SAPIENTIA ERDÉLYI MAGYAR
TUDOMÁNYEGYETEM, KOLOZSVÁR
CSÍKSZEREDAI KAR
BIOMÉRNÖKI TANSZÉK

DIPLOMAMUNKA

Témavezető :
Dr. Miklóssy Ildikó, egyetemi adjunktus

Abszolvens
Both-Fodor MÁrta

-2017-

Anyagcseremérnökséggel tervezett iparban alkalmazható *Escherichia coli* törzsek génexpressziós vizsgálata

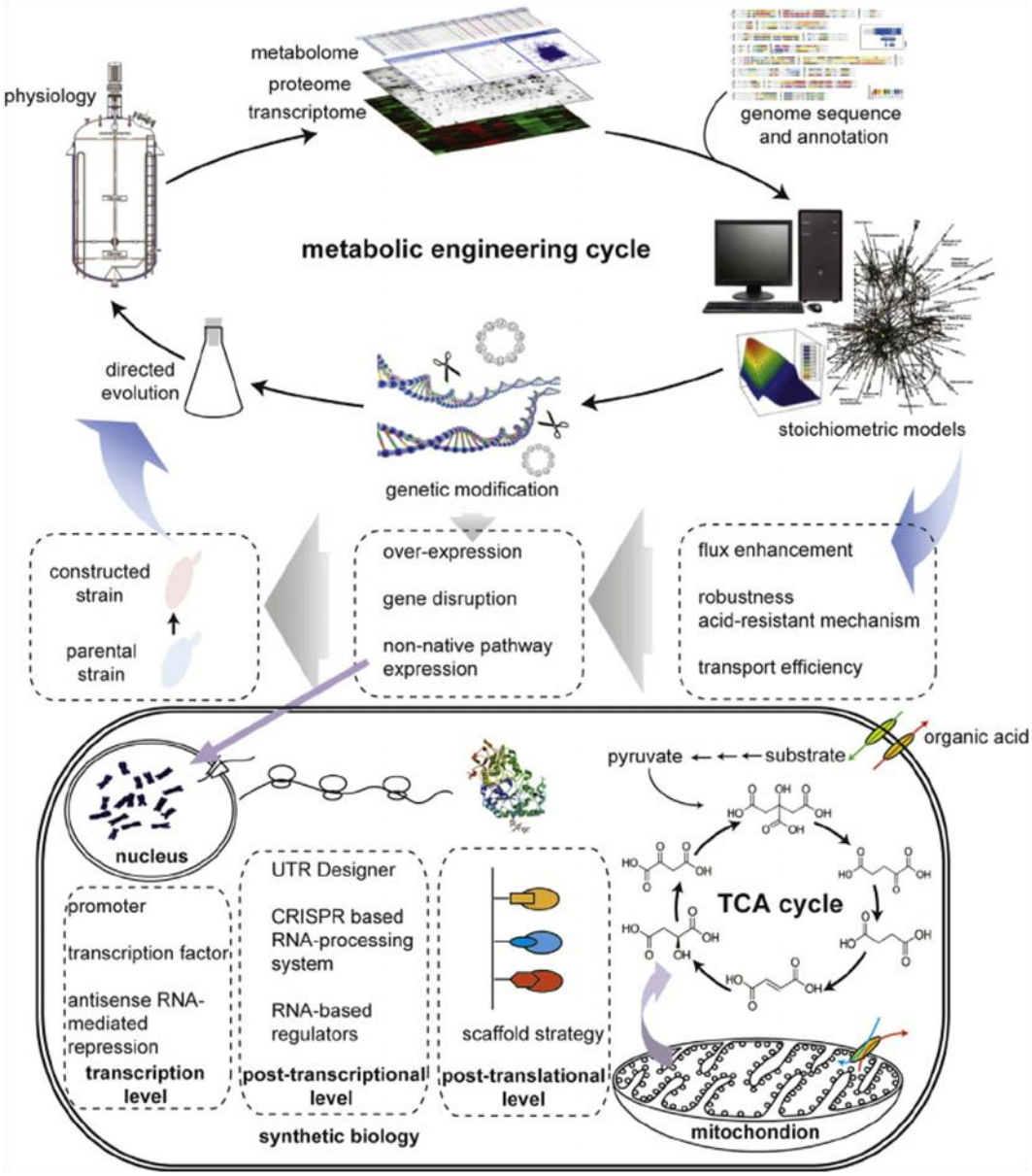
1. Fejezet : Irodalmi áttekintés

1.1. Bevezető

A modern biotechnológiai módszerek az éveken át felhalmozódó kémiai, fizikai, biológiai tudományos eredmények legújabb "találmányaként" van számon tartva a világgazdasági piacán. Forradalmi áttörést ért el a tudományos és technológiai módszerek fejlődésével. Napjainkban a kémiai szintéziseket felváltják a bioalapú ipari eljárások, a különböző vegyipari biológia ismereteket felölelve.

A modern anyagcseremérnökség irányított javítását teszi lehetővé a sejteknek specifikus biokémiai reakciók deléciójával ,inszerciójával, módosításával, rekombináns DNS technológiai módszerek alkalmazásával. Metabolikus útvonalak manipulációja által lehetőség nyílik a mikroorganizusok tulajdonságainak illetve termelési hozamának a változtatása. A molekuláris technikák rendkívüli fejlődése révén a DNS rekombinációval nyilvánvalóvá vált az irányított metabolikus útvonalak módosítása. Számos kutatással arra törekedtek hogy kifejezzék ezen módosítás lehetőségeinek technológiai alkalmazását, mint (mikrobiális vagy metabolikus) útvonaltervezés (MacQuitty, 1988, Tong Et.al., 1991), molekuláris tenyésztés (Kellogg et.al., 1981), sejtmüködés (Nerem, 1991) szinten. A kapott fenotipusokban gyakran a nem megfelelő termékhozam vonatkoztatható a nem megfelelő genetikai módosításokra vagy ismeretlen szabályozó kölcsönhatásokra. Ezért a metabolikus útvonalak módosításához elengedhetetlen a teljes metabolikus szabályozás feltérképezése, figyelembe vevése [1].

A modern anyagcseremérnökség több annál mint összeilleszteni géneket bizonyos útvonalak kialakítására néhány milligrammnyi termék nyerés céljából. Az anyagcseremérnőkség a molekuláris biológia, géntechnológia, kémiai reakciókinetika, biokémia, in silico modellezés módszereivel az útvonal építésen (kombinatorikus modellezés, fluxus eloszlás) és gazdaszervezet optimalizálásán (növekedési sebességének termelékenység, termék fokozása) túlmenően a költséghatékony módszerek kidolgozásáig a kereskedelmi szintű ipari alkalmazásig tartó műveletek halmaza [2]. Az anyagcseremérnökség módszereinek egymásutániságából adódó feltételeket, mint körfolyamatot láthatjuk az 1. ábrán. A tervezés pillanatától az elemzéssel bezárólag egy komplex folyamat-együttesről beszélhetünk.



1.ábra. A modern anyagcseremérnökség műveleteinek illusztrálása [31]

Kutatásom fő célja anyagcseremérnökséggel előállított heterológ géneket tartalmazó *E. coli* törzsek létrehozása ,metabolikus útvonalának optimalizálása, valamint transzkripciós mintázatának nyomonkövetése.

További célkitüzéseim:

- A gazdasejt génmanipulációja anyagcsere mérnökséggel

Első lépésben az 1,4-butándiol mennyiségének növelése érdekében az Escerichia *coli K12 MG14D2(DE3)* (Miklóssy és mtsai., 2016) gazdaszervezetből az alkohol dehidrogenázt kodoló génszekvenciát eliminálјuk λ-Red rekombinációs rendszerrel. Ezt követően olyan heterolog géneket(*Clostridium acetobutylicum* akohol/aldehid dehidrogenáz, *Chloroflexus aurantiacus* malonil-koenzimA reduktáz, *E. coli* szukcinil-koenzimA-szintetáz kódoló

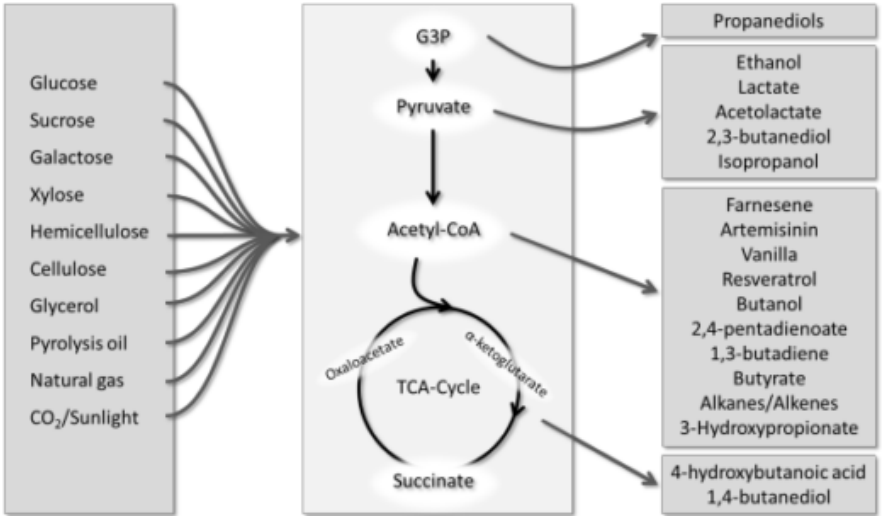
szekvenciái) transzformálunk a sejtbe amelyekkel a hiányos 1,4-butándiol útvonal termelése müködőképes lesz.

- Fermentációs kísérletek különböző térfogatokban a törzsek tenyésztési körülményeinek vizsgálatához.

  A létrehozott mutáns törzsek optimalizálása minimál táplevesben glicerin és glükóz szubsztráton, aerob és mikroaerob/anaerob körülményeken. Ezen kisérletekből a vizsgált törzsek génexpresszió változásairól , a változásokból szorosan következő tenyésztési körülmények otpimalizálási lehetőségéről(oxigénellátás, C-forrás) valamint a termelt metabolitokról is eredményeket kapunk.
- Expressziós profilok meghatározása RT-qPCR módszerrel.

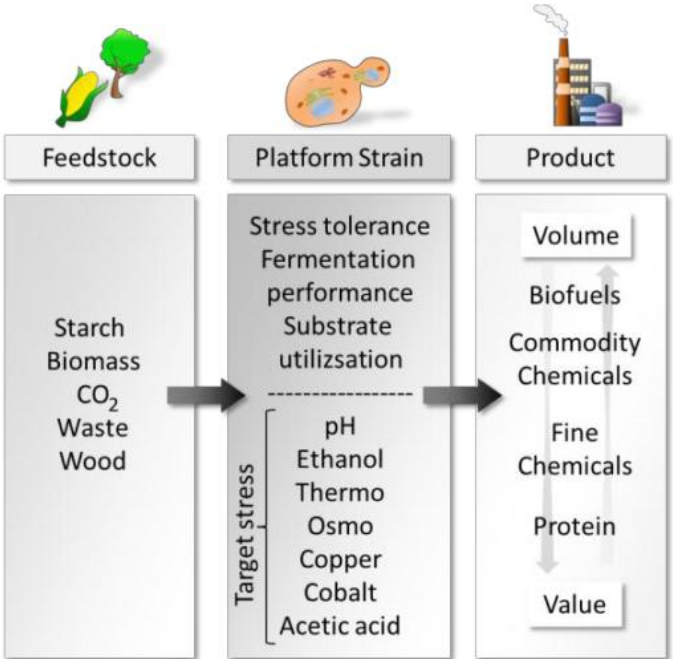
1.2.Anyagcsere az ipari szintézisekben

Képzeljünk el egy világot ahol mikrobák termelik a villamos energiát amellyel világíthatjuk lakásainkat, iskoláinkat, közutjainkat, az üzemanyagot amellyel közlekedési eszközeinket működtethetjük, gyógyszereket amelyekkel számos kémiai szintézist lerövidihetünk, elhagyhatunk, élelmiszereket amelyeket nap mint nap fogyaszthatunk. Ezek az alkalmazások mára már léteznek, és nem elhagyanyagolható ezen módszerek időbeni optimalizálása, fenntartása. Az élelmiszer- gyógyszeripar mára már bizonyitották a mikrobák hasznosságát a kívánt termék bioszintézisében. A mikroorganizmusok gyors növekedésükkel, viszonylag olcsó szénforrás- ,tápanyagigényükkel, metabolikus útvonalaik megváltoztatásával iparban való foglalkoztatásuk megnőtt. Úgy a primer mint szekunder metabolitoknak is globális piaci értékük van. Az anyagcseremérnökség az enzimfunkciók biokémiai ismeretével valamint a DNS szintetizálásának képességével alkalmas mikrobiális bioszintetikus útvonalak felfedezéséhez, kialakításához. Általában olyan mikrobákat választunk amelyeknek jól ismerjük a genomszekvenciájukat, hogy megfelelőek legyenek génmódosításokra, heterológ gének befogadására [3]. Azonban az iparágak elsősorban a baktériumok ,algák, élesztők által termelt metabolit alapú termékekre összpontosítanak.[4]



2.ábra. Anyagcseretermékek *de novo* szintézise.[4]

A 2. ábra általánosan szemlélteti különböző szubsztrátokból felhasználásával a szubsztrát metabolizmus különböző szakaszaiból képződő metabolitokat. Az ábrán feltüntetett metabolitokból kiderül hogy a folyamatoknak(glikolizís, citrát ciklus) nem köztes intermedierjeiről van szó hanem különböző körülményeknek a fenntartása, bizonyos körülmények "építése" szükséges a képződésükhöz. Mára már fontos az iparban alkalmazható törzsek előzetes módosítása, optimalizálása, körülményeinek behatárolása, termék hozam fokozása, ennek eredményeképpen jöttek létre az úgynevezett platform törzsek amelyek már hordozzák a megfelelő tulajdonságokat/információkat (például hőmérséklet-, alkohol-, savtolerancia) . A platform törzsek alkalmazásával lehetőség adódik a kívánt képességű törzsek kiválasztására az alapanyag feldolgozás és kívánt termék előállítás szempontjából. A 3. ábrán látható a különböző platform törzseknek az adott szénforrás metabolizmusából adódó mára csak igen gazdaságos haszontermékeik.



3.ábra. Platform törzsek felhaszálása ipari szintézisekben.[4]

Általánosságban elmondható, hogy a biotechnológia alapú vegyi anyag termelés a mikroorganizmusok elsődleges anyagcseretermékeinek de novo szintézisére épül. Ezen belül a glikolízis valamint a citrátkör esszenciális [5].

A glikolízis során 1 glükóz molekulából keletkezik 2 molekula piruvát, a keletkező energia ATP formájában raktározódik el. Ez az energia a glikolízis során keletkező nagyenergiájú foszfátvegyületek keletkezése során termelődik. aerob körülmények között a piruvát átalakulva acetil Coa-vá a TCA ciklusban oxidálódik, amely során a koenzimek is visszaa oxidálódnak a légzési lánc mentén. Ezzel szemben anaerob körülmények között a glükóz lebontását fermentációnak nevezzük, mert a piruvát redukciója során reoxidálódik a NADH aminek segítségével elsősorban tejsav vagy alkohol keletkezik. Aerob körülmények között citrát ciklusban első lépésben az acetil CoA-ol citromsavat kapunk, mégpedig az acetil CoA és az oxálecetsav kondenzációjából, a CoA lehasadásával. Ezt követi a cisz akonitsav egy vízkilépési reakcióval, majd egy sztereospecifikus vízaddicióval izocitromav képződik. Az ezt követő lépésekben NADPH+ redukálodik oxálborostyánkősavon keresztül,, majd α-ketoglutársav keletkezik.Az α-ketoglutársavnak átalakulása szukcinil-Coa-vá NADH+H+-t eredményez. A következő lépésben ATP keletkezése közben szubsztrátszintű foszforilációval borostyánkősav keletkezik. Ezt követi a fumársav ,és ennek egy sztereospecifikus vízaddiciójával képződik az oxálacetát [6].

Az ipar egyik legnagyobb tömegtermékeinként van számontartva a mikrobiális úton előállított szerves savak. A szerves savakat úgy az anerob mint aerob mikroorganizmusok

termelik. A szerves savak termelődhetnek a sejtek növekedési szakaszában , tovább alakulhatnak és felhalmozódhatnak, aerob körülményeken csak abban az esetben képződnek ha szubsztrátum tökéletes oxidációja gátlást szenved. Szerves savak közül ipari szempontból a legnagyobb szerepe, de a sorban a következnek az ecetsav, tejsav,borostyánkősav, fumársav stb.

A fosszilis tüzelőanyagok környezetre káros hatását mára már számos kutatás is tárgyalja, azonban a megoldás is itt áll napjaink küszöbén, ami a a biomassza felhasználását bioenergia termelésre mint alternatív tüzelőanyag fejlesztésre foglalja magába. A bioüzemanyagok közül a hidrogén, bioetanol, és magasabb tüzelőanyagok szintézise válik lehetővé különböző szintetikus útvonalak kialakításával, optimalizálásával.[4]

A mikroorganizmusok hozamának növelésére egy jó példa a CsrB túltermelő *E. coli* gazdaszervezetként való alkalmazása a bioüzemanyagok előállításához tervezett útvonalakhoz növekvő n-butanol (88%) és amorfadién termeléshez vezetett (55%) a kontrollsejtekhez képest [3]. Minden évben több mint 80 millió tonna ipari vegyi anyagot termelnek kőolaj alapú alapanyagokból, ezek petrokémiai anyagok(nyersolaj, benzin, földgáz). A vegyipar egyre inkább előmozdítja a fenntartható technológiákat mint például az energiafelhasználás csökkentése és a nyersanyagok újrahasznosítása. A biotechnológia egy olyan új megközelítést kínál amely megújuló szénhidrátból(növényi glükóz, xilóz, szacharóz) ipari vegyi anyagokat állít elő. A mikroorganizmusokról az előbbiekben leírtakból kiderülve megtudhattuk hogy számos olyan metabolitot(alkohol, szerves savak,aminosavak, antibiotikumok) termelnek amelyek kereskedelmi szempontból is nagyon fontosak. Egy másik példa a DuPont kialakította azt a bioszintetikus útvonalat amellyel Escherichia coli baktériumot átalakította az 1,3-propándiol (OEM) termelésére, amely a Serona^{TM} márkájú üvegszálak építőeleme.[7]

1.3.Az anyagcsere tárgya és módszerei

1.3.1. Anyagcseremérnökség alkalmazásai

A géntechnológiák rohamos fejlődésével mára már elengedhetetlen a célzott génmódosítások alkalmazása szervezetek tulajdonságainak megváltoztatására valamint javítására. Ezáltal lehetőségünk van olyan számunkra hasznos metabolitoknak a mennyiségi növelésére ami a génmódosítás előtti gazdaszervezetben vagy csak csekély mennyiségben vagy egyáltalán nem termelődött [8]. A modern anyagcseremérnökség a rekombináns DNS technológiával felhasználva a sejtek (növény, baktérium, élesztő) irányított változását teszi

lehetővé számunkra. Egyik legfontosabb célja a termelő törzs optimalizálása, amely során növelhető a kívánt metabolit/metabolitok mennyisége [1].

Az anyagcsere-technikákat népszerűen alkalmazzák, a biotechnológia, gyógyszeripar az élelmiszeripar és az italgyártás szempontjából fontos vegyi anyagok előállításához. Bővülő módszertana elérhetőségével a kívánt kritériumok alapján való sejtek teljesítményének optimalizálásában és a rekombináns sejtszervezetek tervezésében esszenciálissá válik a matematikai modellezés és a számítási analízis [9].

Szakirodalomban számos kutatást találunk heterológ metabolikus útvonalakat tartalmazó anyagcsere és génmérnökséggel előállított *E. coli* törzsekre. Például a 2,3-butándiol ([10]), az 1,3-butándiol ([11])a tejsav ([12]), szukcinsav ([13]) esetében [14].
Számos metabolitot alkalmaznak polimerek gyártásának építőelemeként, ilyenek lehetnek a dikarbonsavak, diaminok, diolok, hidroxisavak, általában elsődleges anyagcseretermékek. Ezeket vad illetve módosított gazdaszervezetek anyagcseretermékekként termelődnek, azonban kereskedelmi szintű termeléshez elengedhetetlen bizonyos útvonalak eliminációja, gátlása. A közelmúltban számos kutatás foglalkozott ezen mikroorganizmusok fejlesztésével és nagy számban sikerült is heterológ gének alkalmazásával magasabb termelési hozamot elérniük például az 1-propanol, 1-butanol termelésében. Az 1-propanol termelését *E.coli* törzset alkalmazva módosított *adhE* (alkohol dehidrogenáz) gén transzformálásával valamint egy stressz-válasz gén eliminálásával sikerült megnövelniük 10,8g /l koncentrációra szakaszos bioreaktorban [15].

1.3.2. Alkalmazható gazdatörzsek(*Escherichia coli* -Keio collection, *Saccharomyces*, *Clostridium*)

A biotechnológiai módszerek megjelenése mellett elengedhetetlen volt különböző mikroorganizmusok, gazdatörzsek felkutatása, megértése, fejlesztése, módosítása. A modern biotechnológia lehetőséget nyújtott ezen gazdatörzseknek olyan szintű feljavítására, alkalmazására amelyekkel számunkra előnyös, hasznos termékeket állíthatunk elő.

Az *Escherichia coli* és *Saccharomyces cerevisiae* mikrobák megfelelnek/alkalmasak termékhozam növeléséhez szükséges beavatkozások alkamazására [3].

A modern biotechnológia korszak kezdetétől széles körben alkalmazták a molekuláris klonozási módszerekhez valamint kereskedelmi célú biotermékek termelése szempontjából az E. coli-t , számos előnyös tulajdonsága miatt is mint például a gyors növekedési sebbessége, generációs ideje, nagy sejtsűrűsége valamint alacsony termelési költsége, fenntartása miatt és nem útolsó sorban a a kiváló genetikai eszközeinek elérhetősége miatt.[16]

Számos omikai technikát alkalmaztak az *E. coli* génkiütéseibe való betekintésére, ezen belül a különböző metabolitok, transzkriptumok-géexpresszios profilok, enzimatikus aktivitás mérések, valamint metabolikus fluxusok vizsgálatával [17].

A *S. cerevisiae* iparban való alkalmazása elterjedt, más mikroorganizmusok melletti tulajdonságai a következők: magas ozmózis tolerancia, alacsony pH-tűrőképesség, valamint homológ rekombinációval történő DNS szekvencia befogadásának képessége. Ezen tulajdonságainak szemléltetésére számos alkalmazása van egyetemeken és iparban, mint "minta-gazdatörzs" van számon tartva [4].

1.3.3. Technológiák alkalmazása, integrált megoldások

A fermentációs eljárások célja lehet mikroba sejttömeg előállítása (pékélesztő gyártása, mikrobiológiai eredetű fehérje előállítása), vagy a mikroorganizmusok primer és szekunder
anyagcseretermékeinek előállítása (alkohol, szerves savak, vitaminok, enzimek, aminosavak, és antibiotikumok előállítása), esetleg szerves anyagok lebontása (biológiai szennyvíztisztítás).
A bioreaktor - a kémiai illetve a biokémiai átalakulást végző készülék. A klasszikus reaktornak két fő típusát ismerjük: a csőreaktort és az üstreaktort. Míg az első, folyamatos működésű, a másodikat lehet szakaszosan vagy folyamatosan működtetni. A szakaszos reaktort meghatározott anyaggal töltjük fel, majd megváltoztatjuk a töltet állapotjelzőit (hőmérséklet és nyomás) és a szükséges másik reagenst, iniciátort, katalizátort stb. adagolunk hozzá. A reakció hatására a koncentráció is változik, mindaddig, amíg el nem érjük a várt átalakulást, mikor is leállítjuk a folyamatot, az üstöt kiürítjük, majd a reakcióterméket elválasztjuk. Bioreaktor típusokat az a 4. ábra mutatja be. A folyamatosan működő üstben vagy csőreaktorban a reagensek adagolása és a termékelvonás folyamatosan történik. A csőreaktorban az anyagmozgatás külső behatásra történik (legtöbbször szivattyúval, de lehet gravitációval is), az üstben úgy külső (szivattyú), mint belső (keverő) hatásra történhet. Amikor szilárd fázisú reagenst kell áramoltatni, akkor vagy a fluidum (gáz vagy folyadék) kinetikai energiáját használjuk, vagy a gravitációhatást alkalmazzuk. Sok esetben a folyamatos termelést sorba kapcsolt folyamatosan működő kaszkád üstökkel vagy párhuzamosan kapcsolt szakaszosan működő üstökkel oldjuk meg. Megemlítjük, hogy az ipari termeléskor a nagy volumenű termék előállítására a folyamatos, míg a kisebb volumenű termék esetében szakaszos üzemmódot alkalmazunk. ([5], szép alexandru-technologiai folyamat elemzése) .

A szakaszos reaktorok előnyei között megemlíthetjük kisebb beruházási költség ellentétben a folyamatos reaktorral, nagyobb nyersanyag átalakulás,többször változtatható. Hátrányai közűl kitűnik a kisebb termelékenység ,a járulékos műveletek veszteségeként,nagyobb ipari higiéniás kockázat. A folyamatos reaktorok esetében kevesebb a nem produktív idő, és a legfontosabb hogy a megnövekedett automatizált reaktorok által költséghatékonyabb a folyamat hosszútávon. Viszont nagyobbak a feldolgozás költségei és nem elhanyagolható az sem hogy nagyon csekély beavatkozást,változtatást lehet eszközölni. A félfolyamatos bioreaktorok a szakaszos és folyamatos műveletek kombinációja,amelynek előnye hogy közel állandó a működése valamint a mikroorganizmusok környezetének optimalizálása is kedvezőbb.

A bioreaktor azon rendszerek egyike amelyben biológiai átalakulás történik, biológiai reakciók mennek végbe. Ezek a biokémiai reakciók termékei a következő folyamatokban keletkezhetnek elsőként mint a legáltalánosabb folyamat a mikroorganizmusok életfunkciójából adódóan az intra és extra celluláris termékek képződése, második folyamat lehet az amikor csak a sejttömeg termelés a cél, valamint a harmadik folyamatként megemlíthetjük, amikor a sejtek biotranszformációval képesek átalakítani a hozzájuk adagolt vegyületeket [18].

