

2. A MIKROBÁK ÉS SZAPORÍTÁSUK

A biológiai ipar jellemzően mikroorganizmusokat, vagy állati és növényi szervezetek elkülönített sejtjeit szaporítja el, és ezek anyagcseréjét használja fel a kívánt folyamatok végrehajtására. Ez a folyamat a **fermentáció** (sejtek szaporítása, illetve terméképzése), a reaktoredény, amiben végrehajtjuk a **fermentor**.

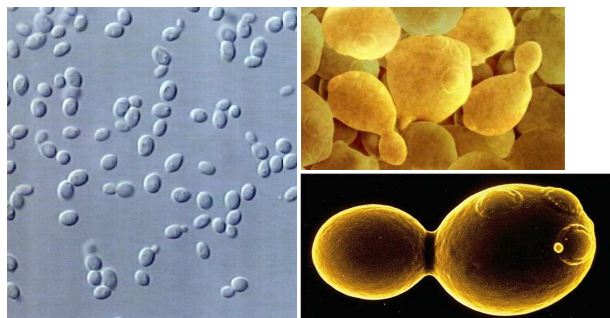
A környezeti tényezők hatnak a mikrobák életfolyamataira, ezáltal szaporodásukra. Ennek törvényszerűségeit, kvantitatív leírását tárgyalja a szaporodási kinetika.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Élesztők morfológiája



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Az ipari jelentőségű mikroorganizmusok típusai

Baktériumok: méret 0.5-5 μm ; gömb, pálcá vagy spirális, osztódással szaporodnak, egyesek spóráképzők

Sugárgombák: (aktinomiceták): fonalas szerkezet (micélium), hosszirányú növekedés, spóráképzők (szaporító képlet)

Élesztők: ovális alakú, 5-20 μm , szaporodás főleg sarjzással, a leánysejtek együtt maradnak 1-10 sejtig.

Penészek: 4-20 μm fonalas szerkezet (hifa), szaporodásuknál az ivaros és vegetatív szakaszok váltakoznak, jellegzetes spóratartókat fejlesztenek.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

A fonalas gombák morfológiája

A spóratartók jellegzetes alakjai:



Rhizopus - black bread mold



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Baktériumok morfológiája

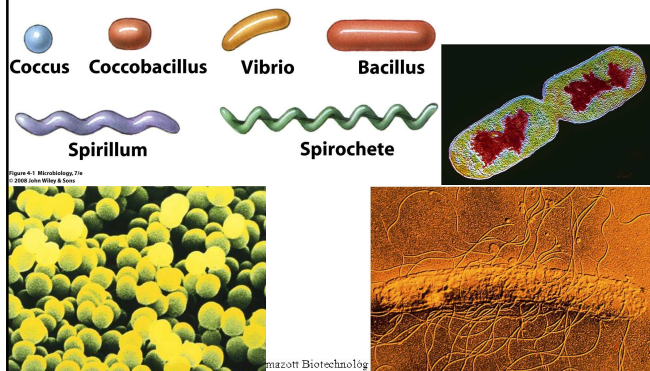


Figure 4-1 Mikrobiológia, 7e
© 2009 John Wiley & Sons

Alkalmazott Biotechnológia

A mikroorganizmusok fejlődését, növekedését befolyásoló tényezők

- **Tápanyagok**
Víz
Makrotápelemek (szénforrás, N-forrás, P, S, Ca, K, Na, Fe)
Mikrotápelemek (szinte az összes elem)
Növekedési faktorkok, vitaminok
- **Oxigén**
aerob anyagcsere: O_2 -t használ fel az anyagcseréjében
anaerob anyagcsere: nem igényel molekuláris oxigént
- **Hőmérséklet**
pszichrofil - hidegkedvelő, mezofil - közepes hőmérsékleten
termofil - melegkedvelő (hőforrásokban akár 90 fokon is)
- **pH**
Savkedvelő/savtermelő - - semleges - alkálikus rothasztók



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Táplálkozási típusok szénforrás és energiaforrás alapján

- **Autotróf:** energiaforrásként nem igényel szerves vegyületeket
 - Fotoautotróf: energiaforrása a fény, C-forrása lehet CO₂ (növények), vagy szerves vegyületek
 - Kemoautotróf: ásványi redox-reakciók energiájának hasznosítása (vas- és kénbaktériumok), C-forrása lehet CO₂, vagy szerves vegyületek
- **Heterotróf:** az energiát szerves vegyületek lebontásából nyeri, ugyanez a szénforrása is



