

Fehér biotechnológiai kutatások

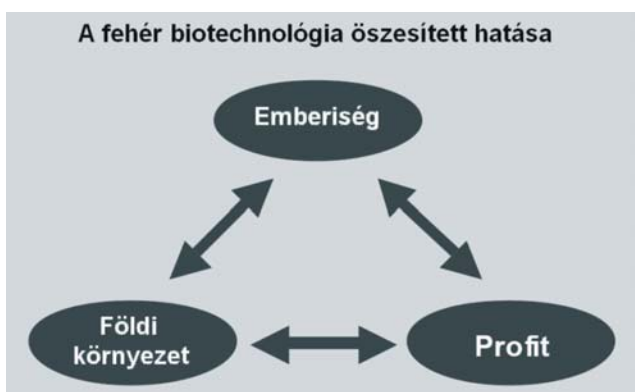
HETÉNYI Kata,^a NÉMETH Áron,^a és SEVELLA Béla^{a*}

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék Műegyetem rkp 3. H-1111 Budapest, Hungary

Bevezetés

Napjainkra egyre elterjedtebb a szakirodalomban a dinamikus fejlődő biotechnológia felosztása az alábbi 3 fő területre: vörös biotechnológia az a terület, amely egészségügyi vonatkozású, fehér biotechnológiának nevezik a tiszta vegyipart megteremtő biotechnológiát (másnéven ipari biotechnológia), illetve zöld biotechnológiaként említik az agrár- és élelmiszer témákkal foglalkozó ágát (ritkán külön kék-biotechnológiának nevezik a víz és tengeri biotechnológiát).^{1,2}

A fehér biotechnológia elterjedésének hajtóereje többérté: 1) kőolaj független, megújuló nyersanyagot használ, 2) CO₂ semleges, 3) energia és nyersanyagtakarékos.² Ezeknek köszönhetően ha a fenntartható fejlődés résztvevői egy kooperáló és önerősítő ciklusban együttműködnek, akkor a fehér-biotechnológia új állásokat jelenthet, miközben csökkenti a környezeti hatást, és profitot is termel (1. ábra).



1.Ábra. A fehér-biotechnológia kedvező hatása ("Triple P").³

Bár a biotechnológia alapjai több ezer éves múltra tekintenek vissza (sör-, bor-, sajtgyártás), az újkori biotechnológia még fiatalnak tekinthető (néhány évtizedes) szemben a több mint száz éves kőolaj alapú szerves kémiai eljárásokkal. Ennek köszönhetően még számos területen az alaposan optimált és hosszú ideje felhasznált vegyipari eljárások olcsóbbak a jelenleg ismert biotechnológiai vetélytársuknál. A fehér biotechnológia előnyei azonban egyes prognózisok szerint (McKinsey&Company) lehetővé teszik már rövid távon, hogy átvegye a vezető szerepet: 2010-re a finomkémiai ágazat termékeinek 60%-át biotechnológiai úton fogják előállítani.^{2,3} Ehhez azonban szükséges, hogy a nyersanyagok ára versenyképes maradjon, illetve politikai, gazdasági és társadalmi támogatásra is szükség van, valamint a folyamatok fejlesztése, optimalizálása sem lezárult még.

Kutató csoportunk tevékenységének középpontjában az utóbbi években a fehér biotechnológiai kutatások állnak,

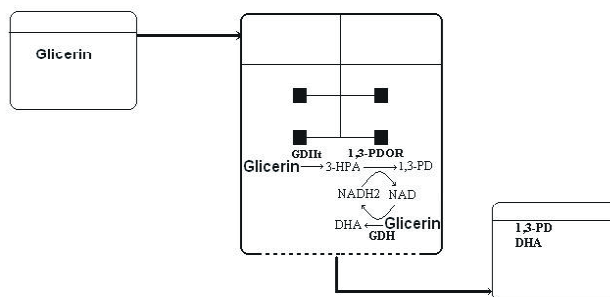
ugyanakkor, kisebb hangsúllyal piros (*Pichia pastoris*-AntitrombinIII) és zöld (almafélék tüzelhalását kiváltó *Erwinia amylovora* baktérium fágjainak előállítás) tematikájú kutatásokat is végzünk/végeztünk. A két fő fehér-biotechnológiai kutatási területünk a biodízel melléktermék glicerinnel enzim úton történő hasznosítása, illetve a gabona alapú, tejsav platformú biofinomító technológia fejlesztése.

