

VIZSGÁLATOK A BAKTERIÁLIS FEHÉRJE-PRODUKCIÓ
KÖRÉBŐL

Gyógyszerészdoktori értekezés

Készült
a Szegedi Orvostudományi Egyetem Orvosi Vegytani
Intézetében



Irta:

TÖRÖK ANGELA
gyógyszerész

SZEGED

1973

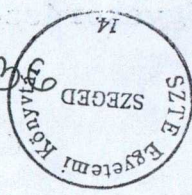
B 5036

NOTES - BUREAU OF THE ARMY

RECEIVED

RECEIVED

B 5036



RECEIVED

RECEIVED

RECEIVED



RECEIVED

RECEIVED

RECEIVED

RECEIVED

RECEIVED

T A R T A L O M

	oldal
1. BEVEZETÉS	2
2. CÉLKITÜZÉS	9
3. KISÉRLETI RÉSZ	10
3.1. Felhasznált módszerek, eszközök, reagensek, rövidítések	10
3.2. Metanol hasznosítása fermentációs uton	20
3.2.1. Törzsgyűjtés és szelekció	20
3.2.2. Felületi kulturák készítése szilárd táptalajon	24
3.2.3. Lombikkulturák készítése tápoldatban	25
3.2.4. Tömegtenyészetek készítése kísérleti fermentorban	27
3.3. Fermentációs technológia	27
4. A FERMENTÁCIÓ SORÁN NYERT VÉGTERMÉK FEHÉRJE- ÉS AMINOSAV TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA	35
4.1. A vizsgálati anyag előkészítése	37
4.2. A végtermék aminosav összetételének vizsgálata papirkromatográfián	38
4.2.1. Egydimenziós felszálló papirkromatográfia	39
4.2.2. Elektroforézissel kombinált papirkromatográfia	42
4.2.3. Egydimenziós leszálló papirkromatográfia	44
4.2.4. Kétdimenziós papirkromatográfia	46
4.3. Ioncserélő vékonyréteg-kromatográfia	55
4.4. Aminosav összetétel meghatározása kvantitatív analízissel	58
4.4.1. A minta hidrolizise	59
4.4.2. Kétoszlopos eljárás	61
4.4.3. Egyoszlopos eljárás	62
4.4.4. Triptofán meghatározás	69
5. A KISÉRLETI EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	76
6. ÖSSZEFOGLALÁS	80
7. IRODALOM	81

1. B E V E Z E T É S

A Föld népessége a megelőző korszakokhoz viszonyítva rohamosan nő. Ez a növekedés különösen a közegészségügyi viszonyok javulásával /járványok megszűnése, gyermekhalandóság csökkenése stb./ nyomán egyre fokozódik. A világstatisztikai adatok szerint az élelmiszerellátás nem tudja követni a népszaporodást. Bár a közlekedés fejlesztésével sikerült megszüntetni az elemi csapások következtében még a múlt században is gyakori éhínségeket, másrészt a mezőgazdaság modernizálása az élelmiszerellátást világméretekben megjavította, egyre fenyegetőbb az a prognózis, hogy az élelmiszertermelés nem áll arányban a népszaporodással. Különösen aggasztóak a fehérjeellátás problémái, mivel a nélkülözhetetlen állati fehérje termelésének ma már jól értékelhető felső határához rohamosan közeledünk.

A fehérjeellátás hiánya a túlnépesedett és gazdaságilag elmaradott országokban egyre nagyobb nehézséget okoz. Az állati fehérje termelése még a legfejlettebb országokban is meglehetősen összetett probléma. Elsősorban a takarmányellátás határozza meg egy országnak az állattenyésztési viszonyait mennyiségi és minőségi tekintetben egyaránt, ez pedig a helyi földrajzi adottságoktól függ. Nem véletlen,

hogy a szarvasmarhatenyésztés elsősorban azokon a területeken fejlődött ki nagymértékben, ahol az évi csapadékmennyiség elegendő /dus legelő/ a megfelelő mennyiségű zöld takarmány termesztésére; ahol viszont a klíma a kukorica termesztésére kedvező, ott a sertésenyésztés vált intenzívvé.

A mezőgazdasági takarmánytermelés, sőt a tengerekből nyerhető takarmánynyersanyagok termelésének lehetősége már a közeli évtizedekben megközelíti a végső határt és a takarmányhiány pótlását ipari úton kell megoldani.

Közismert, hogy a növényvilág szénforrásának biztosítása a napenergia útján a levegő széndioxid tartalmának rovasára történik /fotoszintézis/. A mezőgazdasági termőföld nagysága /még ha sikerül is a termőterületet fokozni/ meghatározott, ezért világszerte kísérleteznek nagyobb vízterületek hasznosításával algatenyészetek létesítése céljából. A magas fehérjetartalmu egysejtű algákkal folytak kezdetben rendkívül biztató kísérletek. A termőterület növelésével kapcsolatos dimenzióanalízis adatai szerint egy kis ország fehérje igényének biztosítása esetén - ez megfelel néhány ezer tonnának - már jelentkező műszaki nehézségek miatt ez a megoldás alig jöhet számításba. Ipari takarmánytermelés széndioxidból egyelőre nem oldható meg. Bár az energiatermelés egyre olcsóbb és az atomenergia fokozott felhasználásával a jövőben szinte korlátlan mértékben fokozható, még hosszú ideig a szénforrás biztosítása a fe-

hérjetermeléshez csak alacsony oxidációs foku, széntartalmu termékekből fedezhető.

Ilyen szénforrások a magas szénhidráttartalmu mezőgazdasági hulladékok. A szénhidrátokból történő fehérjeszintézis már régóta igen fejlett iparág. Ott, ahol a cukoripar fejlett /Németország, Kuba stb./, a cukorgyári melasznak élesztőgomba termelésére való felhasználásával aránylag olcsó fehérjetakarmány állitható elő. Ma már a melasz, de az egyéb alapanyagok /fahulladék, szulfitlug stb./ sem fedezik az élesztőipar nyersanyag igényét. Az utóbbi évtizedekben megindult a kutatás más, nem szénhidráttartalmu szénforrások után. A legutóbbi időben feltárt szénhidrogénmezők biztosítják a keresett szénforrást és megindulhattak a kísérletek a mikroszervezetekkel történő szénhidrogén-fehérje konverzió irányában /8,25,57/.

Az antibiotikumok felfedezése és nagyipari méretekben való gyártása a fermentációs műveleteknek a gyógyszeriparban való bevezetésével /pl. szteroidok bakteriális átalakítása, B₁₂ vitamin, esszenciális aminosavak termelése/ a fermentációs technológiát világszerte rendkívüli mértékben kifejlesztette. Ez a fejlődés már a 30-as évek végén a szteroidok bakteriológiai átalakításával hazánkban is megindult, majd az antibiotikum kutató Központi Biokémiai Ipari Kutató Labornak a 40-es évek végén történt létesítésével az 50-es évek elején az antibiotikumgyártás megindulásával elérte a világszínvonalat. Ilyen előzmé-

nyek után kézenfekvő volt a bakteriális fehérjetermelésre irányuló kísérleteknek a megindítása, annál is inkább, mert a felszabadulás után a Tihanyi Biológiai Intézetben a szteroidok mikrobiológiai átalakításával kapcsolatban sikerült folyékony szénhidrogének, elsősorban paraffinolaj felhasználásával tapasztalatokat szerezni. Ezeknek a tapasztalatoknak alapján a szegedi szénhidrogénmező felfedezésekor Intézetünk bekapcsolódott a szénhidrogén-fehérje témába. Ekkor már külföldön /SZU, USA, Anglia/ szintén megindultak a folyékony szénhidrogénekkel történő vizsgálatok, sőt a földgáznak szénforrásként való felhasználására irányuló kísérletek is. Időközben az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság szervezésével más intézetekben is, így a Központi Élelmiszeripari Kutatóintézetben, Gyógyszerkutató Intézetben indultak kísérletek paraffinolaj-szénforrás felhasználására az élesztőgomba fermentációhoz.

A témával ma már foglalkozik az UNESCO, a WHO, a FAO főleg abból a szempontból, hogy a fermentációs uton termelt fehérjetakarmányok nem tartalmazznak-e az állati szervezetre és közvetve az emberi szervezetre nézve káros anyagokat. Különösen a folyékony szénhidrogének, mint pl. a gázolaj, elágazó szénláncu paraffinokat és aromás szénhidrogéneket is tartalmaz és félt, hogy ezek között előforduló karcinogén hatású anyagok nem moshatók ki tökéletesen a termék-
ből, sőt esetleg az állati szervezetben kumulálódnak.

Az elmúlt 10 év alatt normál paraffinolajjal kísérle-

teztek /19,55,58/. Az erjesztéshez használható paraffinolajat úgy készítik, hogy az elágazó láncokat tartalmazó C_{15} - C_{28} frakciót molekulaszűrőssel tisztítják, azaz a nyers terméket olyan műgyantán bocsátják keresztül, amely térhálózatainak méreteiből adódóan csak a normál láncokat engedi át. Ez a művelet természetesen megdrágítja a tenyésztéshez szükséges tápanyagot. Paraffinolajon kívül felhasználhatnak gázolajat is /15,36,40/. Mindkettő alkalmazása esetén bonyolítja az eljárást a sejtek olajmentesítése.

A legújabb időkben felfedezett földgáztelepek olyan nagy szénforráskészletet tartalmaznak, amelyek a becslések szerint évszázadokra is képesek biztosítani a fermentáció útján nyert fehérjéhez a nyersanyagot. Régóta ismert, hogy a szénhidrogénmezők talajában tenyésznek olyan mikroorganizmusok, amelyek metánt képesek hasznosítani, nemcsak energiatermelésre, hanem a sejteik felépítéséhez szükséges szénatomok beépítésére /4,17,21,53,56/. Éppen ezért ma már kiterjedt vizsgálatok folynak a földgáz-fehérje konverzió ipari megvalósítására. Az eddig ismert eljárások mindegyikénél alapvető problémaként merül fel a vízben alig oldódó metánnak a fermentumban történő diszpergálása. A hidrodinamikai vizsgálatok szerint a művelet energiaigénye a termelés volumenével fokozódik, sőt olyan tapasztalatok is vannak, hogy a folyamat hasznosítási tényezője a fermentum mennyiségének növelésével rohamosan csökken, ami végeredményben a termelést megdrágítja. Ezért legújabbban a mai igényekhez mérten korlátlan mennyi-



ségben rendelkezésre álló földgázból előállítható vizoldékony, olcsó anyagokkal kísérleteznek. Ilyen termékek: a metanol, /1,24,26/ az etanol és az ecetsav, amelyeket számos mikroorganizmus képes szénforrásként hasznosítani. Így pl. egyes Candida féleségek, Pseudomonasok /pl. Pseudomonas aeruginosa/ szénszükségletét teljesen kielégíti egymagában az ecetsav /27/. Vannak olyan Pseudomonasok, amelyek számára az ecetsavnál olcsóbb metilalkohol elegendő az obligát szénigény kielégítésére /7,23/.

Ma már igen fejlett fermentációs iparaggá fejlődött a Richter Gedeon Gyógyszergyárban már a 30-as évek végén megindított szteroid fermentáció, amely főleg szexuálhormonok és kortikoidok mikrobiológiai módszerek beiktatásával történő termelésre irányult. Az Intézetünkben szerzett tapasztalatok szerint mind az acetát-, mind a metanol-hasznosító mikroorganizmusok között akadnak olyan törzsek, amelyek alkalmasak szteroidok bakteriális átalakítására. Ezek szerint várható, hogy a kétféle iparág, a szénhidrogén-fehérje konverzió és szteroid fermentáció összekapcsolható.

Intézetünkben a vizsgálatok tulajdonképpen két irányban folynak. Egyrészt csontképző faktorokat keresnek a mezőgazdasági haszonállatok növekedésének serkentése céljából, másrészt takarmányfehérje termelése mikrobiológiai úton.

Utóbbi témakörben kezdetben az Intézet feladata csak aktív témafigyelés volt, az ismeretes hazai és külföldi

kezdemenyezéseket a továbbfejleszthetőség szempontjából kísérletileg is felülvizsgáltuk. Megvizsgáltuk a gázolajból, n-paraffinolajból és földgázból készíthető termékeket és azt, hogy ipari méretekben melyik nyersanyag használható fel jobban. A gázolaj a már említett okok miatt kiesik. Ugy látszik, hogy a földgázzal való kísérletezés folytatása időszerűvé válik. Mint említettem, a terméket a csak extrakció útján megvalósítható olajmentesítés megrágítja. Ezért áttértünk a földgázból készíthető vizoldékony anyagok hasznosításának vizsgálatára. Különösen az acetát és metilalkohol hasznosítására alkalmas mikroorganizmusok tenyésztése vezetett biztató eredményekre, ezért jelenleg a kísérletek első sorban a tenyésztéssel járó műszaki problémák megoldását szolgálják, de kísérletek folynak a takarmányozási célra felhasználható fehérjék minőségének javítására is.

2. C É L K I T Ű Z É S

A metanolnak a mikroorganizmusok által szénforrásként történő hasznosítása során felmerült technológiai problémák megoldása mellett takarmányozási szempontból alkalmas póttakarmány előállítás.

Ennek érdekében jó metanoltűrő mikroorganizmusok izolálása és ezek tenyésztése. A legmagasabb metanol koncentrációt tűrők fenntartása. Ezekkel kísérletek folytatása, amelyek a mikroorganizmus-tömeg növelésére és aminosav összetételének javítására irányulnak.

3. K I S É R L E T I R É S Z

3.1. Felhasznált módszerek, eszközök, reagensek, rövidítések

Tenyésztés: 30°-ra temperált meleg szobában végeztük.

A tenyésztési idő 35-50 óra között ingadozott.

A tápoldat és a lombikok sterilizálása autoklávban 1 atm gőztulnyomáson 30 percig tartott.

A metanol meghatározása:

A./ Meghatározás Schiff reagenssel / 50/

Oldatok: Schiff-reagens: 1 g kristályos fukszint 1 liter desztillált vízben feloldottam és hozzáadtam 25-30 ml oldatot, melyben 7-8 g nátrium-biszulfitot oldottam.

3 %-os KMnO_4 1:5 arányu foszforsav-víz elegyében

5 %-os oxálsav 1:1 arányu kénsav-víz elegyében
0,25 ml vizsgálandó anyagot 5-10 percig 35°-on tartottam.
Utána hozzáadtam 2 ml 3 %-os foszforsavas KMnO_4 oldatot,
10 percig rázogattam, 2 ml 5 %-os kénsavas oxálsavat,

2 perc várakozás után 5 ml Schiff-reagenst mértem hozzá.
1 órán át 35° on tartottam, közben állandóan kevergettem.
580 mμ-on 23 %-os etanollal szemben fotometráltam.

B./ Meghatározás kromotrópsavval /51/

Oldatok: 3 %-os KMnO_4 15 %-os foszforsavban oldva

10 %-os vizes kromotrópsavas oldat

nátriumbiszulfít

cc. kénsav

0,25 ml oldathoz /0,02-0,1 mg metanolt tartalmaz/ 2 ml

3 %-os foszforsavas KMnO_4 oldatot mértem, szobahőmérsék-

leten 4 percig rázogattam. Utána a KMnO_4 feleslegét ná-

triumbiszulfittal redukáltam. Végül az elegyhez 0,6 ml

10 %-os vizes kromotrópsavat és 10 ml koncentrált kénsa-

vat adtam hűtés és rázogatás közben, majd 50 ml-re kiegé-

szítettem desztillált vízzel. A violás-piros színt 570 mμ-

on fotometráltam.

C./ Metilalkohol meghatározása kénsavas dikromáttal /48/

Oldatok: 0,1 n kénsavas dikromát

0,1 n nátriumtioszulfát

káliumjodid

keményítő indikátor

A fermentumból kivett mintát - minthogy a módszer 0,02-

0,05 %-os metanol tartalommal adja a legpontosabb ered-

ményeket - a várható metanol tartalomnak megfelelően desz-

tillált vízzel higitottam. Ennek aliquot részét Parnas-Wagner-féle készülékbe vittem. A vízgőzdesztillációval kiűzött metanolt 0,1 n kénsavas dikromátban fogtam fel. A mérőoldat feleslegét a reakcióelegy felhigitása után 0,1 n nátriumtioszulfát mérőoldattal visszamértem.

Szobahőmérsékleten a dikromát a metilalkoholt szénsavvá oxidálja. $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} = \text{CO}_2 + 6\text{H}^+ + 6\text{e}$ $E = \frac{M}{6}$

Winkler által módosított Kjeldahl szerinti N meghatározás /18/

Oldatok: koncentrált kénsav

4 %-os bórsav oldat

33 %-os nátriumhidroxid

0,01 n kénsav mérőoldat

szelén

fenolftalein-indikátor

Groak kevert indikátor: I. metilvörös indikátor -100 ml

96 %-os etanolban 0,2 g metilvöröset oldottam.

II. metilénkék indikátor: 0,2 g metilénkéket 100 ml etanolban oldottam fel. I. és II. indikátor oldatot 2 + 1 arányban elegyítettem /34/.

A meghatározás három műveletből áll: roncsolás, desztillálás és titrálás.

Forrásban tartott koncentrált kénsavval roncsoltam, katalizátor jelenlétében. 0,01-0,05 g anyagot bemértem cigarettahüvelyből készült papírtokba, 5 ml koncentrált kénsavat és 0,05 g szelént adtam hozzá. Az elroncsolt és

kétszer desztillált vízzel hígított oldatot Parnas-Wagner-féle készülék desztilláló lombikjába öblítettem és 33 %-os nátriumhidroxiddal lugosítottam. Vizgőzzel desztilláltam. Szedőnek telített bórsav oldatot alkalmaztam. 0,01 n kénsavval titráltam Groak kevert indikátor mellett. Átmenet zöldből fakószürkén át lila színbe. A papíros tokocskák, továbbá a felhasznált kénsav nitrogénmentes voltáról időnként üres kísérletben meggyőződtem.

Kromatográfia

Papirkromatográfia

A kromatogramokat kamratelítés nélkül egydimenziós fel- és leszálló, valamint kétdimenziós módszerrel fejlesztettem ki. Az egydimenziós felszálló kromatográfiát elektroforézissel is kombináltam.

Leszálló módszerrel a kifejlesztést Labor típusu kromatográfiás szekrényben végeztem.

A frontvonal jelzésére neutrálvörös indikátort használtam. Az aminosavakkal egyidejűleg futtattam, R_F értéke megegyezik a legtávolabbra futó aminosav /LEU/ R_F értékével.

A papirelektroforézis kis feszültségű, horizontális, Labor OE-201 típusu készülékben, 300 V feszültségen, 20 mA áramerősséggel 6 óra 45 percen keresztül tartott /54/.

Ioncserés vékonyrétegekromatográfia

20x20 cm-es méretű Fixion 50x8 jelzésű lemezeket használtam. A futtatást 50^o-os termosztátban, 120 percig, 18 cm magasságig végeztem.

Az elválasztáshoz használt pufferek jellemző adatai:

I. táblázat

Jellemző adatok		Puffer		
		ekvilibráló	AS elválasztáshoz	TRP elválasztáshoz
pH		3,28	3,3	6,0
Na ⁺ koncentráció /m/		0,02	0,40	1,5
citrát konc./mól/l/		0,0067	0,40	0,03
citromsav.H ₂ O	g	1,4	84,0	7,0
nátriumhidroxid		0,8	16,0	4,0
nátriumklorid		-	-	81,9
sósav 37% /fs:1,19/	ml	1,2	5,9	-
metilcelloszolv		-	-	100
végtérfogat		1000	1000	1000

A reagensek p.a. és a.lt. minőségűek voltak.

Minden oldatot ionmentes vízzel készítettem!

Aminosav_analízis_automatikus_aminosav-analizátorral

Az aminosavak kvantitatív meghatározását automatikus aminosav-analizátorral végeztem.

A kétoszlopos eljárást SNP 1200-E típusu analizátorral hajtottam végre.⁺/

Hosszu oszlop mérete: 6,8 x 560 mm

Rövid oszlop mérete: 5,3 x 140 mm

Töltet: szulfonált polistírol Chromex KB 53 gyanta
8 % divinilbenzollal polimerizálva.

Hőfok: $50^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$

Puffer átfolyási sebesség: 24 ml/óra

A pufferekhez és a reagenshez általam felhasznált
vegyszer a gyár által előkészített formában kerül
forgalomba.

Az egyoszlopos hárompufferes eljárás: ⁺⁺/

A meghatározást Bio Cal gyártmányu, BC 200-as típusu
automatikus aminosav-analizátorral végeztem.