Törzsszelekció, törzsjavítás, törzsfenntartás

1. **Törzsszelekció:** mikroorganizmusok összegyűjtése (törzsgyűjteményből, izolálása a természetből, talajból, vízből...) Ezek termelőképességét próbafermentációval egyenként meg kell vizsgálni. Általában kis termelésű törzseket találunk.
2. **Törzsjavítás, törzsfejllesztés:** nagyobb termelőképességet genetikai beavatkozásokkal érhetünk el.
Indukált mutáció: besugárzással vagy vegyszerekkel pontoszerű változásokat idézünk elő a géneken. Statisztikus: a sok mutans közül kell megtalálni a néhány jobban termelőt.
 A mutációs-szelekciós lépéseket ismételtetik
Génmanipuláció: a sejtekbe célzottan visznek be olyan géneket, amelyet azok eredetileg nem tartalmaztak – a törzs idegen fehérjét termel (inzulint, immunfehérjéket, stb.)



A mikrobák kémiai összetétele

Organizmus	Összetétel a szárazanyag %-ában			Elérhető sejt-koncentráció a tenyészetben (sejt/ml)	A tenyészet szárazanyag súlya (g/100 ml)
	Fehérje	Nukleinsav	Lipid		
Baktériumok	40-50	13-25	10-15	2·10 ⁸ -2·10 ¹¹	0,02-2,9
Élesztők	40-50	4-10	1-6	1-4·10 ⁸	1-5
Fonális gombák	10-25	1-3	2-7	nem értelmezhető	3-5

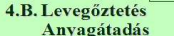
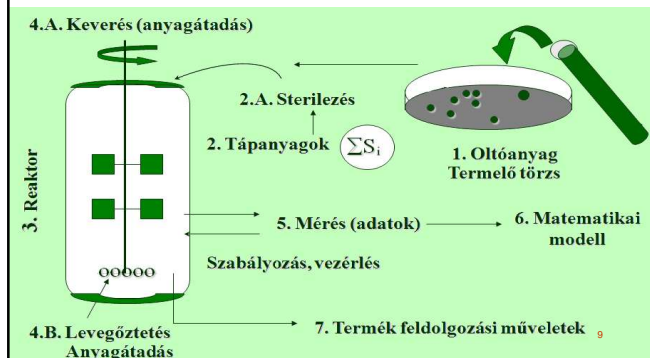


Törzsszelekció, törzsjavítás, törzsfenntartás

3. **Törzsfenntartás**
 Cél: a maximális termelőképesség megőrzése
folymatos, rendszeres átoltással: néhány ciklus után a termelőképesség csökkenhet
a tenyészetek tartósításával:
 - fagyasztva szárítással (iofilizálás)
 - mélyhűtéssel (-180 fokon, cseppfolyós N₂-ben)

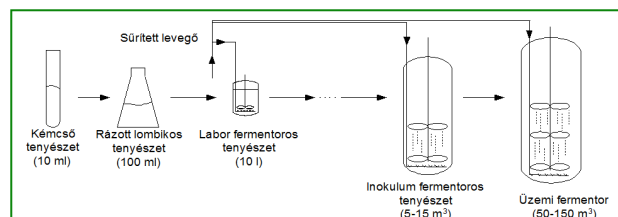


Upstream processing – még egyszer



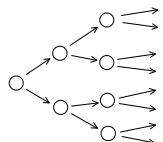
Lépcsőzetes szaporítás

A törzskonzerv nem elegendő egy ipari fermentor beoltásához, fokozatosan szaporítják fel, egyre nagyobb térfogatokban.



A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

Sejtosztódás:



x_0 - kiindulási mikrobakonzentráció
 n - a generációk száma
 t_g - generációs idő = két sejtosztódás között statisztikai átlagban eltelt idő

$$x_0 \rightarrow 2x_0 \rightarrow 4x_0 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n x_0$$

A generációs idő függ a mikroba fajtól, a tenyésztési körülményektől (tápanyag, hőmérséklet, pH, stb.), sőt még egy adott tenyésztés folyamán is változik.



A fajlagos szaporodási sebesség

Az integrált forma: $\ln(x) = \mu(t)$

A határozott integrál határai: $x_0 \rightarrow x$ és $0 \rightarrow t$

$$\ln x - \ln x_0 = \mu(t - 0)$$

átrendezve:

$$\frac{\ln x - \ln x_0}{t} = \mu$$

Ezzel visszakaptuk a generációs idővel kapott alakot.