1. Kutatási eredmények glicerinnel enzim hasznosítására

A glicerinnel a fehér-biotechnológia mintapéldája, hiszen 1) sokáig szintetikus állították elő, 2) mára viszont a biodízelgyártás melléktermékeként keletkezik (megújuló eredetű), és 3) platformkötő vegyület, tehát egyszerű – hagyományos – vegyipari technikákkal vagy biotechnológiai úton nagy hozzáadott értékű származékok nyerhetők belőle, mint például a glicidol, a glicerinkarbonátok, a propilénglikol, az 1,3-propándiol (PD) és a 1,3-dihidroxiacetone (DHA).

Kutatócsoportunkban kifejlesztettünk és szabadalmaztattunk egy olyan kapcsolt enzim eljárást, amely során a glicerinnel, mint egyedüli szubsztrátból egyidejűleg PD és DHA keletkezik koenzimregenerálás közben diszproporcióval. Ezt a folyamatot 3 enzim katalizálja (2. ábra).⁴

Az enzim eljárást az alábbi előnyökkel szolgálhat a de novo fermentációval szemben: 1) nincs biomassza képződés, ezért a nyersanyag nagyobb hányada fordítható terméké képzésre (magasabb a termékhozam), 2) nem képződnek melléktermék metabolitok, ezért „tisza technológiának” is szokták hívni, 3) nincs szükség koenzim adagolásra, mint a rekombináns fermentáció esetében (DuPont).⁵



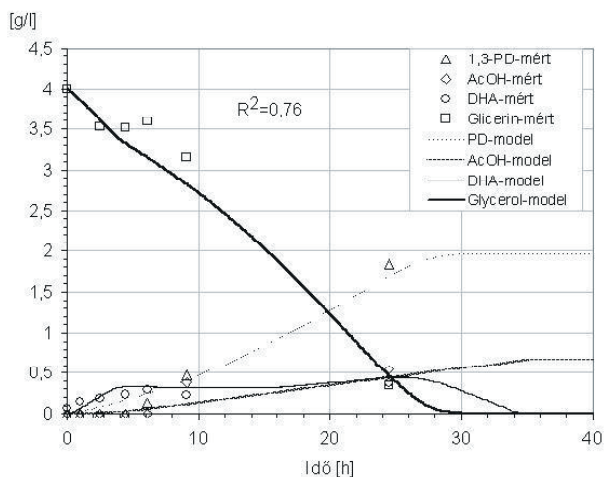
2.Ábra. Az enzim glicerinnel hasznosítás membránreaktorban: GDH: glicerinnel-dehidratáz, PDOR: 1,3-propándiol-oxidoreduktáz, GDH: glicerinnel-dehidrogenáz enzimek, NAD/NADH₂: oxidált/redukált koenzim.

A biokonverzióhoz szükséges 3 kulcsenzimet a glicerinnel – 1,3-propándiol átalakítására képes, természetes

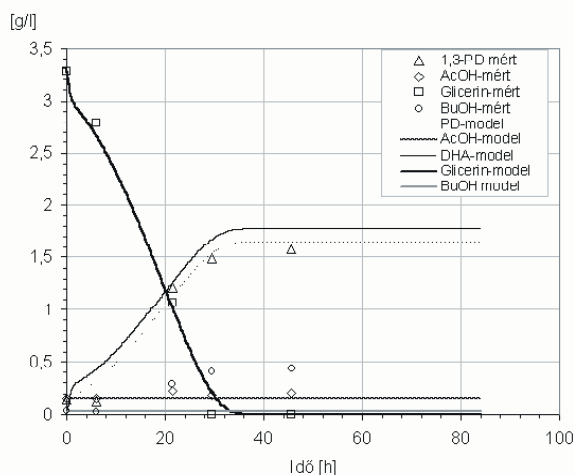
*Dr. Sevela Béla. Tel.: 463-2595 ; fax: 463-2598 ; e-mail: bsevela@mail.bme.hu