⁺/ Ezuton köszönöm meg Ferenczi Richárd vegyésztechnikus
/JATE, Szerveskémiai Intézet/ segítségét, amelyet az aminosav
analizátorral végzett munka során nyújtott.

⁺⁺/ Köszönöm Wöller László vegyészmérnök /Országos Takar-
mányminősítési és Ellenőrző Felügyelőség, Budapest/ segít-
ségét, valamint hogy lehetőséget biztosított a munka el-
végzésére.

Töltet: Aminex A6 szférikus gyanta-Biorad

Gyantatöltet magassága: 55 cm

Puffer átfolyási sebessége: 100 ml/óra

Ninhidrin átfolyási sebessége: 50 ml/óra

Hőmérséklet: 55°

II. táblázat: Egyoszlopos eljáráshoz alkalmazott pufferek

Jellemző adatok		Puffer		
		I.	II.	III.
pH		3,28	4,25	6,0
Na ⁺ konc. /m/		0,2	0,8	1,5
citromsav.H ₂ O		70,5	70,5	32,25
nátriumhidroxid	g	40,0	40,0	20,0
nátriumklorid		-	175,32	438,75
Brij 35		10,0	10,0	10,0
sósav /fs.1,19/	ml	61,6	41,88	-
etanol		300,0	-	-
metilcelloszolv		-	-	-
végtérfogat		5000	5000	5000

Puffer nyomások: I. puffernél: 30-35 atm

II. puffernél: 25-28 atm

III. puffernél: 15-25 atm

Standard Amino Acid Mixture -Biorad

Ninhydrin -Biorad /U.S.A./ Richmond, California-kromatog-
ráfiás tisztaság

Módosított Rosen-féle ninhidrin reagens /47/:

- 1 liter 5 mólos nátriumacetát. 3 H₂O-oldat
- 2 liter 4 %-os ninhidrin metilcelloszolvos oldata
- 2 g káliumcianid
- 20 g nátriumcitrát. 3 H₂O
- ionmentes vízzel 4 literre kiegészíteni.

Triptofán meghatározás:

SNP 1200-E típusu analizátorral történt.

Oszlop mérete: 170 x 7 mm

Töltet: Chromex KB gyanta

Hőmérséklet: 50°

Nyomás: 3 atm

Puffer: 0,35 m Na⁺ koncentrációju nátriumcitrát oldat

Előhívó reagensek

Etanolos ninhidrin reagens /44/:

0,2 g ninhidrint 100 ml 96 %-os etanolban feloldottam.

A kromatogramot a reagenssel bepermeteztem és Labor típusu kromatogram-száritószekrényben 50°-on állni hagytam.

A továbbiakban a detektálás ezen a hőfokon történt.

Acetonos ninhidrin reagens:

0,2 g ninhidrint 100 ml acetonban oldottam. A kromatogramokat áthuztam egyszer az oldatban.

Kadmiosos ninhidrin reagens /11/:

I. 1 g ninhidrint 100 ml acetonban oldottam. Sötét üvegben, hidegen tároltam.

II. 1 g kadmiumkloridot 50 ml jégcet és 100 ml desztillált víz elegyében feloldottam.

Használat előtt 100 ml I. oldathoz 20 ml II. oldatot adtam.

Kollidines ninhidrin reagens /37/:

0,2 g ninhidrint 50 ml 96 %-os etanolban oldottam, hozzáadtam 10 ml ecetsavat és 2 ml 2,4,6-kollidint.

A szín fixálása végett Plasztubol spray-vel permeteztem be a kész kromatogramokat.

Rövidítések

R II.	recésgyomorból izolált baktérium
P III.	piros pigmentet termelő baktérium
V	véglény
a	csak anorganikus nitrogén forrást tartalmazó tápoldat
b	karbamidot is tartalmazó tápoldat
Sch-Sch	Schleicher-Schüll 2043b
Wh-1	Whatman-1
Wh-2	Whatman-2
S	startpont
AS	aminosav
FEH	fehérje
KI	kékesibolya
SzB	szürkésbarna
ZK	zöldeskék
S	sárga

Aminosav rövidítések

+ /

ASP	Aszp	aszparaginsav
THR	Tre	treonin
SER	Szer	szerin
GLU	Glu	glutaminsav
PRO	Pro	prolin
GLY	Gli	glicin
ALA	Ala	alamin
CYS	Cisz	cisztin
VAL	Val	valin
MET	Met	metionin
ILE	Ileu	izoleucin
LEU	Leu	leucin
TYR	Tir	tirozin
PHE	Fea	fenilalanin
LYS	Liz	lizin
HIS	Hisz	hisztidin
ARG	Arg	arginin
TRP		triptofán

+ / A Xerox másolaton lévő rövidítések

3.2. Metanol hasznosítása fermentációs uton

A metanolnak fermentációs uton történő hasznosítása a kísérletek fázisa szerint metodikailag a következő csoportokra osztható:

Törzsgyűjtés és törzsszelekció

Felületi kulturák készítése szilárd

táptalajon

Lombik-kulturák készítése tápoldatban

/rázott kulturák/

Tömegtenyészetek készítése kísérleti

fermentorban

Fermentációs technológia

3.2.1. Törzsgyűjtés és törzsszelekció

Baktériumok gyűjtése és szelekciója

Intézetünkben a szénhidrogén-hasznosító törzsek egész sorát izoláltuk és szelektáltuk olyan táptalajon ill. tápoldatokban, amelyek szénforrásként kizárólag szénhidrogént /gázolaj, paraffinolaj, földgáz/ tartalmaztak vagy szénhidrogénből készíthető egyszerűbb szénvegyületet /szénmonoxid, metanol, etanol, ecetsav/.

A bevezetésben felsorolt megjegyzések figyelembevételével ezidő szerint mind a termék minősége, mind a

gazdaságosság szempontjából a legjobbnak a vizoldékony termékek felhasználása látszik, ezek közül is elsősorban a metanolos táptalajban történő fermentáció.

A metanol-hasznosító mikroorganizmusok különösen a baktériumok /Pseudomonasok/ körében régóta ismeretesek. Ezek igen elterjedtek a mezőgazdaságilag megművelt talajokban. Az irodalmi adatok szerint /24/ metanol tartalmu táptalajban jól tenyésztethetők, metanol tűrésük csak néhány ezrelék. A legjobb termelési eredményeket 1^o/oo-es metanol koncentrációju táptalajban érték el. 1%-os koncentrációnál már nem észleltek szaporodást. Ezek a törzsek gyakorlati szempontból nem jöhetnek számításba, mert a fermentum volumenét annyira megnövelnék, hogy a tenyészet izolálása kilátástalanná válna.

Abból a megfontolásból kiindulva, hogy a lignin metiléterekben gazdag, figyelmünk a ligninbontó mikroorganizmusok felé fordult és főleg a szegedi fűrésztelepek talajából gyűjtöttünk törzseket. Ezek között akadtak olyanok, amelyek metanol tűrése - azaz a termelés szempontjából optimális metanol koncentráció - az irodalmi-nak sokszorososa. A legjobb eredményt egy piros pigmentet termelő Pseudomonas törzsszel értük el. Ez a törzs még 10 %-os metanolos oldatban is tenyésztethető. Az optimális metanol koncentráció pedig 2-3 %. A törzs feltűnően nagy oxigén igénye miatt már a gyűjtésnél is eltekintettünk a hagyományos törzsgyűjtési és szelekciós módszerektől

/szélesztés, passzálás/ és külön erre a célra szerkesztettünk egy készüléket, melynek a lényege az, hogy a szelektálandó mikroorganizmusokat tartalmazó talajszűrletet nagy felületű anyaggal /műanyagforgács/ töltött kolonnán permetezzük át. Közben a kolonnát ellenáramban levegőztetjük. A metanol koncentrációt a talajszűrletben legalább 10 %-ra emeltük és így elértük azt, hogy a metanolt valóban jól hasznosítható, eléggé tiszta tenyészetet kaptunk. A magas metanol koncentrációnál a törzs passzálása el is hagyható és a kolonnáról lefolyó tenyészet rázógépre helyezett fermentáló lombikba vezethető.

/2. ábra./

A törzseket passzálassal tartottuk fenn. A megfelelő ásványi sókat tartalmazó /25. oldal/ tépoldathoz 1 %-nyi metanolt, 3 %-nyi agar-agart adtunk. Az étoltás ferde agarra vagy Petri csészébe kiöntött táptalajra hetenként történt. A törzseket 30^o-os termosztátban tartottuk.

Abból a meggondolásból kiindulva, hogy az állati szervezetek számára az emésztőrendszerükben található mikroorganizmusok nem ártalmasak, szarvasmarha gyomortalomból a leírás szerint izoláltuk a baktériumtörzseket. A tömegtenyésztés szempontjából leghasználhatóbb törzseket a recésgyomorból nyertek között találtuk. Ezek a baktériumok a recésgyomorban nagy számban tenyésznek fiziológiai körülmények között és hozzájárulnak az állat fehérjeellátásához. A tenyésztés során megfigyeltük, hogy

alacsony metanol koncentráció mellett többféle törzs tenyészik együtt, a metanol koncentráció emelésével számuk egyre csökken. A továbbiakban egy piros /P III/ és egy sárga pigmentet termelő, recésgyomorból izolált /R II/ törzset tartottunk fenn. Mindkettő jó metanoltűrő, még 5-10 %-os metanolból is kitenyészthető. Az R II törzs hormonsorba tartozó szteroidok átalakítására is alkalmas.

A recésgyomorból a P III törzset nem sikerült kitenyészteni. Felmerült a kérdés, melyik baktériumot kell előnyben részesíteni a takarmányozási vizsgálatokhoz. Nincs eldöntve, hogy nem tartalmaz-e káros anyagokat /pl. fotoszenzibilizátort/, valamint nem ismeretes a pigment szerkezete sem. Arról csak annyit tudunk, hogy nem karotinoid és nem azonos a prodigiozinnal. Vizzel és az általánosan használt organikus oldószerekkel nem oldható ki.

Véglények gyűjtése és szelekciója

A metanol-hasznosító mikroorganizmusok keresése során próbálkoztunk véglények metanol tartalmu tápoldatban történő fermentálásával.

A véglények kitenyésztéséhez kezdetben a szénhidrogén-mezőkön gyűjtött talajmintákkal kísérleteztünk. Legjobb eredményeket olyan hazai 60-70 évvel ezelőtt létesített értézi kutak környékéről gyűjtött mintákkal kaptuk, amelyek vize nagymennyiségű metángázt tartalmaz. A talaj-

mintákat szűrt és sterilizált Tisza-vízben szuszpendáltak és egy hét múlva paraffinolaj-agar táptalajon szélesztették. A kinőtt telepek közül a Candida és a Pseudomonas törzseket ugyancsak paraffinolaj-agar táptalajon passzáltuk. A törzsekből nagyobb méretű felületi kulturákat készítettünk és azokat a talajszűrlettel bepermeteztük. A tenyészetben kinőtt véglények közül Vorticella törzseket izoláltunk. Ezeket kalciumacetát-acetamid tápoldatban termelt Pseudomonas lombikkulturákra oltottuk és az így készült fermentumokat nagyobb méretű véglénytenyészetek készítésénél inokulumpént használtuk.

A későbbiekben metanolt tartalmazó táptalajon szélesztettük a protozoonokat. Ezeket metanol-hasznosító baktériumtörzsek tenyészetéből készült tápoldatban, valamint a baktérium-fermentum szűrletében szaporítottuk. A tenyésztés befejezéseként azt az állapotot fogadtuk el, amikor a véglények betokozódása megkezdődött és mikroszkóp alatt baktérium már nem volt látható a fermentumban.

Kísérleteinkkel a kérődzők gyomrában végbemenő baktérium-véglény konverzió mesterséges reprodukálására törekedtünk.

3.2.2. Felületi kulturák készítése szilárd táptalajon

A felületi tenyésztés Petri csészében vagy ferde agaron történt.

a tápoldat

1-2 % metanol
2 g NaNO_3
0,2 g KH_2PO_4
1 g K_2HPO_4
0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,5 g KCl
0,001 g FeSO_4 —

b tápoldat

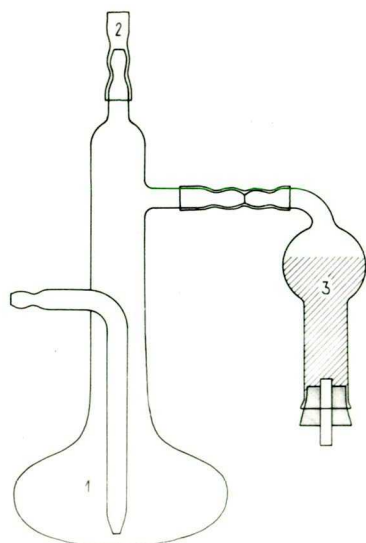
1-2 % metanol
1 g karbamid
2 g NaNO_3
0,2 g KH_2PO_4
1 g K_2HPO_4
0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,5 g KCl
0,001 g FeSO_4 —

és ivóvízzel mindkettőt 1000 ml-re kiegészítettük.

Táptalajként még 3 %-nyi agar-agart tartalmaz.

3.2.3. Lombikkulturák készítése

1. ábrán látható fermentáló lombikokban készítet-
tünk rázott és levegőzött tenyészeteket.



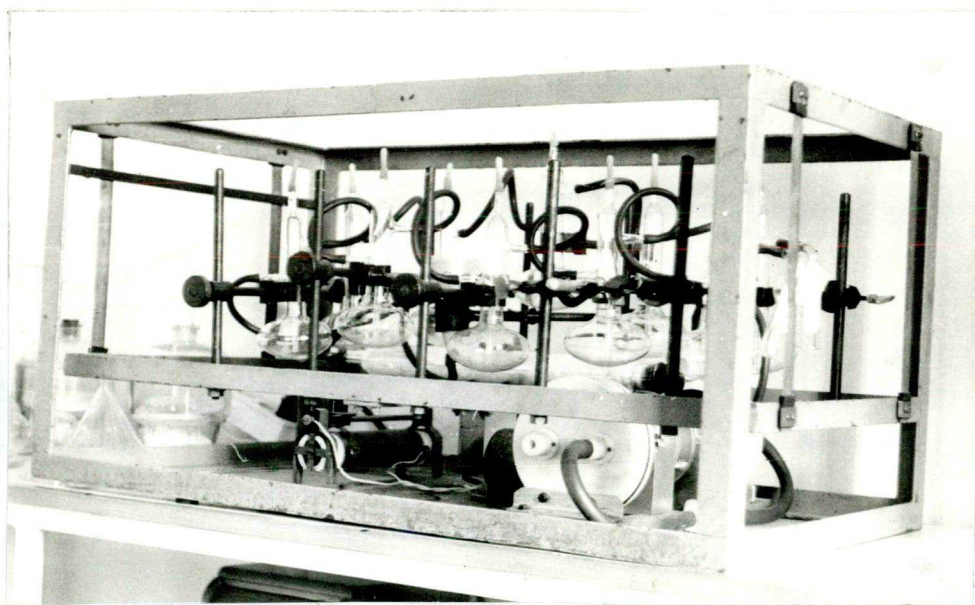
1. ábra. Fermentáló
lombik aerob tenyészete-
tekhez.

- 1. Fermentum tartály
- 2. Oltó sapka
/szemcseppentő/
- 3. Steril vattazár



A rázatást rázó gép segítségével biztosítottuk /2. ábra/. A fermentációt a és b tápoldatban végeztük.

A fermentum levegőztetésére általánosan használt vizgyűrűs kompresszor hátránya az, hogy hosszabb fermentációnál a szállított víz mennyisége megszorodik. Az Intézetünkben kidolgozott elektromágneses membrán-kompresszor azáltal, hogy olaj- és vízmentes levegőt szállít, ezt a hibát kiküszöböli. A kompresszor által szállított levegőt a fermentorba történő becsatlakozása előtt steril üveggyapottal töltött kolonnán vezettük át. Rázott és levegőzött tenyészeteket készítettünk inokulum céljára szakaszosan vagy folyamatosan működő üveggészülékben.



2. ábra. Membrán kompresszorral ellátott rázó gép

3.2.4. Tömegtenyészetek készítése kísérleti fermentorban

A fermentáció saválló acélból készült előfermentorban kezdődik. Az ebben elszaporodott mikroorganizmust tartalmazó előfermentumot, inokulumként öntjük az ugyancsak saválló acélból készült 100 l-es kísérleti fermentorba.

3.3 Fermentációs technológia

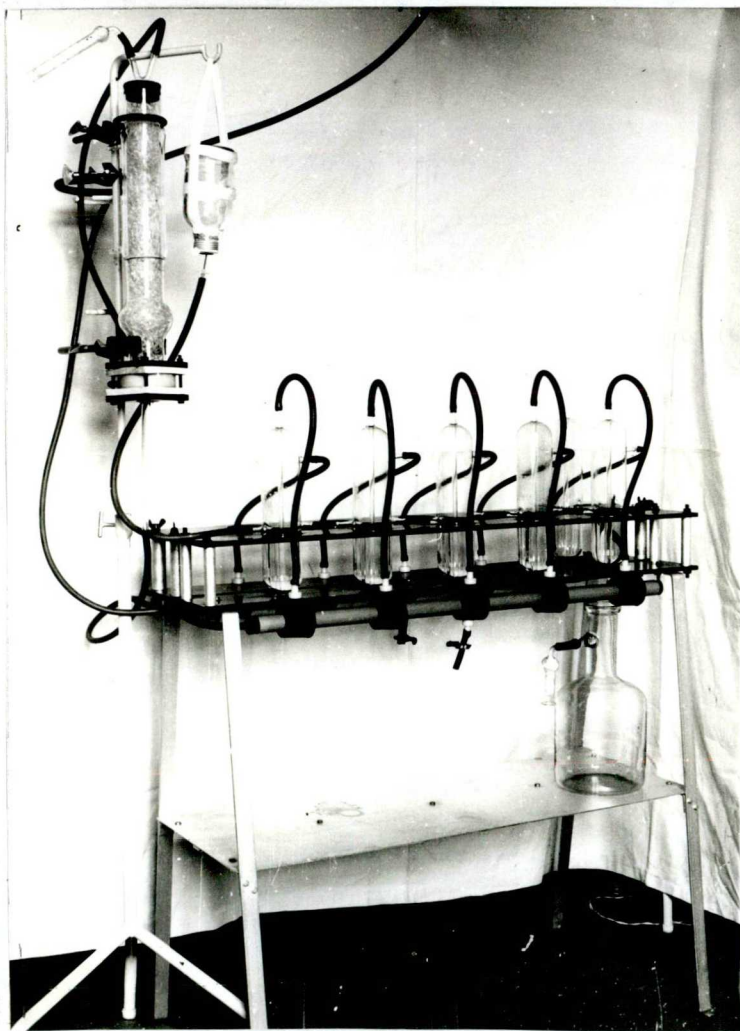
Bár fermentációs kísérleteket kizárólag lombikkulturákkal folytattam, a fehérjeprodukciónak kapcsán felmerült probléma megoldásának a megvilágítása céljából röviden vázolom az Intézetünkben évek során kialakult fermentációs technológiát. Az új technológia kialakítását a metanol alkalmazásakor felmerült különleges problémák tették szükségessé.

A fermentálás végrehajtható szakaszos és folyamatos úton, lombikkulturákban és kísérleti fermentorban. A fermentáció gazdaságossága szempontjából a folyamatos eljárás az előnyösebb.

Ezért készítettünk az Intézetünkben kikísérletezett fermentáló lombikokból álló többedényes üvegfermentort /3. ábra/. A kísérleteink célja, egyrészt folyamatos fermentáció esetén a tápoldat optimális metanol koncentrációjának megállapítása és a stacioner fermentáció se-

bességének a beállítása, másrészt a regenerált metanol mennyiségének a meghatározása volt.

