

## Xilit fermentáció *Candida boidinii* segítségével

### *Kutatási beszámoló*

Dr. Kálmán Gergely

A xilit méltán tart számot nagy érdeklődésre sokrétű alkalmazhatóságának köszönhetően kezdve az élelmiszeripartól, a kozmetikai iparon át, egészen a gyógyszeriparig. Kiváló cukorhelyettesítő, így elsődlegesen cukorbetegnek számára jelent megoldást a mindennapok során. Egészségre gyakorolt hatását számos tanulmány és tudományos kísérlet igazolja.

A xilit ipari léptékű kémiai előállításának módja az 1970-es évektől ismert, azonban a növekvő népszerűségnek és egyre szélesedő igényeknek köszönhetően kiterjedt kutatások tárgyát képezi a xilit biológiai, fermentáció útján történő előállítása.

A környezettudatosságot és fenntarthatóságot szem előtt tartva előtérbe kell helyezni a megújuló nyersanyagokat és az ezen alapuló technológiákat. A Földön nagy mennyiségben rendelkezésre álló lignocellulóz alapú biomassa, mint megújuló erőforrás, megoldást kínál a fenti problémákra és megfelelő alapot biztosít a fermentációs technológiák által történő értéknövelt termékek előállítása számára. A hemicellulóz, a lignocellulózok egy frakciója, jelentős mennyiségű xilózt tartalmaz, mely biológiai úton xilitté fermentálható. A kezdeti kutatások génmódosított organizmusokkal foglalkoztak, de kiderült, hogy a koenzimek regenerálása és a xilóz felvétele igen komoly akadálya a xilit gazdaságos előállításának, így fordult a figyelem a *Candida* törzsek felé, melyek természetes xilóz felhasználók.

A mikrobák közül egyes baktériumok, élesztők és gombák azok, melyek rendelkeznek a xilit előállításához szükséges enzimrendszerrel. Az élesztők közül például a *Candida* nemzetségbe tartozók sikerrel alkalmazhatóak a xilóz xilitté történő alakítására. Mivel természetes xilóz felhasználók, nagy előnyt élveznek a genetikailag módosított mikroorganizmusokkal szemben a xilóz felvételét és a sejten belüli redoxpotenciál fenntartását illetően. Ennek oka, hogy a xilóz xilitté történő átalakítása egy redukciós lépés, melyet aztán egy oxidációs követ, ahol a xilit xilulózzá alakul tovább, így kulcskérdéssé válik az oxidált és redukált kofaktorok sejten belüli kiegyensúlyozottságának és szükséges mennyiségének biztosítása a sejtműködéshez.

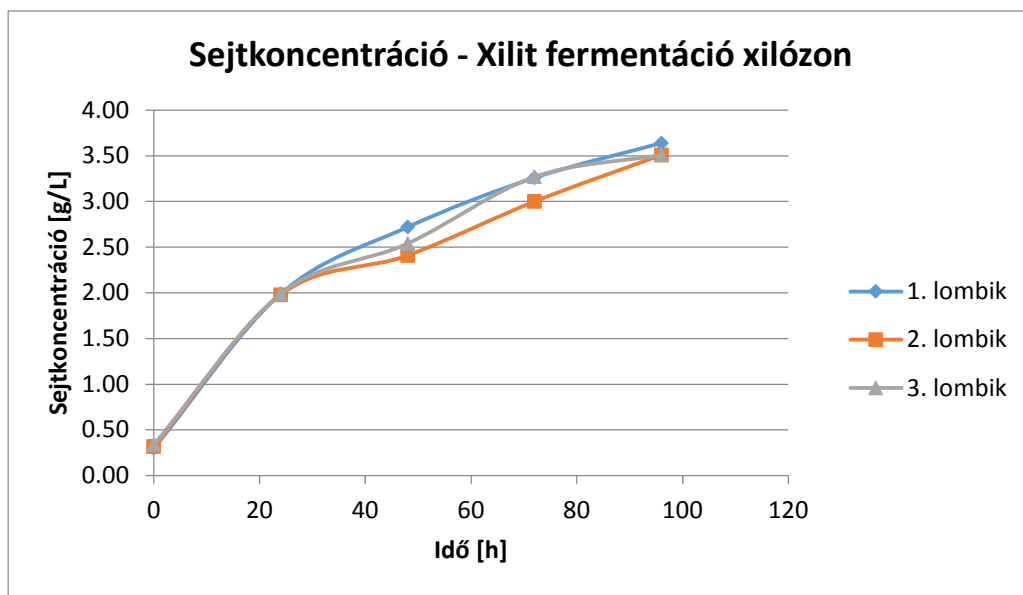
A kutatás keretében azt vizsgáltam, hogy a maximális xilit hozam elérése érdekében a *Candida boidinii* számára melyek az optimális fermentációs körülmények. Az előre felállított kísérleti terv alapján statisztikai vizsgálatnak vetettem alá a kezdeti cukorkoncentrációk, a levegőztetés, valamint a képződő metabolitok egymásra hatását mesterséges, előre meghatározott fermentációs közegben.