A baktériumsejt alkalmas környezetbe kerülve osztódni kezd. A két egymást követő osztódás között átlagosan eltelt időt generációs időnek nevezzük. Nagyszámú baktériumegyedet tartalmazó populációban az egyes baktériumok generációs ideje jelentős eltérést mutat.. Ezt az átlagos generációs időt adják meg általában egy mikroorganizmus jellemzésére. A generációs idő függ a mikroba fajtól, a tenyésztési körülményektől (tápanyag, hőmérséklet, pH, stb.). Tehát ahogy a fentiekben is írja a baktériumok a nekik megfelelően optimalizált környezetbe(pH, hőmérséklet, ozmotikus viszonyok) és a megfelelő tápanyagellátás mellett elkezdenek növekedni és egy idő után osztódni is, azaz egy anyasejtből két azonos leánysejt keletkezik. Az első generáció tehát 2, a második 22=4, a harmadik 23=8 a negyedik 24=16, és így tovább az n-edik generációig, amely összesen 2n darab leánysejtet eredményez [5].

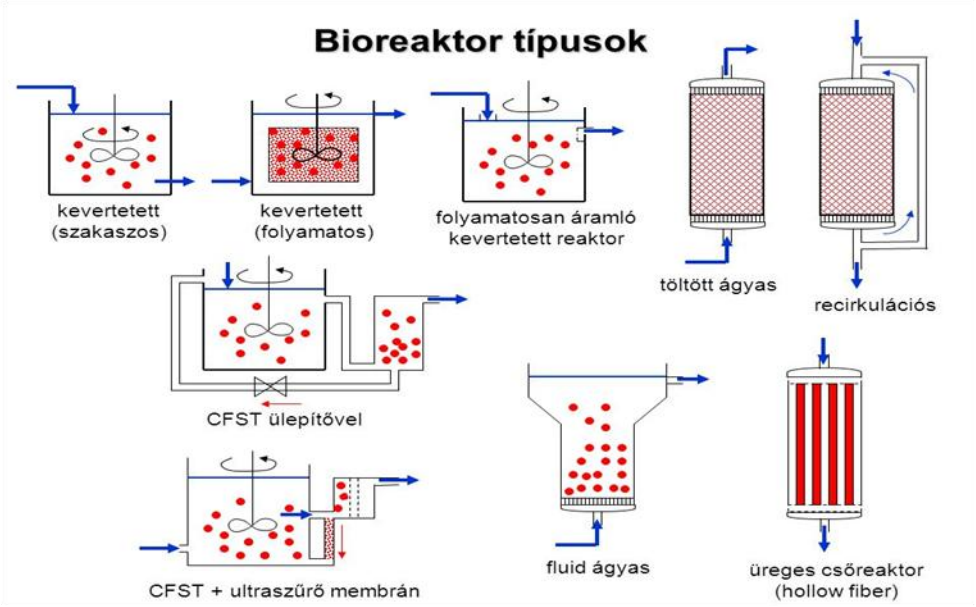
Bioreaktorban történő metabolit termelés folyamatának főbb műveletei a következőek:

1. A bioreaktor megtervezése: a mikroorganizmus igényeinek biztosításához szükséges feltételek biztosítása(levegőztetés, keverők, szelepek, hűtő-fűtőköpeny,tömítő gyűrűk)
2. A reaktor oxigén-szükséglete: annak függvénye hogy aerob vagy anaerob fermentációról beszélünk, anaerob fermentációnál nincs szükség oxigénre, míg aerob

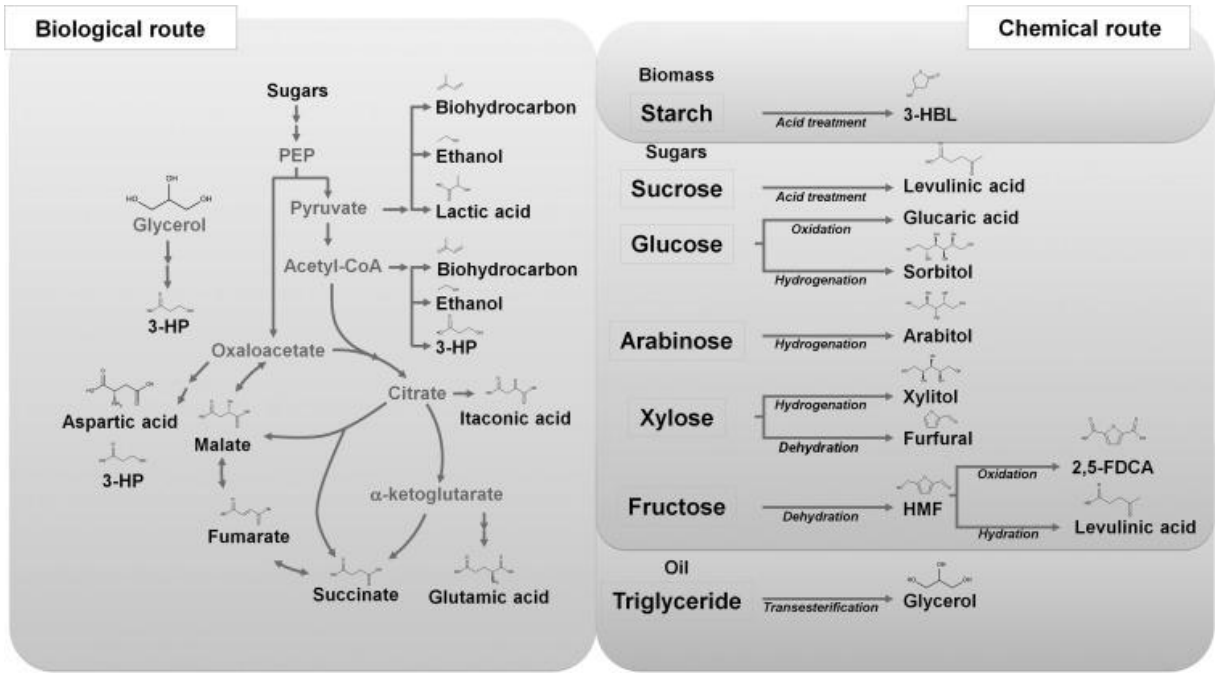
fermentációhoz elengedhetetlen, itt azonban különböző technikák között válogathatunk az oxigén beoldódási fokának függvényében.

3. A bioreaktorban lejátszódó folyamatok műszeres kontrollja: a kontroll rendszer feltétlen elemei a változó, a szenzor a jelátalakító valamint a szabályozó. A szabályozás történhet manuális, automatizált illetve kombinált vezérléssel. Szabályozást a következő esetekben alkalmazunk int például a habzás gátlása, nyomás kiegyenlítése, oxigénellátás pótlása,keverés optimalizálása, fermentlé kémhatásának szabályozása, szubsztrátum pótlása stb.

4. Termék kinyerés a reaktorból: feltételei a különböző kritériumok mint termék tervezett felhasználása, termék tisztasága, termék ára, kinyerési technológia kiválasztása. Extracelluláris termékek kinyerésének szakaszai szűrés, centrifugálás, mikrobasejtek aggregációja, flokkulációja, termék kicsapása. Intracelulláris termék kinyerés szakaszai sejtfeltárás, elsődleges tisztitás, másodlags tisztítás(adszoprció, kromatográfiás módszerek) [19].



4.ábra. Alkalmazható biorektor típusok.(http://slideplayer.hu/slide/2194963/)



5.ábra.Biological and chemical routes for the production of the 2004 US DOE's top 12 chemicals [20] and the revised 2010 top 10 chemicals from biomass. [20]

Az 5. ábra az Egyesült Államok Energiaügyi Minisztériuma által kiválasztott biomasszából előállítható legfontosabb 12 kémiai anyagát szemlélteti. Ezek az anyagok mikrobiális erjesztéssel és egyszerű kémiai eljárásokkal is előállíthatóak. Az ábra szemlélteti a biológiai útvonalakon termelődő vegyi anyagokat valamint a kémiai vegyi anyag átalakításokat.

A kőolaj alapú iparágak az általuk okozott számos problémából adódóan mint például az klimaváltozás próbálnak figyelmet szentelni a biodiverzitás megteremtésében. Ezen belül a biofinomítás egyik legfontosabb célja hogy a kőolaj alapú finomítok folyamatait lecserélhessék olyan folyamatokra amelyekkel csökkenthetik mindazon problémáikból adódó kárt amellyel nap mint nap szembe kell nézniük, ezért próbálnak mesterséges mikroorganizmusokat alkalmazni, egyre elterjedtebben. Vagyis a mikrobiális gazdaszervezeteknek olyan szintű fejlesztése anyagcseremérnökségi technikákkal amellyel számos iparilag hasznos metabolitot, tüzelőanyagok túltermelését és megújuló biomasszát eredményez. Az anyagcseremérnökségi technikák a szintetikus és evolúciós biológiával karöltve számos hasznos stratégiát dolgozott ki amellyel maximalizálják a termelési hozamot valamit a termelékenységet és eközben minimalizálják a folyamatban levő teljes működési költséget [15].

Ezek a műveletek magukba foglalják mindazon tevékenységeket amelyek feltételei a folyamatnak, ilyenek például a termelő gazdatörzsek kifejlesztése, szubsztrátok előkezelése

valamint a hatékony nyersanyag feldolgozás és a termék kinyerési műveletek hatékonyságának növelése [20].

1.4. Anyagcsere módszerei

1.4.1. Géntechnológiák, Génbeviteli módszerek, heterológ gének alkalmazása

Gének helyettesítését mikroorganizmusokban számos technikával lehet elérni, a legegyszerűbb eljárások közé sorolható a homológ rekombinációs technológia is, aminek lényege hogy a homológ DNS-darabok rekombinációja során egyesítenek két különböző DNS darabot. A homológ rekombinációs rendszerek kiválóan alkalmazható bakteriális gének eliminálására, inszerciojára. Azonban ezeknek a beavatkozásoknak elengedhetetlen feltétele a plazmidok illetve fág rendszerek felhasználása. A homológ rekombináció a mikroorganizmusok törzsfejlődésén túlmenően a legfontosabb szerepe a DNS károsodásának javítása. E.coliban a rekombináció függ a baktéiumsejt RecA fehérjéjétől. Ez a fehérje képes DNS –fehérje filametumokat képezni amelyek képesek más DNS molekulákat keresni homológiájuk alapján, ezután párt tudnak cserélni. A RecA fehérje feltétele a RecBCD és Rec F rekombinációs rendszereknek [21].

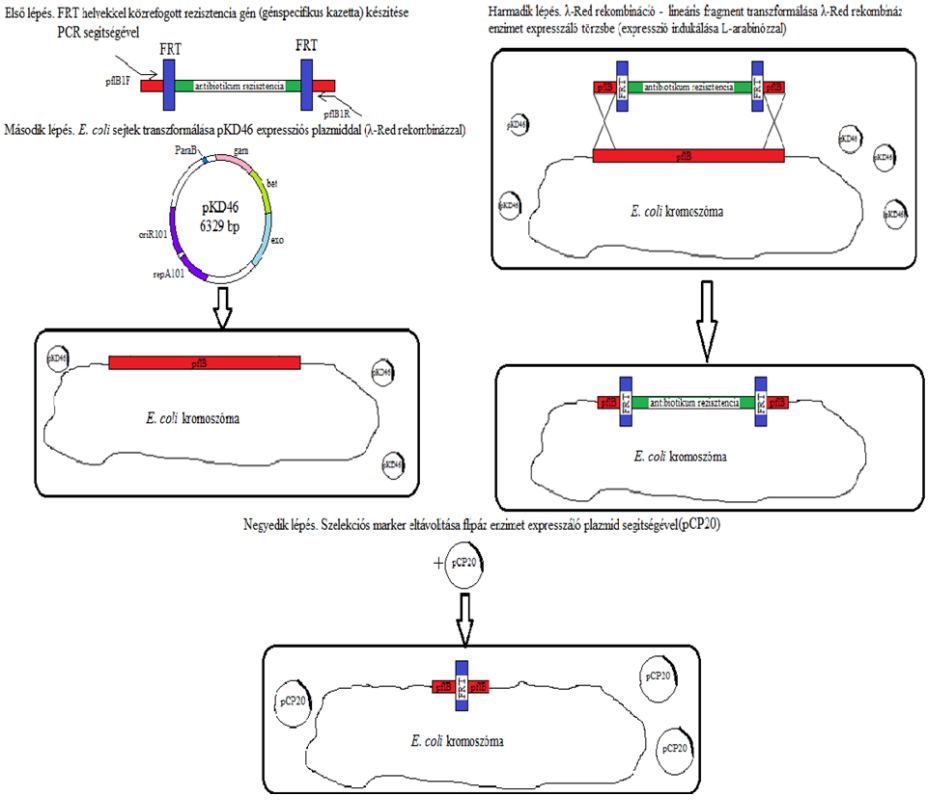
Az utóbbi évek legújabb vívmányai közé tartoznak a DNS hibajavításon alapúló módszerek közül a cink-ujjas és TALEN nukleázok,valamint a génműködés RNS alapú szabályozását megvalósító módszerek mint CRISP/Cas9 rendszer (7.ábra)

1.4.1.1. λ Red rekombináz rendszer

Bakteriális genomok célzott módosítására a leggyakrabban alkalmazott homológ rekombinációs módszer során a kromoszóma egy régiója a bevitt idegen DNS szakaszra cserélődik, a λ-Red rekombináz rendszer enzimeinek segítségével [22]. Az eljárás során az elimiálni kívánt gén helyére egy génspecifikus kazettát transzformálnak. A kazetta feltételei hogy tartalmazza a bevitt genetikai információt, ami legtöbb esetben antibiotikum rezisztencia-szelekciós gén, a következő feltétele egy pomoter amely a gazdaszervezetben gondoskodik a gén kifejeződéséről, és nem utolsó sorban egy 40-50 bázispár hosszúságú nukleotid szakasz amely homologiát mutat a kicserélni kívánt gén határoló régióival(6.ábra).

Az λ-Red rekombináz rendszer enzimjei közül a Gamma gátolja a RecBCD valamint a SbcCD nukleázok aktivitását. Ezek a nukleázok normális körülmények között a bevezetett lineáris DNS-t lebontják. A lineáris DNS lehet kétszálú(dsDNS) valamint rövid egyszálú(ssDNS). Az Exo fehérje egy exonukleáz a lineáris duplaszálú DNS-t dolgozza fel. A

dsDNS-hez kötődve lebontja 5->3 irányba. A Beta fehérje az ssDNS-ekhez kötődve megvédi őket a degradációtól [23].

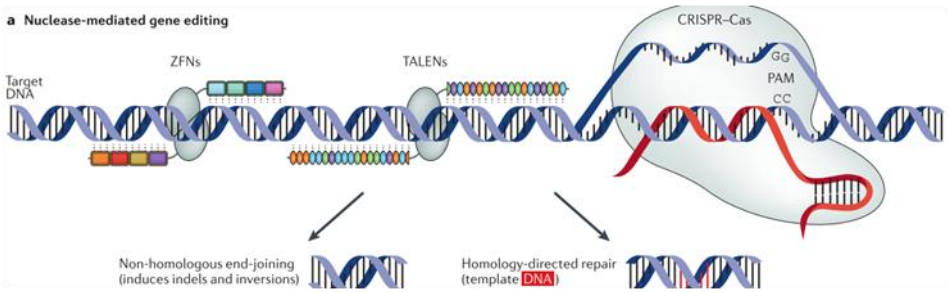


6.ábra.Génkiütés lépései λ-Red rekombinációs rendszerrel [34]

1.4.1.2. CRISPR/*Cas* rendszer

A genomikai módosításokban fontos a nukleáz-alapú genomszerkesztés CRISPR / Cas9 rendszere, valamint a transzkripciós szabályozás megalapítása. A CRISPR rendszer megtalálható a baktériumfajok mintegy 40%ban, valamint az ősbaktériumok többségében, fiziológiás szerepe az idegen DNS molekulák felismerésében és lebontásában áll. A CRISPR helyek rövid ismétlődő palindróm szekvenciákból állnak, amelyeket a fág vagy más mobilis genetikai elemekkel homológ szekvenciák határolnak. A CRISPR lókuszok átírása egy prekurzor CRISPR RNS formájában történik, amelyet érett formává alakítanak a Cas fehérjék, illetve az RNáz III. Az érett crRNS molekula specifikusan kötődik a célszekvenciához (fág vagy transzpozon szekvencia), és a Cas nukleázok aktiválásával bontják azt. A legjobban tanulmányozott rendszer része a Cas9 nukleáz, amely működéséhez két típusú RNS molekula szükséges, ezeket a genommérnökségi eljárásokban egy kis irányító RNS szekvencia (sr-small guide-RNA) helyettesíti. Ezen rendszert sikerrel alkalmazták *Streptococcus pneumoniae* és *E. coli* fajok esetében [3]. A Cas9 gén mechanizmusától és gén tartalmától függően három tipusú

rendszert ismerünk [24]. A rendszerben sgRNS-t alkalmazunk a Cas9 fehérje irányítására A Cas9 elsődleges feladataként nukleázként működik, endonukleáz doméneken keresztül hasítja a DNS-kettős szálát 'DNS törések'-et létrehozva. A CRISP/Cas9 rendszer egyidejüleg egy Cas9 fehérjével vagy több sgRNS-el több genomi szekvenciát is megcélozhat, ezáltal a rendszer komplex genom szerkesztésére is képes lehet (7.ábra) [25].



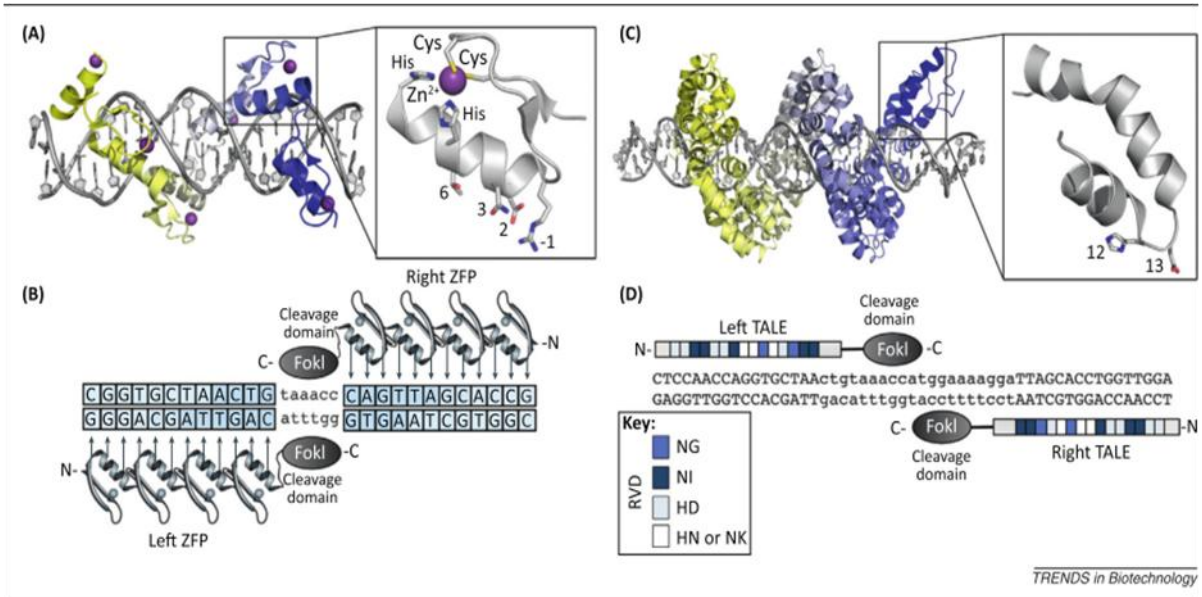
7. ábra. Genommódosítási módszerek(ZFN, TALENs, CRISPR-Cas) mechanizmusa [32]

A CRISPR (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats)-Cas9 rendszerhez nem szükséges fehérjemérnökség, és alkalmazása csak egy rövid, génspecifikus irányító RNS molekula szintézisét feltételezi.

Cink-ujj nukleázok (ZFN)és transzkripciós aktivtor-szerű effektor nukleázok (TALEs)

A ZFN és TALEN-ek szekvencia specifikus DNS modulokból állnak, amelyek specifikus genomiális helyeken végeznek javításokat. DNS kötő doménjüknek szerkesztési lehetősége biztosítja hogy bármilyen szekvenciát felismerhessenek. Ezek a modulok számos effektor doménnel kombinálhatóak(nukleázok, represszorok, transzkripcios aktivátorok, hiszton acetil transzferázok), ezáltal befolyásolhatják a genom funkcióját-szerkezetét. A TALEs fehérjék a Xanthomonas növényi patogénből származnak, amelyek 33-35 ismétlődő aminosavból álló DNS kötő doméneket tartalmaznak, amelyből mindegyik egy bázispárt ismer fel. A folyamatos DNS szekvenciák felismeréséhez a TALEs fehérjék összekapcsolódnak. Egyetlen feltételük hogy kötőhelyük timin bázissal kezdődjön. A Cys2-His2 cink-ujj domén eukariotákban is megtalálható, emberben a második leggyakoribb fehérje domén. ZFN-ek felépítése lehetőséget adott egyedi DNS-kötőfehérjék kialakításához.

Az alábbi 8.ábrán láthatjuk a cink-ujj és transzkripcós aktivátor szerű fehérjék szerkezetét. Az A ábra mutatja a szerkesztett cink-ujj fehérje komplexet a DNS-el, az ábrán látható 1,2,3, felszini oldalláncok kapcsolatba kerülnek a DNS-el. A B ábrán a cink-ujj fehérje DNS hez kötött dimerje látható, ahol a két cink –ujj kötőhelyet FokI hasítási tartománnyal választanak el. A C ábrán a TALEs fehérje és DNS komplexet láthatjuk. A specifikus TALEs ismétlések a hipervariábilis aminosavaikon keresztül ismerik fel a bázispárokat. A D ábrán a DNS-hez kötött TALEs nukleáz láthaó, valamint itt is a TALEN kötőhelyek egy távtartó szekvenciával elvannak választva eyástól így ezek specifikusan tervezett TALE-k felismerhetik az egyedülálló jobb vagy baloldalt [26].



8.ábra. Egyedi ZFN és TALEN nukleázok DNS módosítási sémája [26]

1.5. Az 1,4-butándiol előállítása

Az 1,4-butándiol termelés felhasználásának elterjedése következtében megközelítőleg évente petrolkémiai eljárással 1,3 millió tonnát termelnek. Számos környezeti probléma és fosszilis források korlátozása közrejátszott a bió-alapú BDO gyártásához.
Eddigi tudásunk szerint az 1,4-butándiolt egy természetben megtalálható élőlény sem képes előállítani. Számos módosított E. coli törzset fejlesztettek ki a butándiol termelésére, termelésének fokozására [22].

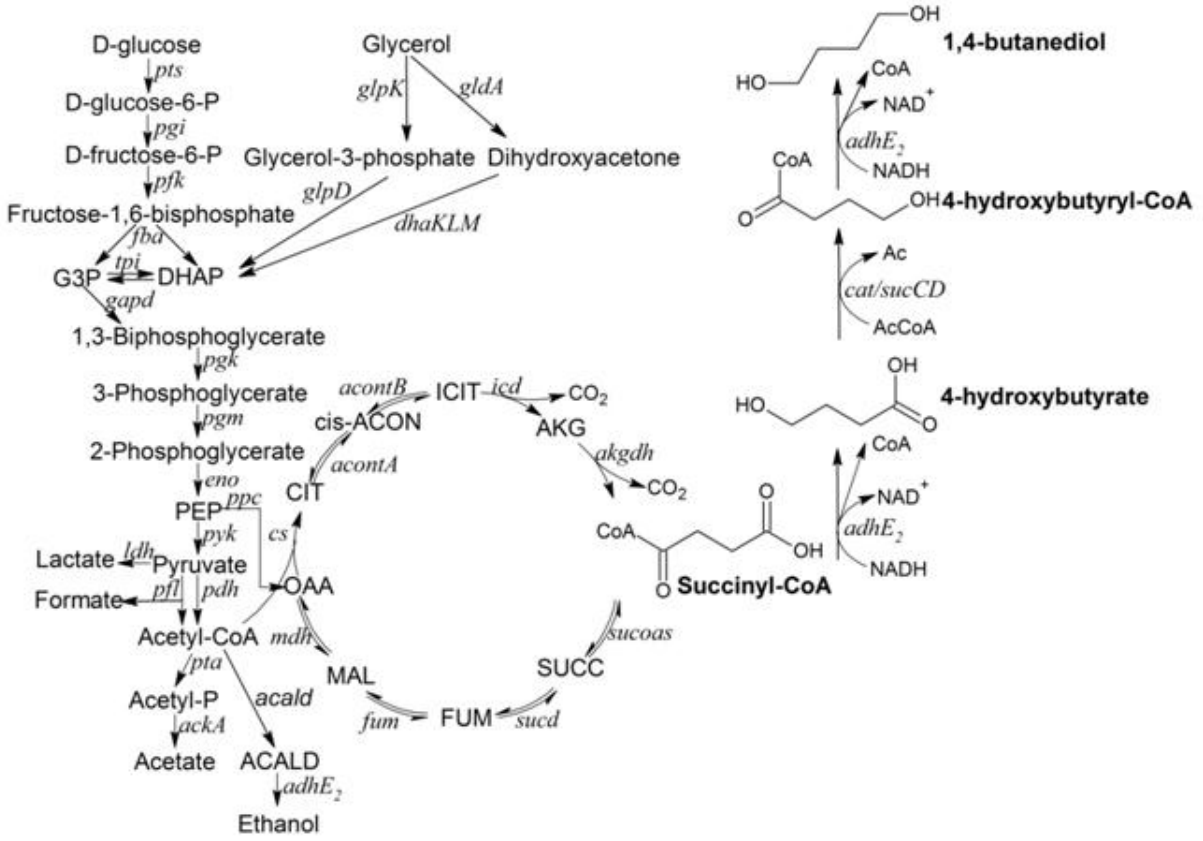
Azok a enzimek, amelyek elsősorban a BDO termeléshez vezető fluxusokat szabályozzák, a központi glikolízis, a trikarbonsav (TCA) ciklus ágának és az új BDO

előállítási útvonalnak szerves részét képezik [9]. Korábban bebizonyosodott hogy E.coli YSB11 törzsébe négy gén bevitelével fokozható a BDO termelése,a citrát ciklus során termelődött köztes metabolitból a szukcinil CoA-ból kiindulva, a *Porphyromonas gingivalis* génjeinek transzformálásával a *sucD* gén által kódolt szukcinát szemialdehid dehirogenáz átkonvertálja a *4hbd* (4 hidroxi butirát dehidrognáz)-al 4 hidroxi-butirátra, ezt követően a *cat2* (4 hidroxi-butirát CoA transzferáz) gén biztosítja a 4 hidroxi butirát CoA képződését. Valamint a *Clostridium beijerinckii* –ből származó *adh* (alkohol dehidrogenáz) génnel elérték a 4 hidroxi butirát CoA átalakítsást 1,4-butándiollá. Azonban ez a módszer sem fokozta az 1,4-butándiol túlzott termelését. Tovább optimalizálva a bioszintetikus útvonalat a Corinebacterium glutaimicum *kgd* gén beépítésével tudták növelni az alfa-ketoglutarát szukcinil szemialdehiddé konvertálásával a 4 hidroxi butiril fele vezető fluxust. További optimlizálásként a *Cl. beijerinckii adh* gén helyett alkalmazták a nagyobb aktivitású *Cl. saccharoperbutylacetonicum* mutáns *bld* génjét. . Ezeket a géneket a megfelelő promoterek segítségébel juttaták be a gazdaszervezetbe így biztosítva a gének kifejeződését, indukálással [27].