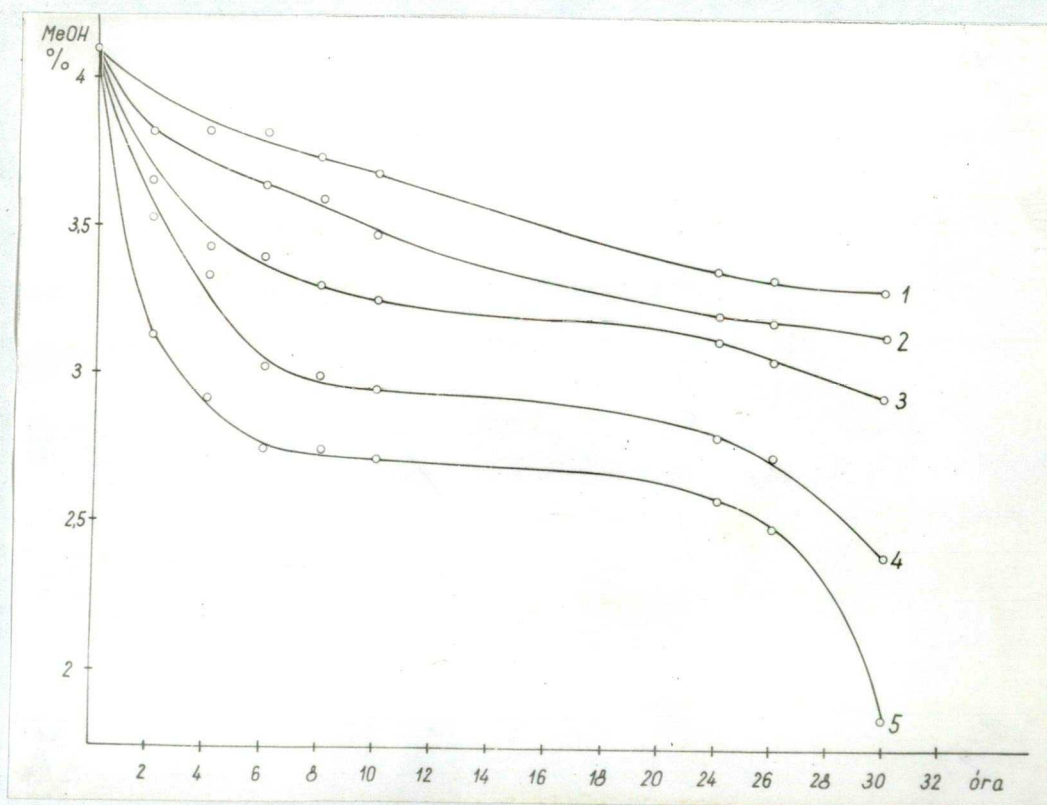
A folyamatos fermentáció esetén az egyes lombikokat sorba kapcsoltuk.



3. ábra. Ötedényes üvegfermentor

A fermentum metanol tartalmának meghatározására több módszert próbáltam ki /50,51/. A fermentumok komplex összetétele miatt /mikroszervezetek, metabolitok megjelené-

se az oldatban stb./ a módszerek nem váltak be és a kísérleti eredmények annyira ingadoztak, hogy a metanol meghatározására új módszert kellett kidolgozni. Az előbb leírt problémán kívül olyan eljárást kerestem, amely szorozatvizsgálatra megfelelőbb. Az új meghatározás lényege, hogy a metanolt a fermentumból vizgőzzel desztilláltam és kénsavas dikromáttal széndioxidig oxidáltam /48/. Az egyes edényekben mért metanol tartalomról megszerkesztettem a folyamatos fermentáció metanol görbéjét. /4.ábra./ A tápoldat állandó, azonos ütemű adagolása-kor a tenyésztés során állandó állapot alakul ki. A görbék-ből leolvashatjuk a maximális termeléshez tartozó optimális metanol-koncentrációt /4.ábra, 5-ös számú görbe.



4. ábra. Metanol koncentráció változása folyamatos fermentáció alatt

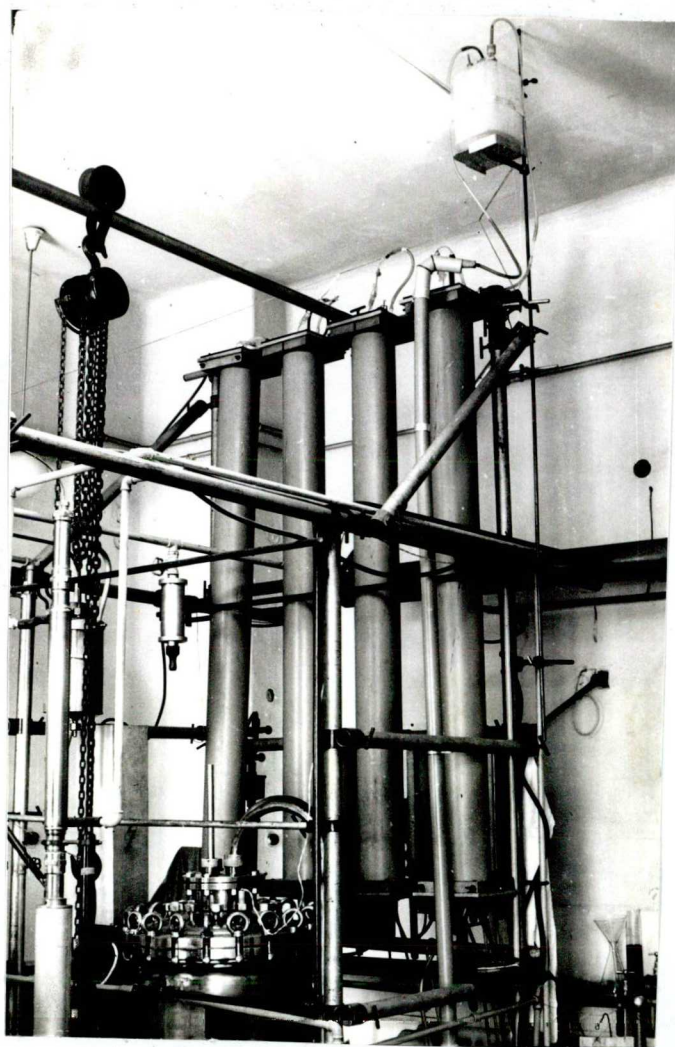
1,2,3,4,5 a fermentáló edények száma

Az optimális metanol koncentráció beállítása mellett megállapíthatjuk a tápoldat áramlási sebességét, vagyis az optimális átfolyási sebességet, ami végeredményben a fermentor kubaturájának kihasználhatóságát is meghatározza.

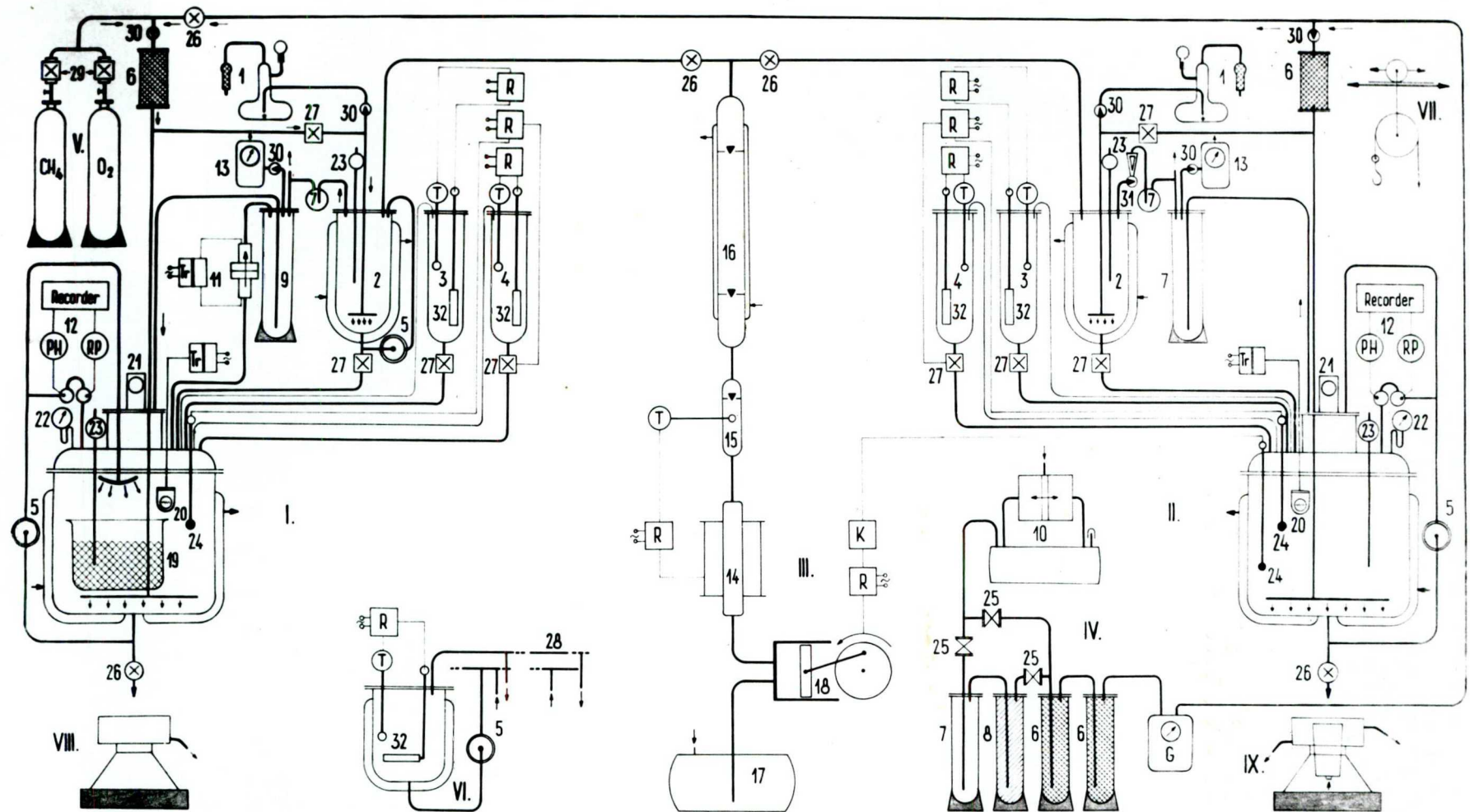
Következő feladatot a fermentációkor a levegőzés során elsodort metanol visszanyerése jelenti. A fermentumból eltávozó metanolgőzök gazdaságos felhasználása céljából a levegő-metanol elegyet átvezettük az egyes fermentáló edényeken. Az utolsó lombikból eltávozó levegő-metanol elegyet műanyagszálakkal lazán töltött kolonnán átáramoltattuk /5. ábra/. A metanol visszanyerése céljából a kolonnát $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízzel átpermeteztük és a kioldott metanolt a fermentáló lombikba visszavezettük.

Metanol regenerálására irányuló vizsgálatoknál a fermentáló lombikok párhuzamosan kapcsolhatók és a regeneráló kolonnáról lecsorgó folyadékban a metanol-tartalom vizsgázzesztiláció nélkül meghatározható.

Intézeti fermentáló berendezésünk /6. ábra/ II.számú fermentorában is végeztem metanol regenerálására vonatkozó kísérleteket. A fermentorból eltávozó levegő-metanol tartalmának a visszanyerése a 30 melletti nyílal jelölt kipufogó csőhöz kapcsolt kolonnákban történt.



5. ábra. Metanol regeneráló kolonnák



6. ábra. Fermentáló berendezés mikroszervezetek folyamatos és szakaszos tenyésztéséhez

6. ábra: Fermentáló berendezés mikroszervezetek szakaszos és folyamatos tenyésztéséhez.

I. Zárt fermentáló készülék, II. Nyitott fermentáló készülék, III. Automatikus tápoldat-sterilizáló, IV. Levegő-sterilizáló, V. Gázelegyítő, VI. Termosztát, VII. Szerelőcsiga, VIII. Dobcentrifuga, IX. Ülepítő centrifuga.

1. Inokulum tenyésztő edény oltótubussal és steril zárral, 2. Előfermentor, 3. Prekurzor tartály, 4. Habzásgátló tartály, 5. Örvényszivattyú a fermentum cirkuláltatásához, 6. Steril szűrő, 7. Formaldehid tartály, 8. Szilikagél tartály, 9. CO₂ abszorber, 10. Mechanikus meghajtású membránkompresszor, 11. Elektromágneses meghajtású membránkompresszor, 12. pH és redox mérő és regisztráló, 13. Gázelemző, 14. Elektromos fűtésű tápoldat sterilizáló, 15. Hőszabályozó, 16. Tápoldat hűtő gravitációs szelepekkel, 17. Tápoldat tartály, 18. Tápoldat kompresszor, 19. Fermentum porlasztó, 20. Fermentor megvilágító, 21. Periszkopos megfigyelő ablak, 22. Manométer, 23. Mintavevő, 24. Hőregulátor, 25. Szelep, 26. Steril szelep, 27. Szolenoidos szelep, 28. Termosztát vízvezeték, 29. Redukciós szelep, 30. Tűszelep, 31. Rotaméter, 32. Elektromos fűtőtest.

A fermentáció eredményességének fontos szempontja még a termék izolálhatósága. Az 1-2 μ nagyságu baktériumok elkülönítése akár szűréssel, akár centrifugálással, csak laboratóriumi méretekben oldható meg. A magas metanol koncentráció mellett a baktériumsejtek makroszkóposan megfigyelhető pelyhek formájában aggregálódnak, amelyek a tápoldatból a fajsúlydifferencia következtében jól ülepszíthatók. Meghatároztam azt a maximális metanol koncentrációt, amelyet a törzsek még eltűrnek, valamint azt a minimális koncentrációt, amelynél a sejtek aggregációja megszűnik és a tenyészet zavarossá válik.

Szakaszosan végzett kísérleteinknél azt találtam, hogy a maximális koncentráció 4 %, a minimális 2 % körül van. Tapasztalataink szerint az R II törzs fermentációja során igen jól ülepszítható baktérium sejtömeget nyertünk. A protozoon tenyésztés esetén elértük, hogy a betokozódott véglényekről a fermentlé dekantálható. Ezekkel a mikroorganizmusokkal igen egyszerű módon ki nyerhető végterméket kaptunk.



4. A FERMENTÁCIÓ SORÁN NYERT VÉGTERMÉK FEHÉRJE- ÉS AMINOSAV TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA

A mikrobiális fehérje-produkció a bevezetésben vázoltak figyelembe vételével legbiztosabbnak a földgázból nyert metanol hasznosításával látszik, ezért fehérje vizsgálataimat a metanol-fehérje konverzió útján kapott termékekre koncentráltam.

A bakteriális fehérje javítását egyrészt a fermentáció során alkalmazott adalékanyaggal láttuk biztosítotttnak. A szarvasmarhák takarmányozásánál adalékként karbamidot használnak /2/, ezért szerepelt a karbamid kísérleteimben, mint szerves nitrogén forrás. Másrészt a kérődzők gyomrában in vivo végbemenő baktérium-véglény fehérje konverzió in vitro megvalósítása útján kíséreltük meg.

Fehérje vizsgálataim célja nemcsak a különféle eredetű termékek fehérje tartalmának meghatározása volt, hanem az is, hogy a takarmányozási célra készült termék minősége adott fermentációs technológia mellett hogyan javítható.

Régebben a takarmány minőségét egy hányadossal jellemezték, mely számlálója a takarmány égéshője kalóriá-

ban kifejezve /C/, nevezője pedig a fehérje mennyisége /P/, azaz $\frac{C}{P}$.

Mai felfogás szerint a takarmány minősége az aminosav összetételétől függ. Tekintve, hogy az aminosavak egy részét a szervezet szintetizálja, az optimális aminosav összetétel szempontjából elsősorban az esszenciális aminosavak mennyisége a mérvadó.

A klasszikus fehérje meghatározás N meghatározáson alapul. A fehérjék átlagos N-tartalma 16 %, 1 g N-nek $\frac{100}{16} = 6,25$ g fehérje felel meg. A N meghatározás eredménye a nukleinsavak N-tartalmát is magában foglalja. A nukleinsav N meghatározástól azonban a következők figyelembe vételével eltekinthetünk: egyrészt a nukleinsav N mennyisége a fehérje N-hez viszonyítva elhanyagolható, másrészt a N meghatározás eredménye számunkra csak tájékoztató jellegű vizsgálat, mivel az esszenciális aminosavak mennyiségét aminosav-analizátorral kvantitativ meghatározhatom.

A N-tartalmat Winkler által módosított Kjeldahl módszerrel határoztam meg /18/. A meghatározás Kjeldahl 1883-ban leírt eljárásán alapul. A szerves vegyületek N-jét tömény kénsavval való roncsolással ammóniumsulfáttá alakítjuk. Az ammóniát luggal szabaddá tesszük és azt ismert mennyiségű savba desztilláljuk. Winkler Lajos szerint az átdesztilláló ammóniát bórsavban is felfoghatjuk és közvetlenül savval titrálhatjuk.

III. táblázat. Az egyes minták N és fehérje tartalma

Minták	N %	N x 6,25 %
P III/a	6,73	42,06
P III/b	8,21	51,31
R II/a	5,72	35,75
R II/b	7,46	46,62
V	9,37	58,56

A különböző összetételű táptalajon történt fermentációs folyamatok során kapott biomassza aminosav összetételét kromatográfiásan vizsgáltam.

4.1. A vizsgálati anyag előkészítése

A fermentumból centrifugálással nyert sejttömeget desztillált vízzel többször mostam, majd 60^o-on vákuumban súlyállandóságig szárítottam. A további vizsgálatokhoz ezekből az anyagokból mértem be.

Az anyag előkészítése kvalitatív analízisre:

Savas hidrolízis

A szárított és elporított végterméket 6 n sósavval 110^o-on 20 órán át melegítettem. A hidrolizátumot vákuumban bepároltam és a kenőcsszerű, sötétbarna maradékot

desztillált vízben felvettem.

Só- és szénhidrátmentesítés

A kb. 50-szeresére hígított hidrolizátumot az erősen savas polistírol alapvázú Varion KS gyantából készült /10-15 cm magas, 1 cm átmérőjű/ oszlopon 10 csepp/min. sebességgel átfolyattam. A hidrolizátum átcsepegése után vízzel semlegesre mostam; a pH-t ellenőriztem indikátor-papírral. A gyantán megkötött aminosavakat 5 %-os ammóniumhidroxiddal eluáltam. A 30-50 ml eluátumot szárazra pároltam és a visszamaradó anyagot etanol-víz egyenlő arányu elegyében /2-4 ml-ben/ felvettem. A továbbiakban ezt az oldatot használtam a kromatográfiás vizsgálatokhoz.

4.2. A végtermék aminosav összetételének vizsgálata papirkromatográfiásan

A hidrolizátum aminosavait részben papirkromatográfiás uton, részben a kromatográfiában ujabban használt ioncserés vékonyrétegen választottam szét. A papirkromatográfiás módszert egy- és kétdimenzióban alkalmaztam. Az egydimenziósat egyes esetekben elektroforézissel is kombináltam.