mikroorganizmusokból kívántuk kinyerni. A szakirodalom szerint ötféle genusba sorolt baktérium képes erre anaerob körülmények mellett: Klebsiellák, Citrobacterek, Clostridiumok, Lactobacillusok és Enterobacterek,⁶ Kutatásaink során *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus reuteri*, és *Clostridium butyricum* törzsek enzimermentációját vizsgáltuk, és hasonlítottuk össze. A tenyészetekből ultrahangos feltárással nyers enzimoldatot nyertünk ki, amelynek GDHt, PDOR, és GDH aktivitását vizsgáltuk. Ezt a tisztítatlan nyers enzimoldatot membránreaktoros biokonverziókban használtuk fel glicerint átalakításra. A biokonverziók során azonban melléktermék képződést tapasztaltunk (ecetsav, vajsav), ami a tisztítatlan enzimoldatnak köszönhető. A melléktermékképzés vizsgálatára, és a kiküszöbölés lehetőségeinek tanulmányozására összetett matematikai modellt állítottunk fel, amellyel *in silico* kísérleteket végeztünk. A modell megalkotásakor a sejtek glicerinhasonosító metabolikus útvonalát szimuláltuk, a koenzim használó útvonalak esetében random bi-bi mechanizmust, a többi esetben Michaelis-Menten kinetikát feltételezve. A kinetikai paramétereket a modell kísérleti adatokhoz történő illesztésével határoztuk meg, az illeszkedés jóságát pedig a determinációs együtthatóval (R^2) jellemeztük. A modellt mindkét forrás mikroorganizmusra alkalmaztuk és megállapítottuk, hogy míg a *K. pneumoniae* eredetű enzimek készítmény alkalmatlan a DHA/PD egyidejű előállítására,⁷ addig a *C. butyricum* eredetű alkalmas.⁸ Ennek oka az, hogy az előbbi esetében a GDHt kulcsenzimet ATP koenzim energiájának segítségével regenerálni szükséges, mivel a GDHt az átalakulás során „önnyilkos inaktivációt” szenved, ezt az ATP-t pedig a melléktermék képző metabolikus út termeli. *Clostridium* esetében nem szenved öninaktivációt a GDHt enzim, ezért nincs szükség ATP-függő regenerálásra, így a melléktermék képző útvonal eliminálható (3. és 4. ábra).

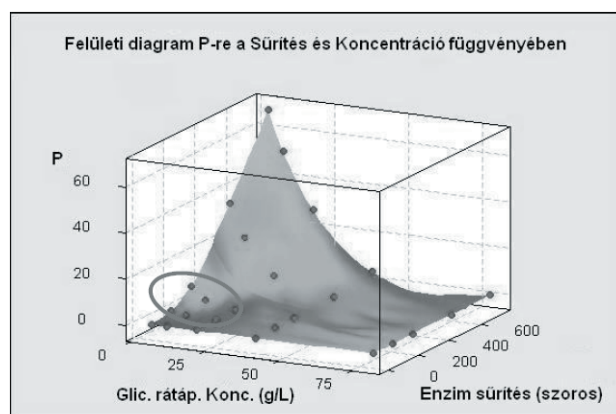
A felállított matematikai modellel azt is meg tudtuk vizsgálni, hogy megvalósíthatók-e olyan kísérleti körülmények, amelyek mellett eljárásunk a jelenleg használatos ipari eljárással versenyképes lehet. A modell alapján megfelelő enzim dózis alkalmazásával a folytonos üzemű enzimes membránreaktor potenciálisan versenyképesnek bizonyult az ipari fermentációs eljárással (5. ábra).



3.Ábra. Glicerint biokonverzió és modell illesztés *Klebsiella* eredetű enzimek készítménnyel.



