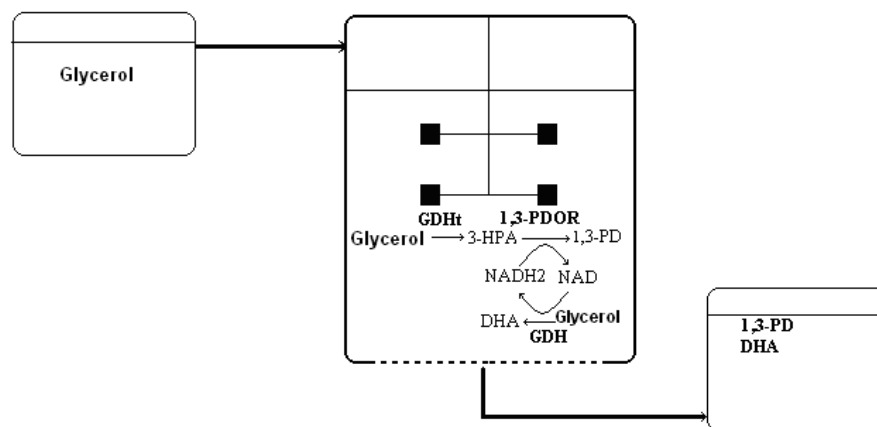


OTKA kutatásunk négy biotechnológiai up stream és down stream részfeladat kimunkálására irányult: kutatásokat végeztünk 1,3-propándiol biokonverziós előállítására (1), modell enzimszisztemeken vizsgáltuk a festékkromatográfiás enzimszisztítás lehetőségeit(2), és kutatásokat végeztünk az alfa-galaktozidáz (3) és a fitáz(4) enzim fermentációs előállításával, tisztításával és felhasználhatóságával kapcsolatosan.

### (1) 1,3-propándiol biokonverziós előállításának vizsgálatával kapcsolatos eredmények

A project kezdetekor a szakirodalom kutatásával kezdtük meg a munkát. Ennek célja az volt, hogy megfelelő enzim-forrás mikroorganizmust találjunk a célul kitűzött enzimes 1,3-propándiol (1,3-PD) előállításához. A kidolgozandó eljárás nyersanyagául a glicerint választottuk, hiszen már a pályázat kezdetén látható volt, hogy a következő években a biodízelgyártás volumene kiszélesedik, és ezzel paralel a glicerintől megújuló nyersanyag-felesleg keletkezik, amelynek hasznosítása célszerű. A glicerint nagyon jó nyersanyag, mert úgynevezett platform alkotó, azaz belőle egyszerű reakciókban egy sor értékes anyag nyerhető. Ezek közül biológiailag is előállítható a 3-hidroxi-propionaldehid (HPA), az 1,3-dihidroxiacetone (DHA) és az 1,3-PD. A HPA reuterin néven kereskedelmi forgalomban is kapható, antibiotikus hatású vegyület, amelyet fermentációval állítanak elő. Az DHA-t szintén fermentálják, és a kozmetikai iparban igen keresett vegyület a bőrbarnító szerek gyártásához. A legperspektivikusabb azonban mégis az 1,3-PD, amelyet évente több mint 100.000t mennyiségben gyártanak szerves szintetikus úton etilénoxidból illetve akroleinból. Ezt a nagy mennyiséget az tette szükségessé, hogy belőle egy igen kedvező tulajdonságú polimert (Poli-Trimetilén-Tereftalátot, PTT) lehet előállítani. A téma jelentőségét igazolja, hogy előbb (2004-ben) Montréalban egy 94.000t/év kapacitású PTT gyár épült (Shell), majd 2006-ban 10 éves kutatás után egy biotechnológiai alapú 43.000t/év kapacitású 1,3-PD üzem épült (DuPont) az USA Tennessee állambeli Loudonban. A biológiai eljárások előnyét a hagyományos szerves kémiai technológiákkal szemben ma már nem kell hangsúlyozni, azt azonban igen, hogy a project során kutatócsoportunk egy új biotechnológiai (enzimes) eljárást kívánt kidolgozni szemben az időközben megvalósult fermentációs 1,3-PD előállítással. Ezt az indokolta, hogy a fermentációs eljárásoknál a nyersanyag egy részéből biomassza képződik (amelynek a felhasználás utáni kezelése problémát jelenthet), ami csökkenti a nyersanyagra vetített termékhozamot. A fermentációs eljárásokban a felhasznált sejtek gyakran termelnek metabolitokat is, amelyek szintén csökkentik a termékhozamot és nehezítik a termékinyerést is. A DuPont fermentációs technológiájában ezen kívül még egy költséges kofaktor (B<sub>12</sub>) adagolása is szükséges. Ezek a problémák kiküszöbölhetőek egy tiszta, enzimes eljárás használatával. Az 1. ábrán mutatjuk be a tervezett módszert.