A kísérletek két részre oszta zajlottak. Az első részben a *C. boidinii* xilózon, mint egyedüli szénforráson történő növekedését és xilit hozamát vizsgáltam. A második, nagyobb részben különböző glükóz-xilóz arányú tápoldatokban, különböző levegőztetési viszonyok mellett tanulmányoztam a sejtek növekedését, a szénforrások és az oxigénnel való ellátottság hatását, az etanol képződést valamint ezek xilit képződésre kifejtett hatását.

*Candida boidinii* élesztő segítségével végeztem xilóz fermentációs kísérleteket. Statisztikai módszerekkel, kísérleti terv alapján előre meghatározott kezdeti xilóz és glükóz koncentráció, valamint levegőztetés hatását vizsgáltam a xilit hozamra nézve.

A kísérleti munka eredményeként levont következtetéseim és megfogalmazott kérdéseim statisztikailag megalapozott tudományos háttérrel biztosítanak a fenntartható és gazdaságilag is megvalósítható ipari léptékű xilóz fermentációs technológia megalkotását célzó további kutatásokhoz és fejlesztésekhez.

A kísérletet 3 párhuzamos lombikkal hajtottam végre, melyekből mintákat vettem 0, 24, 48, 72 és 96 óránként és mértem a mintákban lévő sejtkoncentrációt. A sejtömeg változását az alábbi grafikonon ábrázoltam. A végső átlagos sejtkoncentráció 3,56 g/L volt a lombikokban. A 60 g/L-es glükózt tartalmazó tápoldaton növő sejtek 4,57 g/L-es koncentrációjához képest ez 32%-al kisebb sejtömeget jelent, ami annak köszönhető, hogy egyrészt a glükóz a preferált szubsztrát az élesztő metabolizmusában a xilózzal szemben, amely gyors növekedést tesz lehetővé. Másfelől a glükózon történt sejt szaporítás nem mikroaerob környezetben zajlott, így a sejtek számára megfelelő mennyiségű oxigén állt rendelkezésre, ami gyors növekedésükhöz vezetett.



A sejtek a kezdeti viszonylag gyors növekedés után lassuló ütemben kezdtek el szaporodni, ami a kimerülő tápanyagoknak, illetve a képződő metabolitoknak lehet köszönhető. Megmértem a tápoldat pH-ját még az inokulálás előtt, majd a fermentáció befejeztével. A pH 5,91-es értékről 4,24-re csökkent. Ez hathatott kedvezőtlenül a *C. boidinii* növekedésére, mert a mikrobák feltehetően ecetsavat termeltek, mely negatívan befolyásolja a sejt növekedést.

A *C. boidinii* hajlamos nagy mennyiségű etanol termelésére is, ebben az esetben az 1-es, 2-es és 3-as lombikban rendre 6,68; 5,26 és 5,05 g/L koncentrációban képződött alkohol.