A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

$$x = 2^n x_0 \quad \text{átrendezve:} \quad n = \frac{\ln x - \ln x_0}{\ln 2}$$

A generációk száma a definícióból kifejezve:

$$\frac{t}{t_g} = n \quad \text{a kettőből:} \quad \frac{\ln x - \ln x_0}{t} = \frac{\ln 2}{t_g} = \mu$$

Az $\frac{\ln 2}{t_g} = \mu$ kifejezés a fajlagos szaporodási sebesség egyik felírása



A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

A fentiek szerint t_g és μ között fordított arányosság van:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

t_g és μ értéke minden tenyésztésben más és más, sőt egy tenyésztésen belül is változik.

Jellemző legrövidebb generációs idők:

baktériumok: ~20 perc, élesztők: 1-2 óra, penészek: 5-24 óra

Egy tenyésztésen belül legnagyobb (és állandó) a szaporodási sebesség az exponenciális szakaszban: μ_{\max}



A fajlagos szaporodási sebesség

A mikrobaszaporodás egy elsőrendű differenciálegyenlettel írható le:

$$\frac{dx}{dt} = \mu^* x \quad \text{az új sejtek mennyisége a jelenlévő élő sejtek számától függ. Átrendezve:}$$

$$\frac{1}{x} * \frac{dx}{dt} = \mu \quad \text{= fajlagos szaporodási sebesség egységnyi mikrobátömegre vonatkoztatott szaporodás.}$$

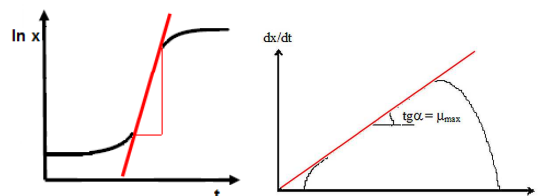
Hogy lehet a μ kétféle felírásának azonosságát igazolni?

$$\frac{dx}{x} = \mu dt \quad \text{szétválasztással integráljuk az egyenletet}$$



A maximális növekedési sebesség meghatározása

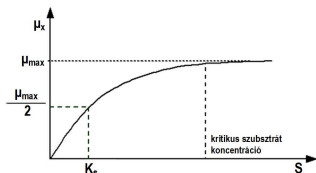
- félogaritmikus ábrázolásból
- átszerkesztett diagramból



A szubsztrátkoncentráció hatása a szaporodásra

A sejtek sokféle szubsztrátot dolgoznak fel egyidejűleg – ez sokféle enzimes reakciót jelent – a sebesség-meghatározó lépés ezek közül a leglassabb. Egy enzimes reakció sebessége határozza meg az egész anyagcsere eredő sebességét – jogos az enzimeknél használt egyenlet alkalmazása.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Hozamkonstans

Elsőként a növekedés és a tápanyagfelhasználás közötti összefüggést vizsgáljuk. A fajlagos sebességek hányadosa adott törzs és adott szubsztrát esetén állandó:

$$Y = \frac{\mu_x}{\mu_s} = \frac{\frac{1}{x} \frac{dx}{dt}}{\frac{1}{S} \frac{dS}{dt}} = \frac{dx}{dS}$$

Ezt nevezzük **hozamkonstansnak** (yield), jelentése: egységnyi szubsztrát felhasználása révén létrejött mikrobátömeg.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

A szubsztrátkoncentráció hatása a szaporodásra

A kritikus szubsztrátkoncentráció fölött a szaporodási sebesség állandó és maximális. Ha a tenyésztés során a mikroba tápanyagfogyasztása következtében az adott szubsztrát koncentrációja a kritikus alá csökken, akkor kezdi korlátozni, limitálni a növekedést.

Ezáltal a tenyészet átlép az exponenciális fázisból a hanyatló szakaszba.

Egy adott mikrobánál a μ_{\max} értéke állandó, de a K_s és S_{krit} koncentrációk minden egyes szubsztrátra mások és mások.