1. ábra

Az első enzim a glicerín-dehidratáz (GDHt, EC. 4.2.1.30), amely a glicerínről egy vízmolekulát hasít le B<sub>12</sub> koenzim segítségével, majd a képződött HPA-t NADH<sub>2</sub> koenzimel az 1,3-propándiol-oxidoreduktáz enzim (PDOR, EC.1.1.1.202) redukálja 1,3-PD-lá. Az eközben NAD<sup>+</sup>-dá oxidálódott koenzim visszaredukálását a harmadik kulcsenzim a glicerín-dehidrogenáz (GDH, EC.1.1.1.6) végzi, miközben a glicerínből DHA-t állít elő. Az enzimeket és a koenzimeket egy membránreaktorban tartjuk bezárva, így megvalósítható egy olyan folytonos technológia, amelyben a betáplált glicerínből szimultán két értékes termék keletkezik: 1,3-PD és DHA.

Az elnyert pályázat következő szakaszában a három kulcsenzimet *Enterobacter aerogenes*-szel előállítottuk. Kidolgoztunk egy hatékony rátáplálásos fermentációt és egy enzimmányozási módszert. A költséghatékonyság jegyében nem tisztítottuk meg a megfermentált sejteket, hanem az ultrahangos sejtfeltárás után kapott és a sejttörmelékeltől elválasztott nyers enzimdátot használtuk fel sikeresen glicerín biokonverzióra. A nyers enzimmányozás használatát az indokolta, hogy az irodalom szerint a 3 enzimet 3 különböző módszerrel kell tisztítani, ami igen költségessé teszi az eljárást. Tovább nehezítené a tisztítást, hogy a GDHt – az irodalom [1, 2] és a saját kísérletek szerint is – öninaktiválódást szenved, és az így keletkezett komplexet regeneráló fehérjék állítják helyre. A sikeres biokonverzióhoz ezeket a regeneráló fehérjéket is meg kellene tisztítani.

A sikeres glicerín-PD biokonverziós kísérleti eredményeink leírására egy differenciálegyenletekből álló összetett matematikai modellt alkottunk. Sajnos, a nyers enzimdát használatának következményeként nemcsak a kívánt reakciók játszódtak le, így a DHA dihidroxiaceton-kináz (DHAK, EC.2.7.1.29) foszforilációját követő reakciók miatt melléktermékként ecetsav is képződött. A matematikai modellt szimulációs vizsgálatokra felhasználva megállapítottuk, hogy megfelelő inhibícióval a melléktermékképződés csökkenthető, ám meg nem szüntethető, mert a melléktermékképzés közben keletkezik a GDHt regenerálásához szükséges [2] ATP koenzim is. A DHAK inhibíciójával lehetőség lenne a melléktermék visszaszorításra, pl. 3-klór-hidroxiacetonnal (DHA analóg) [3]