Az alábbi (9,10.) ábrákon láthatjuk a glicerin és a glükóz metabolzimusát,az 1,4-butándiól termelésének útvonalát. Miklóssy és mtsai. (2016) létrehoztak egy olyan *E. coli* baktériumtörzset génmérnökségi és metabolikus mérnökségi módszerek segítségével, amely alkalmas 1,4-butándiol bioszintézisére. A bevitt heterológ gének segítségével a Szentgyörgyi-Krebs ciklus szukcinil-koenzimA köztitermékéből kiindulva 1,4-butándiol állítható elő egy háromlépéses reakciósorral. *In silico* módszerekkel azonosították azokat az útvonalakat, mely gének eliminációjával a szénfluxus az 1,4-butándiol bioszintézise felé irányítódik át: tejsavtermelés leállítása az *ldhA* delécójával, hangyasavtermelés leállítása a *pflB* delécójával. A vizsgált bioszintetikus folyamat a modern anyagcseremérnökség módszereivel előállított, rekombináns *E. coli* törzsön alapszik, amely fenntartható nyersanyagokból (glükózból/glicerinből) az 1,4-butándiol termelésére alkalmas heterológ útvonalat tartalmaz.

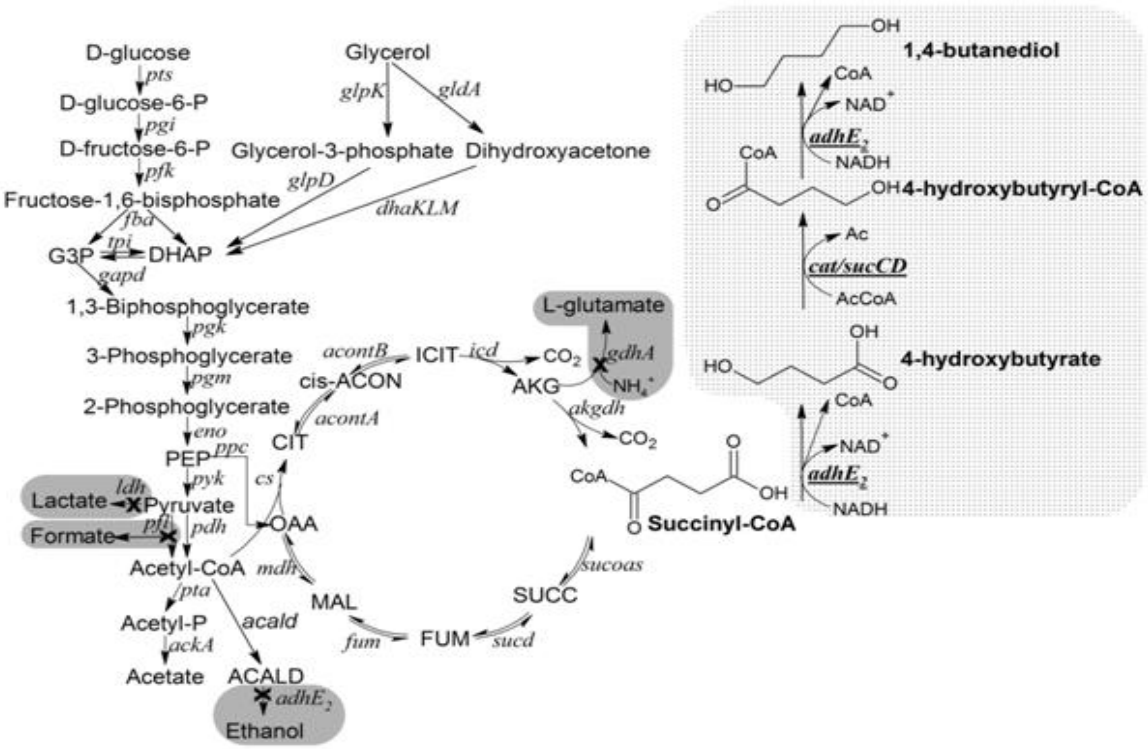
A termelő törzsek további metabolikus optimalizálása, valamint a létrehozott törzsek tenyésztési körülményeinek, valamint bizonyos gének expressziós szintjének vizsgálata kiemelten fontos elsősorban egy iparilag hasznosítható 1,4-butándiol termelő *E. coli* törzs létrehozása szempontjából. A 10. ábrán ezen útvonal optimalizálását követhető nyomon, a felsorolt gének eliminálálásával, illetve heterológ gének(bioszintetikus útvonalak) alkalmazásával Emellett a törzsek mélyebb fiziológiai és metabolomikai vizsgálata azért fontos mivel a mai napig nincsenek megfelelő ismereteink arról, hogy a génmanipuláció során (gének bevitele, törlése, csendesítése, erősítése) a különböző gének expressziós profilja

hogyan változik, illetve hogy e változások miként módosíthatják a teljes anyagcsere-hálózatot [14].



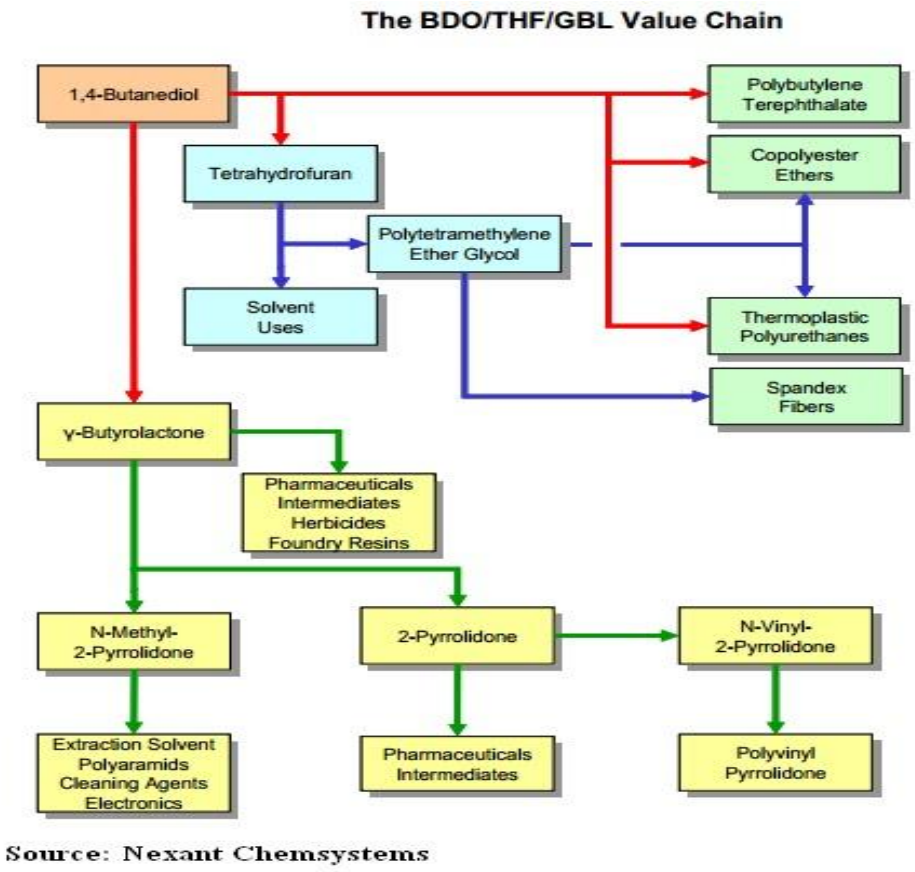
9.ábra. Glükóz és glicerin szubsztrát metabolizmusa az 1,4-butándiol termelés útvonala [14]

A 9. ábrán látható a glükóz illetve glicerin szubsztrát metabolizmusa és a lehetséges metabolit termelési útvonalak, az ábráról jól látható hogy az 1,4-butándiól termelésének lehetséges bioszintetikus útvonalát a citrát ciklus köztes termékéből kiindulva a szukcinil-KoA-ból a 4-hydroxibutiráton, valamint a 4- hydroxibutiril –KoA en keresztül kapható meg, különböző heterológ gének feltételével. Azonban az is látható hogy a tejsav, hangyasav, etanol termelés elsődleges. Ennek függvényében az alábbi 10.ábrán látható ezen útvonalak gátlása, hogy a szén fluxus iránya az 1,4-butándiol termelés fele optimalizálódjon. A következő gének eliminálásával mint a laktát dehidrogenáz -*ldh* (tejsav szintézis gátlása) piruvát formát liáz-*pfl* (hangyasav termelés gátlása, a NADH specifikus glutamát dehidrogenáz génjét-*gdhA* (L-glutaminsav termelését gátolva) valamint az alkohol dehidrogenáz gén-*adhE* (etanol termelés gátlása). Heterolog géneket alkalmazva mint szukcinil-KoA-t, alkohol dehidrogenáz-t



10.ábra. Optimalizált 1,4-bután̈diol termelés [14]

A konkrét metabolit túltermelésekor fel kell tenni a legfontosabb kérdést, hogy milyen metabolikus útvonalakat kell használnunk? Ez a kérdés maga után vonja a megoldáshoz elengedhetetlen kérdés sorozatot, miszerint a reakció megtörténik-e termodinamikailag kedvező biológiai körülmények között-, a közbenső metabolitok toxikusak-e a sejt számára-, a konverzióhoz szükséges enzimek expresszálódnak-e a gazdaszervezetben? Az útvonal tervezésre és fluxusoptimalizálásra mára már számos kutatás ad választ,amelyeknek alapjait a következőkben felsoroltak mint, az anyagcseremérnökség tudásának alapját képző módszerek, a metabolikus hálozatok topográfiája, kinetikája szabályozása, fluxus meghatározása, mellékreakciók eltávolítása, megfelelő gének eliminálása, keletkező metabolitok mérése, adják.[2] A 11.ábrán az 1,4 bután̈diol további felhasználási útvonalai láthatóak.



11.ábra. 1,4-bután̈diol további felhasználási útvonalai [33]

Az 1,4 bután̈diol felhasználási útvonalait a 11. ábra mutatja be, elsődleges útvonalai a tetrahidrofurán, a polibutilén tereftalát, valamint a gamma butirolakton vegyületek előállításának irányába mutat. A gamma butirolaktont használják táplálékkiegészítőkben zsírégetőként, altatóként és olykor alkohol- függő emberek kezelésében.A tetrahidrofuránt főként oldószerként használják, Jól oldja a PVC-t, a kaucsukot, a polisztirolt, a cellulózésztereket. Jó öldószerképességével alkalmas élelmiszercsomagolások újrahasznosításában.

1.6. Transzkriptomikai eredmények alkalmazása anyagcseremérnökségben

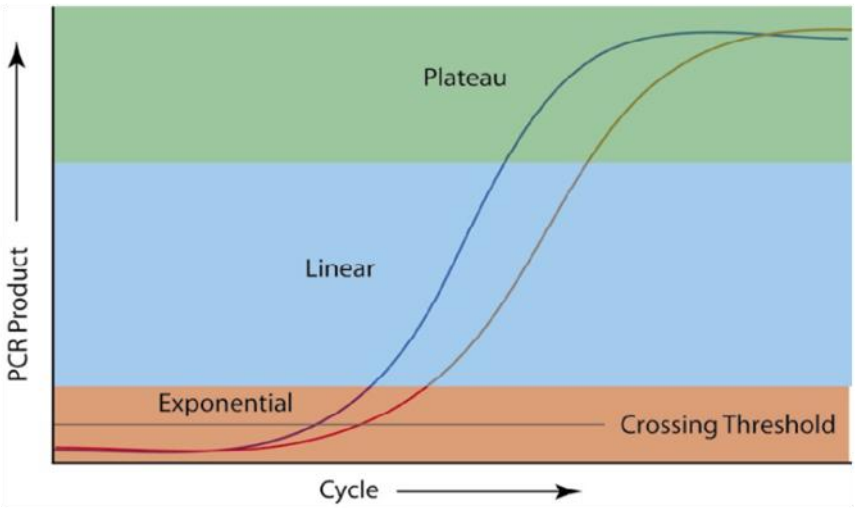
1.6.1. Metabolikus útvonalak vizsgálatának lehetőségei, transzkriptom elemzés

Bizonyos mikrobiológiai laboratóriumokban még mindig hagyományos technikákon alapuló módszerekkel, protokolokkal dolgoznak, ezekkel a módszerekkel végzik a bakteriális izolátum azonosítását is. Mára már számos olyan módszer létezik amely ezen módszereket felülírja, költséghatékonyságuk szempontjából valamint bonyolult és időigényes vizsgálataik miatt is [28]. A bioszintetikus útvonalak tervezése, gazdaszervezetbe juttatása közben számos

olyan anyagcsere technikai módszer látott napvilágot amelyekkel a rendelkezésre álló transzkriptomikákat, metabolomikákat, proteomikákat lehet vizsgálni, és elemezni [9].

Fontos a génexpresszió profilelemzése mindazon heterológ útvonalakat tartalmazó, baktérium populációknak amelyek nem természetes metabolitokat termelő törzsek fejlesztése céljából lettek előállítva anyagcseremérnökségi technológiával. A transzkripciós szinten végzett elemzések hozzájárulnak iparban alkalmazandó törzsek továbbbi optimalizálására (termelési hozam javítása, tenyésztési körülmények optimalizálása) a szabályozó génekben illteve anyagcseretermelés génjeinek változásának minőségi mennyiségi mérése által [29].

A génexpresszió mértékének mennyiségi vizsgálatára az RT(valós idejű)-qPCR(kvantitativ polimeráz láncreakció)-el lehetőség nyílik.. A fluoreszcencia alapú RT-qPCR módszerben használatos SYBR Green interkaláló festék a PCR során az RNS molekula primer közvetített replikációját követően kapcsolódik a termékhez, ezáltal kibocsájtva a fluoreszcens jelet, amelyet a műszer detektál a reakciók során. Az interkaláló festékek előnye hogy viszonylag olcsóak,és a legfontosabb, hogy nem szekvencia specifikusak. Azonban ennek hátránya hogy megkülönböztetés nélkül betudnak kötődni minden olyan helyre ahol kettős szálú DNS van, ezáltal primer dimereket létrehozva. A jel erőssége, mennyisége függ a keletkező termék tömegétől [30].



12.ábra. Amplifikációs görbe [30]

A fenti 12.ábrán látható amplifikációs görbének általánosan három szakasza van, az első exponenciális szakasz amikor a termék mennyisége még kicsi, az enzim és a reagensek nem korlátozzák, viszont azért lehet nehezen kimutatni mert kevés a termék. A második a lineáris szakasz , itt a termék mennyisége fokozatosan halmozódik, ellenben a reagensek

korlátozódnak, valamint a plató szakaszban megáll a termékképzés, mivel a reakció kimerül [30].

Az elemzések lehetnek abszolút vagy relatív értékek. Abszolút értékek alatt értjük egy adott RNS mintának darabszámát mintánként, valamint a relatív értékek azok amelyek megmutathatják h A minta mennyi RNS-t tartalmaz B mintához képest.

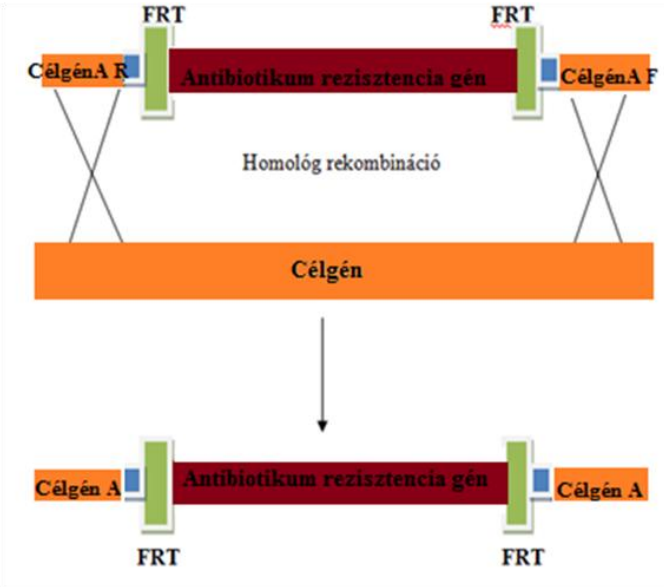
2. Anyag és módszer

2.1. *E. coli* K12 MG16D3(DE3) mutáns törzsek létrehozása

Miklóssy és mtsai. (2016) létrehoztak egy olyan *E. coli* baktériumtörzset génmérnökségi és metabolikus mérnökségi módszerek segítségével, olyan gének eliminációjával amelyekkel a szénfluxus az 1,4-butándiol bioszintézise felé irányítódik át: az *ldhA* gén deléciójával leáltották a tejsav termelést míg a *pflB* gén deléciójával a hangyasav termelését. Kutatásom során a kettős génkiütött E. Coli K12 MG14D2(DE3) törzs genomjából λ-Red rekombináció módszerével helyettesítettük az alkohol dehidrogenáz gént, a céltermék hozamának növelése érdekében valamint a már létrehozott bioszintetikus útvonallal versengő etanol termelő anyagcsereút visszaszorítása céljából.

2.1.2. Génspecifikus kazetta elkészítése polimeráz láncreakcióval (PCR)

A mutáns törzs létrehozásának első lépését az alkohol-dehidrogenáz génre specifikus kazetta elkészítése jelentette, polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával. Ahol DNS templátként a két flipáz rekombináz felismerő szekvencájú szakaszok (FRT) által közrefogott kloramfenikol rezisztencia gént tartalmazó pKD3-as plazmidot alkalmaztuk(10.ábra). A plazmidok extrakromoszomális cirkuláris DNS molekulák, amelyek a sejt replikációjától függetlenül is képesek replikálódni. Ebből a tulajdonságukból adódóan expressziós vektorként való alkalmazásuk elterjedt a génmérnökségi kutatásokban, szelekciós marker génjeiknek köszönhetően megkönyítik a plazmidot tartalmazó illetve nem tartalmazó sejtek szelektálását.



13.ábra. . PCR-el amplifikált, génspecifikus antibiotikum rezisztencia kazetta és a célgén megszakításának szemléltetése homológ rekombinációval. [34]

A génspecifikus kazetta elkészítéséhez alkalmazott primerek forward (adhE1) és reverz (adhE2) az *E. coli adhe2* genomi régiójával, valamint a pKD3-al homológ szekvenciákat tartalmaznak (11. táblázat)

1. táblázat A génspecifikus kazetta elkészítéséhez használt primerek szekvenciája

Primer	Szekvencia
adhE1	5’ATAATCACGACCGTAGTAGGTATCCAGCAGAAT CTGTTTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3’
adhE2	5’CGAGCAGATGATTTACTAAAAAAGTTTAACATT ATCAGGAGAGCATGGGAATTAGCCATGGTCC-3’



14.ábra. Polimeráz láncreakcót végző készülék

A génspecifikus kazetta elkészítéséhez használt PCR reakciót SureCycler 8800 (Agilent Genomics) készülékkel valósítottuk meg(14 ábra).

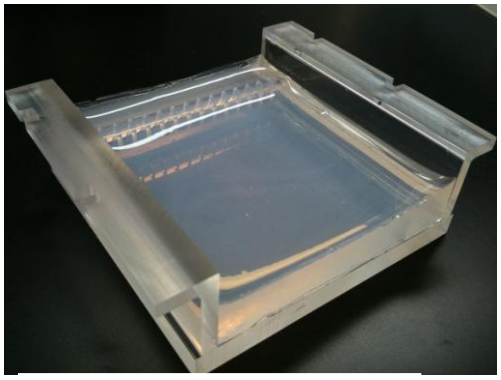
A PCR során használt program paramétereit, illetve a reakció komponenseit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat PCR program paraméterei, reakció komponensek a génspecifikus kazetta elkészítéséhez

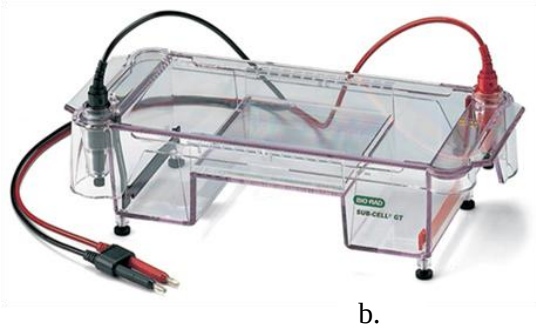
Ciklusszám	Hőmérséklet	Idő	Reakció összetétel	
1x	95ºC	5 perc	10x Pfu puffer	5 µL
35x	95ºC	0,5 perc	10 mM dNTP	2 µL
	62ºC	0,5 perc	10 mM adhE1 primer	2 µL
	72ºC	2 perc	10 mM adhE2 primer	2 µL
1x	72ºC	7 perc	Templát DNS (pKD3)	1 µL
			Pfu polimeráz enzim	1 µL
			ultratiszta víz	37 µL

A PCR termék ellenőrzését agaróz gélelektroforézissel valósítottuk meg. Az 1%-os agaróz gél elkészítése: kimértünk 0,5 g agarózt amit 250 ml-es üveglombikban 50 ml 1×TAE-oldattal töltöttünk fel, ezt követően mikrohullámú sütőben melegítettük az oldatot az agaróz feloldódásáig. Majd hozzáadtunk 3 µl Red-Safe festéket és a gélöntő kádba öntöttük, amelybe beleraktuk a zsebek kialakításához szükséges fésűt.

Kis idő elteltével a gél megdermedt (kialakult a térhálós szerkezete) vigyázva a zsebekre, kivettük a fésűt a gélből, és az elektroforézis tankba helyeztük. A tankot is előzőleg feltöltöttük 1×TAE-oldattal. A zsebekbe a mintákat az általunk megszabott sorrendben vittük fel, a követező mennyiségekben: 5 µl PCR termék + 1 µl 6X mintafelvivő festék (6x Loading Dye, Thermo). Az elektroforézis 90 V-on 25-30 percig tartott. A gél térhálos szerkezetéből adódóan a DNS fragmentumok nagyságuk függvényében haladnak a gélben, a nagy fragmentumok kisebb utat míg a kisebb fragmentumok nagyobb utat képesek megtenni ugyanannyi időintervallum alatt így lehetőségünk nyílik a különböző fragmentumok méret szerinti ellenőrzésére. A gélben méret szerint elválasztott DNS fragmentumokat-t UV fénnyel detektáltuk, egy erre alkalmas készülék alkalmazásával (15.ábra).

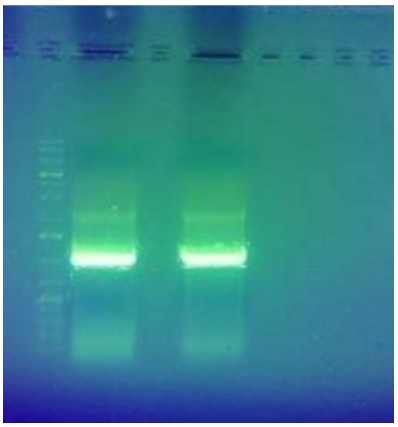


a.



b.

1kb DNS létra | 1 minta | 2 minta



c.

a. gélöntőkádban elkészült gél, kialakított zsebekkel
b. elektroforézis tank
c. DNS fragmentumok UV fény megvilágítása alatt

15.ábra. Agaróz gélelektroforézis előkészítési,ellenőrzési szakaszai

A sikeres ellenőrzést követően a génspecifikus kazettának megfelelő méretű PCR terméket gélből izoláltuk GeneJET Gel Extraction Kittel (Thermo Scientific). A gélből izolálást követően a PCR terméket *DpnI* restrikciós enzimmel emésztettük, amelynek célja a templát (pKD3) DNS hasítása.

A reakcióelegy összetétele:

- 3,5 µl 1x Tango puffer
- 30 µl tisztított PCR termék
- 1 µl *DpnI* (10 U/µl)
- 0,5 µl steril desztillált víz.

A reakcióelegyet 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően az enzim inaktiválását a 80°C-on 20 percig tartó inkubálással értük el, majd a DNS-t 2,5 térfogat jéghideg abszolút

etanollal kicsaptuk. A kicsapott DNS-t 1 ml jéghideg 70%-os etanollal mostuk, majd lecentrifugáltuk és szárítottuk, ezután a pelletet felszuszpendáltuk 15 µl desztillált vízzel.