A xilóz fermentáció eredményeit az alábbi táblázat tartalmazza.

<b>Xilóz fermentáció eredményei</b>	
<b>Cx=60 g/L; F:50/100mL;t=96 h</b>	
Végső xilit koncentráció	19,65 g/L
Xilóz fogyás	85,1%
Xilóz konverzió	32,7%
Xilit/fogyott xilóz	38,5%

A kísérleti tervnek megfelelően végrehajtott xilóz fermentáció eredményeit az alábbi szempontok szerint elemeztem:

- a paraméterek sejtnövekedésre kifejtett hatása
- a glükóz-xilóz arány hatása az etanol termelésre különböző töltöttségeknél
- a glükóz-xilóz arány hatása a fogyott xilóz alapján számolt xilit hozamra különböző töltöttségeknél
- a glükóz-xilóz arány hatása a xilit hozamra különböző töltöttségeknél

Az elemzést statisztikai módszerekkel végeztem. A kísérleti eredményeket a Statistica programban úgy tudtam kiértékelni, hogy a szoftverben, a kísérleti terv alapjául is szolgáló, rögzített glükóz és xilóz koncentráció, valamint töltöttség értékek mellé beillesztettem a végső, 96 órás mintákban mért sejt- és etanol koncentrációkat, valamint xilit hozamokat.

Összevetve a többi mérési eredményemmel: a xilóz fermentáció során 3,56 g/L-es koncentrációban képződtek sejtek, a glükóz tápoldaton történő szaporítás során több mint 5 g/L-es oldatot kaptam.

Ebből levonható a következtetés, hogy célszerű magasabb sejt koncentrációval kezdeni a fermentációt, mert a mikroaerob körülmények nem kedveznek az élesztő szaporodásának és ez negatívan befolyásolhatja termelékenységét.

A xilit fermentációs előállításakor a sejtek oxigénnel való ellátottsága miatt a redukált és oxidált koenzimek között megmutatkozó kiegyensúlyozatlanság az oka a xilit extracelluláris felhalmozódásának. Az XR enzim NAD(P)H függő, az XDH pedig NAD<sup>+</sup> függő, vagyis oxigén hiányos környezetben az XDH által képződő NADH nem tud visszaoxidálódni annak redukált formájává a légzési elektronláncon keresztül. Az enzim működése így lelassul, xilit felhalmozódást eredményezve. A NAD<sup>+</sup> regenerálásnak egy módja, ha a sejt piruváttól, acetaldehidet át etanolt vagy glicerint állít elő. Az elégtelen oxigénmennyiség negatívan hat a sejtek metabolizmusára és energiatermelésére és ezért erjedési folyamatok indulnak be, hogy anaerob körülmények között is energiához jussanak, így lesz az etanol a végső elektron akceptor.

Az eredmények hasonlóak, mint a fogyott xilózra számolt xilit hozamnál. A xilit képződésének kedvez az alacsony glükóz és magas xilóz kezdeti koncentráció. A xilózos kísérlettel összevetve, ahol 32,7%-os

konverziót sikerült elérni, itt 34%-os konverzió olvasható le a válaszfelületről 0 g/L glükóznál, ami a modell pontosabb illeszkedését jelenti.

A grafikon alacsony glükózt tartalmazó részein a xilóz konverzió igen magas, azonban a glükóz kis változására is érzékenyen reagál a xilit hozam csökkenésével.

Alacsony töltöttségénél 30 g/L glükóz koncentráció felett nem is képződik xilit, hacsak nincs jelen jelentős mennyiségű xilóz (>45 g/L). A töltöttség csökkentésével a glükóz teljes inhibeáló hatásához magasabb glükóz koncentráció kell.

A töltöttség növelésével lineárisan nő a xilit hozam is, a növekedő töltöttség a xilit hozamot jelentő felület Z irányú eltolását jelenti. Alacsony glükóz koncentráció esetében a kezdeti xilózból magas arányban képződik xilit, melyet a megnövelt kezdeti xilóz a glükózhoz képest nem befolyásol számottevően.