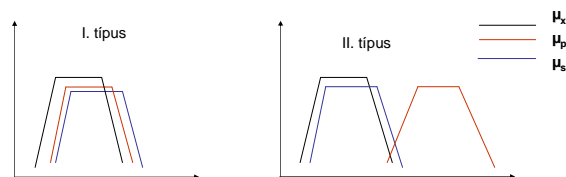


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

Termékképződési kinetika

Ha a mikroorganizmus valamelyik metabolit termékét akarjuk üzemi méretekben előállítani, akkor mindhárom folyamatot együttesen célszerű vizsgálni. A folyamatok időbeli lefutása szerint két alaptípus különíthető el:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Komplex kinetikai leírás

A teljes fermentációs folyamat leírásához három folyamat, a szaporodás, a szubsztrátlebontás és a termékképződés sebességét, és a köztük lévő kapcsolatokat kell megvizsgálni. Ehhez bevezetjük a következő fajlagos sebességeket:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad \mu_x - \text{fajlagos növekedési sebesség}$$

$$\mu_s = \frac{1}{S} \frac{dS}{dt} \quad \mu_s - \text{fajlagos szubsztrátfelhasználási sebesség}$$

$$\mu_p = \frac{1}{P} \frac{dP}{dt} \quad \mu_p - \text{fajlagos termékképződési sebesség}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Termékképződési kinetika

1. A termékképződés párhuzamos a növekedéssel (pl.: alkoholos erjesztés, tejsav fermentáció, ... → primer anyagcsere-termékek)
 - növekedéshez kötött termékképződésű fermentációk
2. A termékképződés később kezdődik – a keletkező termék mennyisége itt nem a szaporodástól függ, hanem a jelenlévő sejtek számától. (pl.: antibiotikum fermentációk... → szekunder anyagcsere-termékek)
 - sejtszámhoz kötött termékképződésű fermentációk



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Termékképződési kinetika

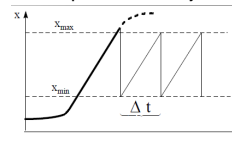
- Növekedéshez kötött termékképzés: $\mu_p = \alpha \cdot \mu_x$ $\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt}$
- Sejtszámhoz kötött termékképzés: $\mu_p = \beta$ $\frac{dp}{dt} = \beta \cdot x$
- Vegyes típusú termékképzés: $\mu_p = \alpha \mu_x + \beta$ $\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta \cdot x$



Fermentáció típusok

Félfolytonos (semicontinuous) fermentáció:

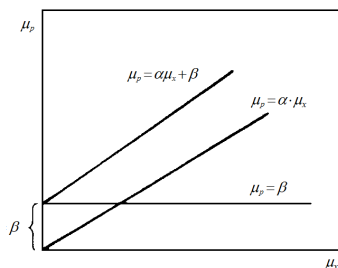
Ez ismétlődő szakaszos fermentációk sorozatának fogható fel. Az egyes fermentációs ciklusok között a fermentort nem ürítik ki teljesen, ehelyett a szakaszos tenyésztés végén a kész fermentlé kb. 90 százalékát lefejtik, majd a készüléket friss, steril tápoldattal töltik fel. A tenyésztés újra indul, a mikroorganizmusok elszaporodása és termékképzése után újabb lefejtés-feltöltés következik.



Termékképződési kinetika

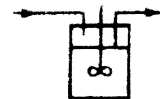
Ugyanez diagramon:

(Luedeking-Piret ábrázolás)



Folytonos fermentáció

Folytonos fermentáció: folyamatos a tápoldat bevezetés és termékelvétele. A két térfogatáram egymással egyenlő, a készülékben lévő fermentlé térfogata is állandó. A rendszerben állandósult állapot alakul ki.



Előnyei:

- produktivitása 5-10 -szer nagyobb, mint a szakaszos tenyésztésé
- automatizálási lehetőség, az üzem egésze folytonossá tehető
- egyenletes terméket biztosít



Fermentáció típusok

Szakaszos (batch) fermentáció: az összes tápanyagot és mikrobát egyszerre, a folyamat elején visszük be, betáplálás és elvétel nincs. A folyamat végén az összes fermentlevet egyszerre vesszük el és feldolgozzuk.

Rátáplálósos (fed-batch) fermentáció: a tenyésztés indításánál elkészített tápoldaton kívül menet közben is adnak be tápanyagokat, a létrejött fermentlevet a folyamat végén egyszerre engedik le.



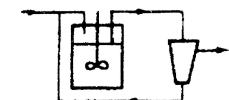
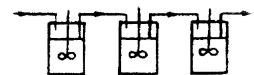
A folytonos fermentáció változatai

Töblépcsős folytonos fermentáció.