2.1.3. Kémiai kompetens sejtek készítése és transzformálása pKD46-al

Az *E. coli* K12 MG14D2(DE3)-es törzset tettük kompetensé. Első lépésben az összemért és sterilezett 5 ml Luria Bertani (LB: 1000 ml-re: 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 5 g NaCl, pH 7.5) oldatban 1-1 telepből kiindulva egy éjszakán át inkubáltuk a kulturánkat. Másnap reggel az éjszakai előnevelésből átoltottunk 150 ml LB táplevesbe, amit 37°C-on inkubáltuk 250 rpm-en ,OD_{600nm} = 0,4 - 0,5 értékig. A sejtsűrűség követését Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotométerrel végeztük.(16.ábra)



16. ábra.A Varian Cary 50 Bio UV-Vis Spektrofotométer

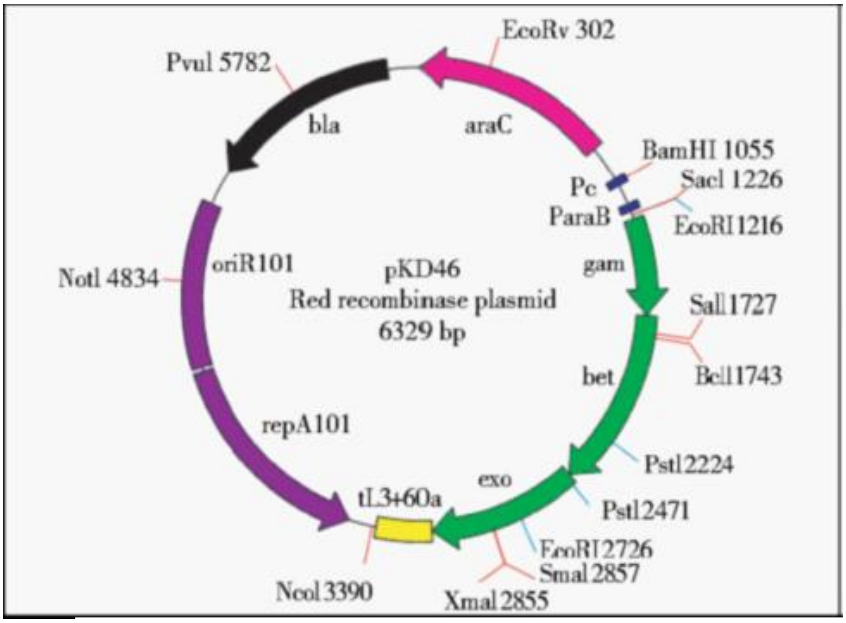
Ezt követő lépések a következők:

1. a sejtkultúra 20 percig jégen inkubálása
2. 10 percig centrifugálás 5000 rpm-en 4°C-on.
3. felülúszó leöntése,sejtek szuszpendálása és 10 ml jéghideg, steril 100 mM-os $CaCl_2$-oldatban
4. 10 percig centrifugálás, 5000 rpm, 4°C-on
5. felülúszó leöntése és a sejtek szuszpendálása 2 ml jéghideg, 100 mM-os $CaCl_2$-oldatban

Ha hosszabb ideig akarjuk tárolni akkor a kompetens sejtekhez 200 µL 80%-os steril glicerint adtunk, és 100 µl-ként 1,5 ml-es mikrocentrifúga tubusokba szétosztjuk, majd -80°C-on tároltuk a felhasználásig.

A red rekombináz rendszer génjeit tartalmazó pKD46-os plazmidot a kémiai kompetens *E. coli* kultúrákba hősokk segítségével juttattuk be. A sejtmembránt felépítő lipidek szénhidrogén láncai hőmérséklet növelés hatására átereszthetővé válnak. A pKD46 hőmérséklet-érzékeny replikációt és ampicillin rezisztenciát mutat, és a lambda fág 2154 nukleotid (nt) hosszúságú DNS fragmensét tartalmazza, amely a Red homológ rekombinációs

rendszer Red rekombinázt kódoló géneket (beta, gam és exo) tartalmazza, P_{araB} promoter szabályozása alatt (17.ábra). A transzformáláshoz a frissen készített 100 µl kémiai kompetens *E. coli* sejtekhez hozzáadtunk 1 µl pKD46 hőrezisztens plazmidot.



17.ábra. pKD46 plazmid térkép
(http://2012.igem.org/Team:Nanjing_China_Bio/method)

Ezután 20 percen át jégen tartottuk, majd 1 percre 42°C-ra termoblokkba helyeztük (hősokk),továbbá ismét jégre tettük. Ezt követően hozzáadtunk 900 µl LB táplevest, amellyel egy órát inkubáltuk 37°C-on rázatva. Végül a transzformálási elegyből 100 µl-ert ampicilin tartalmú LB táptalajra szélesztettünk és 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

2.1.4. Elektrokompetens sejtek készítése és elektroporálás

A pKD46 plazmidot sikeresen felvevő *E. coli* K12 MG14D2(DE3) sejteket tettük ezzel a módszerrel kompetensé. Egy *E. coli* K12 + pKD46 teleppel beoltottunk 5 ml LB-tápoldatot,ezúton a tápoldathoz ampicilint adagoltunk(100 µl/ml), hiszen a plazmid tartalmú sejtek megszerezték az ampicilin rezisztenciát, és így tovább fokozzuk a fertőzésveszély kizárázát.,majd 30°C-on egy éjszakán át neveltük 250 rpm-el. A következő lépésben az inokulumunkat átoltottuk 100 ml végtérfogatban LB-ampicillin tartalmú tápoldattal, és 30°C-on tovább inkubáltuk OD_{600}=0,6 eléréséig. Annak érdekében, hogy a Red rekombináz gének kifejeződjenek a sejteket 2,5 ml 1 M arabinózzal indukáltuk. Ezt követő lépéssorozatok:

1. 10 percig jégen inkubáltuk
2. 15 percig 4500 rpm-en 4°C-on centrifugáltuk.
3. a pelletet 100 ml jéghideg, steril 10%-os glicerin oldattal figyelmesen felszuszpendáltuk

4. centrifugáltuk (15 perc 4500 rpm, 4^{o}C)
5. a pelletet 50 ml jéghideg, steril 10%-os glicerin oldatban felszuszpendáltuk
6. centrifugáltuk
7. a pelletet 5 ml steril 10%-os glicerin oldatban szuszpendáltuk
8. és ismét centrifugáltuk
9. végül 0.1 ml jéghideg steril 10%-os glicerin oldatban ügyelve szuszpendáltuk a sejteket, és 50 µl-enként szétosztottuk további tárolási cél szempontjából is .

Az 50 µl elektokompentensé tett sejtszuszpenzióhoz 1 µl általunk elkészített génspecifikus kazettát adtunk, amit 1 percig jégen inkubáltunk, majd a lehűtött elektroporáló küvették aljára pipettáztuk.

Az elektroporáló készülék (Gene Pulser Xcell), menüjéből kiválasztottuk a Pre-Set Protocols menüsort, innen a Bacterial, *E. coli* 2,5 kV, 0,2 cm protokollt (18.ábra). Az elektroporáló küvettát az elektroporáló kamrába helyeztük, és a PULSE gomb megnyomásával C=25 µF, PC=200 ohm, V=2,5 kV paramétereken sokkoltuk a sejteket. Az elektrosokkot követően gyorsan 1 ml steril, szobahőmérsékletű SOC tápoldatban szuszpendáltuk a sejteket, és steril Eppendorfokba pipettáztuk.



18.ábra.A Gene Pulser Xcell elektroporáló készülék egy impulzus generátor,amely kondenzátorokat használ szabályozott, exponenciális elektromos impulzusok előállítására a sejt elektroporálásához. Képes az eukarióta és a prokarióta sejtek transzfekciójára is.

SOC tápoldat elkészítése :100 ml SOB oldathoz : 2 g tripton, 0,5 g élesztőkivonat, 0,2 ml 5 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, desztillált víz 100 ml-ig, pH = 7, autoklávozás (20 percig 121^{o}C-n) 2 ml 1 M glükóz oldatot beleszűrése.

Az elektroporált elegyet 37^{o}C-on 2 órán keresztüli inkubálás követte 250 rpm-en rázatva. Végül a transzformálási mixből és a kontroll reakcióból 100-100 µl-ert szélesztettünk LB táptalajra, amihez előzőleg a táptalaj készítése során ampicilint illetve kloramfenikolt

adagoltunk, ezáltal tudtuk szelektálni mindazokat a sejteket amelyek az ampicilin illetve kloramfenikol rezisztenciát is megszerezték.A szélesztést követően a táptalajokat 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán át a telepek megjelenéséig.

A gének eliminációjának ellenőrzése PCR reakciókkal történt, génspecifikus ellenőrző primerek segítségével(3. táblázat):

3. táblázat Génspecifikus ellenőrző primerek a gének eliminációjának ellenőrzésére

Primer neve	**Szekvencia**
pflB3 **pflB4**	5’-AAATCCACTTAAGAAGGTAGGTG-3’ 5’-TCGTGGAGCCTTTATTGTAC-3’
ldhA3 **ldhA4**	5’- GCACAAAGCGATGATGCTGTAG-3’ 5’- CCGTTCAGTTGAAGGTTGCG-3’
adhE3 **adhE4**	5’-CAAATCATCACCGCACTGAC-3’ 5’-TCCTTAACTGATCGGCATTG-3’

A PCR mixbe templátként egy steril fogpiszkáló segítségével jutattuk bele a transzformált telepeket. A PCR során alkalmazott reakció összetétel valamint az alkalmazott program paraméterei a 4. táblázatban láthatóak.

4. táblázat Alkalmazott PCR programjaés a reakció összetétele

Ciklusszám	Hőmérséklet	Idő
1x	94ºC	5 perc
35x	94ºC	0,25 perc
	40ºC	0,5 perc
	72ºC	2 perc
1x	72ºC	7 perc

Reakció összetétel	
10x Taq puffer	5 µL
$MgCl_2$	4 µL
10 mM dNTP	2 µL
10 mM Forward primer	2 µL
10 mM reverse primer	2 µL
Templát DNS	≈1 µL
Taq polimeráz enzim	0,3 µL

ultratiszta víz	33,7 µL

A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen való elválasztással ellenőriztük. Az agaróz gél készítésének részletezését az előbbiekben (génspecifikus kazetta ellenőrzésénél) tárgyaltuk.

2.1.5. Antibiotikum rezisztencia megszüntetése

Annak függvényében hogy további célkitűzéseinknek eleget tegyünk és különböző heterológ géneket jutassunk a mutáns sejtjeinkbe és azokat szelektálni tudjuk a már meglévő antibiotikum rezisztencia géneket elkell távolítanunk, így a mutáns sejtekből iindulva elektrokompetens sejteket készítettünk, és a sejteket pCP20 hőmérséklet-szenzitív plazmiddal transzformáltuk.

Az elektrokompetens sejtek elkészítését és az elektroporációt az előbbiekben tárgyalt részekben leírtak alapján végeztük. Az elektrosokkot követően hasonlóan a fent leírtakkal 1 ml SOC oldat hozzáadása után, a sejteket 37^{o}C-on inkubáltuk 2-3 órán keresztül rázattuk, majd ampicilin tartalmú táptalajra oltottuk, ezt követően 37^{o}C-on inkubáltuk 14-16 órát. A másnap kifeljődött telepeket antibiotikum nélküli LB-táptalajra oltottuk, és 2 napon keresztül 43°C-on inkubáltuk, hogy elveszítsék a sejtek a pCP20 plazmidot. Ezt követően a 43^{o}C-os lemezekről a telepeket ellenőrzésképpen átoltottuk egy ampicilin, egy kloramfenikol és egy antibiotikum nélküli LB táptalajra. Azokkal a telepekket tekintettük sikeresnek amelyek nem nőttek ki az antibiotikum tartalmú táptalajon, csak az antibiotikum nélkülin.

A továbbiakban az 1,4 butándiol előállításához alkalmas törzsek létrehozásához a fent leírt eljárás alapján elektroporálással jutattuk a pGS1.1, ill pGS2.1 plazmidokat a génkiütött törzsekbe, illetve létrehoztunk egy kontroll törzset is, a pETDuet plazmiddal való transzformálással.(5. táblázat)

5.táblázat Létrehozott törzsek, illetve termelő törzsek jelölése

Törzsek jelölése	Magyarázat
MG16D3	E.coli *Δadh, Δpfl, Δldh,* alkohol dehidrogenáz, piruvát formát liáz, laktát dehidrogenáz, alkohol dehidrogenáz (*pflB, ldhA, adhE*) géneket nem tartalmazó törzs
MG16D3+pETDuet	coexpressziós vektor, T7 promoter, Ampicilin rezisztencia
MG16D3+pGS1.1	pETDuet +adhE(*Clostridium acetobutylicum*)+sucCD (*E.coli*)
MG16D3+pGS2.1	pETDuet+mcr(*Chloroflexus aurantiacus*)+sucCD (*E.coli*)

2.2. Fermentációs kísérletek nagyobb térfogatban

A fermentáció során követtük a négy törzs növekedését nagyobb térfogatban, meghatározott időintervallumokban mintákat vettünk az RT-qPCR vizsgálathoz. A vizsgált törzsek a következők voltak: MG16D3, MG16D3+pETDuet, MG16D3+pGS1.1, MG16D3+pGS2.1. Mind az előneveléseknél mind a fermentációnál a Minimál táplevesben (6.táblázat)két szubsztrátot alkalmaztunk : glükóz (5g/L), glicerin (5g/L). 70 ml Minimál táplevest tartalmazó 150 ml-es lezárható üvegekbe, úgy hogy a kezdeti optikai denzitásuk 600 nm-en 0,3 legyen.

A fermentáció során különböző időpontokban mintát vettünk, amiből optikai denzitást mértünk, illetve totál RNSt izoláltunk: 13.000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk és a felülúszót -80^{0}C-on tároltuk a felhasználásig. RNS izoláláshoz a lecentrifugált sejtüledéket használtuk fel

6. táblázat.1X M9 tápleves összetevője

Összetevő megnevezése	Végső koncentráció	Nyomelemek	1000X	
Na_2HPO_4	3,54 g/L	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	50 mM	1,35 g/100 mL
NaCl	0,50 g/L	$CaCl_2$	20 mM	0,22 g/100 mL
KH_2PO_4	3,40 g/L	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10 mM	0,19 g/100 mL
NH_4Cl*	2,00 g/L	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mM	0,41 g/100 mL
$C_6H_{12}O_6$*	2,00 g/L	$CoCl_2$	2 mM	0,04 g/100 mL
$MgSO_4$*	2,00 mM	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	2 mM	0,03 g/100 mL
$CaCl_2$*	0,02 mM	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	2 mM	0,04 g/100 mL
Ampicillin*	100 µg/mL	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2 mM	0,04 g/100 mL
TRACE*	1X	$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$	2 mM	0,05 g/100 mL
		$H_3BO_3 \cdot 5H_2O$	2 mM	0,03 g/100 mL
		HCl	60 mM	**

*- sterilizálás után, a kihűlt táptalajba steril szűrőn keresztül mérjük be
**- a beérendő HCl mennyiséget a törzsoldat koncentrációja határozza meg

2.3. Termelő törzsek génexpressziós profilelemzése RT-qPCR módszerrel

A génexpressziós profilvizsgálathoz első lépésben az említett kultúrákból megfelelő mennyiségű és minőségű RNS izolálása szükséges, ehhez a GeneJET RNA Purification Kit-et (Thermo) alkalmaztuk, a gyártó leírása szerint. A kapott összRNS koncentrációját spektrofotometriás módszerrel (GenWay, Genova Nano) határoztuk meg. Az RNS alapú cDNS szintézist reverz transzkripcióval valósítottuk meg (RevertAid cDNA Synthesis Kit, Thermo), oligodT primer alkalmazásával. Az RT reakció összetételét a 7. táblázat tartalmazza. Első lépésben összemérjük a templátot az Oligo DT-vel valamint RNase inhibitorral, ezt követően 10 percig 70°C-on tartjuk majd gyorsan jégre tettük, ezt követően belemérjük a többi reakció összetevőt és 42°C-on 1 órán át inkubáltuk, majd 5 percig 95°C-on inaktiváltuk az enzimet. A kapott cDNS koncentrációját spektrofotometriás módszerrel (GenWay, Genova Nano) mértük.

7. táblázat RT reakció összetétele

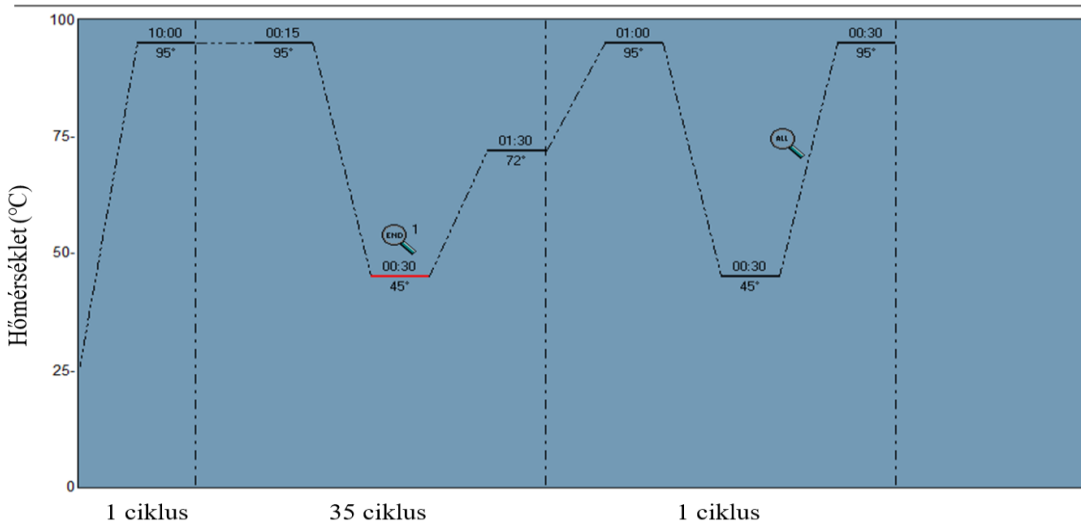
Reakció összetétele	
MLV buffer	20 µl
10 mM dNTP	7,5 µl
Oligo DT	7,5 µl
DTT	4 µl
MLV enzim	3 µl
RNase inhibitor	1 µl
RNS templát	77 µl
Összesen	120 µl

Az előzetes primer tesztelés során a tervezett primerekkel (8. táblázat) PCR reakciókat állítottunk össze(9.táblázat), majd a keletkezett termékek agaróz gélen való ellenőrzésével a primereknek megfelelő hibridizációs körülményeket választottuk ki.

8. táblázat Felhasznált primerek

Primer neve	Szekvencia
pflB3 pflB4	5'AAATCCACTTAAGAAGGTAGGTG3' 5'TCGTGGAGCCTTTATTGTAC3'
adhE3 adhE4	5'CAAATCATCACCGCACTGAC3' 5'TCCTTAACTGATCGGCATTG3'
fumA3 fumA4	5'GGCTTCCATTCCCAGTTCCG3' 5'CCTGCTAACCAGCGAACACG3'
ppc3 ppc4	5'CGATAAGATGGGGTGTCTGG3' 5'TATCGCCGAATGTAACGACA3'
sucCD-F sucCD-R	5'CCACAGACGTCATGAACTTACATGAATATCAG3' 5'CGATATCTCGAGTTTCAGAACAGTTTTCAGTGC3'

Az RT-qPCR reakcióhoz Mx3005P QPCR készüléket (Agilent Technologies) használtunk, SybrGreen kémia alapján való detektálással (Maxima SybrGreen, Thermo), referencia fluorokrómként ROX festéket alkalmazva. A reakcióelegyek összetételét a 9. táblázat tartalmazza, a ciklusok során alkalmazott hőmérsékleti profil a 19. ábrán van feltüntetve.



19.ábra. RT-qPCR hőmérséklet profil

Az eredmények feldolgozása, adatok kiértékelése MxPro QPCR szoftver segítségével történt, az amplifikációs görbékből meghatározva az összehasonlítandó minták c(T) értékeit, a fluoreszcencia értékek referenciafestékhez normalizált értékeiből (dRn) a génexpresszió mértékének változásához meghatároztuk a Δc(T) értékeket. A disszociációs görbék alapján a keletkezett termékek minőségét állapítottuk meg.

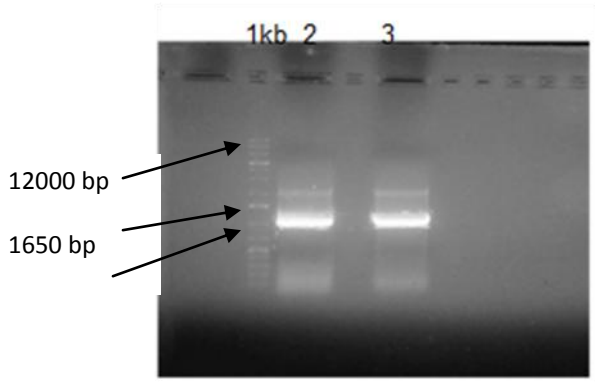
9. táblázat QPCR reakció összetétele

Reakció összetétele	
2X QPCR Mix	10 µl
10µM Forward primer	1µl
10µM Reverse primer	1µl
100ng Templát cDNS	1µl
ultratiszta víz	7µl

3. Eredmények és értékelés

3.1. E. coli K12 MG16D3(DE3) mutáns törzsek létrehozása

A mutáns törzs előállítása érdekében először elkészítettük a génspecifikus kazettát PCR segítségével a leírtak alapján. Ez a lineáris DNS fragmentum tartalmazza az alkohol-dehidrogenáz gén két határoló régióját, valamint a két határoló régió között a kloramfenikol rezisztencia gént, valamint a rezisztenciagén eltüntetése érdekében flipáz felismerési szekvenciákat. A génspecifikus kazetta sikerességét 1%-os agaróz gélen ellenőriztük (**Hiba! A hivatkozási forrás nem található.**), az eredményeink szerint sikerült egy megfelelő méretű PCR reakcióterméket kapnunk. Ezt követően a kazettának megfelelő méretű (1100 bp) PCR terméket gélből izoláltuk, emésztettük DpnI restrikciós endonukleázzal a plazmid DNS eltávolítása érdekében, majd etanollal kicsaptuk a megemésztett PCR terméket. A DNS tisztítás, kicsapás, koncentrálás eredményességét ismét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.



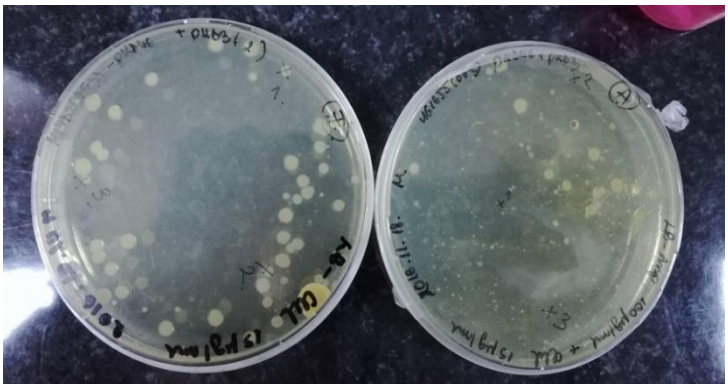
20.ábra. Génspecifikus kazetta agaróz gélelektroforézissel ellenőrizve
1 kb DNS molekulasúly-marker, Fermentas, 1 µl; 2, 3: génspecifikus kazetta

A génspecifikus kazetta elkészítését követően *E. coli* K12 MG14D2(DE3) kémiai kompetens sejteket hoztuk létre, majd pKD46 ampicillin rezisztenciáért felelős gént tartalmazó plazmiddal transzformáltuk. A transzformálási keverékből 100 µl-ert ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettünk, ezen a táptalajon csak azok a sejtek képesek fejlődni, amelyek felvették a plazmidot. A 21.ábra. azt mutatja, hogy a sejtek felvették az ampicillin rezisztencia gént tartalmazó pKD46 plazmidot, így sikeresnek értékeljük a transzformálást, míg azok a sejtek, amelyekhez nem adtunk plazmidot nem fejlődtek ampicillin jelenlétében.

Egyetlen pKD46 tartalmú *E. coli* K12 *MG14D2(DE3)* telepből kiindulva elektrokompetens sejteket hoztunk létre, majd elektroporálással bejuttattuk az *adh*-génspecifikus kloramfenikol kazettát. Az elektroporálás eredményét az 21-22. ábra tartalmazza. A kloramfenikol tartalmú táptalajon megjelent transzformált telepekből arra következtetünk, hogy a bakteriális genomban sikeresen megtörtént az alkohol-dehidrogenáz gén cseréje a szelekciós marker génre.

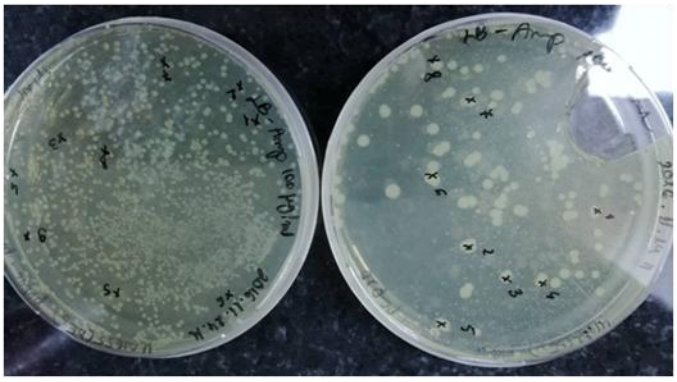


21. ábra Transzformálás után ampicillines táptalajon kifejlődött pKD46 plazmidot tartalmazó E. coli telepek



22. ábra Az adh-génspecifikus kloramfenikol kazettát tartalmazó elektroporált sejtek

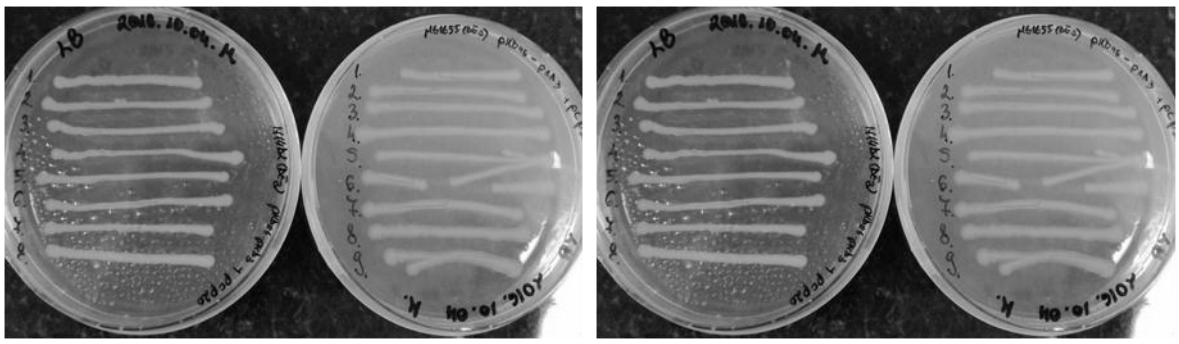
Az antibiotikum rezisztencia gén eltávolítása érdekében pCP20 plazmidot juttattunk a sejtekbe elektroporálással, majd ampicillin tartalmú táptalajon szelektáltuk a plazmidot tartalmazó sejteket (23. ábra).