4.Ábra. Glicerint biokonverzió és szimuláció *Clostridium* eredetű enzimek készítménnyel és vajsav inhibícióval



5.Ábra. Folytonos üzemű enzimes glicerint biokonverzió hatékonyságának *in silico* vizsgálata ($P=PD$ termelékenység/maradék glicerint koncentráció) A megjelölt pontoknál a PD termelékenység $>2,5g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$, a maradék glicerint koncentráció $<1 g/L$.

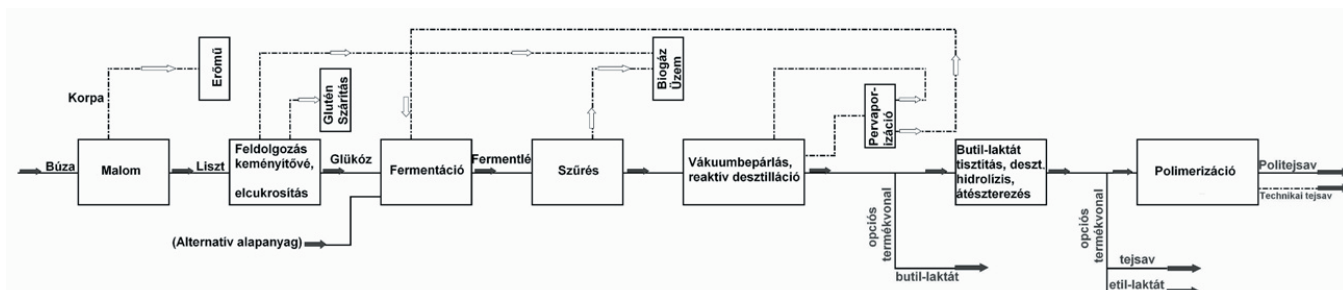
2. Kutatási eredmények tejsav előállítására

A tejsav szintén nagy potenciállal rendelkező intermediér molekula. A tejsavplatform alkotói között megtalálhatóak „zöld-oldószerek” (tejsav-észterek), politejsav (PLA), akrilsav, laktonitril, és propilén-glikol is, amelyek mindegyike jelentős piaccal rendelkezik a vegyiparban. A tiszta tejsav önmagában is piacképes termék a gyógyszer és élelmiszeripar számára.

Bár előállítására kémiai és biológiai úton is van lehetőség, a kémiai szintézis racém elegyet, a fermentációs előállítás pedig optikailag tiszta tejsavat eredményez. A mikrobiális fermentáción alapuló ipari termelés az 1950-es évek óta ismert. Ennek során mezofil *Lactobacillus*-okkal konvertálnak glükózt tejsavvá. Mivel a termék erősen savas, valamint a disszociálatlan sav toxikus a termelő mikrobára, ezért fermentáció közben a pH-t szabályozni kell. Erre a klasszikus technológiában $CaCO_3$ -ot alkalmaznak, amely a tejsavval Ca -laktátot képez. A fermentáció után a Ca -laktáttól kénsavval szabadítják fel a szabad tejsavat, amit azután desztillálással és bepárlással tisztítanak. A kénsavas kezelés mellékterméke nagy mennyiségű gipsz, amelynek piaca korlátozott, ezért gyakran csak deponálják.

Mindezek alapján célszerűnek tűnt egy új tejsavtermelő technológia kidolgozása. Ezt az is indokolta, hogy a technológia szubsztrátja glükóz, amely növényi alapanyagokból könnyen előállítható egy olyan agrár-ipari országban, mint amilyen Magyarország is. A fehér biotechnológia területén ma már nem ismeretlen az a trend

sem, amelyet az úgynevezett „biofinomító”-k elterjedése jelez. A *biofinomító* a kőolajfinomító analógiájára épül, azaz egy (biológiai)nyersanyagból előbb néhány kulcsintermediert, majd további nagy hozzáadott értékű kemikáliákat, élelmiszereket, tápszereket és energiát állít elő úgy, hogy a nyersanyag minden részét hasznosítja, így minimalizálva a hulladék képződést.



6. Ábra. A tervezett biofinomító technológia sémája.