Ezeket két vagy több, folytonos fermentorból álló lánc alkotja. Az első reaktorból elvett fermentlevet a második fermentorba vezetik.

Sejtrekirculációs folytonos fermentáció.

Az eltávozó sejtek egy részét állandóan visszavezetjük a fermentorba egy folytonosan működő elválasztó (szűrő, üleptető, centrifuga) segítségével. Ezáltal megnövelhető a reaktorban a sejtkoncentráció, így sokkal intenzívebben zajlanak le a biokémiai folyamatok.



A folytonos fermentáció kinetikája

A folytonos reaktoroknál a reaktoron átmenő anyagáramot két összefüggő paraméterrel jellemezhetjük:

$$\text{tartózkodási idő} = \frac{V}{W} \qquad \text{hígítási sebesség} = D = \frac{W}{V}$$

V = a reaktorban lévő anyag térfogata
W = az átmenő térfogatáram

A tartózkodási idő az átlagosan a reaktorban töltött időt jelenti, a hígítási sebesség pedig az időegység alatt végrehajtott térfogatcserék számát.



A folytonos fermentáció kinetikája

Különböző beállított D értékeknél:

Ha $D = 0$, a rendszer szakaszos tenyészetként működik.

Ha $0 < D < \mu_{\text{pillanatnyi}}$, akkor a sejtkoncentráció növekszik, a szaporodási sebesség pedig csökken, mindaddig, amíg egyenlővé nem válik a D-vel.

Ahol a D éppen egyenlő μ_{pill} -val, ott azonnal beáll az állandósult állapot (ezt nehéz megtalálni).

Ha $D > \mu_{\text{pill}}$, az a sejtkoncentráció csökkenését, és a szaporodás gyorsulását eredményezi, mindaddig, amíg az el nem éri D-t.

Ha $D > \mu_{\text{max}}$, akkor a tenyészet még a maximális szaporodási sebesség mellett sem tud annyi sejtet termelni, mint amennyit elveszünk. Így nem tud egyensúlyi, állandósult állapot kialakulni, a sejtkoncentráció csökken, végül teljesen eltűnnek a sejtek rendszerből (= kimosódás).



A folytonos fermentáció kinetikája

Ha a betáplálásban nincsenek sejtek, akkor a reaktorban szaporodó sejtek koncentrációjára az alábbi mérlegegyenletet írhatjuk fel:

változás = szaporodás – kimosás

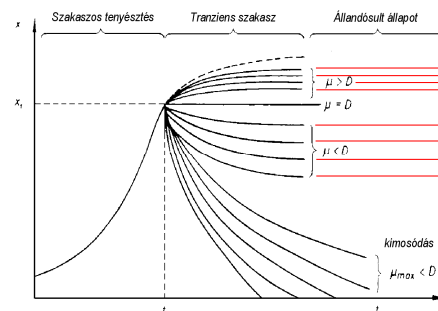
$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x - D \cdot x$$

Állandósult állapotban az x sejtkoncentráció is állandósul, ekkor a szaporodás egyenlővé válik a kimosódással:

$$\mu \cdot x = D \cdot x \quad \text{azaz} \quad \mu = D$$



A folytonos fermentáció kinetikája



A folytonos fermentáció kinetikája

$$\mu = D$$

→ a fajlagos szaporodási sebesség egyenlővé válik a hígítási sebességgel. A hígítási sebességet mi választjuk meg (egy szivattyú beállításával), ez a rögzített érték. A szaporodó tenyészet ehhez alkalmazkodik, és egy tranziens (átmeneti) szakasz után a szaporodás sebessége egyenlővé válik a kimosásával. A tranziens szakasz után áll be az állandósult állapot.

A folytonos tenyésztés minden esetben szakaszos tenyésztéssel kezdődik. Amikor a szakaszos görbe t_1 időpontban eléri a x_1 mikrobakoncentrációt, akkor folytonosítjuk a rendszert, azaz D hígítási sebességgel adagolni kezdjük a tápoldatot.



A folytonos fermentáció kinetikája

Ugyanezt a szakaszos sebességi görbén:

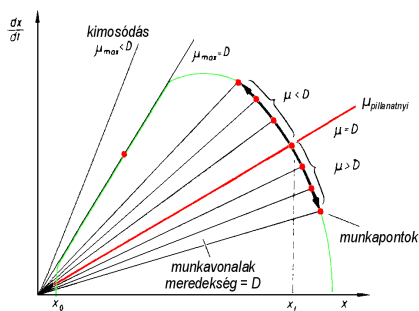
A folytonosítás pontjában (x_1) az origóból húzott egyenes iránytangense egyenlő az x_1 sejtkoncentrációnál mérhető ($\mu_{\text{pillanatnyi}}$ -val).