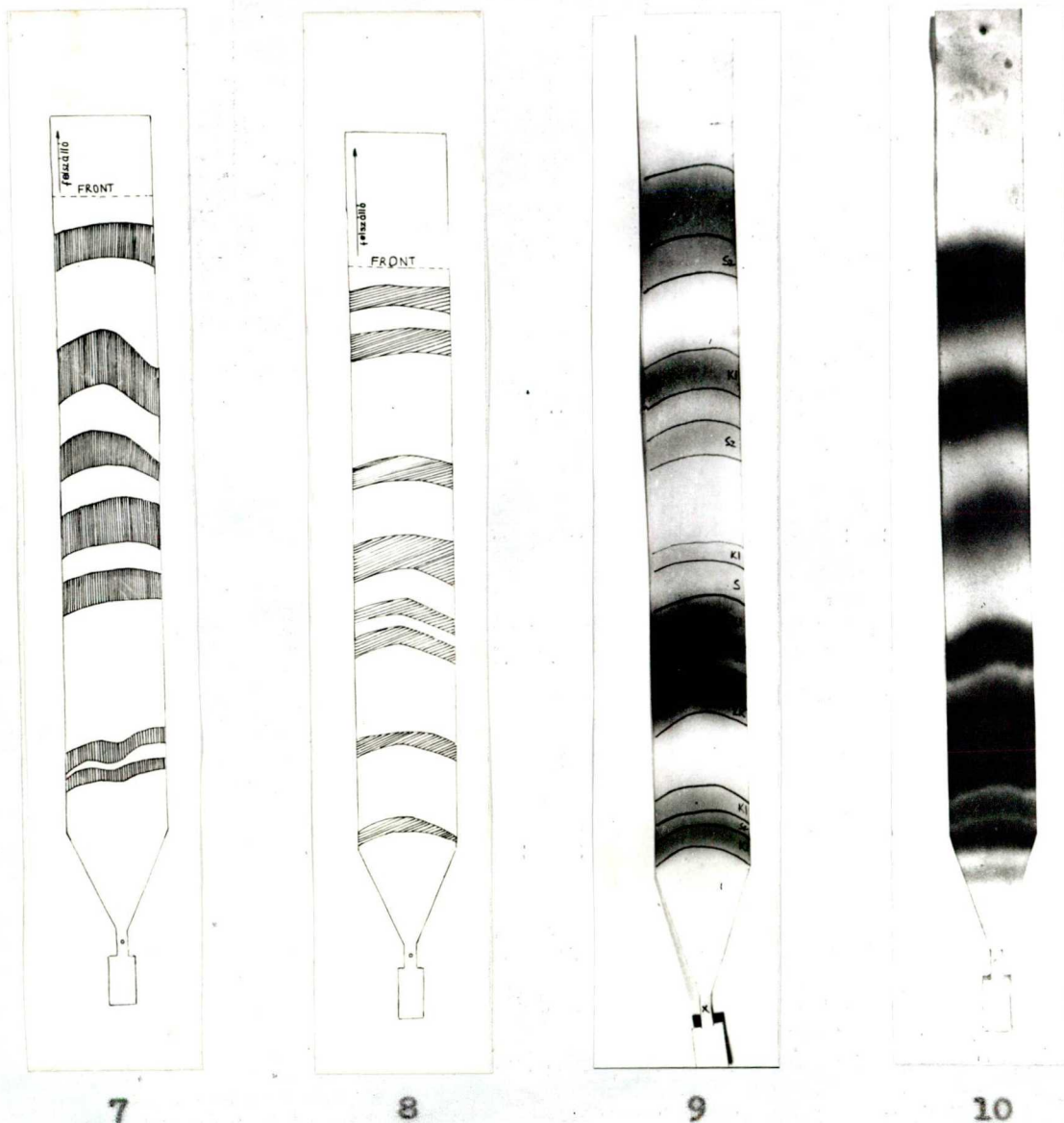
4.2.1. Egydimenziós felszálló papirkromatográfia

Egydimenziós felszálló futtatást a következő rendszerekben végeztem:

- 1./ i-propanol-hangyasav-viz /75:13:12/ /28/
7. ábra
- 2./ kloroform-metanol-25%-os ammónia /4:4:1/ /52/
8. ábra
- 3./ n-butanol-jégecet-viz /4:1:5/ /felső fázis/ /42/
9. ábra
- 4./ fenol- n-butanol-metiletilketon-propionsav-
ecetsav-viz /20:20:50:10:10:20/ /3/
10. ábra

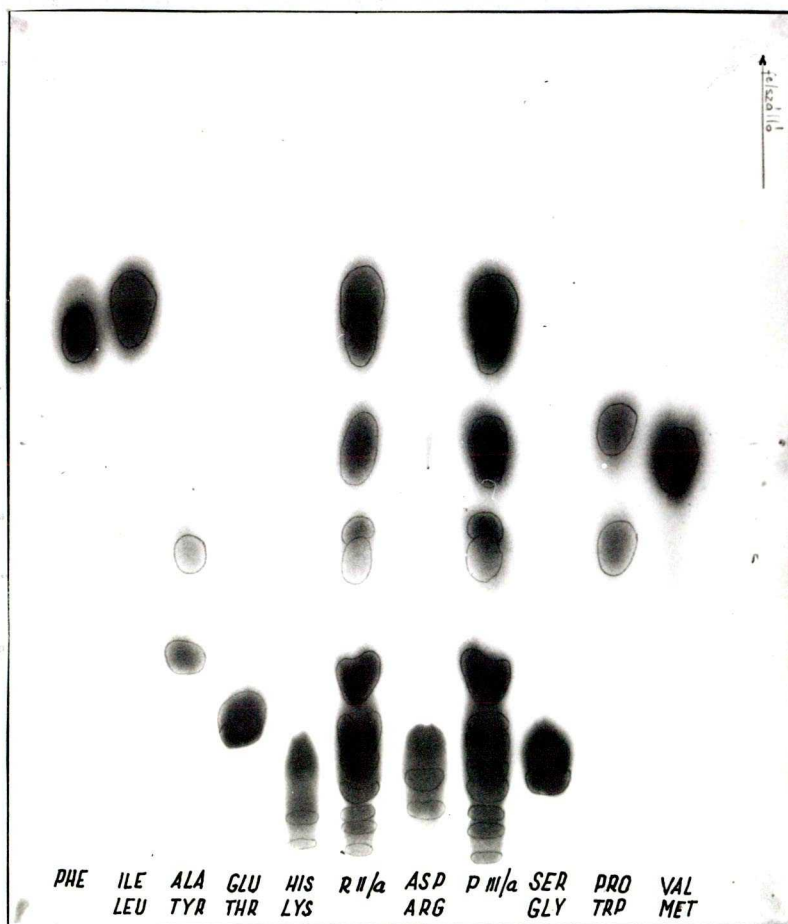
Legjobb elválasztást a 4.számú rendszerben kaptam /11. ábra/. Az elválasztást a papircsikok alakja is befolyásolja. A LINSKENS szerinti csikokon /29/ a szűkületbe felvitt minta kromatogramján az anyag élesen elvált csikok formájában jelent meg /7. 8. 9. 10. ábra/.

Az 1./ 2./ 3./ és 4./ számú rendszerben egydimenziós, felszálló módszerrel történt kifejlesztéssel a közel azonos R_f érték miatt az egyes csikok több aminosavat tartalmaznak, ezért az elválasztás nem kielégítő.



A fehérje eredetű aminosavak egydimenziós, felszálló kromatogramjai különböző futtatószerekben

7. ábra: Papír: Sch-Sch 2043b
Kifejlesztőanyag: 1./ számú rendszer
Előhívó: etanolos ninhidrin reagens
8. ábra: Papír: Sch-Sch 2043b
Kifejlesztőanyag: 2./ számú rendszer
Előhívó: etanolos ninhidrin reagens
9. ábra: Papír: Sch-Sch 2043b
Kifejlesztőanyag: 3./ számú rendszer
Előhívó: etanolos ninhidrin reagens
10. ábra: Papír: Wh-2
Kifejlesztőanyag: 4./ számú rendszer
Előhívó: etanolos ninhidrin reagens



11. ábra

Azonosítás standard aminosavakkal

R II/a baktérium hidrolizátuma

P III/a baktérium hidrolizátuma

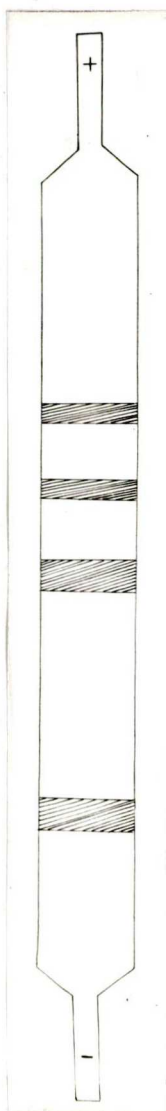
Papir: Wh-2

Kifejlesztőelegy: 4./ számú rendszer

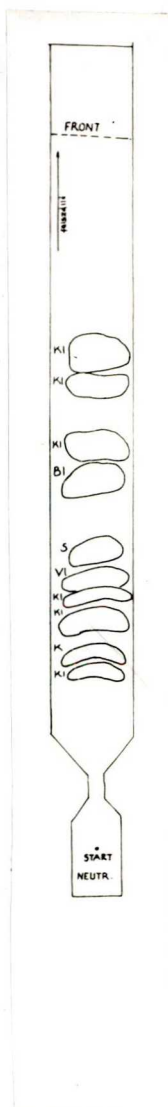
Előhívó: etanolos ninhidrin reagens

4.2.2. Elektroforézissel kombinált papirkromatográfia

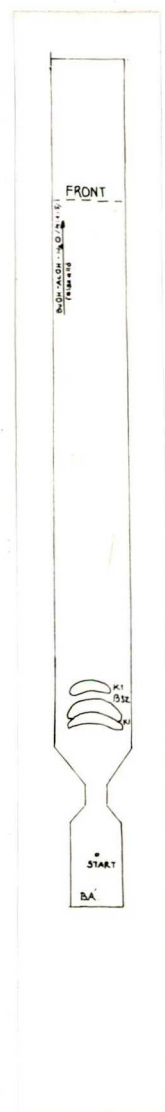
A mintákat papirelektroforézis készülékkel választottam szét. Elektrolitként piridin-jégecet-víz /30:100:4810/ arányu elegyét használtam, melynek pH-ja 3,9 volt /54/. Az analizálandó oldatot a papircsikok közepére csepepenttettem fel. Az elválasztás után a csikokat levegőáramban történő szárítás után 0,2 %-os acetonos ninhidrin oldaton huztam át. Az előhívott elektroferogramon az egyes frakciók kékesibolya sáv formájában jelentek meg. Különböző vándorlási sebességük alapján az aminosavak négy frakcióra váltak szét, mégpedig középen a semleges, az anód felé az ASP, majd a GLU, legtávolabb a katód felé a bázikus aminosavak /12. ábra/. Továbbiakban az előhívott minta alapján a ninhidrinnel nem kezelt papircsikok szétvágott darabjairól az aminosavakat forró desztillált vízzel eluáltam. Ezután az eluátumokat bepároltam és a maradékot etanol-víz /1:1/ elegyében felvettem, majd külön a bázisos és semleges frakciókat MATHIAS szerinti papircsikon /22/ egydimenziós, felszálló rendszerben fejlesztettem ki. Futtatóelegyként a 3./ rendszer felső fázisát használtam. /13. és 14. ábra./ A kromatogramokat szárítás után 0,2 %-os ninhidrin reagenssel hivatam elő. Az aminosavak kékesibolya színnel reagáltak, kivéve a PRO-t, amely sárga színreakciót adott. Az ALA ibolyaszínű foltjában vöröses-, a TYR-ban barnás ill. szürkés árnyalatot figyeltem meg.



12



13



14

12. ábra. A fehérje eredetű aminosavak elektroferogramja.

Papir: Sch-Sch 2043b

Elektrolit: piridin-jégecet-víz /30:100:4810/

Előhívó: acetonos ninhidrin reagens

13. ábra. A semleges aminosavak kromatogramja, egydimenziós, felszálló futtatással.

Papir: Sch-Sch 2043b

Kifejlesztőelegy: 3./ számú rendszer

Előhívó: etanolos ninhidrin reagens

14. ábra. A bázisos aminosavak kromatogramja egydimenziós, felszálló futtatással.

Papir: Sch-Sch 2043b

Kifejlesztőelegy: 3./ számú rendszer

Előhívó: etanolos ninhidrin reagens

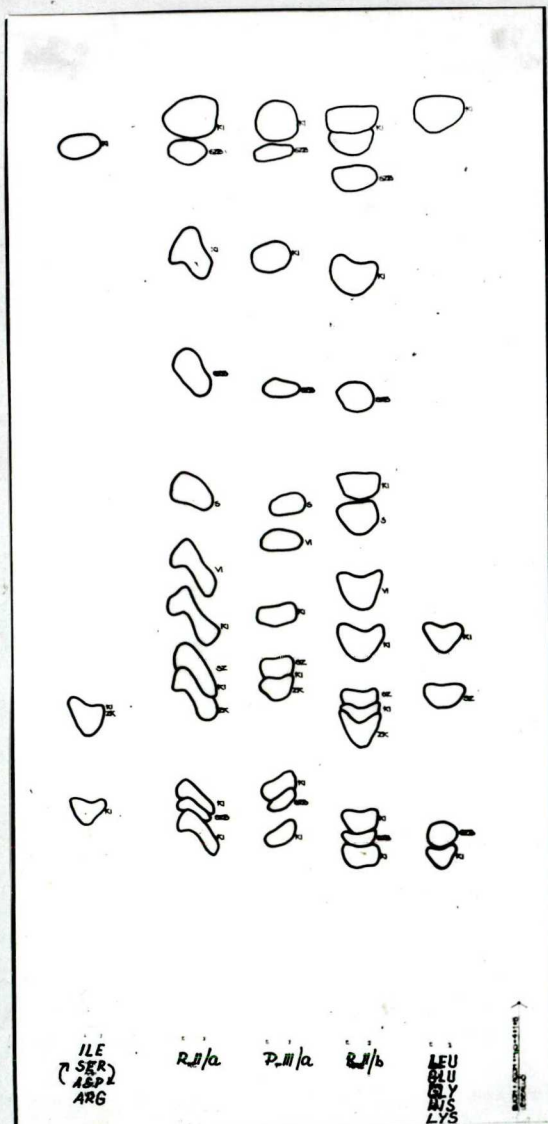
4.2.3. Egydimenziós leszálló papirkromatográfia

Az aminosavak azonosítása leszálló módszerrel jobban értékelhető eredményre vezetett. A start és frontvonal közötti távolságot ugyanis növelni tudtam az elválasztás javára. A vizsgálandó oldat mellé felvitt standard aminosavak segítségével csaknem valamennyi aminosavat azonosítani tudtam /15. ábra/. Kifejlesztőszerként a 3./ számú elegyet használtam. A futtatás távolsága 50 cm volt. Előhívószerként kezdetben ninhidrin reagenst alkalmaztam. Később arra törekedtem, hogy az egyes aminosavak színreakciói változatosabb árnyalatokban jelenjenek meg. Ezt kollidines-ninhidrin reagenssel értem el /37/. Ezzel a reagenssel az ASP-zöldeskék, a GLY-szürke, az ALA-vörösesibolya, a PRO-sárga, a TYR-barnásibolya, a HIS- és PHE-barnásszürke, a többi aminosav kékesibolya színnel reagált.

A bázisos aminosavak sorrendje a starttól a front felé: LYS, HIS és ARG. Az alkoholos savas oldószernek megfelelően alacsony R_F értékkel futnak, a foltok mégis jól definiáltak. A felettük lévő foltban csaknem azonos R_F értékkel négy aminosav helyezkedik el. Ebben a diffúz foltban színe alapján csak a legalacsonyabban elhelyezkedő zöldeskéken reagáló ASP ill. a legmagasabbra futó szürke színreakciót mutató GLY ismerhető fel. A közöttük levő kékesibolya átmenetben a standard alapján a GLU és SER-nek csupán a jelenlétére lehet következtetni.



A GLY feletti kékesibolya folt a THR-ra, vörösesibolya az ALA-ra, a sárga színű folt pedig a PRO jelenlétére utal. Utánuk sorban a TYR, a VAL együtt a MET-nel következik, majd egy foltban a PHE, LEU és ILE. Utóbbi folton belül színreakció alapján csak a PHE különíthető el.



15. ábra. Az aminosavak egydimenziós, leszálló kromatogramja.
R II/a, R II/b és P III/a baktériumok fehérje eredetű aminosavai
Papir: Sch-Sch 2043b
Kifejlesztőanyag: 3./ számú rendszer
Előhívó: kollidines-ninhidrin reagens

Egydimenziós leszálló módszerrel megállapítottam, hogy a baktériumtörzsek aminosav összetétele kvalitatíve azonos. Ha egy kromatogramot PARTRIDGE elegyben /42/ egymásután többször kifejlesztettem, növekvő R_F érték szerinti sorrendben a LYS, HIS, ARG, ASP, GLY, THR, ALA, PRO, TYR és PHE-t azonosítottam. Közel azonos R_F érték miatt az együttlfutó GLU és SER, VAL és MET, ILE és LEU részint kétdimenziós, részint ioncserés vékonyréteg-kromatográfiával azonosítható.

4.2.4. Aminosavak elválasztása kétdimenziós papirkromatográfiával

Amint már az előzőekben leírtam, a vizsgált baktériumok hidrolizátumában egydimenziós kromatográfiával az aminosavaknak csak egy része identifikálható. Azoknak az aminosavaknak az elválasztását, amelyek a kromatogramon együtt jelennek meg diffúz folt formájában, mint pl. SER és GLY, VAL és MET, LEU és ILE kétdimenziós kromatográfiával kíséreltem meg.

Az analizálandó oldatot a papir sarkától az átlón 28 mm távolságra cseppentettem fel. Az első dimenziós futtatás után a papírt levegőáramban megszáritottam és 90°-os elfordítás után ismét futtattam. Az előhivószer ugyanolyan összetételű kollidines-ninhidrin reagens volt, mint az egydimenziós leszálló kromatográfiánál.

A szín fixálása céljából kadmios-ninhidrin reagenssel is próbálkoztam. Ezzel az aminosavak bíbor színreakciót adnak, amely tartósabb ugyan, mint a kollidines ninhidrin reagenssel kapott, de árnyalati különbség nem észlelhető. Így nem jelentett előnyt az azonosításnál, ezért a további kísérleteknél nem is használtam.

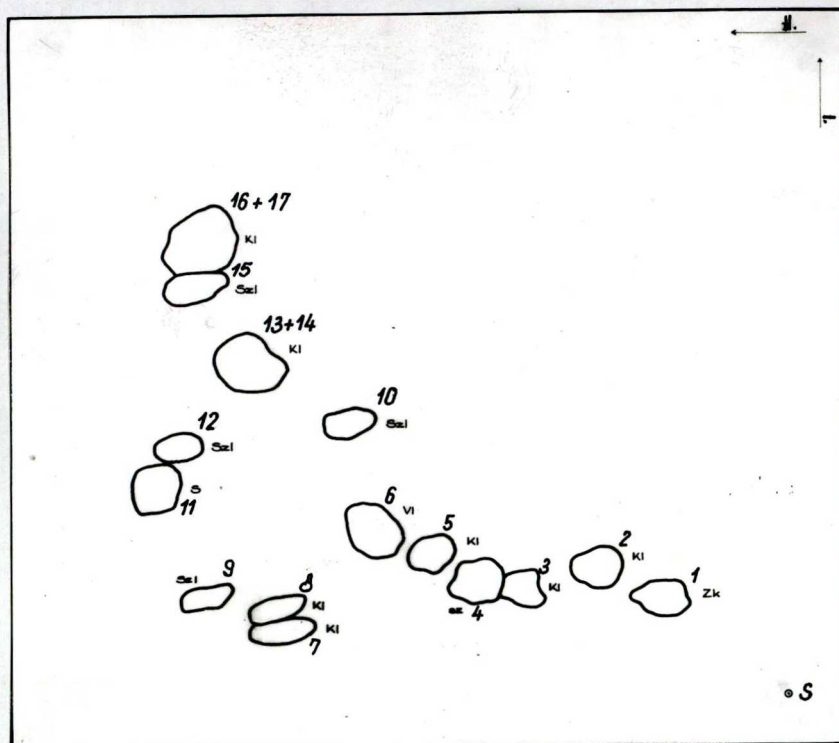
Aminosavak számozása:

ASP-1	LYS-7	VAL-13
GLU-2	ARG-8	PHE-15
SER-3	HIS-9	LEU-17
GLY-4	PRO-11	ILE-16
THR-5	TYR-10	ninhidrin
ALA-6	MET-14	pozitív 12 anyag

A kromatogramokat a következő futtatóelegy-párokban fejlesztettem ki:

5/I. dimenzióban n-butanol-jégacet-víz /4:1:5/ arányu elegyének felső fázisában.

5/II. dimenzióban fenol /75 g/ és víz /25 g/-ben. A lé-
teret ammóniával telítettem /30/.



16. ábra. Az aminosavak kétdimenziós kromatogramja

Papir: Sch-Sch 2043b

Kifejlesztőegység: 3/I.

5/II.

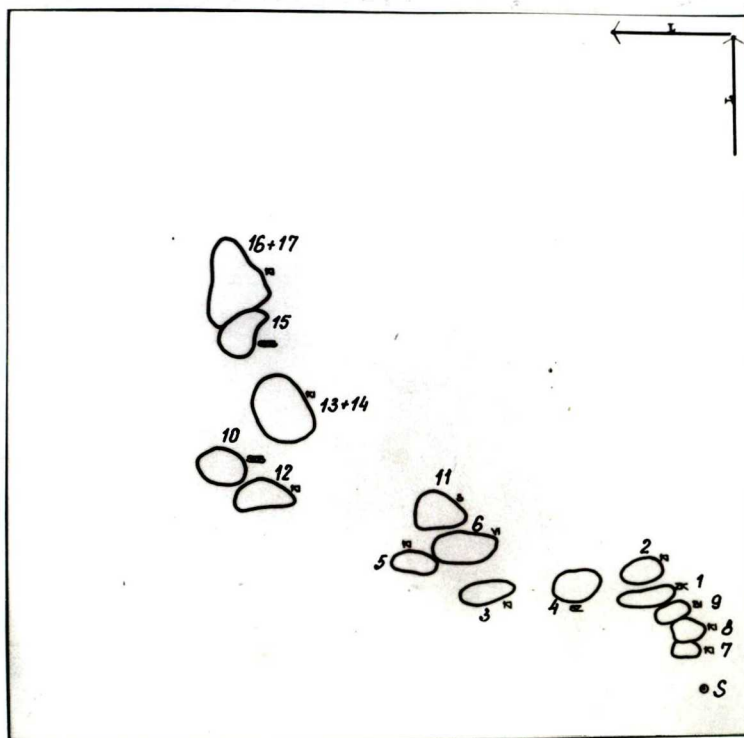
Elshivó: kollidines-ninhidrin reagens

Ezekkel a szolvensekkel az ASP és GLU, valamint a semleges aminosavak egy része szétválasztható.