Ezen megfontolások figyelembe vételével kezdtünk hozzá 2005-ben az új technológia kidolgozásához a Nitrokémia Zrt és a HUNEST Biorefinery Kft támogatásával. Mivel a Nitrokémia Zrt balatonfüzfi gyártelepén a korábbi vegyikombinátot felszámolták és a környezeti kármentesítést már elvégezték, lehetőség nyílt egy gabona alapú tejsavplatformra épülő biofinomító barnamezős beruházásának előkészítésére. Ezért a kísérletekkel párhuzamosan megkezdődtek a tervezési munkák is, amelyekben szintén részt vállaltunk.

A biofinomító technológia vázlatát mutatja a 6. ábra.

A beérkező szemes takarmányt (alapvetően búza) megőröljük, a korpa frakciót elválasztjuk, és az égetőben a hőtartalmát hasznosítjuk. A lisztet megáztatjuk, tésztát készítünk, amelyből az ún. Westfália technológiával (trikanter segítségével) a liszt szuszpenziót frakciókra választjuk szét, és a felesleges glutént eltávolítjuk, majd szárítva terméként értékesítjük. A liszt szuszpenzió főfrakciója (keményítő) kétféle enzim hidrolízis után a megfelelő kiegészítő komponensekkel kerül az oltó és termelő fermentorokba. A fermentációt követően szűréssel eltávolítjuk a mikroba sejttömeget és a nagy molekulájú oldott anyagokat (főleg fehérjék, és maradék poliszaharidok), majd koncentráció után az ammónium-laktátot reaktív desztillációban észteressítjük. A termék egy részét átészterezzük, a többitől pedig PLA készül.

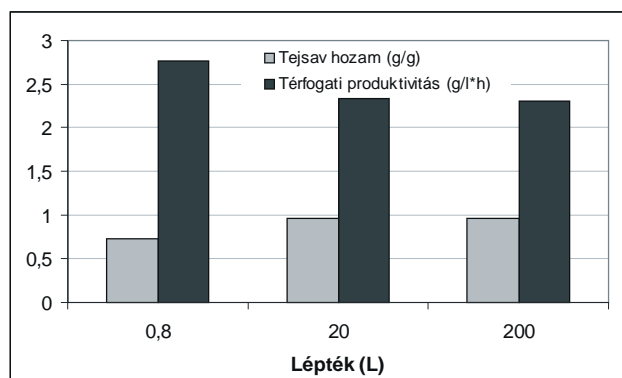
Kutatómunkánk során több ponton is csatlakoztunk a vázolt technológia fejlesztéséhez: 1) fő feladatunk, a fermentáció hatékonyságának növelése megfelelő baktérium kiválasztásával, és a tápközeg optimalizálásával, 2) vizsgáltuk a liszt szuszpenzió frakcióinak hasznosítási lehetőségét a tejsav fermentációban, 3) megkezdtük a 2. generációs tejsav előállítás kutatását (tejsav fermentáció közvetlenül a keményítőtől), 4) alternatívákat keresünk a fermentációban nem hasznosuló komponensek hasznosítására (glutén, korpa, pentozánok), 5) végül pedig alternatív alapanyagok felhasználásának vizsgálatával is foglalkozunk.

A fermentáció optimalizálása során az MKT878-as tejsavtermelő *Lactobacillus* baktériumunkra optimált „Lac-2” tákózeget

(1. táblázat) használtuk referenciaként, mivel ezzel a tápközeggel és mikroorganizmussal $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ térfogati produktivitást tudtunk elérni 0,8-20-200L-es léptékben is (7. ábra).