Az általunk beállított D értékeket is az origóból induló egyenesekkel (munkavonal) jellemezhetjük, amelyek kimetszik a görbén munkapontot, ahol a rendszer állandósult állapotban üzemelni fog. Az x_1 pontban lévő tenyészet a tranziens szakaszban a görbe mentén „átmegy” a munkapontba. Ennek során a sejtkoncentráció és a μ értéke is változik.

Ha a beállított $D > \mu_{\text{max}}$, akkor nincs metszéspont, azaz nincs munkapont, nincs állandósult állapot, a rendszer kimosódik.



A folytonos fermentáció kinetikája



A folytonos fermentáció kinetikája

Vizsgáljuk meg, hogy milyen állandósult tápanyag (szubsztrát) koncentráció (S) alakul ki a fermentorban. A szubsztrátra felírt mérlegegyenletben figyelembe kell venni a bevitt tápoldatban lévő anyagot is (S₀).

$$\text{változás} = \text{bevitel} - \text{kimosás} - \text{fogyasztás}$$

Kihasználva, hogy $\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \cdot \frac{dx}{dt}$ és $\frac{dx}{dt} = x\mu$

a mérlegegyenlet:
$$\frac{dS}{dt} = D \cdot S_0 - D \cdot S - \frac{\mu \cdot x}{Y}$$

A folytonos fermentáció kinetikája

A sebességi diagram alkalmas többlépcsős, kaskád rendszerű folytonos fermentációs rendszerek viselkedésének becslésére is. Az első lépcsőben kialakuló állandósult állapotú mikrobakonzentrációt (x₁-t) az előzőekhez hasonló módon kapjuk meg. A második lépcsőben a befolyóban is találhatóak sejtek, így a munkavonal nem az origóból indul, hanem az x₁ értéktől. Meredeksége a második lépcsőre érvényes hígítási sebesség, amely nem szükségszerűen azonos az elsővel. Az átfolyó térfogatáramoknak azonosnak kell lenniük, így a reaktorok térfogatának kell különböznie.

A folytonos fermentáció kinetikája

A μ szubsztrátfüggését is figyelembe véve az egyenleteket kiegészíthetjük:

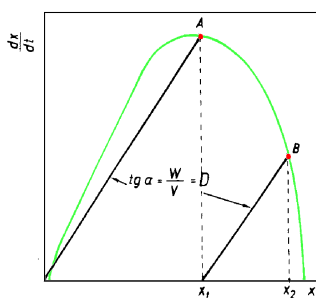
$$\frac{dx}{dt} = x \left[\mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) - D \right]$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_0 - S) - \frac{\mu_{max} \cdot x}{Y} \left[\frac{S}{K_s + S} \right]$$

Állandósult állapotban nincs változás, a deriváltak nullák. Átrendezve kifejezhetők az állandósult koncentrációk:

$$S = K_s \cdot \left(\frac{D}{\mu_{max} - D} \right) \quad x = Y \cdot (S_0 - S) = Y \left[S_0 - K_s \left(\frac{D}{\mu_{max} - D} \right) \right]$$

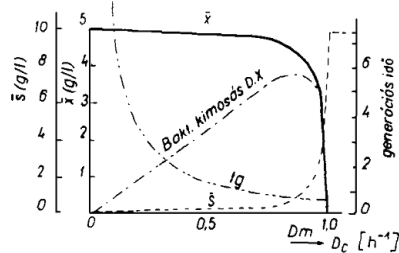
A folytonos fermentáció kinetikája



A folytonos fermentáció kinetikája

A konstansok ismeretében x és S változása a D függvényében kiszámítható:

D·x = produktivitás, a kivett sejtmenyiség



A folytonos fermentáció kinetikája

Látható, hogy széles hígítási sebesség tartományban a szubszt-rát állandósult állapotú koncentrációja a fermentorban és így az elfolyó lében is igen kicsi. Tehát a szubsztrát csaknem teljesen felhasználódik. Csak a kritikushoz közeli hígítási sebességnél jelenik meg az elfolyó fermentlében jelentős mennyiségben fel nem használt szubsztrát.