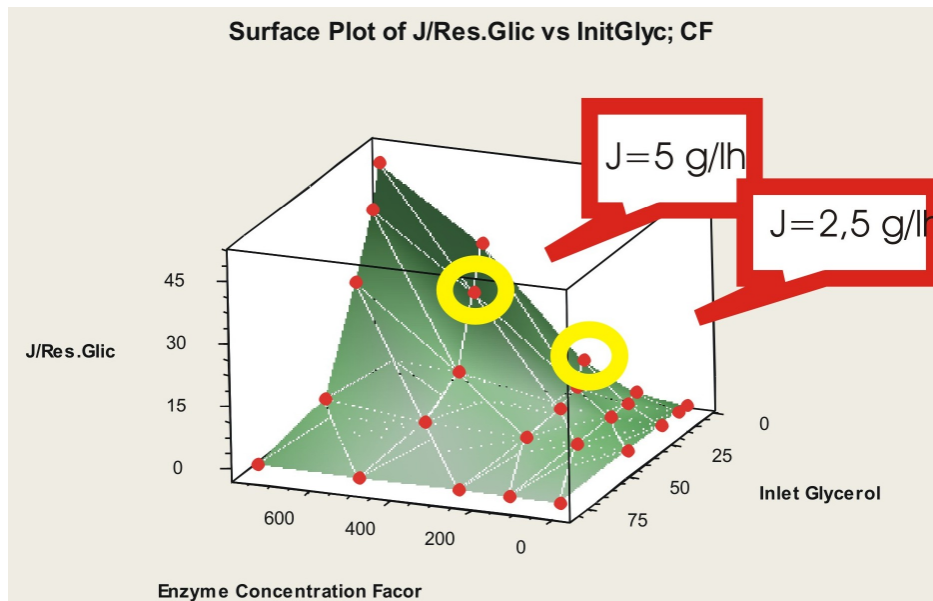
Mindeközben elkészült egy *Pichia pastoris*ba klónozott PDOR is, melynek aktivitása több mint 10x nagyobb volt az eredeti enzimménél, stabilitása viszont csökkent. A szakirodalom alapján egy alternatívaként a *Thermotoga maritima* hipertermofill törzset is kipróbáltuk enzimmányozás [4, 5] mikroorganizmusként, ám rendkívüli tápanyagigénye és oxigénintoleranciája miatt technológiai célú felhasználásra alkalmatlan.

A soron következő szakaszban sikerült megtalálni a megfelelő enzimmányozási mikroorganizmust: *Clostridium butyricum* [6]. Ennek előnye, hogy a GDHt enzime nem szenved öninaktivációt [7], így nem szükséges az ATP a biokonverzióhoz, ezért az esetleges melléktermékek visszaszoríthatóak, illetve újra számba lehet venni az enzimmányozás lehetőségeit (2-vel kevesebb enzim szükséges). Ezekkel a sejtekkel számos fermentációt végeztünk, a kinyert enzimdátokat pedig több cikluson át (akár 15 sikeres biokonverzió) használtuk. ATP analóg inhibitorral felére volt csökkenthető a melléktermék (vajsav) képződés és 1,5x nőtt a termékhozam.

Ekkor kezdtük meg az enzimmányozási hatékonyságának javítására tett kísérleteket.

A projekt utolsó szakaszában sikerült a komplex és költséges tápközeg mellé egy alternatívát is találnunk, ez pedig a glicerinnel kiegészített tejsavó. Ennek használata azért is előnyös, mert a maradék fehérje és laktóz tartalma miatt magas a BOI és KOI értéke, ezért a környezetet szennyvízként terheli. Ráadásul nagy mennyiségben keletkezik, ezért jelentős gazdasági és környezetvédelmi problémát képvisel.