Az ammóniás atmoszféra előnye, hogy abban a bázisos aminosavak gyorsabban futnak és így magasabb R_f értékek alakulnak ki. A SER és GLY egy foltban marad, de színárnyalat alapján elkülöníthető. A VAL és MET, valamint az ILE és LEU ezzel a módszerrel nem választható el.

6/I. dimenzióban n-butanol-jégecet-víz /4:1:5/

6/II. dimenzióban piridin-víz /4:1/ arányú elegyében /49/



17. ábra. Az aminosavak kétdimenziós kromatogramja

Papír: Sch-Sch 2043b

Kifejlesztőelegy: 6/I.

6/II.

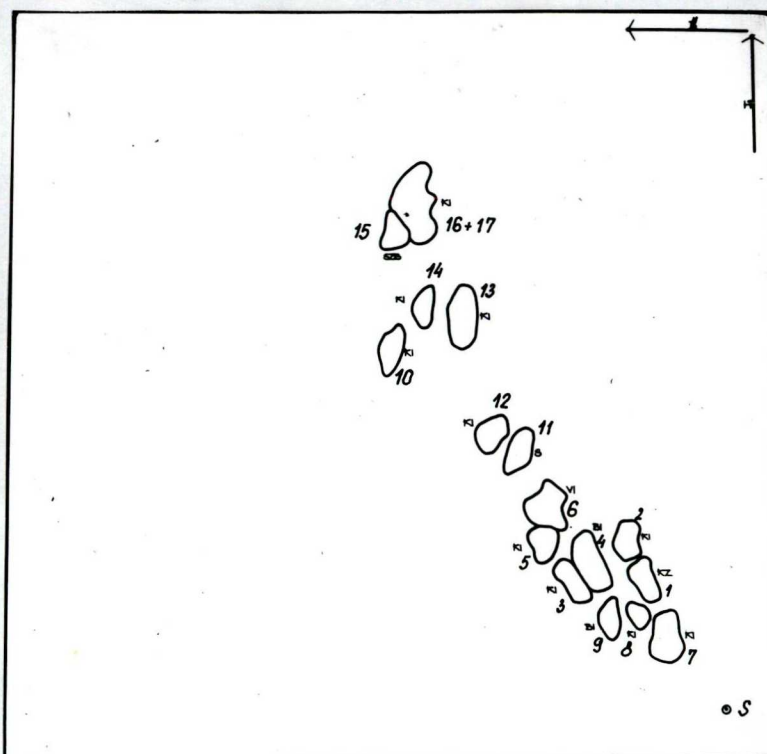
Előhívó: kollidines-ninhidrin reagens

Az oldószer-kombinációban a SER is különvél a GLY-től, csak az általában együttfutó VAL és MET, ILE és LEU képez közös foltot.

HÖRHAMMER által ajánlott módszer:

7/I. dimenzióban PARTRIDGE elegyben

7/II. dimenzióban piridin- i-amilalkohol-víz /7:6:6/
arányú elegyében /43/



18. ábra. Az aminosavak kétdimenziós kromatogramja

Papír: Sch-Sch 2043b

Kifejlesztőelegy: 7/I.

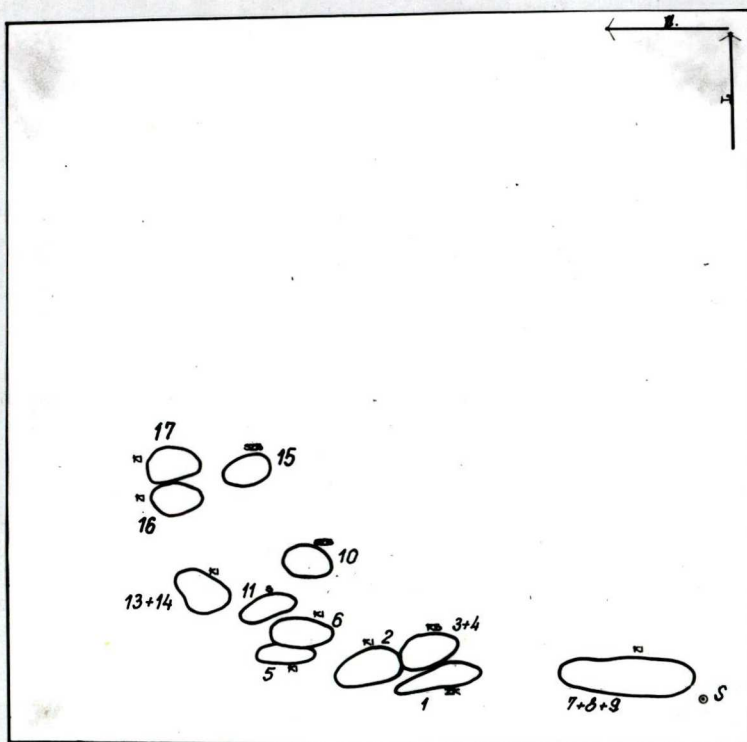
7/II.

Előhívó: kollidines-ninhidrin reagens

Ezekkel az oldószer variációkkal elértem, hogy a MET elvált a VAL-tól. A II. rendszerben a MET R_f értéke magasabb, mint a VAL-é.

8/I. dimenzióban t-amilalkohol-metiletilketon-viz
/6:2:2/ arányu elegyében

8/II. dimenzióban metanol-viz-piridin /20:5:1/ arányu
elegyében /6/



19. ábra. Az aminosavak kétdimenziós kromatogramja

Papir: Sch-Sch 2043b

Kifejlesztőelegy: 8/I.

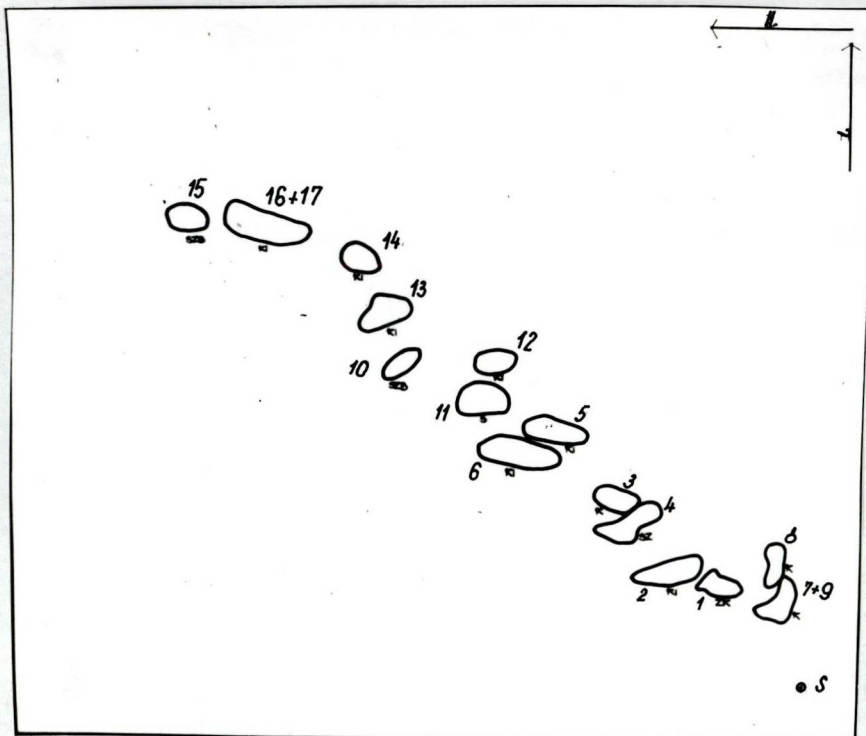
8/II.

Előhívó: kollidines-ninhidrin reagens

A felsorolt futtatószeresek a "gyorsan futó aminosavak" szétválasztására kedvezőek. Ezekkel tapasztaltam először, hogy a LEU és ILE két részre oszló foltot mutat. Az alacsony R_F értékű bázisos aminosavak ebben a rendszerben nem váltak szét.

9/I. dimenzióban propilalkohol-víz /7:3/ arányú elegyében

9/II. dimenzióban i-propilalkohol-víz /4:1/ arányú elegyében /14/



20. ábra. Az aminosavak kétdimenziós kromatogramja

Papír: Wh-1

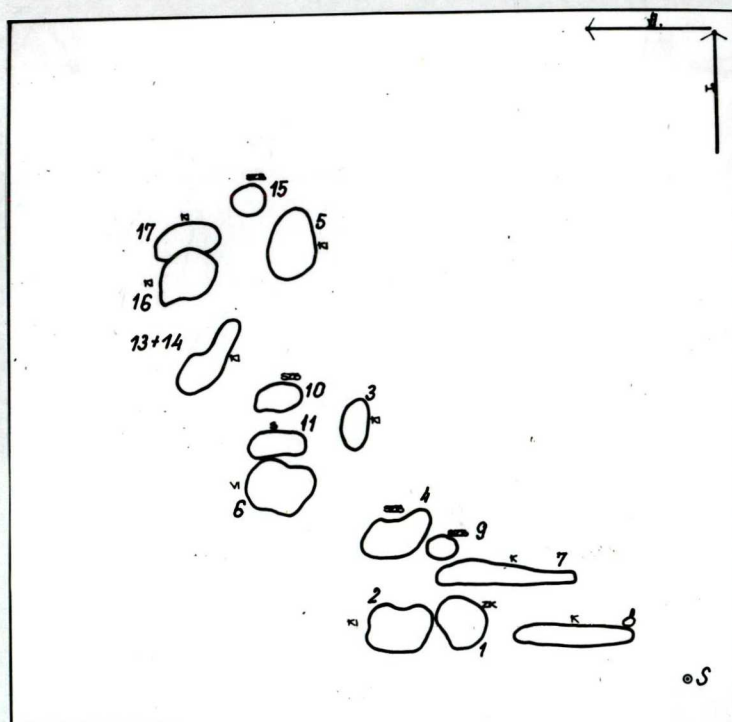
Kifejlesztőelegy: 9/I.

9/II.

Előhívó: kollidines-ninhidrin reagens

A bázisos aminosavak közül a HIS, valamint a LEU és ILE nem azonosítható.

- 10/I. dimenzióban metanol-viz-piridin /20:1:5/ arányu elegyében
- 10/II. dimenzióban t-butanol-metiletilketon-dietilamin-viz /40:40:20:4/ arányu elegyében /46/



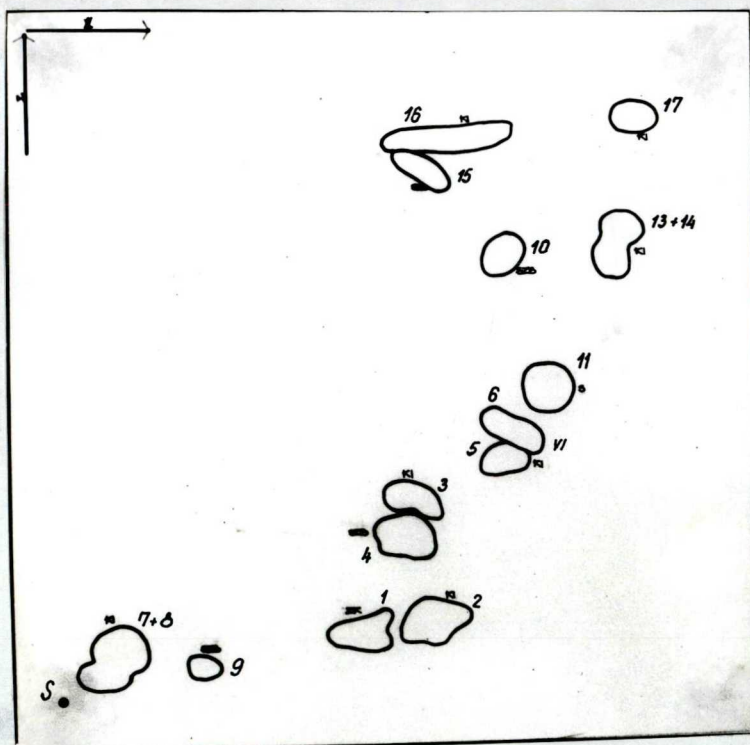
21. ábra. Az aminosavak kétdimenziós kromatogramja
Papir: Sch-Sch 2043b
Kifejlesztőelegy: 10/I.
10/II.

Előhívó: kollidines-ninhidrin reagens

Ezekben a szolvensekben a bázisos aminosavak nagyon jól szétválnak. Az ARG elhuzódó foltot ad, felette található a LYS, ugyancsak elhuzódó folt alakjában. A színárnyalat alapján a HIS a kromatogram közepén látható. A THR elhelyezkedése eltérő a szokásostól, az R_F értéke mindkét rendszerben magasabb.

11/I. dimenzióban t-butanol-metiletilketon-víz
/4:4:2/ arányú elegyében

11/II. dimenzióban t-butanol-metanol-víz /4:5:4/
arányú elegyében /5/



22. ábra. Az aminosavak kétdimenziós kromatogramja

Papír: Wh-1

Kifejlesztőelegy: 11/I.

11/II.

Előhívó: kollidines-ninhidrin reagens

Ebben a rendszerben a bázisos aminosavak közül az ARG
és a LYS egy foltban a start környékén helyezkedik el.

4.3. Aminosavak elválasztása ioncserélő vékonyréteg- kromatográfiával

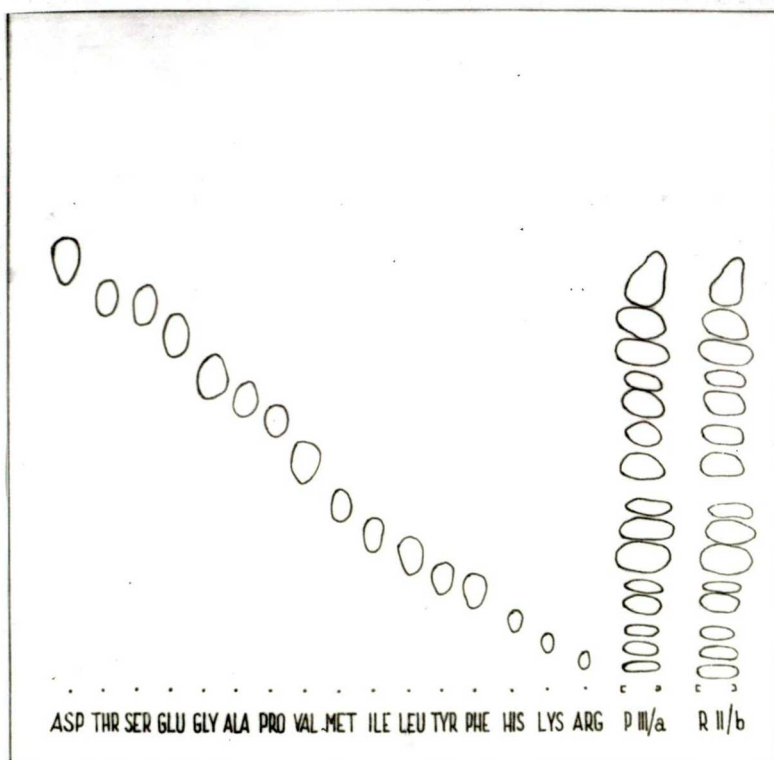
Bár az előzőekben leírt módszerek kielégítő értékhez vezettek, a ma ismert elválasztás technikai lehetőségek közül a Magyarországon 1971-ben gyártott és forgalomba hozott ioncserélő Fixion 50x8 jelzésű vékonyrétegen érhetők el a legjobb eredmények.

A Fixion 50x8 műanyagfóliára rögzített Dowex 50x8 típusu kationcserélő gyantát tartalmaz Na^+ ciklusban. A lemezt felhasználás előtt 0,02 Na^+ molaritású, 3,28-as pH-ju citrátpufferrel ekvilibráltam /lásd 14. oldal/ /11,20/, ezzel kialakítottam a gyanta megfelelő ciklusát ill. ionmiliójét.

Az eljárás egydimenziós futtatáson alapul. Az aminosav elválasztásnál analóg oszlopkromatográfiás eljárásra jellemző kísérleti feltételeket /puffer, molaritás, pH, hőmérséklet/ biztosítottam. A technikai kivitelnél a vékonyréteg-kromatográfiánál jól bevált megoldásokat alkalmaztam az alábbiak szerint.

A lemez alsó szélétől 2 cm távolságra 16 aminosav oldatát cseppentettem fel kontrollként, valamint a baktériumok hidrolizátumát. A futtatást 0,4 Na^+ molaritású 3,3 pH-ju nátriumcitrát pufferben végeztem, 18 cm magasságig, termosztátban 50° -on 120 percig. Szárítás után a réteget ninhidrin-reagenssel bepermeteztem. A 16 amino-

savból mindössze a THR és SER képez közös zónát. A starthoz legközelebb helyezkedtek el a bázisos aminosavak, sorrendben ARG, LYS, HIS és utánuk a többi PHE, TYR, LEU, ILE, MET, VAL, PRO, ALA, GLY, GLU, THR+SER és ASP /13/.



23. ábra. Az aminosavak elválasztása Fixion 50x8 lemezen.

A LEU és ILE két különálló foltot képez, így igazolt hogy a megelőző kromatográfiás eljárások során a közös foltban valóban mindkét aminosav együtt volt.

Az ioncserélő vékonyréteg-kromatográfia az előzőekben tárgyalt módszerekkel szemben számos előnnyel rendelkezik. Technikai kivitel szempontjából egyszerű, elválasztás szempontjából gyors és 16 aminosav 15 komponensre választható.

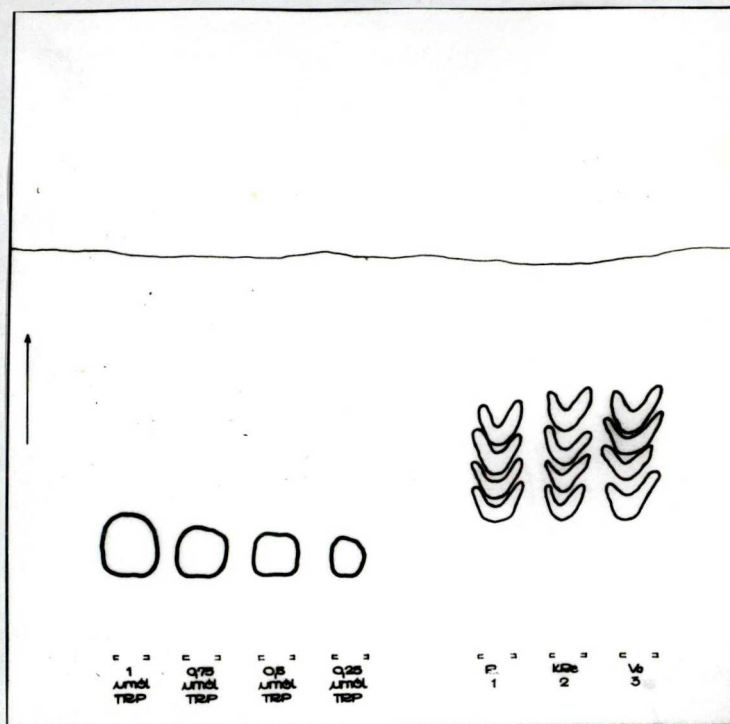
Triptofán kimutatása lugos hidrolizátumból

A triptofán savas hidrolizissel elbomlik /lásd 69. oldal/, lugos hidrolizis során viszonylag stabil marad.

A lugos hidrolizátumból hagyományos papir- vagy vékonyréteg-kromatográfiával történő egyértelmű kimutatására nincs lehetőség, a neutralizált lugos hidrolizátum rendkívül magas sótartalma miatt. Az ioncserélő vékonyréteg-kromatográfiával ez a probléma áthidalható, mert a vizsgálandó anyaggal felvitt viszonylag sok só nem zavarja a kromatográfiás elválasztást.

Az elporított anyagot leforrasztott ampullában 4 n NaOH-ban 105⁰-on 5 órán át hidrolizáltam. Lehűtés után pár csepp tömény sósavval semlegesítettem és megszűrtem. Ebből az oldatból vittem fel 10-30 µl-t a lemezre 1 cm-es sávban. A futtatást 6-os pH-ju és 1,5 m Na⁺ koncentrációju citrátpufferben végeztem 10 cm magasságig. A viszonylag magas pH ill. magas Na⁺ koncentráció /1,5 m/ mellett a TRP a legalacsonyabb R_F értékű /12/. /24. ábra./

Egyidejűleg futtatott standard TRP-al való összehasonlítás alapján a hidrolizátumokból a TRP nem mutatható ki kvalitatíve.