1. Táblázat. A Lac-2 tápközeg összetétele

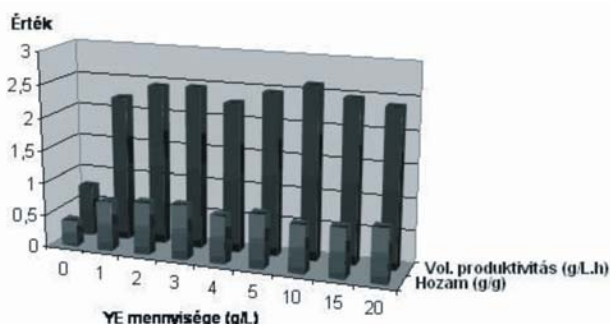
Komponens	optimált összetétel (g/l)
glükóz	120
kukoricalekvár	30
élesztőkivonat	6
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
MnSO_4	0.01



7.Ábra. Tejsav termelés különböző léptékben.⁹

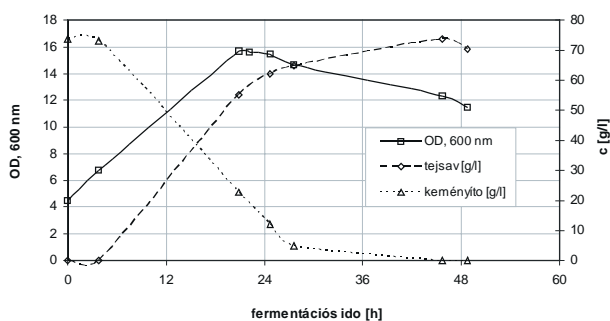
A tápközeg optimalizálás első lépéseként megvizsgáltuk,¹⁰ hogy kizárólag a biofinomítóban alkalmazandó liszt szuszpenzió hogyan alakul a fermentáció. Megállapítottuk, hogy további nitrogénforrás kiegészítés szükséges az oldott liszt fehérjékén kívül, ezért magas élesztőkivonat koncentráció mellett végeztünk fermentációt a lisztuszuszpenzió. A fermentáció sikeres volt 20 g/L élesztőkivonat mellett, ami azonban gazdaságtalanná tenné az eljárást, ezért

további alternatívákat vizsgáltunk. Megállapítottuk, hogy a leginkább költséghatékony eljárás az, ha a technológia során eddig elválasztott glutént hidrolizált formában a tápoldathoz adjuk, így ugyanis az élesztőkivonat koncentrációját minimálisra tudtuk csökkenteni (8. ábra).



8.Ábra. A minimálisan szükséges élesztőkivonat koncentrációjának meghatározása.¹¹

A közvetlen keményítő hasznosító mikroorganizmusok közül a *Lactobacillus amylovorus* törzssel végeztük tejsav



9.Ábra. Keményítő alapú tejsav fermentáció lefutása.¹²

Hivatkozások

- DaSilva, E. J. *Electron. J. Biotechnol.* **2004**, 7, (3), 01-02.
- EuropaBio, White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future. EuropaBio Position Paper 2003. http://www.europabio.org/documents/100403/Innenseiten_final_screen.pdf Letöltve:2008.08.14.
- Bachmann, R. Presentation at the Bio-Conference; New York; **2003**
- Sevella B.; Kupcsulik B.; Németh Á.; Novák L.; Poppe L.; Dukai J.; Nagy F., *P 05 00961* 2005.
- Lisa Anne Laffend Vasantha Nagarajan and Charles Edwin Nakamura. U.S. Patent 5,686,276, 1995.
- Biebl, H.; Menzel, K.; Zeng, A.-P.; Deckwer, W.-D., Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 52, (3), 289-297.
- Németh, Á.; Sevella, B., *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2008**, 144, (1), 47-58.
- Németh, Á., Ph.D dissertation, Budapest University of Technology and Economics, 2008.
- Hetényi, K., Németh, Á. and Sevella, B. *Fifth Croatian Professional and Scientific Conference on Biotechnology with International Participation* **2007**, Stubicke Toplice.
- Hetényi, K., Németh, Á., and Sevella, B. *Hung. J. Ind. Chem.* **2008**, közlésre elfogadva, megjelenés alatt
- BME, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tsz. Búzaliszttal alapú tejsavtermelő technológia fejlesztése, *Kutatás-fejlesztési jelentés*, **2008**.
- Pásztor, A., *TDK dolgozat*, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, **2007**

Researches on White Biotechnology

Today it becomes usual to divide biotechnology into 3 (or 4) branches: one of these is the so called "white biotechnology" or industrial biotechnology. As it serves numerous advantages (less dependency from petrol, less CO₂ emission and more economical energy and raw material utilization), several segments of the chemical industry will utilize biotech processes as high as 60% of its total production in 2010 according to forecasts. These facts

lead us to carry out our researches mostly on the field of white biotechnology beside a few red and green biotechnological works.