23. ábra A pcp20 –as plazmiddal rendelkező *E. coli* sejtek ampicillin tartalmú táptalajon

Ezt követően a kinőtt telepekből antibiotikum nélküli táptalajra oltottunk át, majd 2 napig 43 °C-on inkubáltuk. A pCP20 egy hőmérséklet-szenzitív plazmid, ezért a sejtek 43 °C-on elveszítik a plazmidot. Ezt követően a 2 napos telepeket három új lemezre oltottuk át, egy antibiotikum nélküli, egy ampicillin tartalmú és egy kloramfenikol tartalmú lemezre. Amint a 24.ábrán láthatjuk, a sejtek csak az antibiotikum nélküli táptalajon fejlődtek. Ez azt jelenti, hogy a génspecifikus kazetta kloramfenikolt kódoló része sikeresen eliminálódott.

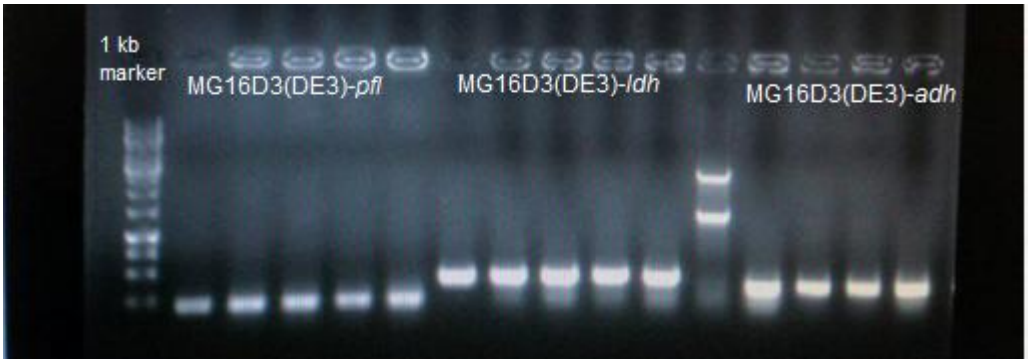
A B C D



24.ábra. LB lemezen 43 °C-os 2 napos inkubálás után kinőtt telepek(A,B), kontroll LB-Ampicilin, LB-Kloramfenikol táptalajok(C,D)

Kutatásunk során első lépésben az alkohol-dehidrogenáz gén eliminációját λ-red rekombinációs módszerrel végeztük. A génkiütés sikerességét génspecifikus (az adhE terminális genomi régióihoz kötődő) ellenőrző primerekkel végzett PCR reakcióval, majd 1%-os agaróz gélen való elválasztással ellenőriztük, amelynek eredménye a 7. ábrán látható.

Az eredmények azt mutatják, hogy sikerült az alkohol-dehidrogenáz gén eltávolítása, az ellenőrző PCR reakciótermékei a génkiütött törzsben egy sokkal kisebb fragmentumot mutatnak az eredeti törzshöz viszonyítva. Ugyanakkor ellenőriztük a már meglévő génkiütéseket is (*pflB, ldhA*), mindkét törzs telepeiben, a 25.ábrán ezekkel a primerekkel végzett ellenőrzés is látható.



25. ábra Génkiütés ellenőrzése (*adh3-4, pfl3-4, ldh3-4* primerekkel)

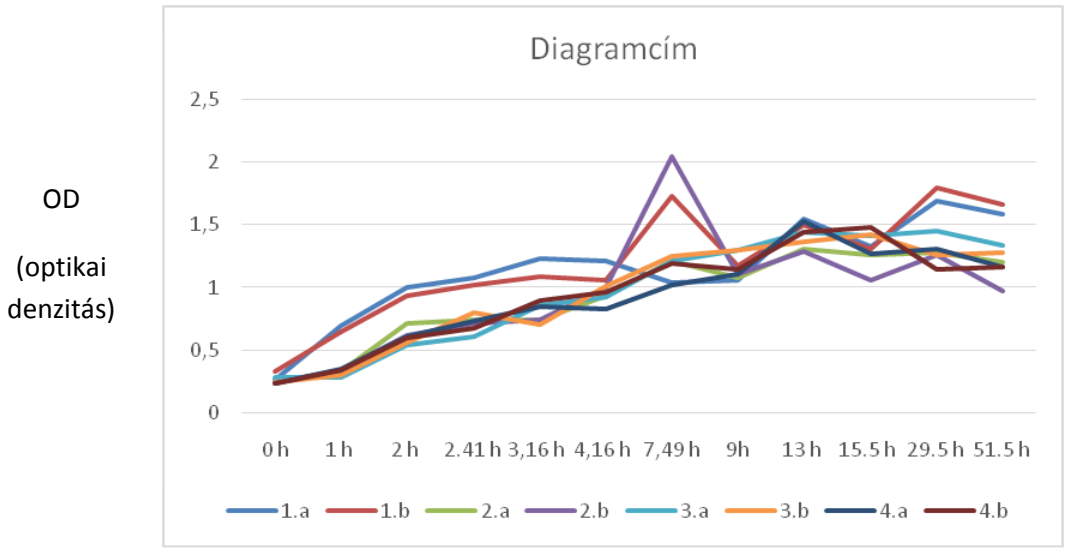
A génkiütés ellenőrzése után került sor a létrehozott hármas mutáns törzs transzformálására az 1,4-butándiol bioszintetikus útvonalát tartalmazó pGS1.1, illetve pGS2.2 plazmidokkal, az Anyag és módszer fejezetben leírtak alapján. Mivel ezen plazmidok viszonylag nagyméretűek, bejuttatásuk a génkiütött törzsbe elektroporálással történt. A plazmidok által hordozott ampicillin rezisztencia gén alapján szelektáltuk a plazmidokat felvett *E. coli* K12 MG16D3(DE3) telepeket (termelő törzsek), majd a továbbiakban ampicillin tartalmú tápközegben tenyésztettük a populációdinamikai, illetve génexpressziós vizsgálatokhoz.

3.2. Fermentációs kísérletek nagyobb térfogatban

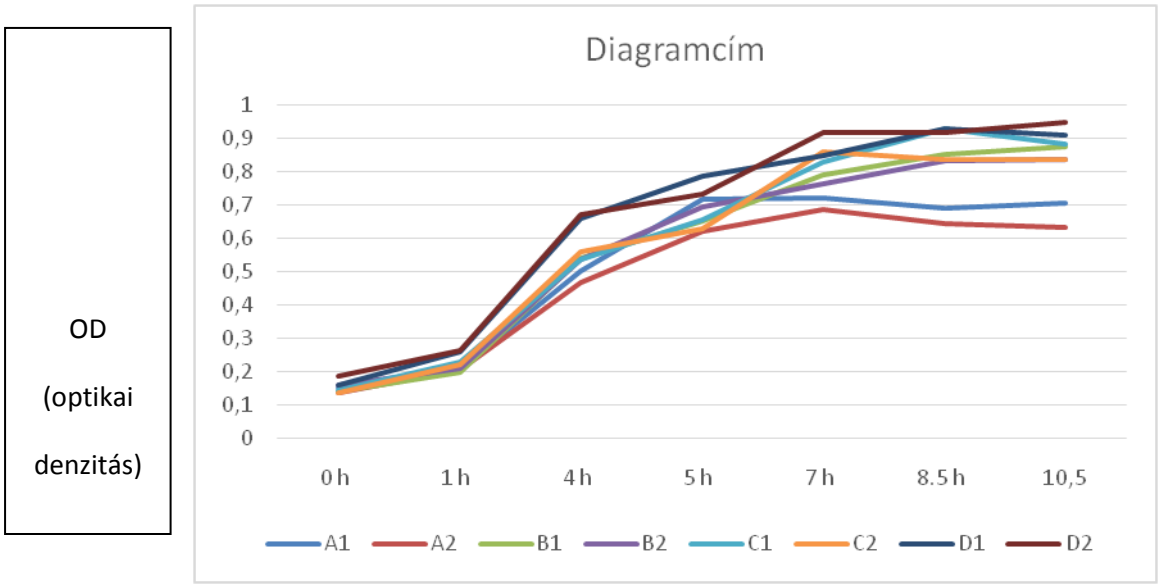
A létrehozott génkiütött, illetve termelő törzsek tenyésztéséhez, ennek következtében az RNS izoláláshoz szükséges nagyobb térfogatban végzett fermentációkat mikroaerob oxigénellátottság mellett végeztük, amelyet lezárható tenyésztő edényekkel valósítottunk meg.

A fermentációk során követtük az E. coli K12 MG16D3(DE3), E. coli K12 MG16D3(DE3) + pETDuet, E. coli K12 MG16D3(DE3) + pGS1.1, E. coli K12 MG16D3(DE3) + pGS2.1 törzsek növekedését glükóz, illetve glicerin szénforrás

felhasználásával, kettős ismétlésben. A génexpresszió mértékének követése céljából a kultúrákat (termelő törzseknél 0,5 mM IPTG-vel való indukálás után) a késői exponenciális növekedési fázisig növeltük (OD600~1 értékig), majd összRNS-t izoláltunk. A késői exponenciális növekedési fázis megfelelő egyrészt a kivont RNS minősége szempontjából, másrészt a génműködés szempontjából is. A 26,27. ábrákon a fentiekben felsorolt törzsek sejtsűrűség növekedését követtük nyomon, a 26. ábrán jól látható a törzseknek az időbeni egymás közötti növekedési különbségei.(glükóz szubsztráton) A 27. ábra ugyanezen törzseknek a sejtsűrűség változását ábrázolja, glicerin szubsztráton, itt megfigyelhettük hogy a mutáns és termelő törzsek egyformán változnak, igaz hosszabb idő alatt érik el ugyan azt az OD_{600}=1 értéket a glükóz szubsztrátot hasznosító törzsekkel szemben. Az eredményeink a glicerin hasznosítok optikai denzitását követően kevesebb mint a glükóz szubsztrát felhasználó törzsek esetében,ezáltal a 27. ábra diagramján egy exponenciális fázist figyelhetünk meg míg a 26. ábrán már a stacioner fázis kezdeti szakasza is megjelenik. Ezekből az eredményekből még nem látható releváns különbség a két szubsztrátot hasznosító mikroorganizmusok között.



26.ábra Termelő törzsek optikai denzitás mérése az idő függvényében-glükóz szubsztráton



27.ábra.Termelő törzsek optikai denzitás mérése az idő függvényében-glicerin szubsztráton

3.3. Termelő törzsek génexpressziós profilelemzése RT-qPCR módszerrel

A kísérletsorozat célja az előző lépésben létrehozott termelő kultúrák vizsgálata az alkalmazott genetikai módosítások (heterológ gének bevitele) illetve tenyésztési körülmények (szénforrás), az adott törzsek primer metabolizmusának fontos génjeire gyakorolt hatásának (pl.: piruvát metabolizmus, citrátkör) szempontjából.

Első lépésben a fermentációs flaskákban levő törzsekből vett 3 ml sejtkultúrából össz RNS-t izoláltunk. Az izolált RNS minták spektrofotometriás koncentráció meghatározásából kitűnik, hogy sikeres volt az RNS izolálása és tisztítása minden kultúra esetében. Az 10. táblázat az összRNS koncentrációk értékeit mutatja be, amelyből kiderül, hogy jó hozammal (min. 20,39 µg/ml) koncentrációban sikerült tiszta RNS oldatok előállítása.

10. táblázat *E. coli* K12 MG16D3(DE3) + termelő törzsek glükóz, illetve glicerin szubsztráton mért össz RNS koncentráció

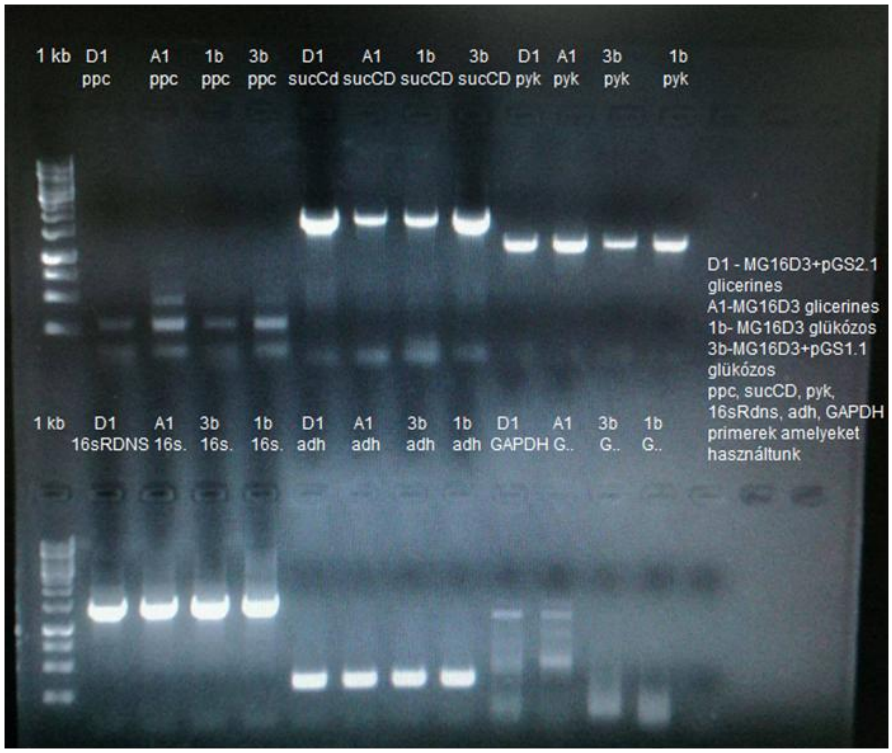
Törzs	Glükóz szubsztrát		Glicerin szubsztrát	
	Minta	Koncentráció	Minta	Koncentráció
E. coli K12 MG16D3(DE3)	1a	20,39 µg/ml	A1	67,20 µg/ml
	1b	22,98 µg/ml	A2	78,88 µg/ml
E. coli K12 MG16D3(DE3) + pETDuet	2a	34,38 µg/ml	B1	77,15µg/ml
	2b	55,66 µg/ml	B2	80,03 µg/ml
E. coli K12	3a	38,43 µg/ml	C1	69,92 µg/ml

MG16D3(DE3) + pGS1.1	3b	32,80 µg/ml	C2	105,6 µg/ml
E. coli K12 MG16D3(DE3) + pGS2.1	4a	42,36 µg/ml	D1	70,86 µg/ml
	4b	40,33 µg/ml	D2	68,04 µg/ml

Az össz RNS koncentráció meghatározása után az RNS-t komplementer DNSsé (cDNS) írtuk át reverz-transzkripciós reakcióval, az Anyag és módszer fejezetben leírt protokoll alapján. Az átírást követően, a szintetizált cDNS minőségének, illetve a qPCR reakcióhoz kiválasztott génspecifikus primerek megfelelő hibridizálási körülményeinek meghatározásához próba-PCR reakciót végeztünk, amelynek eredményeit, 1% agaróz gélelekotroforézissel való elválasztás után, a 28. ábra szemlélteti. A génspecifikus primerekkel (ppc, sucCD, adh, specifikus, illetve a 16SrDNS, GAPDH referencia génekre specifikus) végzett PCR esetében azokat a reakciókat tekintettük sikeresnek, ahol jól elkülöníthető és megfelelő DNS fragmentumot találtunk (sucCD, pyk, adh, 16SrDNS) és a további kvantitatív reakciókat ezen ellenőrzések alapján végeztük. A próba PCR eredményei azt is mutatják, hogy sikerült a qPCR-hez templátként használható, megfelelő minőségű, cDNS előállítása. Ez utóbbi következtetést a cDNS koncentrációk spektrofotometriás meghatározásából kapott eredmények is alátámasztják (11. táblázat).

11. táblázat E. coli K12 MG16D3(DE3) + termelő törzsek cDNS koncentrációi glükóz, illetve glicerin szubsztráton

Törzs	Glükóz szubsztrát		Glicerin szubsztrát	
	Minta	Koncentráció	Minta	Koncentráció
E. coli K12 MG16D3(DE3)	1a	946,8 µg/ml	A1	547,7 µg/ml
	1b	907 µg/ml	A2	889,8 µg/ml
E. coli K12 MG16D3(DE3) + pETDuet	2a	893 µg/ml	B1	917,9 µg/ml
	2b	933 µg/ml	B2	893,5 µg/ml
E. coli K12 MG16D3(DE3) + pGS1.1	3a	927,5 µg/ml	C1	894 µg/ml
	3b	947,6 µg/ml	C2	938,9 µg/ml
E. coli K12 MG16D3(DE3) + pGS2.1	4a	945,5 µg/ml	D1	1236 µg/ml
	4b	973,5 µg/ml	D2	1231 µg/ml



28. ábra A próba-PCR reakciótermékeinek ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

Az RT-qPCR-hez a cDNS mintákból készítettünk 100 ng/ml-es hígításokat, és a megfelelő módszert alkalmazva összemértük a reakciókat. Az RT-qPCR reakcióhoz Mx3005P QPCR készüléket (Agilent Technologies) alkalmaztuk.

A létrehozott törzsek expressziós profilelemzéséből egy előkísérleti lépést sikerült megvalósítani. Ezt a kísérletet a *ppc* (foszfo-enolpiruvát) a *fumA* (fumarát) az adh (alkohol dehidrogenáz) a sucCD (szukcinil-koenzimA) illetve a pflB (piruvát formát liáz) génspecifikus primerek segítségével végeztünk. A kvantitatív PCR transzkripcióban kontrollként a 16 SrADN-t alkalmaztuk. A lenti 29,30,31,33,34-s ábrákon az MG16D3 illetve az MG16D3-petDuett, MG16D3+pGS 1.1 valamint MG16D3-pGS2.1- es plazmidokat tartalmazó kultúrák amplifikációs görbéi láthatóak az előbbiekben leírt primerek jelenlétében. A görbék értelmezéséhez a 11. táblázatban leírt CT (cycle treshold) értékek adnak kiindulópontot.

Az amplifikációs görbék jelmagyarázatának értelmezéséhez a 11. táblázat nyújt segítséget, ahol feltüntettük a mikrotitráló lemezre felvitt minták sorrendjét, a minták elnevezése azonosítható a 11-12. táblázat alapján.

11. táblázat Mikrotitráló lemezen a cDNS templátok elhelyezkedése különböző primerek jelenlétében

	ppc		fumA		adhE		pflB		16srDNS		NTC*	sucCD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1a	A1	1a	A1	1a	A1	1a	A1	1a	A1	ppc	1a
B	1b	A2	1b	A2	1b	A2	1b	A2	1b	A2	fumA	2a
C	2a	B1	2a	B1	2a	B1	2a	B1	2a	B1	adhE	3a
D	2b	B2	2b	B2	2b	B2	2b	B2	2b	B2	pflB	4a
E	3a	C1	3a	C1	3a	C1	3a	C1	3a	C1	16srDNS	A1
F	3b	C2	3b	C2	3b	C2	3b	C2	3b	C2	sucCD	B1
G	4a	D1	4a	D1	4a	D1	4a	D1	4a	D1		C1
H	4b	D2	4b	D2	4b	D2	4b	D2	4b	D2		D1

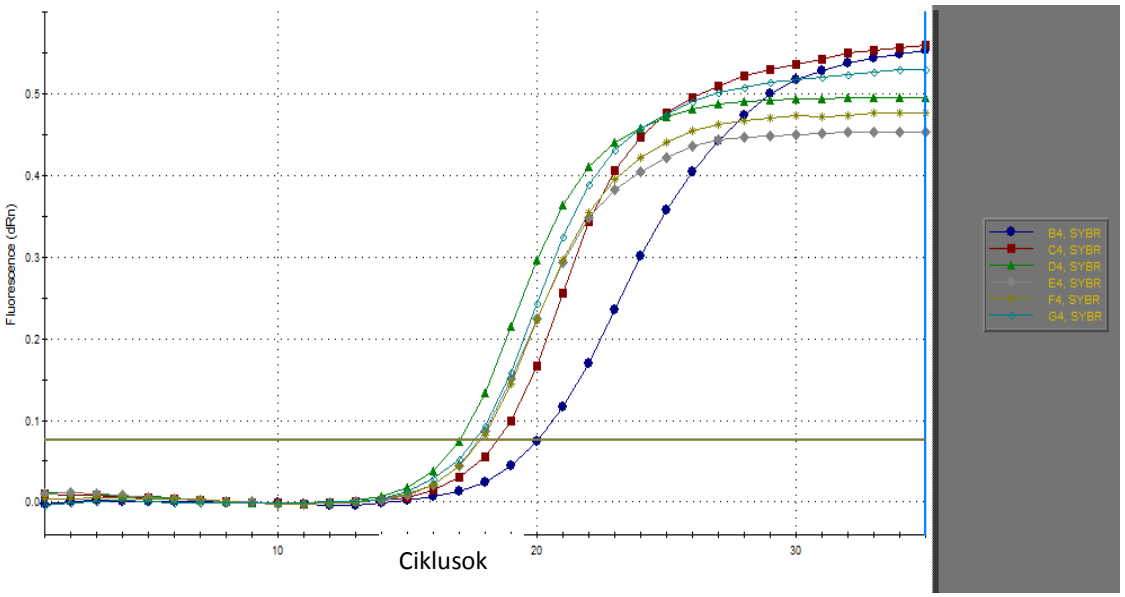
*-templát DNS-t nem tartalmazó kontroll minták

12. táblázat Cycle treshold értékek

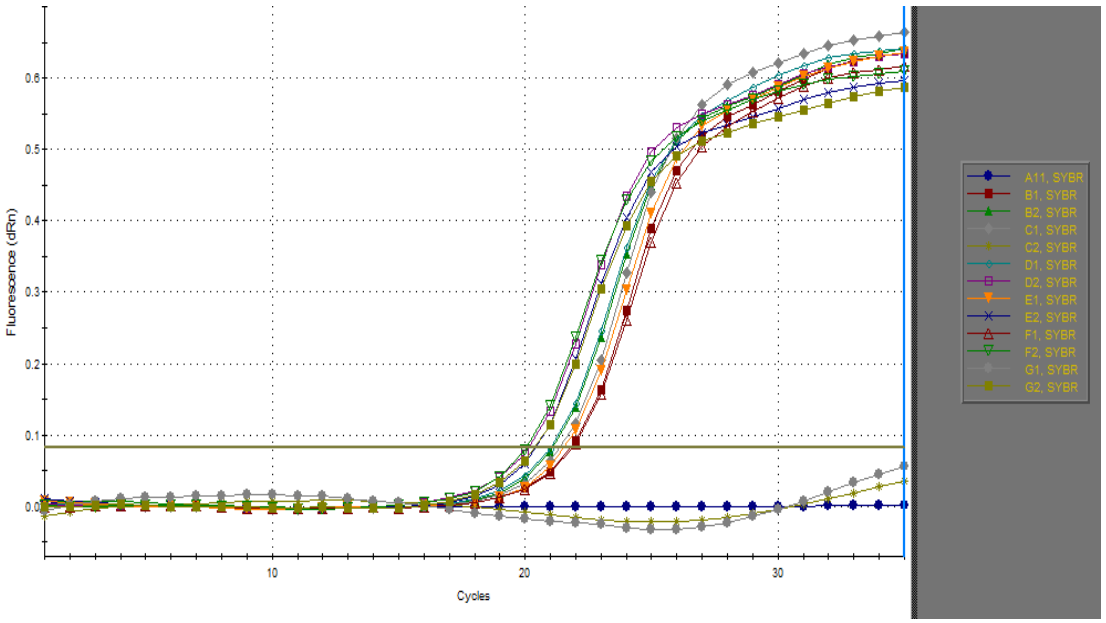
Gén	Cycle treshold érték, C(T)								NTC **
ppc	1a*	1b 21,83	2a 21,43	2b 21,05	3a 21,59	3b 21,89	4a*	4b*	*
	A1*	A2 21,13	B1*	B2 20,18	C1 20,49	C2 20,09	D1 20,44	D2*	
fumA	1a*	1b*	2a*	2b*	3a*	3b*	4a*	4b*	*
	A1*	A2 20,04	B1 18,55	B2 17,04	C1 17,08	C2 17,87	D1 17,67	D2*	
adhE	1a 17,83	1b 17,83	2a 18,08	2b 17,23	3a 17,83	3b 17,24	4a 17,39	4b 17,1	24,17
	A1*	A2 16,35	B1 16,42	B2 14,94	C1 16,01	C2 16,77	D1 17,24	D2*	
pflB	1a 32,53	1b 34,13	2a 18,73	2b 17,97	3a 18,40	3b 18,47	4a 18,85	4b*	28,51
	A1 32,75	A2*	B1 16,97	B2 15,28	C1 17,01	C2 16,19	D1 16,51	D2*	
sucCD	1a 21,33	1b*	2a 21,43	2b*	3a 17,91	3b*	4a 18,12	4b*	*
	A1 20,64	A2*	B1 20,66	B2*	C1 17,57	C2*	D1 17,03	D2*	

*-a CT érték meghatározása nem lehetséges, **-templát DNS-t nem tartalmazó kontroll minták

A 29.ábrán jól láthatjuk, hogy a fumA (fumarát) jelenlétében a mutáns törzshöz képest a termelő törzseknél enyhe változás van, ezen belül is a glicerin szubsztrátot fogyasztó törzseknek. A 30.ábrán láthatjuk, hogy ppc (foszfo-enolpiruvát) jelenlétében a CT értékek nem mutatnak szignifikáns eltérést, sem glükóz, sem glicerin szubsztrát jelenlétében.