Végül a korábban már sikerrel alkalmazott matematikai leírást ültettük át a clostridium eredetű enzimkészítményre. Ennek felhasználásával megállapítottuk, hogy az enzimoldat megfelelő (~200x) koncentrációjával a jelenleg iparban is használt technológia (DuPont) produktivitása ( $J \sim 2,5$  g/lh) elérhető (2. ábra), esetleg felülmúlható.



2. ábra

**(2)Léptéknövelhető izolálási eljárások** kialakítása oxidoreduktáz enzimekre c. feladattal kapcsolatosan az alábbi eredményeket értük el.

Modellként a diagnosztikus és borászati fontosságú malát-dehidrogenáz enzim izolálását és tisztítását választottuk.

A vizsgálatok első szakaszában tiszta enzimpreparátum felhasználásával vizsgáltuk a malát-dehidrogenáz festékkromatográfiás viselkedését. Amikor ezzel már kielégítő hatékonyságú izolálási módszert alakítottunk ki, áttértünk a természetes közegből (sertés szívizom) való kinyerési technológia kialakítására. Adaptálva a szakirodalmi módszereket, optimaltunk a sertés szívizom feltárásának lépéseit. Megállapítottuk, hogy az előzetesen homogenizált szívizom ultrahangos kezelése javítja a feltárást, ennek optimális ideje 10 perc.

Az enzim megkötése a festékkromatográfiás tölteten a kutatások során kimért paraméterekkel ment végbe. Az elúció optimalása során megvizsgáltuk az eluens összetételének hatását, és megállapítottuk, hogy az etil-alkohol optimális koncentrációja 10 %, és ehhez még 1 M karbamid hozzáadása tovább javítja a kihozatalt.

Az optimált eluens összetétele: 0.1 M-os pH 9 foszfát puffer + 1 M KCl + 10 % EtOH + 1 M karbamid, az áramlási sebesség: a gradiens indítása előtti időtartamban 0.5 ml/perc, a továbbiakban 1 ml/perc.

A felállított anyagmérlegek szerint a módszer hozatala 66 % volt, a beinjektált enzimmennyiség 2/3-a visszanyerhető. Ugyanakkor a kidolgozott festékkromatográfiás módszerrel kb. 33-szoros tisztulást (fajlagos aktivitás-növekedést) értünk el.

### (3) $\alpha$ -Galaktozidáz enzimek kapcsolatos kutatások

Az  $\alpha$ -galaktozidáz fermentációra szelektált *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs enzim termelésének maximalizálására meghatároztuk a tápközeg optimális szén- és nitrogénforrás koncentrációját, valamint az inokulálási technológiát. Az optimalizált tápközeg összetétele a következő: 30 g szacharóz, 9 g ammónium-acetát, 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  és 1 ml Vogel-féle nyomelem oldat. A fenti komponensek McIlvaine pufferban (pH=7,5) 1000 ml-re oldandók. Az enzimfermentáció indításához a 2 napos inokulum tenyészet alkalmazása ajánlott. A kidolgozott technológiával 7-8 napos fermentációs időtartammal 100 NE/ml enzimaktivitás érhető el. „Szendvics” technikát fejlesztettünk ki az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim kimutatására a gélelektroforézis során. Az enzim kinyerésére és tisztítására a tenyészle szűrletéből történő ammónium-szulfátos kicsapást követően négy lépésből álló kromatográfiás eljárást dolgoztuk ki, amely molekulaméret és töltés alapján történő elválasztásokból állt. Az enzim tisztítás során 114-szeres tisztulást és 59 %-os kitermelést értünk el. A kapott termék specifikus aktivitása 1813 NE/mg. Az enzim molekulatömege 94 kDa és izoelektromos pontja 3,9-4,1 között volt. Az enzim glikoprotein és szénhidrát tartalmát 5,3 (m/m) %-ra becsültük. Az enzimhez kapcsolódó szénhidrátok vizsgálata során a következő megoszlást találtuk: 56 % mannóz, 36 % glükózamin, 8 % galaktóz és a glükóz tartalom 1 %-nál kisebb. Az enzimaktivitás optimális pH tartománya pH=5,0-5,5 és optimális hőmérséklete ebben a pH tartományban 65 °C. Az enzim legalább 1 napon keresztül stabilnak bizonyult 55°C-on pH=6,4-8,3 tartományban. 70 °C-on és e feletti hőmérsékleteken történő inkubálás során az enzimkészítmény nagyon rövid időn belül inaktíválódik. Az enzim aktív volt p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozidon, melibiózon, raffinózon és sztachiózon, de nem szabadított fel galaktózt intakt galaktomannánokból. Az enzim kinetikai paraméterei:

Szubsztrátum	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]
p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid	1,13	2498
raffinóz	1,61	4434
sztachióz	1,17	4889

A legnagyobb affinitást az enzim a raffinózhoz mutatta.

A  $\text{Mn}^{++}$  aktivátorként, míg a  $\text{Ca}^{++}$ , a  $\text{Zn}^{++}$  és a  $\text{Hg}^{++}$  erős inhibitoroként hat a vizsgált  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktivitására.  $\text{Ag}^+$  ionok hatására az enzim inaktíválódik.

Meghatároztuk a *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim első 15 aminosav szekvenciáját (SPDAIVLDGTDALD). A fehérje-fehérje összehasonlítási módszert (BLAST) alkalmazva megállapítottuk, hogy az általunk szekvenált aminosav sorrend nem mutatott hasonlóságot a fehérje-adatbázisban lévő egyik  $\alpha$ -galaktozidázéval sem. Többszörös szekvencia összerendezést végeztünk el az adatbázisban található GH-36 és GH-27 családhoz tartozó galaktozidázokkal. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz GH-36 családhoz tartozik.

Az enzimalkalmazási kísérletek során megállapítottuk, hogy 55°C-on és pH=5,5 McIlvaine pufferral 50 NE  $\alpha$ -galaktozidáz/g szubsztrátum aránynál 1 és 8 (w/w) % koncentrációkat alkalmazva a melibióz és a raffinóz hidrolízise 3 órán belül lezajlik. Raffinóz szubsztrátum esetében kimutattuk,

hogy a hidrolízis első órájában átmeneti termékként 3, illetve 4 monoszacharidból álló trimer és tetramer vegyületek is keletkeznek. A sztachióz hidrolízisének 24 órás hidrolízis idő után csak 60 %-os konverziót figyeltük meg. A *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz jelentős transzferáz aktivitást mutatott a melibióz/maltóz rendszerben. Mind a transzferáz mind a hidroláz aktivitás pH=5.5-nél mutatott optimumot. Az optimális melibióz:maltóz arány 2:1 volt. Maximális triszacharid koncentrációt kb. 6-10 (w/w) % 120-210 perces reakcióidő intervallumban mértük.