One of our most promising researches is to develop and improve an enzymatic utilization of the biodiesel byproduct glycerol. In our patented⁴ process 3 key enzymes are linked to each other through their coenzymes, thus they catalyze the disproportion of glycerol

3. Összefoglalás

A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékének Fermentációs kísérleti üzemi kutatócsoportja innovatív és intenzív kutatásokat végez elsősorban a fehér biotechnológia területén. Ezen belül az egyik legjelentősebb eredményünk a biodízel melléktermék glicerinnel enzimhasznosításának kidolgozása, amelynek során sikerült laboratóriumi léptékben megvalósítani egy koenzimregeneráló membrán-bioreaktoros eljárást, amely a glicerinnel egyidejűleg 1,3-dihidroxiacetont és 1,3-propándiolt állít elő (akár a jelenlegi előállításokkal versenyképesen is).

Fehér biotechnológiai kutatásaink másik igen fontos területe egy gabonabázisú tejsav-platformon alapuló biofinomító technológia fejlesztése, amelynek során sikerült az optimált laboratóriumi tápközegen elérhető eredményeket ipari tápközegen is elérni. A technológia intenzifikálása érdekében folytatott kísérleteinket új törzsek (termotoleráns) és technológiai megoldások (pl. direkt keményítő fermentáció) kiválasztására jelenleg is folytatjuk.

into 1,3-propanediol (PD) and 1,3-dihydroxyacetone (DHA) at the same time. According to the literature⁶ we examined several natural PD producer microorganisms to test their enzyme producing ability. Using *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* bacteria as enzyme sources we compared their raw enzyme solution in glycerol bioconversion. The conversion accompanied with some byproduct formation (acetic acid and butyric acid), so we built up a complex mathematical model for studying the behaviour of this enzyme system. We found that in the case of *K. pneumoniae* it is not possible to eliminate the byproduct formation, because it serves the ATP needed for the regeneration of suicide inactivated glycerol-dehydratase enzyme. We demonstrated mathematically and experimentally (Fig.4.) that the raw enzyme solution of *C. butyricum* is able to produce DHA and PD simultaneously. Using the mathematical description, we compared our process to the only biological PD production (*de novo* fermentation at DuPont), and found, that our system can be competitive to the industrial technology in continuous operation with concentrated enzyme solution (Fig. 5.).

An other promising case is related to the development of the production technology of a lactic acid biorefinery. The fermentative production of lactic acid – an intermedier to “green-solvents” (esters), poly-lactic acid (PLA), propylene-glycol and acrylic acid – has been applied since the early 1950’s, but there remained

numerous possibilities to further develop the technology. The classical method utilizes pure glucose solution and additives, but in Hungary it would be more advantageous to utilize wheat flour. For this reason, we tested wheather the flour suspension is applicable to lactic acid fermentation or not. We found, that some additional nitrogen-sources are needed, so we tested several ones. The most effective solution was to apply 30g/L of yeast extract, but it’s use would not be cost effective. An other good solution could be to use the gluten fraction of the flour suspension, of the own technology of the planned biorefinary. In this case we determined the minimum YE requirement (Fig. 8.).

An other improvement possibility is to find alternative producer strain, which is able to convert starch directly into lactic acid. We tested *Lactobacillus amylophilus* and *amylovorus*, and found the second one more effective. Applying it on a wheat flour based medium 30g/L yeast extract was also needed (Fig.9.). Further experimental routes will be to find an effective alternative to this huge amount of YE in this case, too.

Lactic acid fermentation is followed by a reactive distillation step (after filtration) which allowed us to use ammonium-hydroxide for pH control during the fermentations. This is very important, because the gypsum formation (produced in large amount in the classical lactic acid technology) can be avoided.