24. ábra. Triptofán kimutatás Fixion 50x8 lemezen

1. P III/a hidrolizátuma
2. R II/b hidrolizátuma
3. V hidrolizátuma

4.4. Az aminosav összetétel meghatározása kvantitatív analizissel

A fehérje lebontásnak több módja ismeretes: ásványi savakkal, luggal való hidrolízis és az enzimés lebontás. A savas hidrolízisnél a triptofán gyakorlatilag teljesen elbomlik, de számos más aminosavnál is részleges veszteséggel számolhatunk. Ennek oka egyrészt a hidrolízis so-

rán jelenlevő kis mennyiségű oxigén, a kéntartalmu aminosavak oxidálásával okoz jelentős analitikai hibát, másrészt a peptidkötések különböző energiaszintje, míg egyes aminosavak már szabad állapotban vannak, addig mások még a peptidkötésekből nem szabadultak fel.

4.4.1. A minta hidrolizise döntően befolyásolja az aminosav meghatározás eredményét ill. annak pontosságát. Ezért a hidrolizis körülményeit részletesen elemzem. A szárított, elporított és homogenizált végterméket bemértem és hozzáadtam a 6 n sósavat. Ügyeltem arra, hogy a vizsgálati anyag és a sósav aránya optimális legyen; 1:500 /minimális arány 1:350/. A fehérjetartalomtól függően 10-20 mg beméréshez 5-10 ml 6 n sósavat adtam. Figyelembe vettem a sósavban oldott oxigén hatását, az ampullát evakuáltam, nitrogéngázzal átbuborékolattam és leforrasztottam. 110° -on 20-24 órán át hidrolizáltam. A legtöbb hidrolizisnél közölt 105° nem hidrolizálja az összes peptidkötést, ezért a különösen stabil ILE-VAL peptidkötések megbontásához 110° szükséges /32/. A hidrolizis végeztével a savmentesítés egy újabb oxidációs lehetőség miatt rotációs filmbepárlóval történt vákuumban, a bepárlás hőfoka 45° volt.

Más kísérőanyag /szénhidrát stb./ jelenléte esetében sikeresen alkalmazhatók a 6 n sósavas hidrolizisek mellett egyes speciális hidrolizisek.

Igy az egyik módszert a DRAWERT eljárást is elvégeztem /16/. 0,03-0,05 g beméréshez 8-10 ml 6 n sósavat és 0,5 ml fenolt adtam. A továbbiakban a hidrolízis menete megegyezett az előzőekben leírtakkal.

A bepárlás után visszamaradt olajos maradékot 2,2 pH-ju citrát pufferben felvettem. A fenolos hidrolizátumnál a bemosáshoz még acetón-etanol /1:1/ arányu elegyét is használtam, végül mérőlombikban kiegészítettem. Utána dupla redős szűrőpapíron szűrtem és az így nyert oldatot feldolgozásig hidegen tároltam.

Aminosav analízise automatikus analizátorral

Több mint két évtizede már, hogy MOORE, STEIN és SPACKMANN /38/ lefektették a modern aminosav analitika alapjait. A módszer az azóta eltelt idő alatt jelentős mértékben fejlődött, de mind kémiai, mind műszertechnikai szempontból alapjaiban a klasszikus módszerrel megegyező.

Az aminosavak elválasztása szulfonált polistírol-divinilbenzol-kopolimer gyantán /erős kationcserélő/ Na^+ ciklusban történik, szakaszos elucióval. A bázikus aminosavak elválasztása egy rövid, a többi - savas és semleges aminosav - elválasztása pedig hosszú oszlopon megy végbe. Mindkét esetben nátriumcitrát pufferrel történik az elució. A bázikus aminosavak elválasztásához

egy puffer, a többihez kétféle puffer szükséges, melyeknek a Na^+ molaritása megegyező, csupán a citrát koncentráció különböző, így a pH-juk eltérő.

A gyanta megfelelő ionmiliódjének kialakítása az ismételt ciklusváltással, majd Na^+ ciklusban az induló pufferrel egyensúlyba hozásával történt. Utána a mintát felvittük az oszlopra, az aminosavak disszociált kationjai adszorbeálódnak az ioncserélő szabad szulfo-csoportjaira. Az eluciós oldatok folyamatos átömlésével az aminosavak fokozatosan eluálódnak az oszlopról. Az effluensben lévő egyes aminosavak identifikálása és detekciója fotométerben történik a ninhidrinreakció alapján. A mérés eredményét rekorder rögzíti színes grafikon formájában. Az egyes csucskok helye szerint meghatározható az aminosavak minősége, a csucsterületek kiszámítása pedig a mennyiségükre enged következtetni. Az aminosav csucskok kiértékelésének számításmenete a következő volt: a csucskok magasságának a félértéke feletti pontok számát szoroztam a csucsmagasság felével és ezt osztottam a bemért standard mólok számával. Így minden aminosavra egy faktort kaptam, amelyet az ismeretlen koncentrációju aminosav oldatok meghatározására használtam fel.

4.4.2. Két oszlopos módszer

A hosszú oszlopról a savas és semleges aminosavakat

3,28-as pH-ju, 0,2 Na⁺ molaritású nátriumcitrát pufferrel ASP-től - VAL-ig; 4,25-ös pH-ju 0,2 Na⁺ molaritású pufferrel VAL-től - PHE-ig eluáltam. A rövid oszlopról LYS-től - ARG-ig 5,28-as pH-ju, 0,35 Na⁺ molaritású pufferrel lehet a bázikus aminosavakat eluálni /45/. /Lásd 25. 26. és 27. ábra./ Ennél a módszernél a teljes analízis idő 4 óra.

Az R II. jelzésű baktériumtörzs karbamid mentes és karbamid tartalmu tápoldatban, valamint a P III. jelzésű baktériumtörzs karbamid mentes tápoldatban történt fermentáció során nyert végtermékének fehérje eredetű aminosavait a kétoszlopos eljárással határoztam meg kvantitativ. /CYS aminosavat nyomokban tartalmaz, ezért nem értékelhető./

Az egyes kromatogramok a 25. 26. és 27. ábrán láthatók.

4.4.3. Egyoszlopos, hárompufferes eljárás

Az összes aminosav meghatározása ugyanazon az oszlopon történik. Az elválasztást ASP-től - GLY-ig 3,28-as pH-ju, 0,2 Na⁺ molaritású pufferrel /9/, GLY-től - NH₃⁻ig 4,25-ös pH-ju, 0,8 Na⁺ molaritású pufferrel /9/, végül 6-os pH-ju, 1,5 Na⁺ molaritású pufferrel végeztem /10/. /28. és 29. ábra./ Az első puffer-váltás a 90. percben, a második puffer-váltás az ammónia-peak felszálló ágában történt.

A módszernek több előnye van a kétoszlopos eljárással szemben: csak egy oszlopot kell kalibrálni,

a mintát egy oszlopra kell bemérni,

a harmadik, magas, 1,5 Na^+ molaritású puffer

alkalmazása a HIS és ARG közötti eluciós

időt csökkenti, így a teljes analízis idő

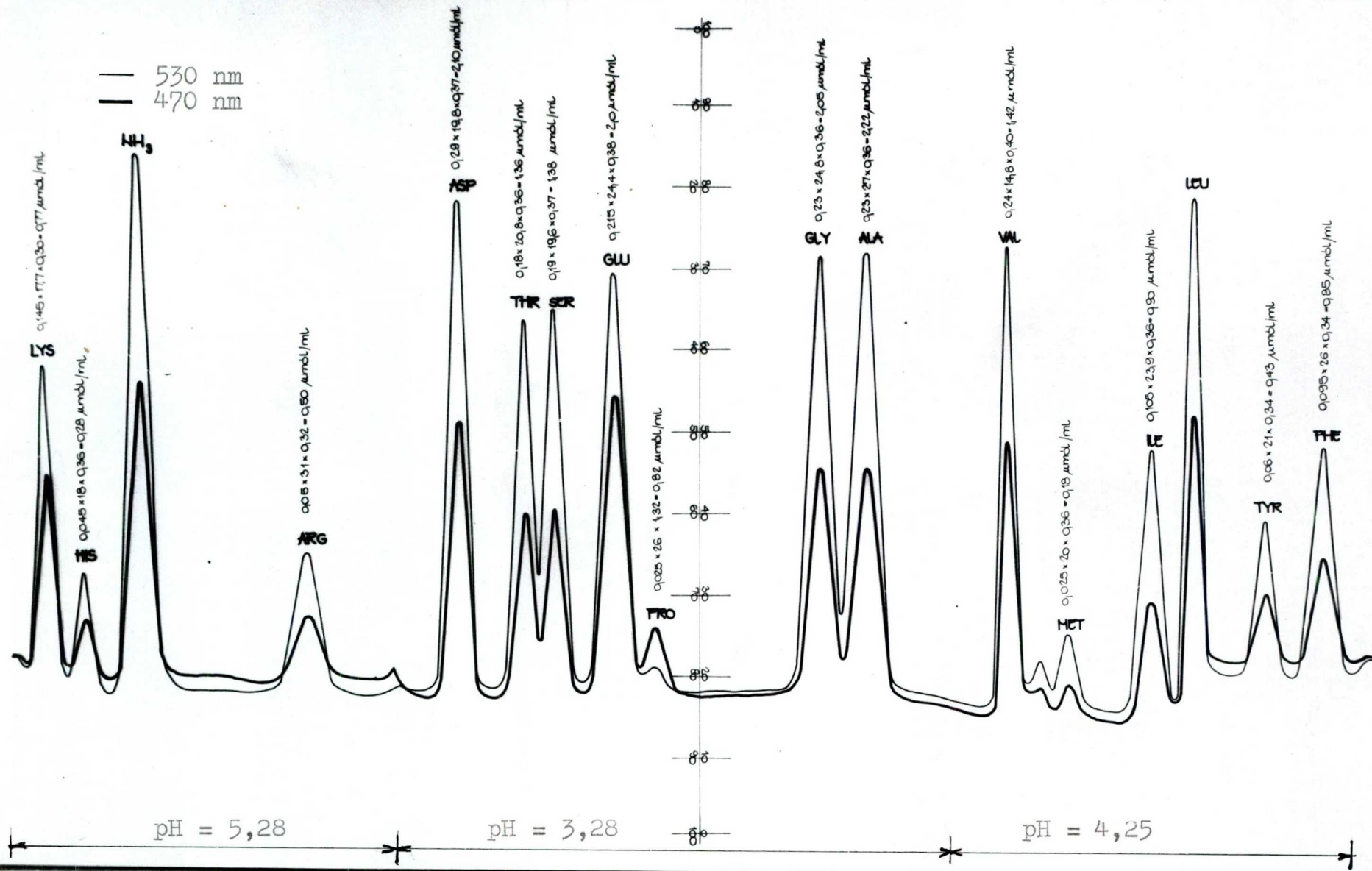
lerövidül.

Ez a módszer - jellegénél fogva - nagyon megfelelő sorozatminta vizsgálatára, mert egyszerű, viszonylag gyors és jól reprodukálható értéket biztosít, hiszen csak az első puffer pH és molaritás érzékeny, a többi puffer gyakorlatilag nem.

Az egyoszlopos, hárompufferes eljárást a P III. jelzésű baktériumtörzs karbamid tartalmu tápoldatban készült fermentum, valamint a V jelzésű protozoon fermentum fehérje eredetű aminosavainak kvantitatív meghatározásakor alkalmaztam.

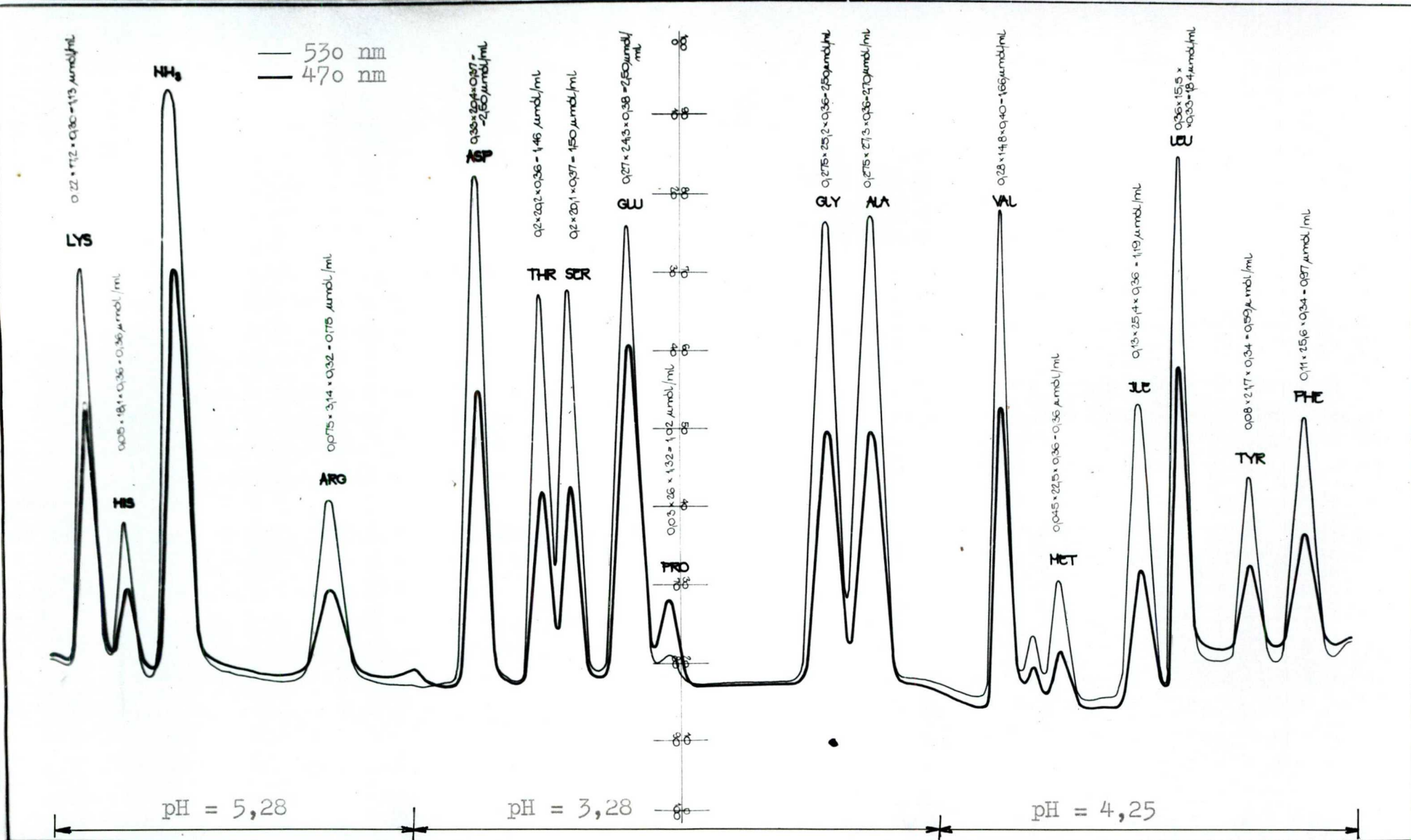
A kromatogramokat a 28. és 29. ábrán mutatom be.