#### **(4) Fitáz enzimrel kapcsolatos kutatások**

A táplálkozási és takarmányozási szempontból jelentős gabona magvak foszfortartalékai fitinsav formában vannak jelen. Ez az élelmiszer összetevő antinutritív komponens, mivel gátolja az élőszervezetek számára fontos mikro- és makroelemek, valamint fehérjék felszívódását. Tekintettel arra, hogy a fitinsav a hőkezelésnek ellenálló, így a fitáz enzimrel történő lebontása. Ennek a távlati célnak a megvalósítása igényli a megfelelő forrásból származó enzim készítmény előállítását. Az OTKA által támogatott kutatási munkánkban egy mezofil, GRAS státusszal rendelkező *Aspergillus niger*, valamint egy termofil *Thermomyces lanuginosus* fonalgombát választottunk a kitűzött cél megvalósítására. A fermentációs tápközegben levő szerves foszfor mennyiségének csökkentésére az inokulálásnál mosott micéliumot használtunk mindkét gombafaj esetében. Tizenhat *T. lanuginosus* törzs fitáz enzimaktivitását megvizsgálva megállapítottuk, hogy a CBS 288.54 és az ATCC 34626 törzsek a legjobb fitáz termelők. A szerves foszfor nélkül készített rizsliszt tartalmú alaptápközeg alkalmazásával több, mint 6 U/l aktivitást értünk el. Az inokulum minősége és mennyisége is jelentős hatással lehet az enzimtermelésre. Kiindulási hipotézisünk az volt, hogy az előtenyésztés során a tápközeg szerves foszfor tartalmának csökkentésétől várható a fitáz aktivitás növekedése. A fermentációs technológia körülményeinek optimalizálására kétszintű, háromfaktoros kísérleti tervet állítottunk fel és valósítottunk meg az enzimtermelés fokozása érdekében. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy az inokulum tápközegben lévő foszfátion koncentráció 1/8-ra történő csökkentésével jelentős enzimaktivitás növekedés tapasztalható. Három napos és 10 % térfogatnyi inokulummal indított fermentáció esetén érhető el a legnagyobb fitáz aktivitás értékek. Megállapítottuk, hogy az 5% rizslisztet tartalmazó tápközeg alkalmazása esetén a glükóz kiegészítés felesleges, mivel költség növelő tényező és nincs hatással az enzimaktivitás alakulására. A fermentációs paraméterek optimalizálása az enzimaktivitásban 4-szeres növekedést eredményezett. Többlépcsés fehérjekicsapási és különböző kromatográfiás (ioncserélő, hidrofób interakció, gélszűrés) műveletekből álló tisztítási eljárást dolgoztunk ki a fermentált enzim kinyerésére és tisztítására. A tisztított enzimnek meghatároztuk a molekulatömegét SDS-PAGE, valamint az izoelektromos pontját IEF módszerrel. Megállapítottuk, hogy a *T. lanuginosus* CBS 288.54 törzs fitáz enzime legalább két közel azonos izoelektromos pontú (pI=4.3) és különböző molekulatömegű (60 és 90 kDa) egységből áll.

Tizenegy *Aspergillus* törzsből szaporodási tulajdonságuk, valamint fitáz aktivitásuk alapján az *Aspergillus niger* F00735 (Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Törzsgyűjteménye, Budapest) jelű törzset választottuk az enzim fermentáció kidolgozásához. A rázatott technikával megvalósított fermentációnál 15 % hasznos térfogattal értük el a legjobb aktivitás értékeket. A fitátot tartalmazó alapanyagok (rizsliszt, búzaliszt, búzadara, kukoricaliszt, kukoricadara, borsóliszt és szójaliszt) közül 6 (w/v) % rizsliszt bizonyult a legalkalmasabbnak az enzimtermelésére. A megfelelő inokulum mennyiséggel (5 tf %) indított fermentációval a 6. nap után 800 U/l titer érhető el. Ez az eredmény nagyon biztató tekintettel arra, hogy az általunk vizsgált *T. lanuginosus* gomba optimális körülmények között is csak 25 U/l fitáz aktivitást biztosított. A megtermelt fitáz enzim kinyerésére és tisztítására is többlépcsés módszert dolgoztunk ki, amely frakcionált kicsapásból, gélszűrésből, ioncserélő kromatográfiából, izoelektromos fókuszálásból és hidrofób kölcsönhatáson

alapuló kromatográfiából áll. Az enzimsztítási eljárásnál 15 % kitermelést és 25-szörös fajlagos aktivitás növekedést értünk el. Meghatároztuk a tisztított enzim molekulatömegét, izoelektromos pontját. Azt tapasztaltuk, hogy az *A. niger* F00735 törzs két közel azonos izoelektromos pontú (pI 4,2-4,7) de különböző molekulatömegű (117-120 kDa és 65-67 kDa) fitázt szintetizált. Mind a két fitáz frakció 60 °C-on mutatott maximális aktivitást.