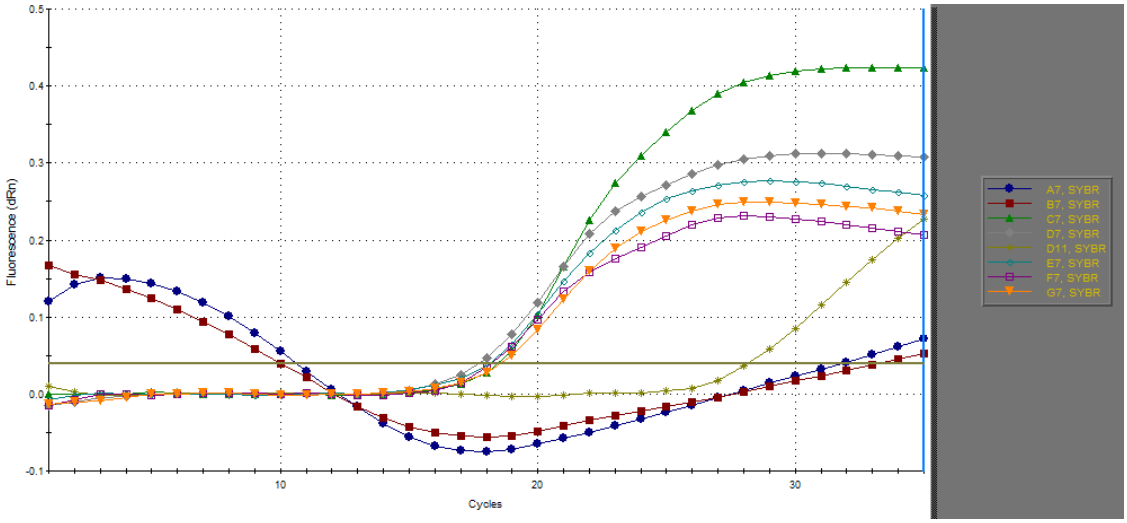
29.ábra. Mutáns illetve termelő törzsek glicerin szubtráton fumA génspecifikus primer jelenlétében mért amplifikációs görbéi



30.ábra. Mutáns és termelő törzsek amplifikációs görbéi ppc génspecifikus primer jelenlétében

A 31. ábrán látható *adh* génexpressziós profil esetében enyhe változást mutatnak az értékek, a görbékről is jól leolvasható módon. Ebben az esetben a glicerin szubsztrátot

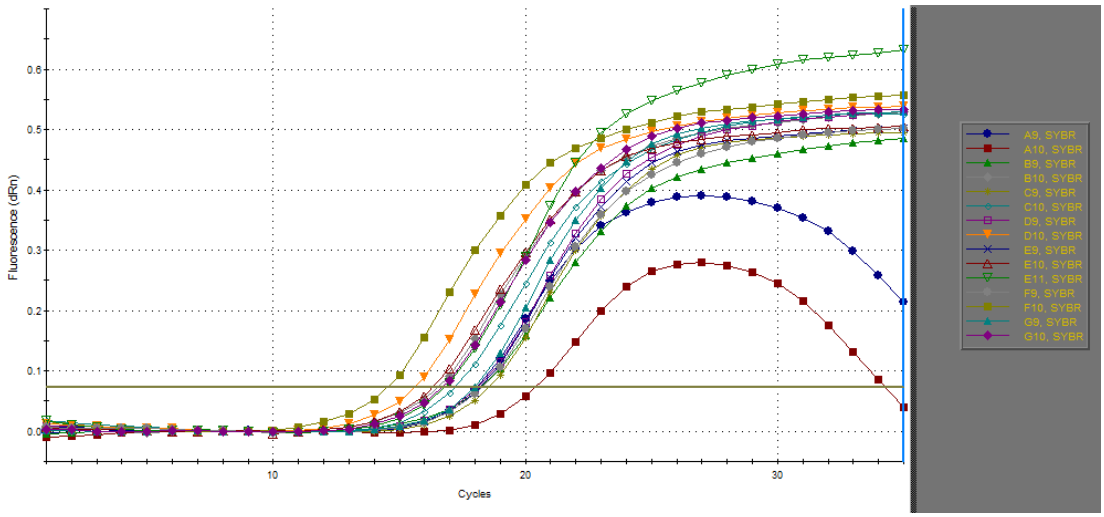
fogyasztó termelő törzsek esetében (D6, C(T)14,94) nagyobb mértékű a változás a kiinduló törzshöz viszonyítva (B6, C(T)16,35).



32.ábra Mutáns és termelő törzsek amplifikációs görbéi pflB primer glükóz szubsztrát jelenlétében

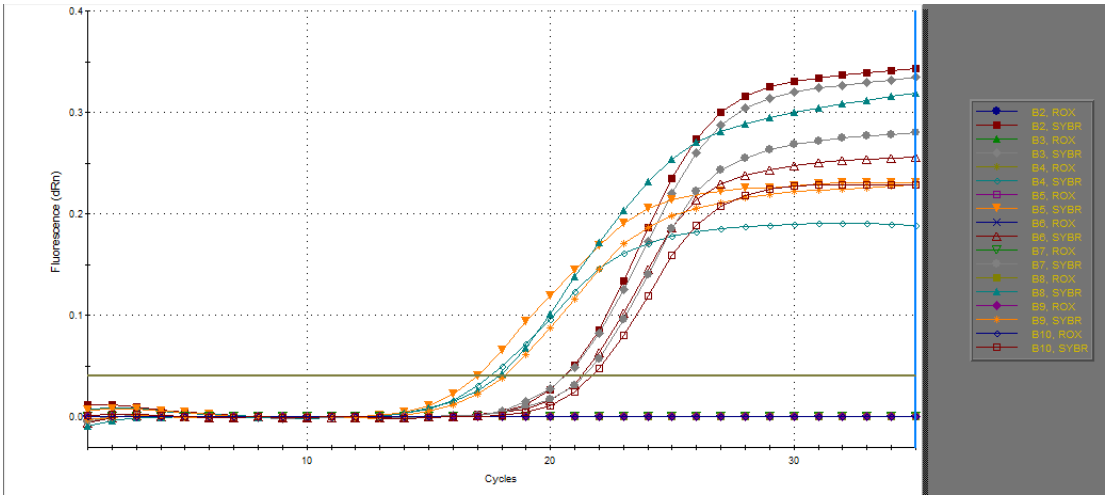
A 32. ábrán látható amplifikációs görbék a *pflB* gén expressziós profilját mutatják a vizsgált törzsek esetében, glükóz szénforrás jelenlétében. Meglepő módon, habár a *pflB* gén deléciós mutánsáról van szó az *E. coli* K12 MG16D3(DE3) esetében, illetve az ebből származó termelő törzsek esetében is, jelentős különbségeket vehetünk észre a gén kifejeződésében a kiinduló törzsek, illetve a termelő törzsek között.

A 32. ábrán A7, illetve B7 jelölt minták a kiinduló törzset jelzik glükóz szubsztrát esetében, ezeknek megfelelő C(T) értékek 32,53 illetve 34,13, amely rendkívül kis génaktivitást jelent. A C7 minta esetében (kontroll plazmiddal transzformált törzs) a C(T) érték 17,97, míg a termelő törzseknél (E7, C(T) 18,40) hasonló értékeket kaptunk. Ezen értékek a *pflB* gén viszonylag magas szintű aktivitását mutatják a plazmidot tartalmazó törzsekben a kiinduló törzshöz viszonyítva, amely egyértelmű magyarázata további vizsgálatokra alapján lehetséges.



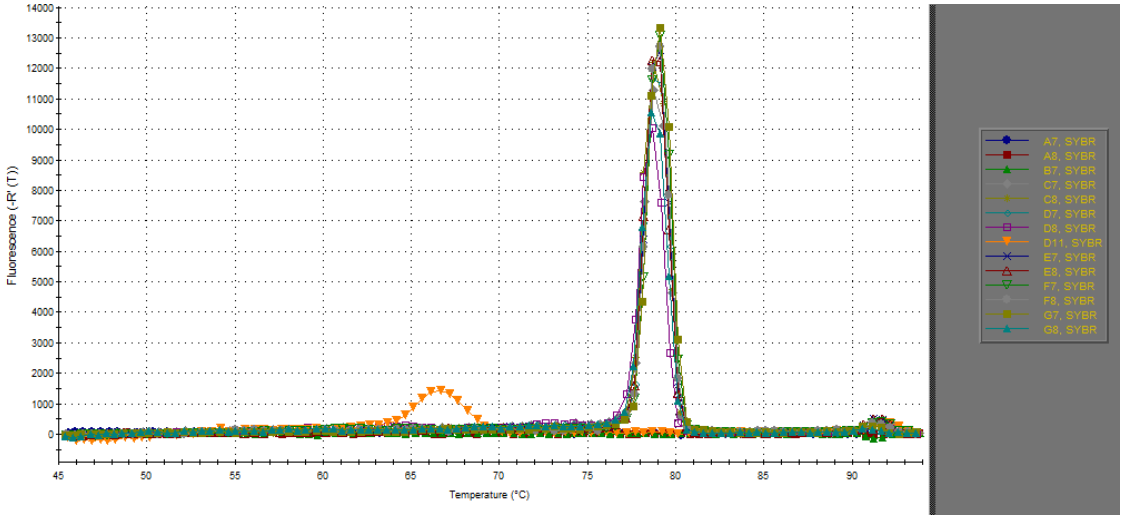
33.ábra Mutáns és termelő törzsek amplifikációs görbéi 16srADN primer jelenlétében

A *sucCD* (szukcinil-koenzim A-szintetáz) génre vonatkozó RT-qPCR vizsgálat egyértelműen jelzi a plazmidon bevitt *E. coli sucCD* megfelelő működését transzkripciós szinten. A kiinduló törzsnek megfelelő minták (B2, C(T) 21,33; B6, C(T) 20,64) valamint a pETDuet kontroll plazmidot tartalmazó minták esetében (B3, C(T) 21,33; B7 C(T) 21,33) hasonló C(T) értékeket kaptunk, ami az eredeti törzsben található *sucCD* működésének felel meg. Ezzel szemben a B4 és B8 minták, amelyek a *sucCD* túltermelését biztosító plazmidot tartalmaznak, 17,91 illetve 17,57 C(T) értékeket mutatnak, az amplifikációs görbén is jól elkülöníthető módon (34. ábra). Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy jól működik a bioszintetikus útvonal enzimeinek termelését biztosító expressziós vektor (pGS1.1, ill. pGS2.1). Ugyanakkor pozitív információt is nyújt az RT-qPCR módszer alkalmazhatóságáról. A két szénforrás esetében nem látható szignifikáns eltérés a kultúrák között a *sucCD* expressziójára való hatás szempontjából.



34. ábra Mutáns és termelő törzsek amplifikációs görbéi sucCD primer jelenlétében

A 35. ábrán bemutatott disszociációs görbe jelentősége, hogy minőségileg is beazonosíthatjuk a qPCR reakció során kapott PCR termékeket, és meghatározhatjuk az esetleges nem specifikus termékek jelenlétét. A görbén olvadáspontjuk alapján találjuk a PCR reakció termékeket, a kisebb olvadáspontú csúcsok primer-dimereket, míg a magasabb olvadáspontú, élesebb csúcsok a várt PCR terméket jelentik. Egy értelmezhető qPCR reakció termékei között legfeljebb egy primer-dimernek megfelelő, illetve a PCR terméknek megfelelő csúcsot láthatunk. A kísérleteink során a 35. ábrán látható disszociációs görbékhez hasonló görbéket kaptunk minden génspecifikus primerrel végzett reakció esetében.



35. ábra Mutáns és termelő törzsek disszociációs görbéi sucCD primer jelenlétében

4. Következtetések

A kutatási célunknak eleget téve létrehoztunk egy olyan *E. coli* törzset, amelyből sikeresen eliminátuk az alkohol-dehidrogenáz génjét, illetve heterológ géneket tartalmazó plazmidokkal transzformáltunk, ezáltal az 1-4 butándiol termelésére alkalmazható törzseket továbbfejlesztése sikeresnek tudható.

A populáció dinamikai vizsgálatokkal az említett törzsek viselkedésének tanulmányozása vált lehetővé különböző körülmények között, melyek összehasonlítása révén meghatároztuk az optimális tenyésztési körülményeket.

A létrehozott törzsek expressziós profilelemzése során a primer metabolizmus néhány kulcsenzimjeire vonatkozóan értékes adatok birtokába jutottunk. A kutatásunk folytatásában ezen kísérleti eredmények alapján tervezzük a glicerin hasznosításért felelős gének expresszsiójának elemzését, a TCA ciklus kulcsenzimjeinek (mdh, fum) vizsgálatát, illetve az 1-4 butándiol kimutatására alkalmas analitikai módszer kidolgozását megvalósítani.

Továbbá levonható azon következtetés, miszerint a rendelkezésünkre álló eszközök-, módszerek-, technológiák- és temérdek információval egy olyan kísérletsorozatot vittünk végig, amellyel célkitűzéseink megvalósítását kísérleti eredményeinkkel támaszthatjuk alá.

Nem utolsó sorban elmondhatjuk hogy hozzájárultunk Székelyföld jövőbeli fejlődéséhez a kutatásunk során alkalmazott technológiák, módszerek, megismerésével és alkalmazásával.

BIBLIOGRÁFIA

[1] G. Stephanopoulos, “Metabolic fluxes and metabolic engineering.,” *Metab. Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–11, 1999.

[2] B. M. Woolston, S. Edgar, and G. Stephanopoulos, “Metabolic Engineering: Past and Future,” *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 4, no. 1, pp. 259–288, 2013.

[3] M. B. Quin and C. Schmidt-Dannert, “Designer microbes for biosynthesis,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 29, no. 1, pp. 55–61, 2014.

[4] D. Jullesson, F. David, B. Pfleger, and J. Nielsen, “Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 7, pp. 1395–1402, 2015.

[5] K. Levente, *Biomérnöki műveletek és folyamatok*. 2011.

[6] “Az anyag- és energiaforgalom alapjai.”

[7] M. J. Burk, “Sustainable production of industrial chemicals from sugars,” *Int. Sugar J.*, vol. 112, no. 1333, pp. 30–35, 2010.

[8] R. Syn, “Ipa ri mikrobiológia,” 2011.

[9] S. Andreozzi *et al.*, “Identification of metabolic engineering targets for the enhancement of 1,4-butanediol production in recombinant E. coli using large-scale kinetic models,” *Metab. Eng.*, vol. 35, pp. 148–159, 2016.

[10] X. J. Ji, H. Huang, and P. K. Ouyang, “Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 3, pp. 351–364, 2011.

[11] N. Kataoka, A. S. Vangnai, T. Tajima, Y. Nakashimada, and J. Kato, “Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered Escherichia coli,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 115, no. 5, pp. 475–480, 2013.

[12] S. Zhou *et al.*, “Production of Optically Pure,” *Society*, vol. 69, no. 1, pp. 399–407, 2003.

[13] M. D. Blankschien, J. M. Clomburg, and R. Gonzalez, “Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of succinate from glycerol,” *Metab. Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 409–419, 2010.

[14] I. Miklóssy, Z. Bodor, R. Sinkler, K. C. Orbán, S. Lányi, and B. Albert, “*In silico* and *in vivo* stability analysis of a heterologous biosynthetic pathway for 1,4-butanediol production in metabolically engineered *E. coli*,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 1102, no. August, pp. 1–16, 2016.

[15] C. Cho, S. Y. Choi, Z. W. Luo, and S. Y. Lee, “Recent advances in microbial production of fuels and chemicals using tools and strategies of systems metabolic engineering,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 7, pp. 1455–1466, 2015.

[16] X. Chen *et al.*, “Metabolic engineering of Escherichia coli: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1200–1223, 2013.

[17] C. P. Long and M. R. Antoniewicz, “Metabolic flux analysis of Escherichia coli knockouts: Lessons from the Keio collection and future outlook,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 28, pp. 127–133, 2014.

[18] L. Pasteur, “Kulcs a bioreaktorokhoz.”

[19] “Biomérnöki m ű veletek és folyamatok ii.”

[20] S. Choi, C. W. Song, J. H. Shin, and S. Y. Lee, “Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives,” *Metab. Eng.*, vol. 28, pp. 223–239, 2015.

[21] D. L. Court, J. A. Sawitzke, and L. C. Thomason, “Genetic Engineering Using Homologous Recombination,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 36, no. 1, pp. 361–388, 2002.

[22] H. J. Hwang *et al.*, “Engineering of a butyraldehyde dehydrogenase of Clostridium saccharoperbutylacetonicum to fit an engineered 1,4-butanediol pathway in Escherichia coli,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, no. 7, pp. 1374–1384, 2014.

[23] J. A. Sawitzke, L. C. Thomason, N. Costantino, M. Bubunenko, S. Datta, and D. L. Court, “Recombineering: In Vivo Genetic Engineering in E. coli, S. enterica, and Beyond,” *Methods Enzymol.*, vol. 421, no. 6, pp. 171–199, 2007.

[24] D. Bikard, W. Jiang, P. Samai, A. Hochschild, F. Zhang, and L. A. Marraffini, “Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 15, pp. 7429–7437, 2013.

[25] A. M. Kabadi, D. G. Ousterout, I. B. Hilton, and C. A. Gersbach, “Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 19, pp. 1–11, 2014.

[26] T. Gaj, C. A. Gersbach, and C. F. Barbas, “ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering,” *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 7, pp. 397–405, 2013.

[27] J. Jeong *et al.*, “Repetitive genomic insertion of gene-sized dsDNAs by targeting the promoter region of a counter-selectable marker,” *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 8712, 2015.

[28] R. J. Clifford *et al.*, “Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 11, p. e48558, 2012.

[29] S. Carneiro, E. C. Ferreira, and I. Rocha, “Metabolic responses to recombinant bioprocesses in Escherichia coli,” *J. Biotechnol.*, vol. 164, no. 3, pp. 396–408, 2013.

[30] H. D. VanGuilder, K. E. Vrana, and W. M. Freeman, “Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis,” *Biotechniques*, vol. 44, no. 5, pp. 619–626, 2008.

[31] X. Yin, J. Li, H. Shin, G. Du, L. Liu, and J. Chen, “Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 830–841, 2015.

[32] A. D. Haimovich, P. Muir, and F. J. Isaacs, “Genomes by design,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 16, no. 9, pp. 501–516, 2015.

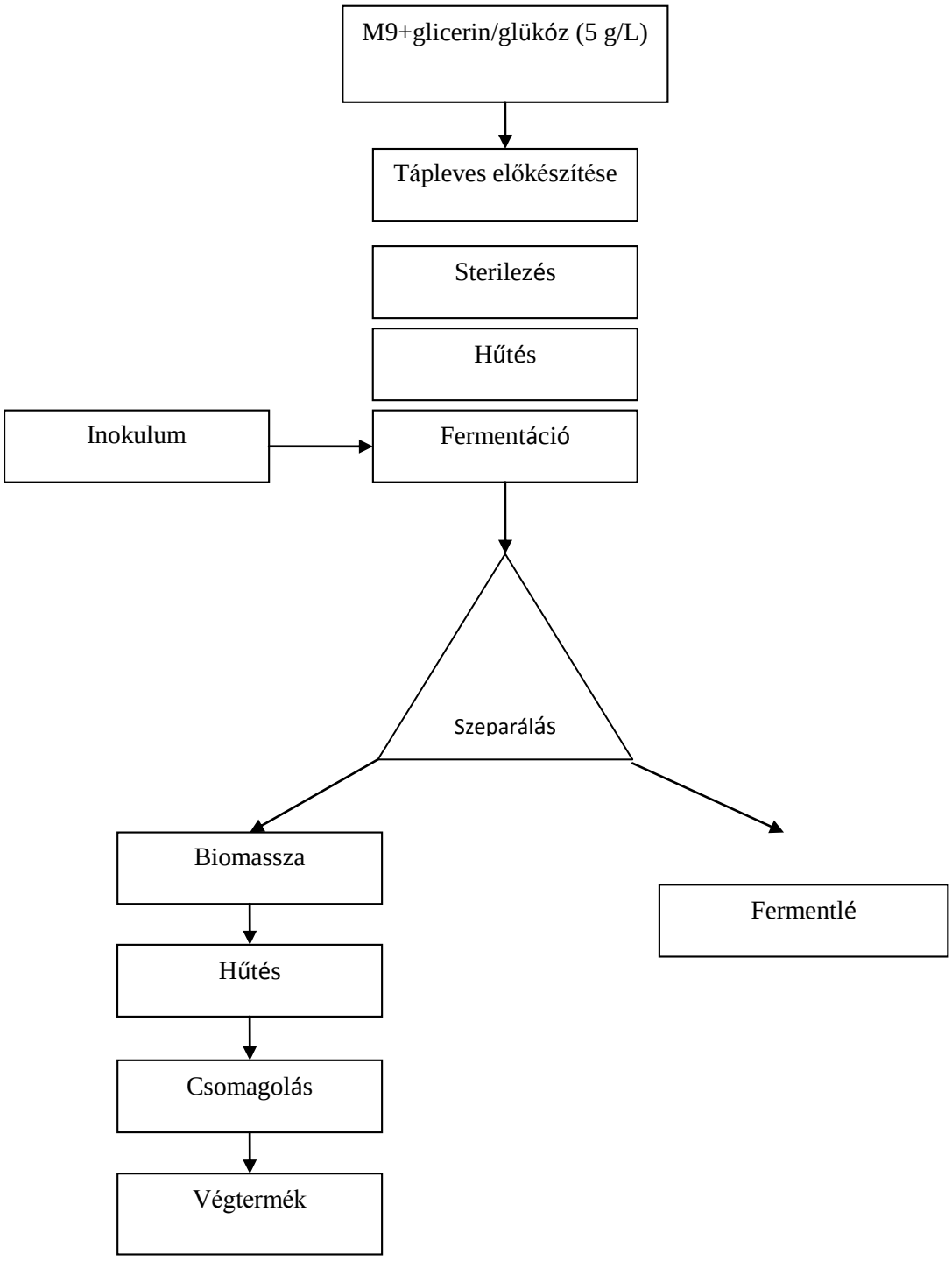
[33] Nexant-Chemsystems, “Is Bio-Butanediol Here to Stay ?,” *Methodology*, 2011.

[34] F. I. Andrea and B. Zsolt, “Génkiüté s λ -Red rekombinációval Escherichia coli -ban

Gene Knockout using λ -Red Recombination System in Escherichia Coli Eliminarea genelor în Escherichia coli folosind sistemul de recombinare λ -Red," pp. 10–15.

Tervezési rész

1.1. A gyártási technológia folyamatábrája



1.1.1. Termelés meghatározása a fermentorban

Tudva azt, hogy évi 4 t biomasszát állítok elő, meghatározzuk az éves tételek számát, valamint az egy tételre eső termelést.

$$P_{év} = 4\ t/év = 4 \times 10^{+3}\ kg/\ év$$

- Munkanapok száma: x=300 nap/év
- Fermentáció időtartama: 148 óra

Figyelembe véve a járulékos időt (reaktor feltöltése, sterilezés, reaktor kiürítése, tisztítása stb., t_a=10 h) számoltuk egy tétel idejét:

$$t_s = t_f + t_{aux} = 148 + 10 = 158 \text{ óra}$$

A sarzsok számát a következő összefüggés adja meg:

$$n_s = \frac{munknapok\ száma\ \times 24\ h}{t_s} = \frac{300 \times 24}{158} = 45{,}56 \approx 46\ tétel/év$$

A tételenkénti termelés:

$$P_s = \frac{P_{év}}{n_s} = \frac{4 \times 10^3}{46} = 86{,}95\ kg/sarzs$$

$$\mathrm{P_h} = \frac{\mathrm{P_{év}}}{\mathrm{n_m} \times 24} = \frac{4 \times 10^3}{300 \times 24} = 0{,}555\ \mathrm{kg/h}$$

Ahol: Ps-tételekénti termelés [kg/sarzs], P_h-éves termelés [kg/h], n_s-tételek száma

A termelés meghatározásához a következőket számoltuk. Tudva a globális hatásfok/veszteség (η_g) értékét, illetve az éves termelést számolható a szükséges hozam (P_f).
Ahol:

P_f- termelés a fermentorban [kg/tétel]

$P_{év}$- éves termelés [t]

A globális hatásfok meghatározásánál figyelembe kell venni a különböző fázisok, műveletek során fellépő veszteségeket:

Szeparálás: η_1=98%

Csomagolás: η_2= 90%

$$\eta_g = \frac{\eta_1}{100} \cdot \frac{\eta_2}{100}$$

$$\eta_g = \frac{98}{100} \cdot \frac{90}{100} = 0.882 = 88.2\%$$

$$P_f = \frac{P_s}{\eta_g}$$

$$P_f = \frac{86{,}95}{0.882} = 98{,}582 \text{ kg/tétel}$$

$$P_{év} = P_f \cdot n_s$$

$$P_{év} = 98{,}582 \times 46 = 4{,}534 \text{ t/év}$$

Ahol: Pf-termelés a fermentorban sarzsonként [kg/sarzs], , μ-globális veszteség

Ahhoz, hogy méretezni tudjuk a különböző berendezéseket meg kell határoznunk, hogy hány kg termék keletkezik adott térfogatban.