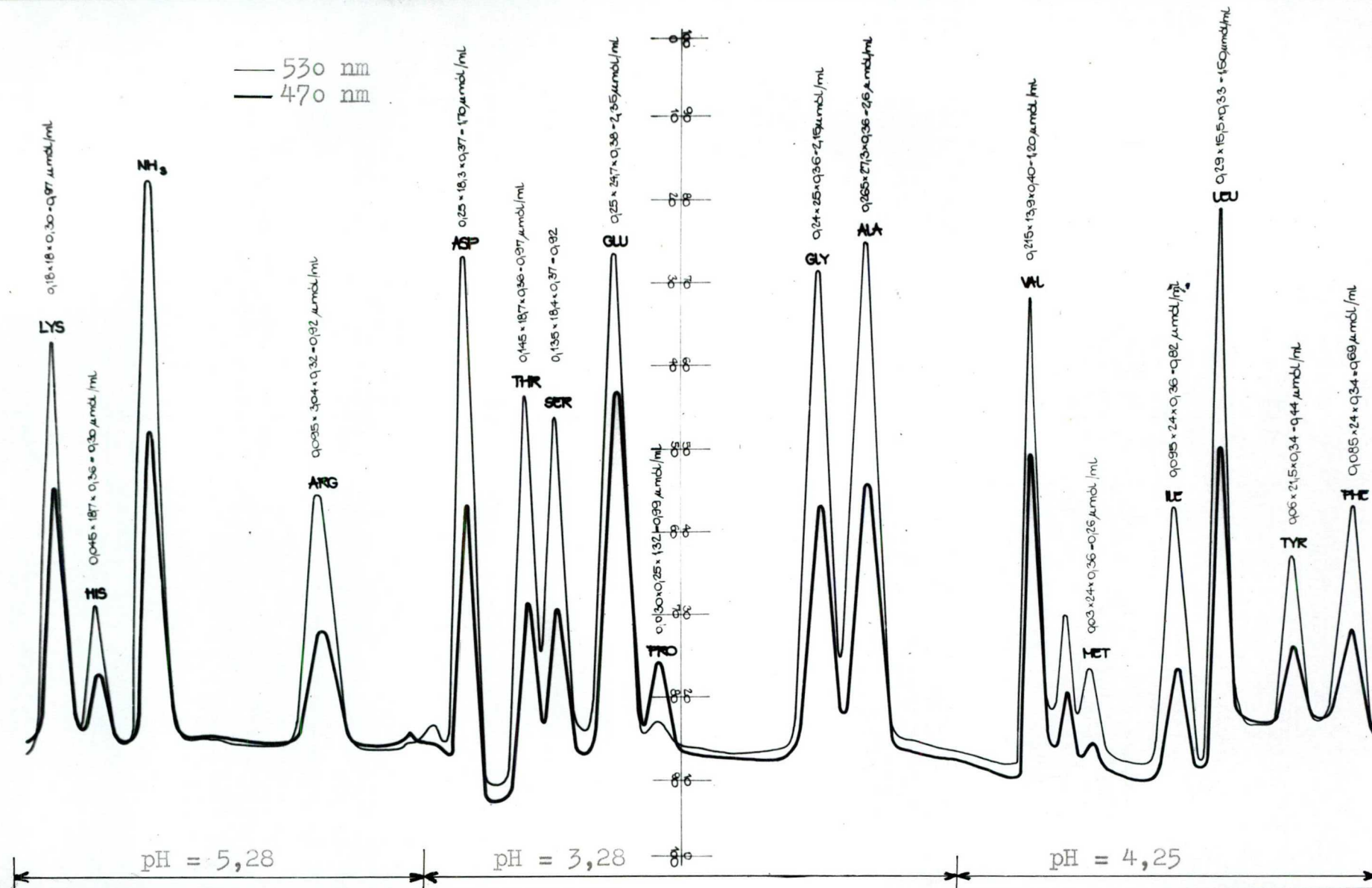
elúciós puffer térfogata

25. ábra. R II/a baktériumtörzs fehérje eredetű aminosav kromatogramja



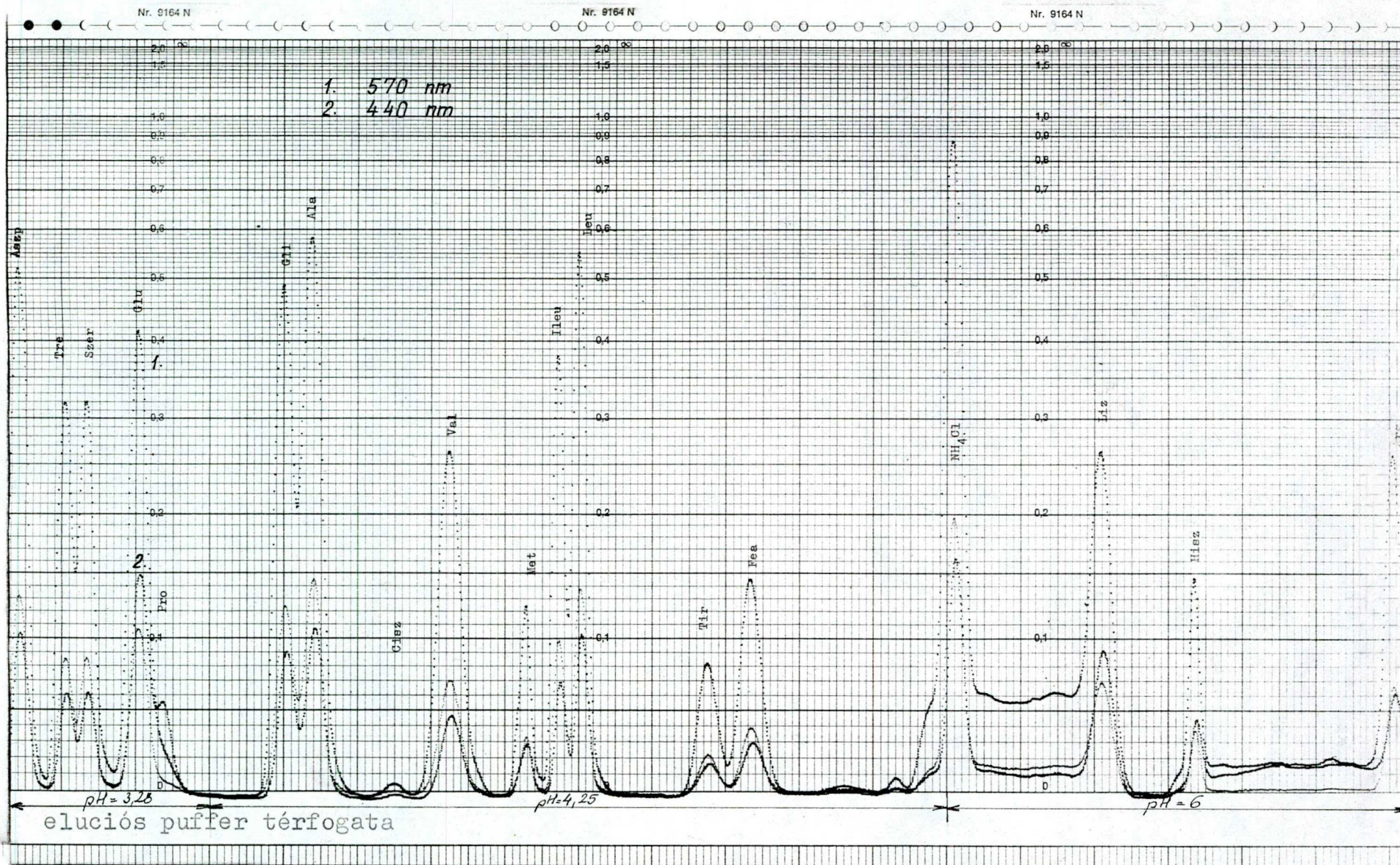
elució puffer térfogata

26. ábra. R II/b baktériumtörzs fehérje eredetű aminosav kromatogramja

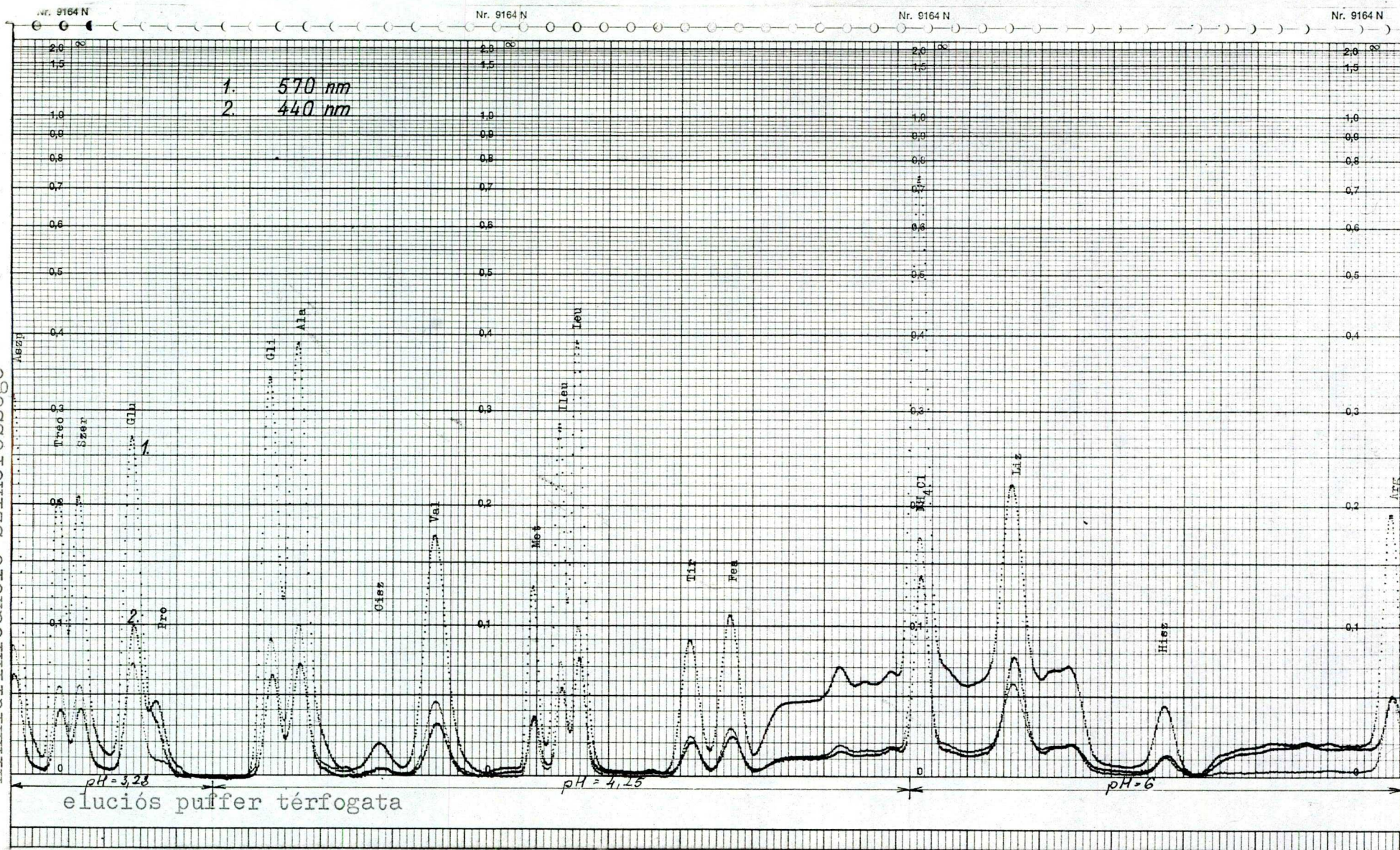


elució puffer térfogata

27. ábra. P III/a baktériumtörzs fehérje eredetű aminosav kromatogramja



28. ábra. P III/b baktériumtörzs fehérje eredetű aminosav kromatogramja



29. ábra. V/véglény/ fehérje eredetű aminosav kromatogramja

4.4.4. Triptofán meghatározás

A savas hidrolízis alkalmazásánál az egyik legfontosabb esszenciális aminosavnak a triptofánnak mintegy 50-70 %-a bomlást szenved.

A triptofán meghatározásánál a lúgos hidrolízis /41/ az egyik legelterjedtebb módszer. Mi egy módosított eljárást választottunk /31,33/. Számításaink szerint ismert mennyiségű triptofán közel 89 %-át nyertük vissza.

A hidrolízis menete a következő volt:

5-10 mg, a fermentáció után kinyert és megfelelő módon kezelt mikroorganizmus-tömeget bemértük vastagfalu kémcsőbe, 1 ml 3 %-os tioglikolsavat /33/ tartalmazó 3 mólus p-toluolszulfonsav oldatot /31/ adtunk hozzá. 30 percig vákuumban kb. -50° -ra lehűtöttük acetonszárazjég keverékével, majd leszivattuk. Közben 2-3-szor kiemeltük, hogy a benne lévő levegő eltávozzon. A hidrolízist 24 órán át 110° -on végeztük. A hidrolízis befejezte után a hidrolizátumot 2,2-es pH-ju citrát pufferrel 5 ml-re feltöltöttük^o és ezt használtuk kvantitatív vizsgálat céljára.

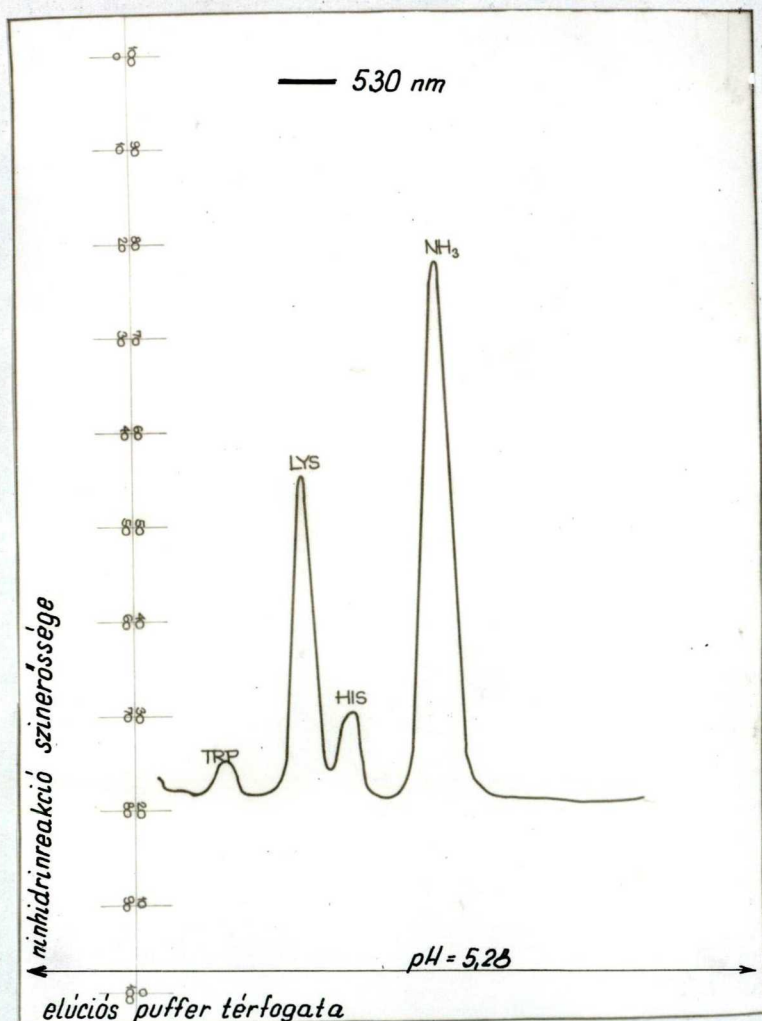
Kvantitatív analízisét automatikus aminosav-analizátorral végeztük.

A minta felvitele 4,25-ös citrát pufferrel történt.

25 percig 4,25-ös pH-ju, 0,2 Na⁺ molaritású pufferrel eluáltunk. Ezzel elősegítettük a LYS és TRP jobb elvá-



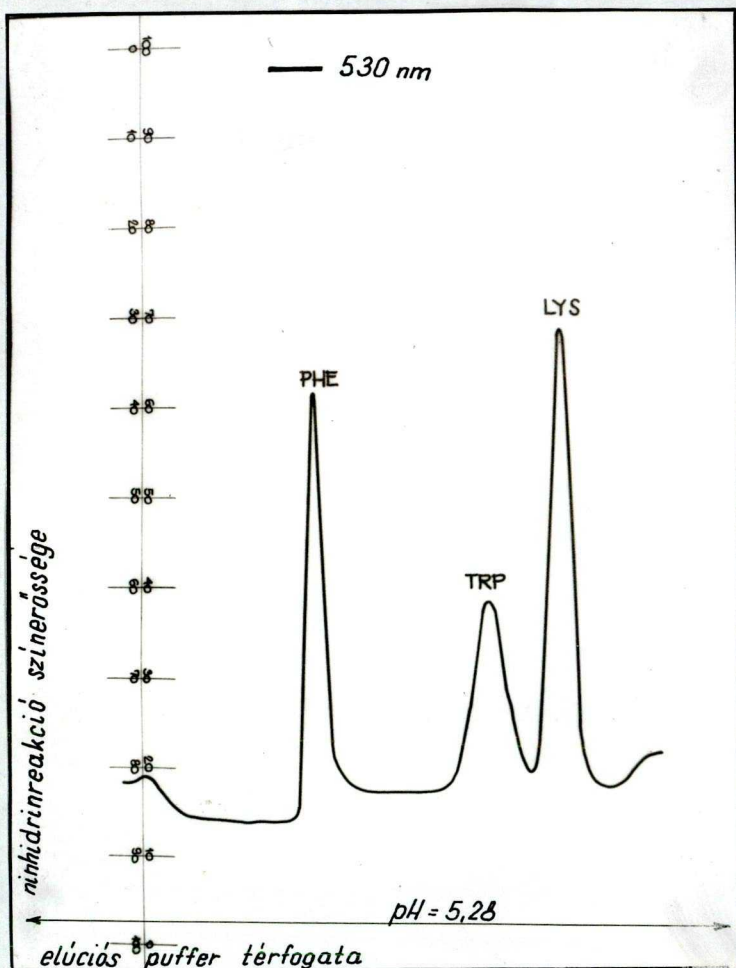
lasztását az oszlopon. 25 perc után 5,28-as pH-jú 0,35 Na⁺ molaritású pufferrel folytattuk az eluciót /30. ábra/. 45. percben PHE csúcsa, 70. percben TRP, 80. percben LYS csúcsa jelentkezett. /39/



30. ábra. Véglény TRP tartalmának automatikus aminosav-analizátorral nyert kromatogramja

A vizsgélatot a TRP tartalom igazolása végett standard TRP-vel megismételtük. Miután a szakirodalomból is-

mert /39/, hogy az aminosavak automatikus analizátorral történő vizsgálatakor az adott körülmények mellett a TRP a PHE és a LYS között jelenik meg, ezért a standard TRP vizsgálatához a fenti két aminosavat, mint vonatkoztatási anyagot a TRP-vel együtt vizsgáltuk.



31. ébra. A standard TRP automatikus aminosav-analizátorral nyert kromatogramja

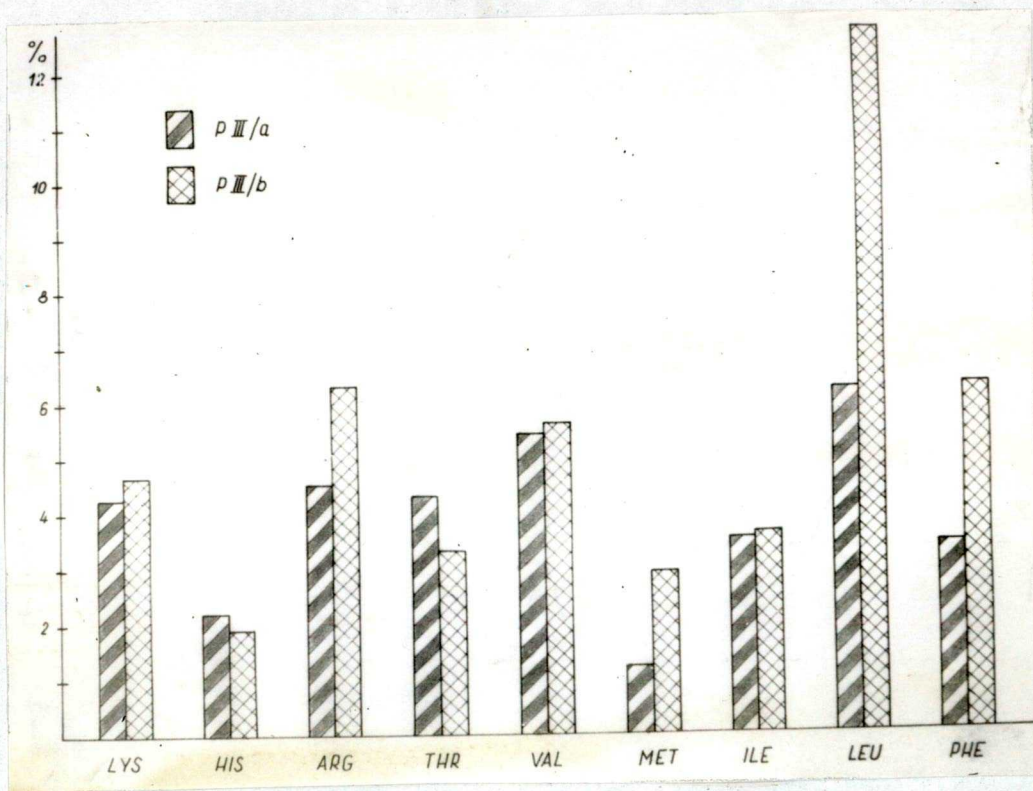
Az analízist minden egyes mintával elvégeztem, a baktériumtörzsből nem tudtam kimutatni a TRP-t, a protozoon is csak kis mennyiségben, 0,22 %-ban tartalmazza /IV. táblázat/.

Az automatikus aminosav-analizátorral végzett kísérleteim célja a mikroorganizmusok aminosav-tartalmának vizsgálata. A kromatogramokon látható csucok elhelyezkedéséből következtettem az egyes aminosavakra, így biztos eredményhez jutottam, és az ioncserélő vékonyrétegen történő elválasztást megerősítettem.

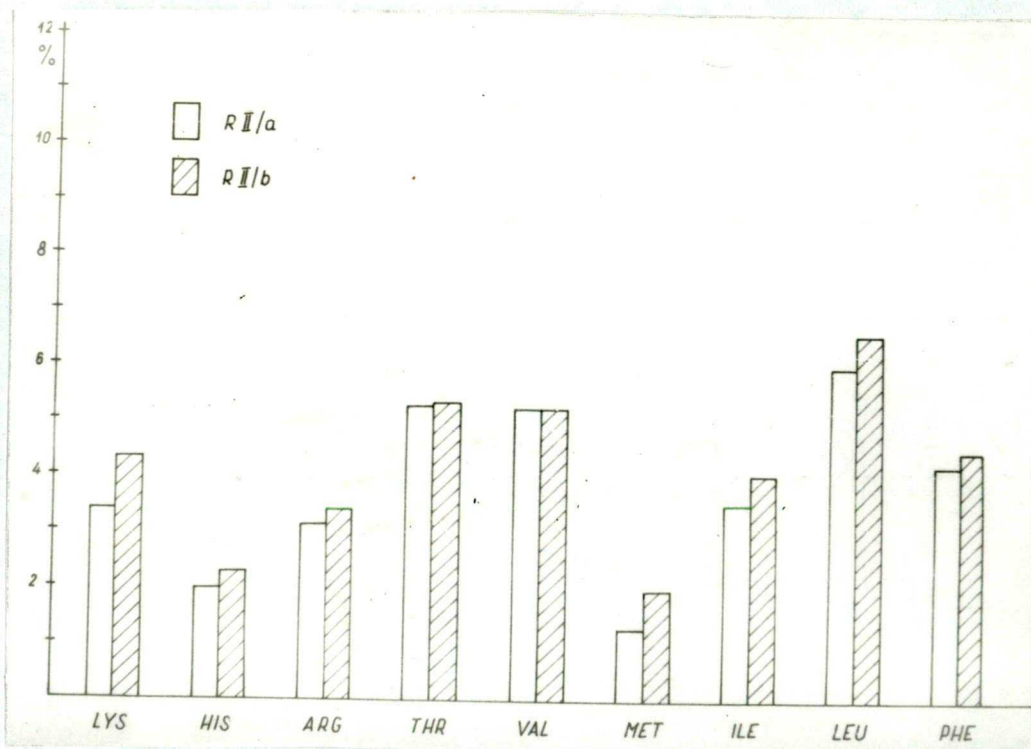
A kiszámított értékekből összehasonlítást végeztem a különböző tápoldatban készült baktériumtörzsek, valamint a véglény esszenciális aminosav-tartalma között.
/IV. táblázat./

