villadsen: <i>Bioreaction Engineering Principles</i>, Table 2.3)	116
3.1. táblázat: Mikrobákkal és enzimeikkel végezhető kémiai átalakítások	122
3.2. táblázat: Szteroidok mikrobiális transzformációinak reakciótípusai	132

3.3. táblázat: Néhány kereskedelmileg jelentős szteroidátalakítás.....	134
3.4. táblázat: Egyéb fontosabb mikrobális poliszaharidok.....	139
3.5. táblázat: Az enzimes és kémiai eljárás összehasonlítása.....	141
3.6. táblázat: Néhány szintézissel előállított peptid.....	167
4.1. táblázat: Néhány mikroorganizmus elemi összetétele.....	176
4.2. táblázat: „Átlagos” baktérium és élesztő elemi összetétele.....	176
4.3. táblázat: Néhány fontosabb fermentációs termék elemi összetétele.....	176
4.4. táblázat: Fermentációs táptalajok.....	178
4.5. táblázat: Répacukormelasz összetétele és néhány jellemzője (Szolnoki Cukorgyár, 1993/94. évi kampány adatai).....	179
4.6. táblázat: A kukoricalekvár összetétele.....	181
4.7. táblázat: MURASHIGE-SKOOG tápoldat növényi sejtek szuszpenziós és kallusz kultúrájához.....	183
4.8. táblázat: EAGLE tápoldat állati sejtvonalak tenyésztésére.....	184
4.9. táblázat: Néhány mikroba glükózfelhasználásának megoszlása beépülésre és energiatermelésre.....	191
4.10. táblázat: Néhány mikroba m és $mATP$ értékei.....	193
4.11. táblázat: Különböző mikrobák C-tartalma, elektron-egyenértéke és égéshői.....	201
4.12. táblázat: C-források elektron-egyenértéke és égéshői.....	202
4.13. táblázat: Termodinamikailag lehetséges maximális ($\eta = 1$) energiahozam alapján számolt eredő hozamok (elméleti maximális) ($\alpha_2 = 0,46$ C-tartalmú mikroba feltételezésével számítva).....	205
4.14. táblázat: Gyorsan szaporodó <i>Escherichia coli</i> összetétele.....	208
4.15. táblázat: Fő mikrotípusok azonos és eltérő tulajdonságai.....	212
4.16. táblázat: A MONOD-modell „javításai” egy egyenletben.....	220
4.17. táblázat: Térfogatcserék hatása a folytonos kemosztát fermentációra (a tartózkodás idő eloszlásának értelmezése).....	254
4.18. táblázat: Kemosztát és szakaszos fermentáció produktivitásának összehasonlítása.....	256
4.19. táblázat: Indirekt kölcsönhatások.....	270
4.20. táblázat: Direkt kölcsönhatások.....	271
4.21. táblázat: A respiráció fajtái.....	283
4.21. táblázat: Y_0 eredő oxigénhozam és m_0 fenntartási koeficiens értékek (N-forrás: NH_3).....	287
4.22. táblázat: Néhány kísérletileg tapasztalt Y_0 érték.....	287
4.23. táblázat: Néhány kísérletileg észlelt kritikus oldottoxigén-koncentráció (C_{Kr}) és Q_{max} érték (C-forrás: glükóz).....	287
4.24. táblázat: Oxigén-szubsztráttelítési állandók néhány mikroorganizmusra.....	288
4.25. táblázat: A glükóz és oxigén mint szubsztrátok összehasonlítása (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1 g/dm^3).....	288
4.26. táblázat: Különböző gázok Henry-állandó értékei különböző hőmérsékleteken (vízben).....	296
4.27. táblázat: Oxigén oldhatósága vízben levegő és tiszta oxigéngáz esetén.....	297
4.28. táblázat: Wihelm közelítésének állandói oxigénre és szén-dioxidra.....	297
4.29. táblázat: Oxigén oldhatósága NaCl-oldatban 25°C -on és 1 bar oxigénnyomáson.....	298

4.30. táblázat: Ionspecifikus állandók CO₂ és O₂ oldatára (25 °C)	298
4.31. táblázat: A tömegátadási számításokban alkalmazott dimenziómentes csoportok.....	301
4.32. táblázat: Korrelációk a tömegátadási tényező becsléséhez	302
4.32. táblázat folytatása.....	303
4.33. táblázat: Korrelációk a buboréksebesség és buborékméret számításához.....	304
4.34. táblázat: Mindennapi életben előforduló nyírősebességek.....	318
4.35. táblázat: Néhány newtoni fluidum viszkozitása 20 °C-on	318
4.36. táblázat: A hatványtörvény paraméterei különböző reológiai viselkedésű fluidumokra.....	320
4.37. táblázat: Bioreaktorokkal szemben támasztott igények a technológia szempontjából.....	336
4.38. táblázat: Gáz/folyadék érintkeztetők (aerob bioreaktorok) jellemzői	359
4.39. táblázat: Aerob bioreaktorok összehasonlítása.....	359
4.7. táblázat: Néhány mikroba hőpusztulásának Arrhenius-állandói	366
4.8. táblázat: Táplódatkomponensek hőbomlásának látszólagos aktiválási energiája [kJ/mol].....	366
4.9. táblázat: Szűrők alkalmazása a fermentációs eljárásokban	381