Szakirodalmi adatok alapján az E coli sejtsűrűség 1 liter oldatban 1 –es optikai denzitáson 1,7g

$$V_u = \frac{P_f}{c} = \frac{86{,}95 \times 10^3}{17} = 5.114{,}70\ l = 5{,}1147\ m^3$$

Mivel a tápleves sűrűsége nem ismert, ezért annak meghatározására használjuk a szakirodalomban javasolt összefüggéseket (Szép és András, 2010).

$$\rho_{kev} = y_{sz} \cdot \rho_{sz} + (1 - y_{sz}) \cdot \rho_l$$

Ahol:

ρ_{kev} - keverék sűrűsége [g/L]

y_{sz} - szilárd anyag térfogattörtje [V/V]

ρ_{sz} - szilárd anyag sűrűsége [g/L]

ρ_l - leves sűrűsége [g/L]

A tápleves komponenseit és tömegtörtjeiket a 3. táblázat foglalja össze.

x.táblázat. Tápleves komponensei

S.Sz.	Komponens	Móltömeg (vizmentes), g/mol	KOncentráció mM	Koncentráció g/L	Tömegtört
1	Na2HPO4	142.14	25	3,5487	0.0035253

2	KH2PO4	174.18	25	3,4017	0.0043199
	NaCl		25	0,5	0,000495686
3	NH4Cl	53.5	37,7	2	0.0026538
4	MgSO4	120.37	2	0,24073	0.0002388
5	FeCl3*6H2O	270,195	50	0.00135	0.0000080
6	CaCl2	110,978	20	0.00022	0.0000022
7	MnCl2*4H2O	197,83	10	0.00020	0.0000012
8	ZnSO4*7H2O	413,44	10	0.00041	0.0000016
9	CoCl2	237,83	2	0.00005	0.0000003
10	CuCl2*2H2O	170,446	2	0.00003	0.0000003
11	NiCl2*6H2O	237,593	2	0.00005	0.0000003
12	Na2MoO4*2H2O	241,94	2	0.00005	0.0000004
13	H3BO3*5H2O	151,81	2	0.00003	0.0000001
14	HCl	36.45	60		0.0021726
15	Glükóz	180	11,1	2	
16	Sum				

$$V = \frac{m}{\rho}$$

Na_2HPO_4: $V_{Na2HPO4} = \frac{m}{\rho_{Na2HPO4}}$

$$V_{Na2HPO4} = \frac{\frac{3.54875}{1000}}{1.7} = 0.00209\ \text{L}\ (y_{Na2HPO4})$$

KH_2PO_4: $V_{KH2PO4} = \frac{m}{\rho_{KH2PO4}}$

$$V_{KH2PO4} = \frac{\frac{3.4017}{1000}}{2.338} = 0.00145\ \text{L}\ (y_{KH2PO4})$$

NaCl: $V_{NaCl} = \frac{m}{\rho_{NaCl}}$

$$V_{NaCl} = \frac{\frac{0,5}{1000}}{2,16} = 0.000231\ \text{L}\ (y_{NaCl})$$

$C_6H_{12}O_6$: $V_{C6H12O6} = \frac{m}{\rho_{C6H12O6}}$

$$V_{C6H12O6} = \frac{\frac{2}{1000}}{1.54} = 0.00129 \text{ L } (y_{C6H12O6})$$

NH_4Cl: $V_{NH4Cl} = \frac{m}{\rho_{NH4Cl}}$

$$V_{NH4Cl} = \frac{\frac{2}{1000}}{1.5274} = 0.00131 \text{ L } (y_{NH4Cl})$$

$MgSO_4$: $V_{MgSO4} = \frac{m}{\rho_{MgSO4}}$

$$V_{MgSO4} = \frac{\frac{0.24}{1000}}{2.66} = 0.00009 \text{ L } (y_{MgSO4})$$

FeCl3*6H2O: $V_{FeCl3*6H2O} = \frac{m}{\rho_{FeCl3*6H2O}}$

$$V_{FeCl3*6H2O} = \frac{\frac{0.00135}{1000}}{1,82} = 0.00000074 \text{ L } (y_{FeCl3*6H2O})$$

MnCl2*4H2O: $V_{MnCl2*4H2O} = \frac{m}{\rho_{MnCl2*4H2O}}$

$$V_{MnCl2*4H2O} = \frac{\frac{0.00020}{1000}}{2,01} = 0.0000001 \text{ L } (y_{MnCl2*4H2O})$$

CaCl2: $V_{CaCl2} = \frac{m}{\rho_{CaCl2}}$

$$V_{CaCl2} = \frac{\frac{0.00022}{1000}}{2,15} = 0.0000001 \text{ L } (y_{CaCl2})$$

ZnSO4*7H2O: $V_{ZnSO4*7H2O} = \frac{m}{\rho_{ZnSO4*7H2O}}$

$$V_{ZnSO4*7H2O} = \frac{\frac{0.00041}{1000}}{3,31} = 0,00000012 \text{ L } (y_{ZnSO4*7H2O})$$

CoCl2: $V_{CoCl2} = \frac{m}{\rho_{CoCl2}}$

$$V_{CoCl2} = \frac{\frac{0.00005}{1000}}{3,36} = 0,000000014 \text{ L } (y_{CoCl2})$$

CuCl2*2H2O: $V_{CuCl2*2H2O} = \frac{m}{\rho_{CuCl2*2H2O}}$

$$V_{CuCl2*2H2O} = \frac{\frac{0.00003}{1000}}{2,51} = 0,00000002 \text{ L } (y_{CuCl2*2H2O})$$

NiCl2*6H2O: $V_{NiCl2*6H2O} = \frac{m}{\rho_{NiCl2*6H2O}}$

$$V_{NiCl2*6H2O} = \frac{\frac{0.00005}{1000}}{1,92} = 0,00000003 \text{ L } (y_{NiCl2*6H2O})$$

Na2MoO4*2H2O: $V_{Na2MoO4*2H2O} = \frac{m}{\rho_{Na2MoO4*2H2O}}$

$$V_{Na2MoO4*2H2O} = \frac{\frac{0.00005}{1000}}{2,71} = 0,00000001 \text{ L } (y_{Na2MoO4*2H2O})$$

H_3BO_3*5H2O: $V_{H3BO3*5H2O} = \frac{m}{\rho_{H3BO3*5H2O}}$

$$V_{H3BO3*5H2O} = \frac{\frac{0,00003}{1000}}{1,44} = 0.00000002 \text{ L } (y_{H3BO3*5H2O})$$

$$\Sigma = 0.00623117 \text{ L } (y_{sz})$$

$$y_{H_2O} = 1 - y_{sz}$$

$$y_{H_2O} = 1 - 0.00623117 = 0.993768 \text{ L}$$

$$\rho_{kev} = V_{Na2HPO4} \cdot \rho_{Na2HPO4} + V_{KH2PO4} \cdot \rho_{KH2PO4} + V_{NaCl} \cdot \rho_{NaCl} + V_{NH4Cl} \cdot \rho_{NH4Cl} + V_{MgSO4} \cdot \rho_{MgSO4} + V_{FeCl3*6H2O} \cdot \rho_{FeCl3*6H2o} + V_{CaCl2} \cdot \rho_{CaCl2} + V_{MnCl2*4H2O} \cdot \rho_{MnCl2*4H2O} + V_{ZnSO4*7H2O} \cdot \rho_{ZnSO4*7H2O} + V_{CoCl2} \cdot \rho_{CoCl2} + V_{CuCl2*2H2O} \cdot \rho_{CuCl2*2H2O} + V_{NiCl2*6H2O} \cdot \rho_{NiCl2*6H2O} + V_{Na2MoO4*2H2O} \cdot \rho_{Na2MoO4*2H2O} + V_{H3BO3*5H2O} \cdot \rho_{H3BO3*5H2O} + V_{glük} \cdot \rho_{glük} + (1 - y_{sz}) \cdot \rho_{H_2O}$$

$$\rho_{kev} = 0,00209 \cdot 1,7 + 0.00145 \cdot 2,338 + 0.000231 \cdot 2,16 + 0.00131 \cdot 1,5274 + 0.00009 \cdot 2,66 + 0.00000074 \cdot 1,82 + 0.0000001 \cdot 2,15 + 0.0000001 \cdot 2,01 + 0,00000012 \cdot 3,31 + 0,000000014 \cdot 3,36 + 0,00000002 \cdot 2,51 + 0,00000003 \cdot 1,92 + 0,00000001 \cdot 2,71 + 0.00000002 \cdot 1,44 + 0.00129 \cdot 1,54 + (1 - 0,00623117) \cdot 1$$

$$\rho_{kev} = \frac{1,00543kg}{L} = 1005,43kg/m^3$$

$$m_{tápleves} = \rho_{kev} \cdot V_u$$

$$m_{tápleves} = 1005,43 \cdot 5,1147 = 5142,47 \text{ kg} = 5,1424 \text{ t}$$

2. Reaktor méretezése

2.1. Reaktor térfogatának meghatározása

Figyelembe véve, hogy a folyamat során bizonyos paraméterek (pH, habzás, stb.) változnak, ezért ezen paramétereket folyamatosan kell korrigálni. Ennek következtében a fermentlé mennyisége időben változhat. Ebből a változásból adódóan a korrigálás érdekében 1%-os térfogat növekedéssel fogunk számolni, amely következőképpen fog változni:

$$V_R = V_u \cdot 1.01$$

$$V_R = 5{,}1147 \cdot 1.01 = 5{,}165\ m^3$$

Ahol:

V_R- a reaktor térfogata [m^3]

V_T-a tápleves térfogata [m^3]

Figyelembe véve a feltöltési hányadost (φ=75%), a reaktor térfogata a következőképpen alakul:

$$V_R = \frac{V_R}{\varphi}$$

$$V_R = \frac{5{,}165}{0.75} = 6{,}887\ m^3$$

2.2. Reaktor magasságának és átmérőjének meghatározása

A reaktor kialakítása henger alakú, illetve a hengeres rész tetején és az alján egy-egy szferoid vagy félgömb alakzat kap helyet. A magasság a következőképpen számolható:

$$V_R = \frac{\pi \cdot D_b^2}{4} \cdot H$$

Ahol:

H- a reaktor magassága [m]

D_b - a reaktor belső átmérője [m]

Tudva, hogy a magasság az átmérő kétszerese, ebből következik:

$$V_R = \frac{2 \cdot \pi \cdot {D_b}^3}{4},$$

$$D_b = \sqrt[3]{\frac{2 \cdot V_R}{\pi}}$$

$$D_b = \sqrt[3]{\frac{2 \cdot 6{,}887}{\pi}} = 1{,}6369\ m$$

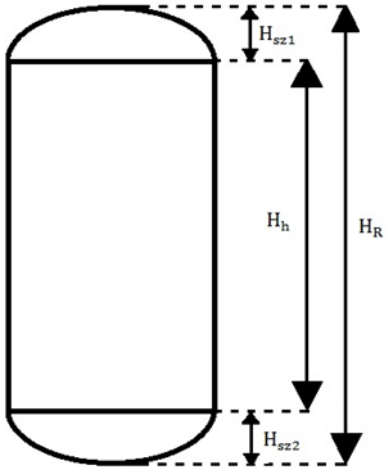
$$H = 2 \cdot D_b$$

$$H = 2 \cdot 1{,}6369 = 3{,}2739\ m$$

Szferoidikus tetejű (süveg), illetve aljú reaktor esetén:

$$H_R - H_h = H_{sz}$$

$$H_R = H_h + H_f + H_t$$



Ahol:

H_R- a reaktor magassága [m]

H_h- a reaktor hengeres részének a magassága [m]

H_{sz}- a reaktor szferoidikus részeinek összmagassága [m]

H_f- a szferoidikus fenék magassága (H_{sz2}) [m]

H_t- a szferoidikus tető (süveg) magassága (H_{sz1}) [m]

2.3. Falvastagság meghatározása

A reaktor rozsdamentes acélból készül, ezért nem kell figyelembe venni a korrózió sebességét. Amennyiben a reaktor normál atmoszférán működik a számításokat 6 atmoszférára végezzük.

$$\delta_{fal} = \frac{D_b \cdot p_{sz}}{2 \cdot \rho \cdot \tau_a^t - p_{sz}}$$

Ahol:

δ_{fal}- falvastagság [m]

D_b- reaktor belső átmérője [m]

p_{sz}- számított nyomás [Pa]

ρ-illesztések, heggesztések koefficiense (0.7)

τ_a^t-használt anyag terhelhetősége az adott hőmérsékleten [Pa]

$$\tau_a^t = \frac{\tau_c^t}{c_c}$$

Ahol:

τ_c^t- a nyomás ahol az anyag tulajdonságai megváltoznak [MPa]

$\tau_c^t = 205$ MPa (Kisfaludy és mtsa., 2004)

C_c- biztonsági (korrekciós) faktor (1.5)

$$\tau_a^t = \frac{205}{1.5} = 136.666 \text{ MPa} = 136.666 \cdot 10^6 \text{ Pa}$$

$$p_{sz} = p + \rho \cdot g \cdot H$$

$$p_{sz} = 6 \cdot 10^5 + 1005{,}43 \cdot 9.81 \cdot 3{,}2739 = 6.323 \cdot 10^5 \text{ Pa} = 0.632 \text{ MPa}$$

$$\delta_{fal} = \frac{D_b \cdot p_{sz}}{2 \cdot \rho \cdot \tau_a^t - p_{sz}}$$

$$\delta_{fal} = \frac{1{,}6369 \cdot 6{,}323 \cdot 10^5}{2 \cdot 0{,}7 \cdot 136{,}666 \cdot 10^6 - 6{,}323 \cdot 10^5} = 0.00542 \text{ m} = 5{,}42 \text{ mm}$$

2.4. Reaktor külső átmérőjének meghatározása

Tudva, hogy $\delta_{fal} = 5{,}42$ mm, számolható a reaktor külső átmérője.

$$D_k = D_b + 2 \cdot \delta_{fal}$$

Ahol:

δ_{fal}- a reaktor falának vastagsága [m]

D_k- a reaktor külső átmérője [m]

D_b - a reaktor belső átmérője [m]

$$D_k = 1{,}6369 + 2 \cdot 0.00542 = 1{,}6477 \text{ m}$$

$$H = 2 \cdot D_k$$

$$H = 2 \cdot 1{,}64774 = 3{,}295\text{m}$$

2.4.1. A szferoidok és a hengeres rész térfogatának, illetve a reaktor pontos magasságának a meghatározása

Korrekciót kell végeznünk, mivel a térfogatban megjelenik a két szferoid térfogata is.

$$V_h = V_R - 2 \cdot V_{sz}$$

V_h - reaktor hengeres részének térfogata [m^3]

V_R- reaktor térfogata [m^3]

V_{sz}- egy szferoidikus rész térfogata [m^3]

A térfogat meghatározásához szükséges a szferoid magasságának (H_{sz}) ismerete. Tudva, hogy a fenék hengeres részének a magassága h = 0.04 m számolható a szferoid magassága.

$$H_{sz} = h + \frac{D_k}{4}$$

$$H_{sz} = 0.04 + \frac{1,6477}{4} = 0.452\ \text{m}$$

Ahol:

H_{sz}- a szferoid magassága [m]

D_l - a reaktor külső átmérője [m]

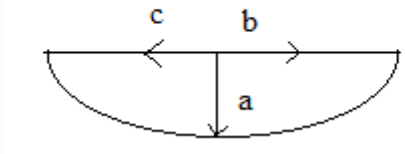
A félszferoid térfogatának kiszámítására a következő összefüggés írható fel:

$$V_{sz} = \frac{\pi}{6} \cdot a \cdot b \cdot c$$

Ahol:

V_{sz}- a szferoid térfogata [m^3]

a, b, c - a teljes hossztengelyek (szferoid esetén b=c) [m]



1. ábra. Szferoid méretezése

$$V_{sz} = \frac{\pi}{6} \cdot h \cdot D_b^2$$

$$V_{sz} = \frac{\pi}{6} \cdot 0.452 \cdot 1,6369^2 = 0,633\ \text{m}^3$$

Mivel két darab szferoidról beszélünk, a térfogatváltozás a következőképpen alakul:

$$V_{sz} = 0,633 \cdot 2 = 1,267\ \text{m}^3$$

A fenti egyenlőség szerint számolhatjuk a reaktor hengeres részének (V_h) a térfogatát:

$$V_h = V_R - V_{sz}$$

$$V_h = 6,887 - 1,267 = 5,622\ \text{m}^3$$

Tudva a reaktor hengeres részének a térfogatát, a következő összefüggés segítségével számolhatjuk a hengeres rész magasságát is:

$$V_h = \frac{\pi \cdot {D_b}^2}{4} \cdot H_h$$

$$H_h = \frac{V_h \cdot 4}{\pi \cdot {D_b}^2}$$

$$H_h = \frac{5,622 \cdot 4}{\pi \cdot 1,6369^2} = 2,69\ \text{m}$$

Ahol:

V_h- a reaktor hengeres részének térfogata [m^3]

H_h- a reaktor hengeres részének magassága [m]

A kapott adatok alapján kiszámíthatjuk a reaktor teljes magasságát:

$$H_R = H_h + 2 \cdot H_{sz}$$

$$H_R = 2{,}69 + 2 \cdot 0.452 = 3{,}594\ \text{m}$$

Ahol:

H_R- a reaktor magassága [m]

H_{sz}- a szferoid magassága [m]

A kapott értékekből meghatározhatjuk a reaktor magasság/szélesség arányát:

$$\frac{H_R}{D_k} = \frac{3{,}594}{1{,}6477} = 2{,}181$$

2.4.2. Csonkok méretezése

A tápleves betáplálása, illetve tartalmának ürítése, elvétele csonkok segítségével történik, ezért szükséges a pontos méretezése. A csonkok méretezésénél figyelembe vettük a kontinuitás tételét.

$$V_\tau = w \cdot S$$

Ahol:

V_τ - hozam [m^3/s]

W - áramlás sebessége [m/s]

S - áramlási keresztmetszet [m^2]

A megadott áramlási sebesség w=2 m/s.

$$S = \frac{\pi \cdot d_k^2}{4}$$

$$V_\tau = w \cdot \frac{\pi \cdot d_k^2}{4}$$

$$d_k = \sqrt{\frac{4 \cdot V_\tau}{\pi \cdot w}}$$

2. táblázat. Csonkok és egyéb járulékos elemek csatlakozási pontjai

Művelet	Időtartam [h]	Áramlási sebesség [m/s]	Darabszám
Betáp	1.5	2	2
Elvét	1.5	2	2
Járulékos elemek (kialakítások) • pH szenzor • Hőmérséklet szenzor • Keverő • Habzásgátló	-	-	 1 1 1 1

Tudva, hogy a feltöltési idő fél óra, kiszámoltuk a hozamot.

$$t_f = 0.5\ \text{h} = 1800\ \text{s}$$

$$V_\tau = \frac{V_u}{t_f}$$

$$V_\tau = \frac{5{,}1147}{1800} = 0.00284\,\frac{m^3}{s} = 2.841\ \text{L/s}$$

$$m_\tau = V_\tau \cdot \rho_{kev}$$

$$m_\tau = 2{,}841 \cdot 1{,}005 = 2{,}855\ \text{kg/s}$$

$$d_k = \sqrt{\frac{4 \cdot V_\tau}{\pi \cdot w}}$$

$$d_k = \sqrt{\frac{4 \cdot 0{,}00284}{\pi \cdot 2}}\,0{,}001808 = 0.0425\ \text{m} = 42{,}52\ \text{mm}$$

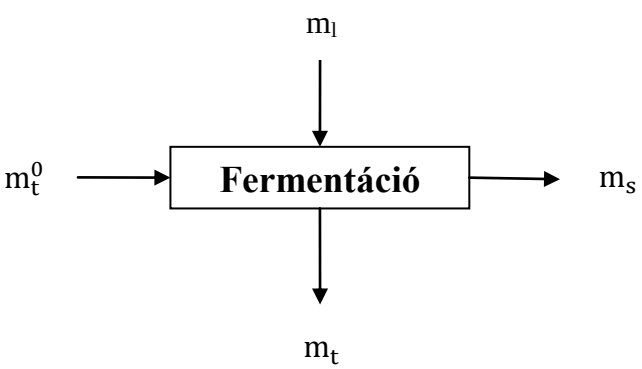
STAS szerint 45 mm külső átmérőjű cső van, amelynek 2 mm a falvastagsága (www.italinox.ro).

d_k=45 mm, d_{fal}=2 mm

3. Anyagmérlegek meghatározása

3.1. Fermentáció anyagmérlege

C-forrás + N-forrás + O_2+ ásványi sók+ speciális tápanyagok (pl. vitamin)→új sejttömeg +



ábra. A fermentáció globális anyagmérlege

termék(ek)+ CO_2+ H_2O

A számolások során eltekintünk a habzás és pH mennyiségétől.

Ahol:

$m^0_{O_2}$- belépő oxigén mennyisége [kg]

m^0_t- belépő tápleves mennyisége [kg]

m_s- keletkező sejt mennyisége [kg]

m_t- kilépő tápleves mennyisége [kg]

A szükséges oxigénmennyiség meghatározásához az alábbi egyszerű összefüggést használtuk:

1 m^3 O_2.....1 m^3 leves/h

x..... 5,1147 m^3/148 h

x= 5,1147 m^3/148 h O_2

$$V_l^\circ = \frac{V_{O_2}}{v/v\%}$$

$$V_l^\circ = \frac{5{,}1147}{0.21} = 24{,}355\ m^3/\text{tétel}$$

$$\rho_l = 1.225\ kg/m^3$$

$$m_l = \rho_l \cdot V_l^\circ$$

$$m_l = 1.225 \cdot 24{,}355 = 29{,}83575\ kg/\text{tétel}$$

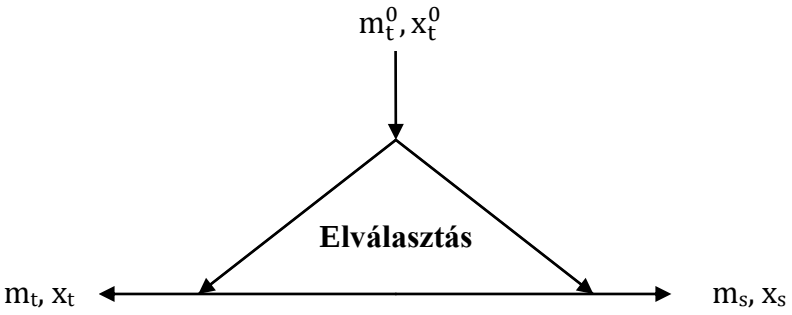
Ahol:

V_l° - bemenő levegő mennyisége [m^3]

ρ_l– levegő sűrűsége [kg/m^3]

3.2. Elválasztás anyagmérlege

Az elválasztási művelet célja a lebegő részecskék elválasztása a vizes fázisból sűrűség alapján. A centrifugálás (ülepítés) valójában szakaszos művelet, a szuszpenzióból kiülepedő részecskék lerakódnak a készülékben és idővel ezeket el kell távolítani, majd újra lehet kezdeni a ciklust. Ezért az elválasztási műveletek mérlegei hármasak, 1 belépő áramból és 2 kilépő áramból állnak.



11. ábra. Elválasztás globális anyagmérlege

$$\begin{cases} m_t^{\circ} = m_t + m_s \\ m_t^{\circ} \cdot x_t^{\circ} = m_t \cdot x_t + m_s \cdot x_s \end{cases}$$

Tudva, hogy a biomassza a fermentlé 2%-t teszi ki, meghatározható a megoszlás, tehát x_s=0.02, illetve x_t=0.98, mert 98%-a tápleves.

$$\begin{cases} 5142{,}47 = m_t + m_s \\ 5142{,}47 \cdot 0.02 = m_t \cdot 0.0004 + m_s \cdot 1 \end{cases}$$

$$m_s = 5142{,}47 - m_t$$

$$5142{,}47 \cdot 0.02 = m_t \cdot 0.0004 + (5142{,}47 - m_t) \cdot 1$$

$$0.9996 \cdot m_t = 5039{,}63$$

$$m_t = 5041{,}64 \text{ kg leves/tétel}$$

$$m_s = 5142{,}47 - 5041{,}64 = 100{,}83 \text{ kg sejt/tétel}$$

sankey??

A termék egyszerű csomagolást kap, a táplevestől elválasztott biomasszát műanyag edényekbe csomagoljuk. Ha ismert, hogy 10%-os veszteség jelentkezik, akkor a biomassza tömege a következőképpen módosul:

$$m_s = 100{,}83 \cdot 0.9 = 90{,}747 \text{ kg}$$

$$N = \frac{m_s}{5} = \frac{90{,}747}{5} = 18{,}14 \approx 18 \text{ palack}$$

$$N = \frac{m_s}{10} = \frac{90{,}747}{10} = 9{,}074 \approx 9 \text{ palack}$$

Ahol:

N- a csomagok száma [db]

Tudva, hogy percenként 2 csomag készül, számolható a csomagolás ideje:

$$T = \frac{18}{2} = 9 \text{ min} = 0{,}15 \text{ h}$$

$$T = \frac{9}{2} = 4{,}5 \text{ min} = 0.075 \text{ h}$$

3.3. Hőmérleg/Energiamérleg

Az energiamérleg az energia megmaradás tételére alapszik, amely alkalmas energiaáramok és áramsűrűségek követésére, energetikai mutatók meghatározására, illetve egyes berendezések méretezésére.

$$\sum E^0 + \sum E_1 = \sum E + \sum E_m$$

Ahol:

ΣE^0- belépő energia mennyisége [J]

ΣE_1- bent lévő energia mennyiség [J]

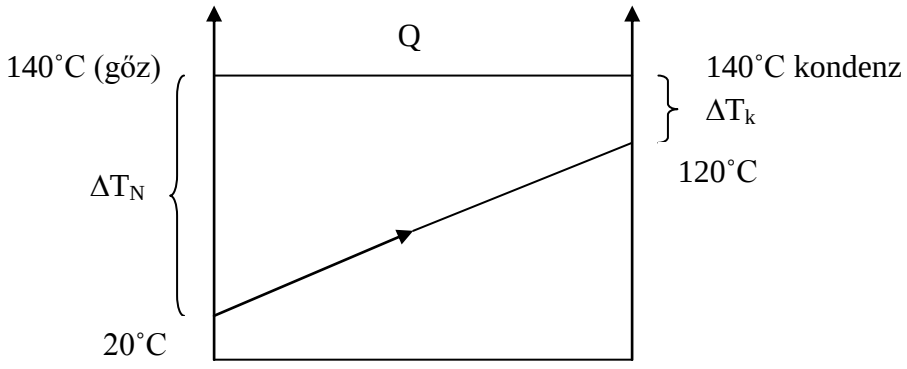
ΣE- bent maradt energia mennyiség [J]

ΣE_m- távozó energia mennyiség [J]

A mérlegeket meghatározott időegységre adjuk meg, esetünkben szakaszos reaktor lévén egy tételre. A hő/energiamérleg mindig feltételezi az anyagmérleg meglétét.