Az ábrák alapján felmerül a kérdés, hogy vajon a maximális xilit hozam 40%-nál tetőzik-e, avagy a kezdeti xilóz koncentráció további növelésével a *C. boidinii* hozama is növelhető-e.

Összefoglalva:

Kutatásomban a kezdeti xilóz, glükóz és a levegőztetés xilit hozamra, etanol képződésre és sejtnövekedésre kifejtett hatását vizsgáltam statisztikai módszerekkel, *C. boidinii* élesztőt használva a fermentációhoz. Fontos megjegyezni, hogy az irodalmi áttekintés során említett további paraméterek (sejtkoncentráció, pH, hőmérséklet, rázatás, egyéb metabolitok) is szignifikáns hatással lehetnek a xilit hozamra. Ezek közül a rázatás intenzitását és a hőmérsékletet állandó értéken tartottam, a sejtkoncentráció, természetéből fakadóan folyamatosan nőtt illetve stagnált a fermentáció során. A pH és a nem mért metabolitok hatása további megválaszolandó kérdéseket vetnek fel.

A statisztikai elemzést követően arra a következtetésre jutottam, hogy a magas xilit hozam elérése érdekében (függetlenül attól, hogy teljes vagy fogyott xilózra számolom) a kezdeti xilóz koncentrációt magasan, lehetőleg 50 g/L fölött kell tartani, mindemellett számolni kell a glükóz szignifikáns negatív hatásával, így a glükóz mennyiségét minél alacsonyabb koncentrációra kell leszorítani a fermentáció során.

A töltöttség növekedése egyértelműen a xilit (és az etanol) képződésének irányába tolta el a fermentációt, éppen ezért a vizsgált töltöttségek felső határát, a 60 mL-es töltöttséget jelölöm meg, mint optimális értéket.

A jövőben a magas xilit termelékenység elérése érdekében a mostaninál magasabb kezdeti sejtkoncentrációt alkalmaznék. A kísérletekben megerősítést nyert, hogy a glükóz és a rendelkezésre álló oxigén, az irodalmi adatokkal is összhangban, a mikrobák gyors növekedését segítik. A xilit hozamra kifejtett kedvezőtlen hatása miatt azonban, csak igen alacsony koncentrációban lehet jelen a fermentáció során a glükóz, a xilit hozamra kifejtett kedvező hatása miatt viszont magas töltöttséget szükséges alkalmazni, így a sejtek növekedésére nézve erősen hátrányos körülmények állnak elő. Ezt kiküszöbölendő már a fermentáció elején magasabb kezdeti sejtszámot javaslok.

A kísérleteim során az etanol képződése elsősorban a xilóz mennyiségétől függött. Az alkalmazandó optimális magas xilóz koncentráció (>60g /L) valószínűsíthetően magas etanol hozamokat is fog produkálni, azonban ez nincsen szignifikáns hatással a képződő xilitre.

Az elvégzett vizsgálataim eredményei további kérdéseket vetnek föl, ezért a jövőbeli kísérletekben azt javaslom vizsgálni, hogy

- az esetlegesen tovább növelt kezdeti xilóz koncentráció magával hozza-e a xilit hozam növekedését?
- a tovább növelt töltöttség milyen szintig képes a xilit hozam növekedését elősegíteni?
- mekkora az optimális kezdeti sejtkoncentráció?
- milyen hatással vannak más metabolitok, mint például az ecetsav vagy a glicerin a fermentációra?
- milyen hatással van a pH, a hőmérséklet és a rázatás intenzitásának változtatása a fermentáció menetére?
- a fermentációs idő növelésével érhető-e el magasabb xilit hozam?
- a preinokulum glükóz-xilóz vegyes tápoldaton történő növesztése növeli-e a xilit hozamot, csökkenti-e a fermentációs időt?

Budapest, 2014. december 19.

Dr. Kálmán Gergely