IV. táblázat: Az egyes fermentációs végtermékek esszenciális aminosav-tartalmának adatai

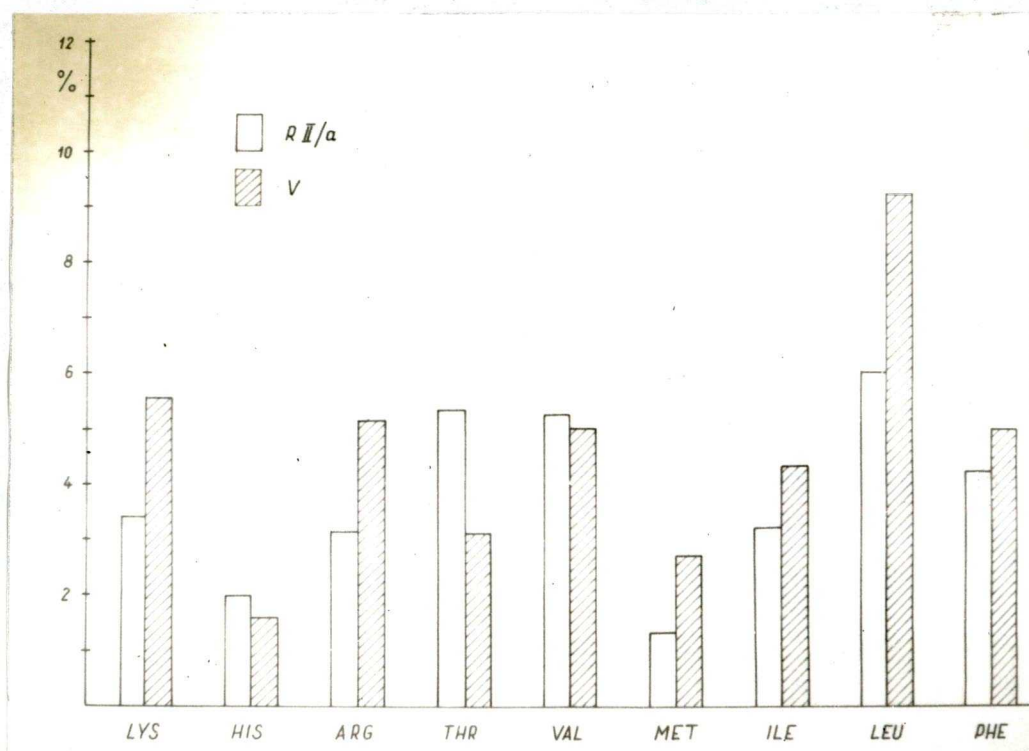
Minták	AS % FEH %		AS % FEH %		AS % FEH %		AS % FEH %		AS % FEH %	
	LYS		HIS		ARG		THR		VAL	
P III/a	1,80	4,27	0,93	2,21	1,90	4,51	1,82	4,32	2,28	5,42
P III/b	2,42	4,71	0,99	1,92	3,24	6,31	1,70	3,31	2,90	5,65
R II/a	1,22	3,41	0,73	2,04	1,13	3,16	1,92	5,37	1,85	5,25
R II/b	2,04	4,37	1,07	2,29	1,60	3,43	2,52	5,40	2,44	5,23
V	3,25	5,54	0,94	1,60	3,03	5,17	1,83	3,12	2,92	4,98
	AS % FEH %		AS % FEH %		AS % FEH %		AS % FEH %		AS % FEH %	
	MET		ILE		LEU		PHE		TRP	
P III/a	0,53	1,26	1,50	3,56	2,47	6,20	1,35	3,39	-	-
P III/b	1,50	2,92	1,86	3,62	6,56	12,70	3,22	6,27	-	-
R II/a	0,47	1,31	1,28	3,56	2,16	6,04	1,52	4,25	-	-
R II/b	0,94	2,01	1,91	4,09	3,10	6,64	2,11	4,52	-	-
V	1,60	2,73	2,52	4,30	5,42	9,25	2,90	4,95	0,22	0,37



32. ábra. P III/a és b esszenciális aminosav-tartalmának összehasonlítása a fehérje százalékában



33. ábra. R II/a és b esszenciális aminosav-tartalmának összehasonlítása a fehérje százalékában



34. ábra. R II/a és V esszenciális aminosav-tartalmának összehasonlítása a fehérje százalékában

5. A KISÉRLETI EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Vizsgálataim a mikrobiológiai uton termelt, takarmányozási célra alkalmas fehérje-produktumok minőségének javítására irányultak, különös tekintettel a metanol-fehérje konverzióban kapott termékekre. Célkitűzésemnek megfelelően foglalkoztam különféle metanol-hasznosító törzsek tenyésztési technológiájának fejlesztésével, a termelés, valamint a termék minőségének javításával és vizsgáltam a fermentációs termék fehérje összetételét.

A törzsgyűjtés és szelektálás során továbbtenyésztés céljából elsősorban a magas metanol koncentrációt tűrőket tartottam fenn, vagyis olyanokat, amelyek még 8-10 % metanolt tartalmazó tápoldatban sem pusztulnak el. A törzsek gyűjtése magas lignin tartalmu talajból és szarvasmarha recésgyomorból történt.

Foglalkoztam a legkedvezőbb fermentációs technológia kiválasztásával és megállapítottam, hogy mindategyésztés, mind a termék feldolgozása szempontjából a folyamatos fermentáció a legalkalmasabb. Az eljárással kapcsolatban módszert dolgoztam ki a többedényes berendezésben való termelésnél a metanolnak a fermentumban történő meghatározására. A módszerrel a tápoldatnak a

fermentoron való optimális átáramlási sebességét állapítottam meg. A módszer üzemből származó mintasorozatok vizsgálatára is alkalmas.

Munkám során bebizonyosodott, hogy a metanol, mint nagyipari termék, jól felhasználható a mikroorganizmusok fehérje-produkciójának szénforrásaként. Vizoldékony-sága következtében a tápoldatban való elosztatása nem okoz problémát. A fel nem használt metanol az ismert ipari eljárásokkal visszanyerhető és ismét felhasználható. A mikroorganizmusok még magas /5-10%/ koncentrációt is eltűrnek és ezzel a fermentációs tér jelentősen csökkenthető.

A kedvező fermentációs körülmények kialakítása után kísérleteim fő célja a termék fehérjetartalmának növelése és aminosav összetételének javítása volt.

Kezdetben a termék fehérje eredetű aminosavait hidrolízis után minőségi analizissel vizsgáltam, egy- és kétdimenziós papirkromatográfiával, majd egy új módszert, az ioncserélő vékonyrétegen történő elválasztást is alkalmaztam. Utóbbi módszer előnye, hogy a közös foltot adó THR és SER kivételével 2 óra alatt egydimenzióban 16 aminosav elválasztható.

Ismeretes, hogy a hidrolízis triptofán meghatározása esetén eltér a többi aminosav analizisekor alkalmazott módszertől. Az irodalomból ismert módszerek nem vezettek egyértelmű eredményre, ezért két ismert módszert

kombináltam kisebb módosítással. Így kielégítő eredményt kaptam.

A továbbiakban az aminosavakat kvantitativ vizsgáltam automatikus aminosav-analizátorral. A vizsgálatok során a hagyományos kétoszlopos eljárás mellett az egyoszlopos, hárompufferes eljárást is alkalmaztam. Ennek előnye, hogy az egy oszlopra való mintabevitel és az egy oszlop kalibrálása pontosabbá teszi a meghatározást, valamint a harmadik eluciós puffer magas Na^+ koncentrációja csökkenti az eluciós időt és így a teljes analízisidő is lerövidül. A meghatározás mintavizsgálatokra nagyon kedvező.

Tekintve, hogy szarvasmarhák takarmányozásánál adalékként karbamidot is használnak, a fermentációs termék fehérjetartalmának emelése céljából a tápoldatban a nitrogén forrást karbamiddal dúsítottam. A vizsgált baktériumok fehérjetartalmának karbamid tartalmu tápoldatban bekövetkező növekedése minden esetben számottevő volt.

/ IV. táblázat. /

A kvantitativ aminosav analízis eredményeiből készült oszlopdiagramokból kitűnik, hogy a karbamid tartalmu tápoldatban készült termék esszenciális aminosav összetétele kedvezően változik az alábbiak szerint:

A P III. jelzésű törzs tenyészetében a LYS, ARG, VAL, MET, ILE, LEU és PHE mennyisége emelkedik, különösen az ARG és PHE, ugrásszerűen a LEU. / 32. ábra /

A recésgyomorból izolált R II. jelzésű törzs tenyésztésében valamennyi esszenciális aminosav mennyisége emelkedik, de leginkább a takarmányozási szempontból igen fontos LYS-é és MET-é. / 33. ábra./

A vizsgált törzsek fehérjetartalmának minősége tovább javítható a kérődzők gyomrában végbemenő baktérium-véglény konverzió mesterséges uton történő megvalósításával. Összehasonlító vizsgálataim szerint a mesterséges konverzióból nyert termék LYS, ARG, MET, ILE, LEU és PHE tartalma nagyobb, mint a recésgyomorból izolált baktériumtörzsből készült fermentációs terméké. / 34. ábra./

A baktériumokból TRP-t nem tudtam kimutatni és a véglényből is csak igen keveset. / 30. ábra./

A vizsgált baktériumtörzsek közül gyakorlati célra az R II. jelzésű törzs látszik előnyösebbnek. Tekintve, hogy a triptofán kivételével az összes többi aminosavat tartalmazza, másrészt mint a szarvasmarha gyomorflórájának állandó komponense, nem valószínű, hogy az állatra nézve káros hatása.

A P III. jelzésű baktériumtörzs az általunk korábban megvizsgált ligninbontók közül a legjobb metanol-hasznosítónak bizonyult, mégis, mint testidegen mikroorganizmus, az előbbi mellett háttérbe szorul, mert az általa termelt piros pigment szerkezete és hatása egyelőre ismeretlen.

A vizsgált baktériumtörzsekből készült termékeken, sőt azok szűrletében tenyésztett véglények fehérje-produkciója kedvezőnek látszik.

Takarmányozási célra való beiktatásuk annál is inkább indokolt, mert a baktérium-fermentum szűrletében melléktermékként tenyészthetők és izolálásuk, valamint feldolgozásuk aránylag egyszerű.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataim a metanol-fehérje konverzióban keletkezett termékek aminosav összetételének megállapítására és a termékek minőségének javítására irányultak.

Az esszenciális aminosavak tartalmának növelését karbamid adagolással értem el. Megállapítottam, hogy a baktériumtenyészetekből eredő termék minősége továbbjavítható véglények tenyészetéből készült termékek bekeverésével.

A termelés és minőség javítási kísérletek megtervezése és lefolytatása a kvalitatív és kvantitatív aminosav analízisek eredményei alapján történtek.

7. I R O D A L O M

1. Asthana, H. - Humphrey, A. E. - Moritz, V.: /1971/ Growth of Yeast on Methanol as the Sole Carbon Substrate
Biotechn. Bioengng. 13, /6/, 923
2. Baitner K.: /1967/ Gazdasági állatok takarmányozása I.
Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. p.73.
3. Barbrioli, G.: /1965/ Papierchromatographische Trennung und Bestimmung von 22 Aminosäuren.
Mikrochim. Acta p.652.
4. Bewersdorff, M. - Dostalek, M.: /1971/ The Use of Methane for Production of Bacterial Protein.
Biotechn. Bioengng. 13, 49
5. Boissonnas, R. A.: /1950/ Séparation rapide des acides aminés par chromatographie ascendante bidimensionnelle sur papier.
Helv. chim. Acta 33, 1966
6. El Bujard-Mauron, J.: /1966/ A Two-Dimensional Separation of Acid, Neutral and Basic Amino Acids by Thin Layer Chromatography on Cellulose.
J. Chromatogr. 21, 19
7. Chalfan, Y. - Mateles, R. I.: /1972/ New Pseudomonad Utilizing Methanol for Growth.
Appl. Microbiol. 23, 135



8. Champagnat, A. - Vernet, C. - Laine, B. - Filosa, J.:
/1963/ Biosynthesis of Protein-Vitamin concentrates
from petroleum.
Nature /London/ 197, 13
9. Dévényi, T.: /1968/ Single-column Procedure for the
Automatic Analysis of Amino Acids.
Acta biochim.biophys.Acad.Sci.hung. 3, /4/, 429
10. Dévényi, T.: /1969/ Modified Single-column Procedure
for the Automatic Analysis of Amino Acids.
Acta biochim.biophys.Acad.Sci.hung. 4, /3/, 297
11. Dévényi, T.: /1970/ Thin Layer Ion Exchange Chromatog-
raphy on Resin-Coated Chromatoplates. I.
Acta biochim.biophys.Acad.Sci.hung. 5, /4/, 435
12. Dévényi, T. - Bati, J. - Fábián, F.: /1971/ Detection and
Determination of Tryptophan by Ion Exchange Chro-
matography.
Acta biochim.biophys.Acad.Sci.hung. 6, /2/, 133
13. Dévényi, T. - Hazai, I. - Ferenczi, S. - Bati, J.: /1971/
Thin-Layer Ion Exchange Chromatography on Resin-
Coated Chromatoplates V.
Acta biochim.biophys.Acad.Sci.hung. 6, /4/, 385
14. Dittmann, J.: /1963/ Ein neues System zur Trennung eini-
ges Aminosäuren, Amide und Amine an dünnen Cellu-
lose-Schichten.
Z.klin.Chem. 1, 190

15. Dostalek, M. - Munk, V. - Volfova, O. - Pecka, K.: /1968/
Cultivation of the Yeast *Candida lipolytica* on
Hydrocarbons.
Biotechn.Bioengng. 10, 33
16. Drawert, F. - Reuter, K.H.: /1969/ Phenol als Inhibitor
der Huminbildung bei der Proteinhydrolyse.
Angew.Chem. 75, 169
17. Dworkin, M. - Foster, J.W.: /1956/ Studies on *Pseudomonas Methanica* /Söhngen/ Nov.Comb.
J.Bact. 72, 646
18. Erdey L.: /1965/ Bevezetés a kémiai analízisbe. II.
Tankönyvkiadó, Budapest. p.84
19. Ertola, R.J. - Mazza, L.A. - Balatti, A.P. - Sanahuja, J.:
/1969/ Composition of Cell Material and Biological
Value of the Cellular Protein of a Micro-
coccus Strain Grown on Hydrocarbons.
Biotechn.Bioengng. 11, 409
20. Ferenczi, S. - Bati, J. - Dévényi, T.: /1971/ Thin Layer
Ion Exchange Chromatography on Resin-Coated Chromatoplates III.
Acta biochim.biophys.Acad.Sci.hung. 6, /2/, 123
21. Hamer, G. - Hedén, C.G. - Carenberg, C.O.: /1967/ Methane
as a Carbon Substrate for the Production of Microbial Cells.
Biotechn.Bioengng. 9, 499

22. Hais, I.M. - Macek, K.: /1961/ A papírkromatográfia kézikönyve.
Akadémiai Kiadó. Budapest. p.157
23. Harrington, A.A. - Kallio, R.E.: /1960/ Oxidation of Methanol and Formaldehyde by Pseudomonas Methanica.
Canad.J.Microbiol. 6, 1
24. Häggström, L.: /1969/ Studies on Methanol Oxidizing Bacteria.
Biotechn.Bioengng. 11, 1043
25. Humphrey, A.E.: /1967/ A Critical Review of Hydrocarbon Fermentation and Their Industrial Utilization.
Biotechn.Bioengng. 9, 3
26. Kaneda, T. - Roxburgh, J.M.: /1959/ A Methanol-Utilizing Bacterium.
Canad.J.Microbiol. 5, 87
27. Leadbetter, E.R. - Foster, J.W.: /1959/ Incorporation of Molecular Oxygen in Bacterial Cells Utilizing Hydrocarbons for Growth.
Nature /London/ 184, 1428
28. Linskens, H.F.: /1959/ Papierchromatographie in der Botanik.
Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg p.166
29. Linskens, H.F.: /1959/ Papierchromatographie in der Botanik.
Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg p.14

30. Linskens, H.F. - Stange, L.: /1961/ Praktikum der Papierchromatographie.
Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg p.15
31. Liu, T.Y. - Chang, Y.H.: /1971/ Hydrolysis of Proteins with p-Toluenesulfonic Acid Determination of Tryptophan.
J.biol.Chem. 246, 2842
32. Mahowald, T.A. - Noltmann, E.A. - Kuby, S.A.: /1962/ Studies on Adenosine Triphosphate Transphosphorylases.
J.biol.Chem. 237, 1146
33. Matsubara, H. - Sasaki, R.M.: /1969/ High Recovery of Tryptophan from Acid Hydrolysates of Proteins.
Biochem.biophys.Res.Comm. 35, 175
34. Mázor L.: /1962/ Szerveskémiiai analízis II.
Műszaki Könyvkiadó. Budapest p.162
35. Miller, T. - Johnson, M.J.: /1966/ Utilization of Normal Alkanes by Yeast.
Biotechn.Bioengng. 8, 549
36. Miller, T.L. - Johnson, M.J.: /1966/ Utilization of Yeast on Gas Oil.
Biotechn.Bioengng. 8, 567
37. Moffat, E. - Lytle, R.: /1959/ Polychromatic Technique for Amino Acids on Paper Chromatograms.
Analyt.Chem. 31, 926

38. Moore, S. - Stein, W.H.: /1958/ Chromatography of
Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins.
Analyt.Chem. 30, 1158
39. Moore, S. - Stein, W.H.: /1963/ Chromatographic Deter-
mination of Amino Acids by the Use of Automatic
Recording Equipment.
in Colowick, S.P. - Kaplan, N.O. Methods in
Enzymology. VI.
Acad.Press. New York p.819
40. Munk, V. - Dostalek, M. - Volfova, O.: /1969/ Cultiva-
tion of Yeast on Gas Oil.
Biotechn.Bioengng. 11, 383
41. Oelschlegel, F.J. - Schroeder, J.R. - Stahmann, M.A.:
/1970/ A Simple Procedure for Basic Hydrolysis
of Proteins and Rapid Determination of Tryptophan
Using a Starch Column.
Analyt.Biochem. 34, 331
42. Partridge, S.M.: /1948/ Filter-paper Partition Chroma-
tography of Sugars.
Biochem.J. 42, 238
43. Pataki, G.: /1966/ Dünnschichtchromatographie in der
Aminosäure and Peptid-Chemie.
Walter de Gruyter et Co. Berlin p.94
44. Patton, A.R. - Chism, P.: /1951/ Quantitative Paper
Chromatography of Amino Acids.
Analyt.Chem. 23, 1683

45. Piez, K.A. - Morris, L.: /1960/ A Modified Procedure
for the Automatic Analysis of Amino Acids.
Analyt. Biochem. 1, 187
46. Redfield, R.R.: /1953/ Two-Dimensional Paper Chroma-
tographic Systems with High Resolving Power
for Amino Acids.
Biochim. biophys. Acta 10, 344
47. Rosen, H.: /1957/ A Modified Ninhydrin Colorimetric
Analysis for Amino Acids.
Arch. Biochem. 67, 10
48. Schulek E. - Szabó Z.: /1966/ A kvantitatív analiti-
kai kémia elvi alapjai és módszerei.
Tankönyvkiadó. Budapest p. 195
49. Sjöholm, I.: /1964/ Enzymatic Inactivation of Oxytocin.
Acta chem. scand. 18, 889
50. Snell, F.D. - Snell, C.T.: /1953/ Colorimetric methods
of analysis III. D. Van Nostrand Company, Inc. Prin-
ceton, New Jersey, Toronto, New York, London p. 45
51. Snell, F.D. - Snell, C.T.: /1953/ Colorimetric methods
of analysis III. D. Van Nostrand Company, Inc. Prin-
ceton, New Jersey, Toronto, New York, London p. 45
52. Tyihák, E. - Vágújfalvi, D.: /1970/ Dragendorff Reactions
for Visualisation of Amino Acids and Amino Acid
Derivates Separated by Paper or Thin-Layer Chro-
matography.
J. Chromatogr. 49, 343

53. Vary, P.S. - Johnson, M.J.: /1967/ Cell yields of
Bacteria Grown on Methane.
Appl. Microbiol. 15, 1473
54. Vámosné, Vigyázó L.: /1967/ Papirelektroforézis.
Műszaki Könyvkiadó. Budapest p. 240
55. Wagner, F. - Kleemann, T.H. - Zahn, W.: /1969/ Microbial
Transformation of Hydrocarbons.
Biotechn. Bioengng. 11, 393
56. Wolnak, B. - Andreen, B.H. - Chisholm, J.A. - Saaden, M.:
/1967/ Fermentation of Methane.
Biotechn. Bioengng. 2, 57
57. Yamada, K. - Takahashi, I. - Kawabata, Y. - Okada, T. -
Onihara, T.: /1968/ SCP from Yeast and Bacteria
Grown on Hydrocarbons.
in Mateles, R.I. - Tannenbaum, S.R. Single Cell
Protein.
M.I.T. Press. Cambridge. Mass. p. 192
58. Yoshida, F. - Yamane, T. - Yagi, H.: /1971/ Mechanism of
Uptake of Liquid Hydrocarbons by Microorganisms.
Biotechn. Bioengng. 13, 215



Ezuton fejezem ki köszönetemet

dr. Krámlí András
egyetemi tanár urnak

hogy a téma kidolgozását az Intézetben lehetővé tette,
munkámat irányította és értékes tanácsaival támogatta.

Köszönetet mondok

dr. Kiszely György
egyetemi tanár urnak

önzetlen szakmai támogatásáért.