3.4. Sterilezés hőmérlege

A tápleves sterilezése tételenként, gőzzel történik (140°C) egy órán keresztül. A bemenő tápleves hőmérséklete 20°C és tudva, hogy a 140°C-os gőz fajlagos hőkapacitása $c_{pgőz}$=2200 kJ/kg, számoltuk a tápleves tömegáramát.



13. ábra. Hőlefutási diagram

$$\Delta T_N = 120°C, \qquad \Delta T_k = 20°C$$

$$\Delta T = \frac{\Delta T_N}{\Delta T_k}$$

$$\Delta T = \frac{120}{20} = 6$$

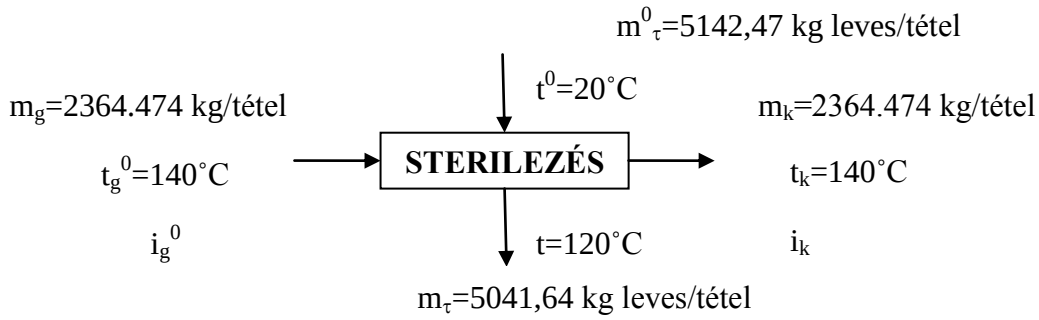
Mivel ΔT>2 ezért *ln* alapú átlagot számolunk, tehát az átlaghőmérséklet a következőképpen alakul:

$$\Delta T_{átlag} = \frac{\Delta T_N - \Delta T_k}{\ln \frac{\Delta T_N}{\Delta T_k}}$$

$$\Delta T_{átlag} = \frac{100}{1.79} = 55.811℃$$

$$m_\tau = 5142{,}47 \text{ kg leves/tétel}$$

-a tápleves tömegárama [kg/s]



ábra. Sterilezés anyagmérlege

$$Q_{cs} = m \cdot c_p \cdot \Delta T$$

$$Q_{cs} = 5142{,}47 \cdot 4.118 \cdot (120 - 20) = 2117669{,}15 \text{ kJ}$$

$$T = \frac{Q_{cs}}{K} \cdot A \cdot \Delta T_{átlag}$$

$$K = 2 \text{ kW/m}^2\text{K}$$

$$A = H_k \cdot 2 \cdot \pi \cdot r$$

$$A = 2.987 \cdot 2 \cdot \pi \cdot \frac{2.177}{2} = 20.441 \text{ m}^2$$

$$A_{szf} = 2 \cdot \pi \cdot a \cdot \left[\frac{a+c^2}{\sqrt{a^2+c^2}} \cdot \frac{\arcsin(\sqrt{a^2-c^2})}{c}\right]$$

$$A_{szf} = 5.318 \text{ m}^2$$

$$T = \frac{5085985.011}{2 \cdot (20.441 + 5.318) \cdot 55.811} = 1768.858 \text{ s} = 0.491 \text{ h}$$

$$m_g \cdot r = m \cdot c_p \cdot \Delta T$$

$$m_g = \frac{m_\tau \cdot c_p \cdot \Delta T}{r}$$

Ahol:

r - latens hő (az a hőmérséklet, amely lehetővé teszi a fázisátalakulást) [J/kg]

$$r = 2151 \cdot 10^3 \text{ J/kg}$$

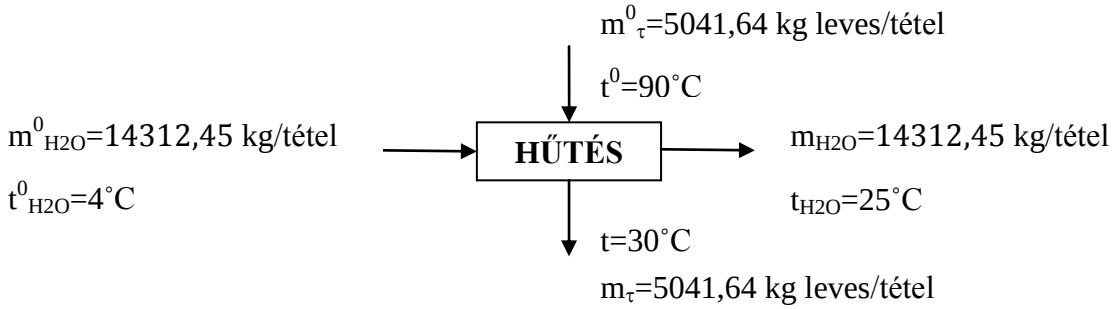
$$m_g = \frac{m_\tau \cdot c_{p\,H2O} \cdot (t - t_0)}{r}$$

$$m_g = \frac{12350.619 \cdot 4118 \cdot (120 - 20)}{2151 \cdot 10^3} = 2364.474 \text{ kg/tétel}$$

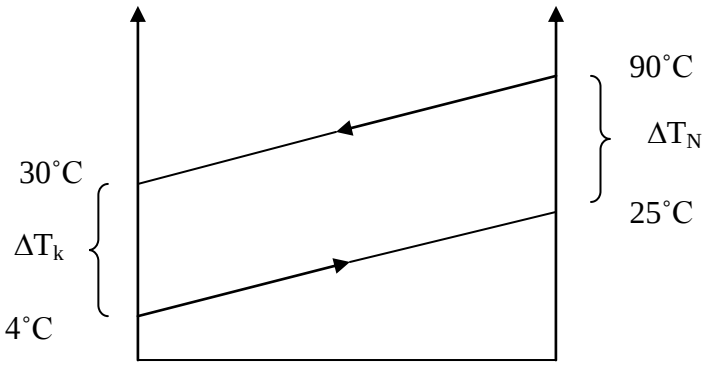
$$\dot{Q_g} = \frac{m_g}{T} = 1.336 \text{ kg/s}$$

3.5. Hűtés hőmérlege

A tápleves lehűl 90°C-ra, majd ezt követően 30°C-ra hűtjük vissza 4˚C-os víz segítségével.



ábra. Hűtés anyagmérlege



ábra. Hűtés hőlefutási diagramja

$$\frac{\Delta T_N}{\Delta T_k} = \frac{65}{26} = 2.5$$

$$\Delta T_{átl} = \frac{\Delta T_N - \Delta T_k}{\ln \frac{\Delta T_N}{\Delta T_k}} = \frac{65 - 26}{\ln \frac{65}{26}} = 42.562°C$$

$$m^0_\tau \cdot c^0_{p_\tau} \cdot t^0 + m^0_{H_2O} \cdot c^0_{p_{H_2O}} \cdot t^0_{H_2O} = m_\tau \cdot c_{p_\tau} \cdot t + m_{H_2O} \cdot c_{p_{H_2O}} \cdot t_{H_2O}$$

A szakirodalomban (Szép és András, 2010) talált fajhő értékek:

$$c_{p_\tau}^{30°C} = 4177 \cdot (1 - x) = 4114 \text{ J/kgK}$$

$$c_{p_\tau}^{90°C} = 4204 \cdot (1 - x) = 4140 \text{ J/kgK}$$

$$c_{p_{H_2O}}^{4°C} = 4200 \text{ J/kgK}$$

$$c_{p_{H_2O}}^{25°C} = 4183 \text{ J/kgK}$$

$$m_{H_2O}^0 = \frac{m_\tau \cdot c_{p_\tau} \cdot t + m_{H_2O} \cdot c_{p_{H_2O}} \cdot t_{H_2O} - m_\tau^0 \cdot c_{p_\tau}^0 \cdot t^0}{c_{p_{H_2O}}^0 \cdot t_{H_2O}^0}$$

$$m_{H_2O}^0 = \frac{5041{,}64 \cdot 4114 \cdot 30 + m_{H_2O} \cdot 4183 \cdot 25 - 5041{,}64 \cdot 4140 \cdot 90}{4200 \cdot 4}$$

$$m_{H_2O} = \frac{4140 \cdot 90 - 4114 \cdot 30}{4183 \cdot 25 - 4200 \cdot 4} \cdot 5041{,}64 = 14312{,}45 \text{ kg/h } H_2O$$

$$m_{H_2O}^0 = 14312{,}45 \cdot 1 = 14312{,}45 \text{ kg } H_2O/\text{tétel}$$

4. Szivattyúk tervezése és méretezése

A szintkülönbségek miatt szivattyúkra van szükségünk a folyadékok áramoltatásához. A szivattyúk tervezéséhez a következő adatokra van szükség .

táblázat. A szivattyúk tervezéséhez szükséges adatok

Zóna	**Hosszúság**	**Ellenállások**			
Puffer, reaktor	15 m	Könyök $\xi = 2(90°)$	Csap $\xi = 2$	Belépés $\xi = 0.2$	Kilépés $\xi = 1$
Hőcserélő, reaktor		3	2	1	1

Meg kell határozni az áramlási sebességet.

$$V_\tau = W \cdot S$$

$$W = \frac{4 \cdot m_\tau}{\pi \cdot d_b^2 \cdot \rho_\tau}$$

Ahol:

W - áramlási sebesség [m/s]

Meghatározzuk a cső belső átmérőjét:

$$d_b = d_k - (2 \cdot \delta_{fal})$$

$$d_b = 45 - (2 \cdot 2) = 41 \text{ mm}$$

$$m_\tau = 5142{,}47 \frac{\text{kg}}{\text{tétel}} = \frac{5142{,}47}{1800} = 2{,}856 \text{ kg/s}$$

$$W = \frac{4 \cdot 2{,}856}{\pi \cdot (41 \cdot 10^{-3})^2 \cdot 1005{,}43} = 2{,}152 \text{ m/s}$$

Meghatározzuk a fellépő nyomás veszteségeket:

1. Dinamikus nyomásesés

$$\Delta p_{dinamikus} = \frac{\rho \cdot W^2}{2}$$

$$\Delta p_{dinamikus} = \frac{1005{,}43 \cdot 2{,}152^2}{2} = 2328{,}125 \text{ Pa}$$

Ahol:

$\Delta p_{dinamikus}$- dinamikus nyomásesés [Pa]

ρ-tápleves sűrűsége [kg/m^3]

2. Súrlódási nyomásesés

$$\Delta p_{súrlódás} = \lambda \cdot \rho \cdot \frac{W^2}{2} \cdot \frac{L}{d_b}$$

Lamináris áramlás esetén: $\lambda = \frac{64}{Re}$

Turbulens áramlás esetén: $\lambda = \frac{0.3164}{\sqrt[4]{Re}}$

$$Re = \frac{\rho \cdot W \cdot d}{\eta}$$

$$Re = \frac{1005{,}43 \cdot 2{,}152 \cdot 0{,}045}{1 \cdot 10^{-3}} = 97365{,}84 \rightarrow \text{turbulens}$$

$$\lambda = \frac{0.3164}{\sqrt[4]{97365{,}84}} = 0.0179$$

$$\Delta p_{súrlódás} = 0.0179 \cdot 1005.43 \cdot \frac{2{,}152^2}{2} \cdot \frac{10}{0.041} = 10.164{,}25 \text{ Pa}$$

Ahol:

$\Delta p_{súrlódás}$- súrlódási nyomásesés [Pa]

λ-csősúrlódási együttható

η-dinamikai viszkozitás [Pa·s]

L – a cső hossza [m]

3. Helyi nyomásesés

$$\Delta p_{helyi} = \sum \xi \cdot \Delta p_{dinamikus} = \sum \xi \cdot \frac{\rho \cdot W^2}{2}$$

$$\Delta p_{helyi} = (3 \cdot 2 + 2 \cdot 2 + 1 \cdot 0.2 + 1 \cdot 1) \cdot 2328{,}125 = 26.075 \text{ Pa}$$

Ahol:

Δp_{helyi} - helyi nyomásesés [Pa]

ξ-ellenállás

4. Geometriai nyomásesés

$$\Delta p_{geo} = (h_2 - h_1) \cdot \rho \cdot g$$

$$\Delta p_{geo} = (3{,}748 - 0.469) \cdot 1005{,}43 \cdot 9.81 = 32341{,}65 \text{ Pa}$$

5. Statikus nyomásesés

$$\Delta p_{statikus} = 0$$

$$\Delta p_{total} = \Delta p_{dinamikus} + \Delta p_{súrlódás} + \Delta p_{helyi} + \Delta p_{geo} + \Delta p_{statikus}$$

$$\Delta p_{total} = 2.328{,}125 + 10.164{,}25 + 26.075 \; + \; 32.341{,}65 \; + 0 = 70.909{,}02 \text{ Pa}$$

5.1.Szivattyú teljesítmény szükséglete

$$N_{számított} = \frac{V_\tau \cdot \Delta p_{tot}}{\eta} = \frac{m_\tau \cdot \Delta p_{tot}}{\eta \cdot \rho_{tápleves}}$$

$$N_{számított} = \frac{3{,}237 \cdot 70.909{,}02}{0.8 \cdot 1005{,}43} = \; 285{,}36 \text{ W}$$

$$N_{reál} = 4 \cdot N_{számított}$$

$$N_{reál} = 4 \cdot 285{,}36 \; = 1.141{,}47 \text{ W} = 1{,}14 \text{ kW}$$

Ahol:

η-hatásfok (80%)

6. Köpeny méretezése

A köpenyt használhatjuk hűtésre, sterilezésre, illetve fűtésre. Ismert, hogy a köpeny általában a reaktor csak bizonyos százalékát (5 cm-el a folyadékszint alatt) fedi.

Első lépésként határozzuk meg a folyadékszint magasságát a hengeres részben:

$$V_f = V_R - V_{sz}$$

Ahol:

V_f – folyadék térfogata a hengeres részben [m^3]

$$H_f = \frac{4 \cdot V_f}{\pi \cdot \Delta^2} = 4 \cdot \frac{V_h - V_{sz}}{\pi \cdot \Delta^2}$$

$$H_f = 4 \cdot \frac{V_u - V_{sz}}{\pi \cdot {D_b}^2}$$

$$H_f = 4 \cdot \frac{5{,}7989 - 0{,}689}{\pi \cdot 1{,}706^2} = 2{,}23\text{m}$$

A köpeny belső átmérőjének meghatározása:

$$D_b = D_k + 2 \cdot x$$

Ahol:

x– a reaktor és a köpeny közötti távolság (x=40 mm)

$$D_b = 1{,}7178 + 2 \cdot 0.04 = 1{,}797 \;\; \text{m}$$

Reaktor teljes átmérője köpennyel együtt:

$$D_{tot} = D_b + 2 \cdot \delta_{falköpeny}$$

$$D_{tot} = 1{,}797 + 2 \cdot 0.00543 = 1{,}807 \text{ m}$$

A köpeny magassága a hengeres részen:

$$H_k = H_f - 0.05$$

$$H_k = 2{,}23 - 0.05 = 2{,}18\ \text{m}$$

7.Reaktor tömegének meghatározása

$$M_R = M_{R'} + M_k$$

$$M_{R'} = M_H + 2 \cdot M_{szf}$$

Szakirodalomból választott 304 ausztenikus acél sűrűsége 7.9 kg/dm^3 (www.directline.ro).

$$\rho_{acél} = 7.9\ \frac{kg}{dm^3} = 7900\ \frac{kg}{m^3}$$

$$V_R = \frac{\pi \cdot D_b^2 \cdot H_h}{4} - \frac{\pi \cdot D_k^2 \cdot H_h}{4}$$

$$V_R = \frac{\pi}{4} \cdot H_h \cdot \left(D_k^2 - D_b^2\right)$$

$$V_R = \frac{\pi}{4} \cdot 2{,}81 \cdot (1{,}717^2 - 1{,}706^2) = 0{,}084\ \text{m}^3$$

$$M_H = V_R \cdot \rho_{acél}$$

$$M_H = 0.084 \cdot 7900 = 663{,}747\ \text{kg}$$

$$M_{R'} = M_H + 2 \cdot M_{szf}$$

$$M_{szf} = V_{fal} \cdot \rho_{acél}$$

$$V_{fal} = \frac{\pi}{6} \cdot (H_{sz} + \delta_{fal}) \cdot D_k^2 - \frac{\pi}{6} \cdot H_{sz} \cdot D_b^2$$

$$V_{fal} = \frac{\pi}{6} \cdot (0.469 + 0.00543) \cdot 1{,}717^2 - \frac{\pi}{6} \cdot 0.469 \cdot 1{,}706^2 = 0.0171\ \text{m}^3$$

$$M_{szf} = 0.0171 \cdot 7900 = 135{,}09\ \text{kg}$$

$$M_{R'} = 663{,}747 + 2 \cdot 135{,}09 = 933{,}927\ \text{kg} \approx 934\ \text{t}$$

$$M_k = \frac{\pi \cdot H_k}{4} \cdot \left(D_k^2 - D_b^2\right) = \frac{\pi \cdot H_k}{4} \cdot \left(D_k^2 - D_b^2\right)$$

$$V_k = \frac{\pi \cdot 2{,}18}{4} \cdot (1{,}717^2 - 1{,}706^2) = 0.0513\text{m}^3$$

Ahol:

H_k- köpeny magassága [m]

M_k-köpeny tömege [kg]

V_k- köpeny térfogata [m^3]

$$M_k = V_k \cdot \rho_{acél}$$

$$M_k = 0.0513 \cdot 7900 = 405{,}57\ \text{kg}$$

$$M_R = 933{,}927 + 405{,}57 = 1.339{,}50\ \text{kg} \approx 1{,}34\ \text{t}$$

$$M_R = 1.339{,}50 \cdot 1.1 = 1.473{,}45\ \text{kg} = 1{,}47\ \text{t}$$

Reaktor teljes tömege a táplevessel együtt.

$$M_l = 5{,}7989 \cdot 1005{,}43 = 5.830{,}38\ \text{kg} = 5{,}83\ \text{t}$$

$$M_{R\,tot} = M_R + M_l$$

$$M_{R\,tot} = 1{,}47 + 5{,}83 = 7{,}3\ \text{t}$$

8. A keverő méretezése

A fermentáció során turbina lapátkeverőt (. táblázat) alkalmazunk, amely által homogén körülményeket biztosítunk az ideális bakteriális növekedés elérése szempontjából.

táblázat. A lapátkeverő geometriai jellemzői (Forrás: Szép és András, 2010)

Jellemzői	**D/d**	**H_1/d**	**H_2/d**	**H_3/d**	**S/d**	**n_s**
Lapátkeverő $\frac{L}{d} = 0.25$ $\frac{w}{d} = 0.2$	3	0,5	1	1	0.1	4

Ahol:

d- a lapát hossza [m]

D- a reaktor belső átmérője [m]

H_1- az első és a második keverőlapát közötti távolság [m]

H_2 –a második és a harmadik keverőlapát közötti távolság [m]

H_3- a legalsó keverő alja és a reaktor alja közötti távolság [m]

L- a lapátrész hossza [m]

w - a lapátrész magassága [m]

s - a hullámtörő szélessége [m]

$$\frac{D}{d} = 3$$

$$d = \frac{D}{3} \rightarrow d = \frac{1{,}706}{3} = 0{,}568\ \text{m}$$

$$\frac{H_1}{d} = 0.5 \rightarrow H_1 = 0.284\ \text{m}$$

$$\frac{H_2}{d} = 1 \rightarrow H_2 = 0{,}568\ \text{m}$$

$$\frac{H_3}{d} = 1 \rightarrow H_3 = 0{,}568\ \text{m}$$

$$\frac{S}{d} = 0.1 \rightarrow S = 0{,}0568\ \text{m}$$

$$\frac{L}{d} = 0.25 \rightarrow L = d \cdot 0.25 = 0{,}568 \cdot 0.25 = 0{,}142$$

$$\frac{w}{d} = 0.2 \rightarrow w = d \cdot 0.2 = 0{,}568 \cdot 0.2 = 0.113$$

8.1. A keverő teljesítményszükségletének meghatározása

$$P = \rho \cdot n^3 \cdot d^5 \cdot \frac{C}{Re^m}$$

Ahol:

P - számított teljesítmény [W]

P_i - indítási teljesítmény [W]

n- a keverő fordulatszáma [rot/s]

C, m – Re alapján kiválasztott értékek

d - a keverő átmérője [m]

ρ - a tápleves sűrűsége [kg/m^3]

Keverési Re szám meghatározása tudva, hogy a keverő fordulatszáma 2 fordulat/perc:

$$Re_k = \frac{d^2 \cdot n \cdot \rho}{\eta}$$

Ahol:

η - dinamikai viszkozitás [Cp] (táblázatból vett érték)

D - a keverő átmérője [m]

n - a keverő fordulatszáma [rot/s]

Behelyettesítve:

$$Re_k = \frac{0{,}568^2 \cdot 2 \cdot 1005{,}43}{0.8 \cdot 10^{-3}} = 810.939{,}62$$

Lapátkeverő, illetve Re=10^3....510^4 közötti érték esetén:

C=5.98 (Szép és András, 2010)

m=0.15 (Szép és András, 2010)

Behelyettesítve:

$$P = 1005{,}43 \cdot 2^3 \cdot 0{,}568^5 \cdot \frac{5.98}{810.939{,}62^{0.15}} = 369{,}035\ W$$

Három keverőre számítva:

$$P = 3 \cdot 369{,}035 = 1.107{,}107\ W$$

Innen az indítási teljesítményszükséglet:

$$\frac{P_i}{P} = 0.134 \cdot Re_k^{0.22} + 1$$

$$P_i = P \cdot 0.134 \cdot Re_k^{0.22} + 1$$

$$P_i = 369{,}035 \cdot (0.134 \cdot 810.939{,}62^{0.22} + 1) = 1355{,}65\ W = 1{,}35\ k$$

8.2. A keverő tengelyének méretezése

Meghatározzuk a keverő tengelyének az átmérőjét:

$$d = \sqrt[3]{\frac{16 \cdot M_t}{\pi \cdot \sigma_a}}$$

Ahol:

M_t – forgató vagy torziós nyomaték [Nm]

σ_a - megengedett nyomaték [N/m^2]

$$\sigma_a = 1.47 \cdot 10^7 Pa$$

A forgatónyomaték értéke mindig a motor teljesítményétől függ:

$$M_t = \frac{9.74 \cdot 10^3 \cdot k \cdot P \cdot \eta}{n}$$

Ahol:

P– a motor teljesítménye [W]

k – túlterhelési koefficiens

Behelyettesítve:

$$M_t = \frac{9.74 \cdot 10^3 \cdot 2.5 \cdot 35 \cdot 0.97}{120 * 1000} = 6889.02\ Nm$$

$$d = \sqrt[3]{\frac{16 \cdot 6889.02}{\pi \cdot 1.47 \cdot 10^7}} = 0.133\ m$$

d_{STAS}=0.14 m

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönet és mély tisztelet illeti vezetőtanáromat, dr. Miklóssy Ildikó adjunktust a munkám, a dolgozat megírása során nyújtott önzetlen, értékes szakmai segítségéért.

Köszönettel tartozóm a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Biomérnöki tanszék oktatóinak és munkatársainak, akik ezen dolgozat elkészítésében segítséget nyújtottak.

Köszönet illeti Hargita Megyéért Egyesületet az anyagi támogatásért.

Tartalom

1. Fejezet : Irodalmi áttekintés 3

1.1. Bevezető 3

1.2. Anyagcsere az ipari szintézisekben 5

1.3.Az anyagcsere tárgya és módszerei 8

1.3.1. Anyagcseremérnökség alkalmazásai 8

1.3.2. Alkalmazható gazdatörzsek(*Escherichia coli* -Keio collection, *Saccharomyces*, *Clostridium*) 9

1.3.3. Technológiák alkalmazása, integrált megoldások 10

1.4. Anyagcsere módszerei 14

1.4.1. Géntechnológiák, Génbeviteli módszerek, heterológ gének alkalmazása 14

1.5. Az 1,4-butándiol előállítása 17

1.6. Transzkriptomikai eredmények alkalmazása anyagcseremérnökségben 21

1.6.1. Metabolikus útvonalak vizsgálatának lehetőségei, transzkriptom elemzés 21

2. Anyag és módszer 23

2.1. *E. coli* K12 MG16D3(DE3) mutáns törzsek létrehozása 23

2.1.2. Génspecifikus kazetta elkészítése polimeráz láncreakcióval (PCR) 23

2.1.3. Kémiai kompetens sejtek készítése és transzformálása pKD46-al 27

2.1.4. Elektrokompetens sejtek készítése és elektroporálás 28

2.1.5. Antibiotikum rezisztencia megszüntetése 31

2.2. Fermentációs kísérletek nagyobb térfogatban 32

2.3. Termelő törzsek génexpressziós profilelemzése RT-qPCR módszerrel 33

3. Eredmények és értékelés 35

3.1. E. coli K12 MG16D3(DE3) mutáns törzsek létrehozása 35

3.2. Fermentációs kísérletek nagyobb térfogatban 39

3.3. Termelő törzsek génexpressziós profilelemzése RT-qPCR módszerrel 41

4. Következtetések 49

BIBLIOGRÁFIA 50

Tervezési rész 53

1.1. A gyártási technológia folyamatábrája 53

1.1.1. Termelés meghatározása a fermentorban 53

2. Reaktor méretezése 59

2.1. Reaktor térfogatának meghatározása 59

2.2. Reaktor magasságának és átmérőjének meghatározása 59

2.3. Falvastagság meghatározása 60

2.4. Reaktor külső átmérőjének meghatározása 61

3. Anyagmérlegek meghatározása 64
3.1. Fermentáció anyagmérlege 64
3.2. Elválasztás anyagmérlege 65
3.3. Hőmérleg/Energiamérleg 67
3.4. Sterilezés hőmérlege 67
3.5. Hűtés hőmérlege 69
4. Szivattyúk tervezése és méretezése 70
6. Köpeny méretezése 72
7.Reaktor tömegének meghatározása 73
8.A keverő méretezése 74
8.1. A keverő teljesítményszükségletének meghatározása 75
8.2. A keverő tengelyének méretezése 76
Köszönetnyilvánítás 77