



Pannon Egyetem
Mérnöki Kar

Pannon Egyetem
Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola

Streptomyces coelicolor biofilm kialakítása
membrán gradosztát reaktorban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette:
Lajtai-Szabó Piroska

DOI:10.18136/PE.2026.980

Témavezető:
Dr. Nemestóthy Nándor
egyetemi tanár

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar
Bio-, Környezet- és Vegyészmérnöki Kutató-Fejlesztő Központ
Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutatócsoport

Veszprém

2025

Streptomyces coelicolor biofilm kialakítása
membrán gradosztát reaktorban

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Vegyésmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskolája keretében

bio-, környezet- és vegyésmérnöki tudományok tudományágban

Írta: Lajtai-Szabó Piroska

Témavezető: Dr. Nemestóthy Nándor

Elfogadásra javaslom: igen / nem.

.....
témavezető

Az értekezés bírálatra bocsátható.

.....
TDHT elnök

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján %-ot ért el.

A bíráló Bizottság tagjai:

elnök:.....

bírálok:.....

tagok:.....

Veszprém,

.....
Bíráló Bizottság elnök

A doktori (PhD) oklevél minősítése:.....

Veszprém,

.....
EDHT elnök

Absztrakt

A mikrobiális szekunder metabolitok jellemzően környezeti stressz – tápanyag-limitáció, kompetitív fajok jelenléte, gátló anyagcsere-termékek felhalmozódása, stb. – hatására termelődő anyagok, melyek mind ökológiai, mind gazdasági szempontból kiemelkedő fontosságúak. Az iparilag releváns termelő mikroorganizmusok között az egyik legjelentősebb a *Streptomyces* nemzetség, melynek tagjai többek között antimikrobiális és tumorellenes ágenseket, immunszuppresszánsokat, enzimeket, pigmenteket és sziderofórokat képesek előállítani.

Az ipari termelés során egyrészt elegendő tápanyagot kell biztosítani a mikrobák fejlődéséhez, ugyanakkor meg kell valósítani a terméképződéshez szükséges limitációt. A kettő közti egyensúly hosszú távú fenntartása a hagyományos technológiákkal nehezen kivitelezhető, ezért előállításuk jellemzően szakaszos üzemmódban történik, holott a folyamatos eljárás műszaki és gazdasági előnyökkel járna. Erre kínál megoldást egy viszonylag új, kevésbé ismert berendezés, a membrán gradosztát reaktor (MGR). Speciális kialakításának köszönhetően a reaktorban párhuzamosan zajlik a biofilm megújulása és a szekunder metabolitok keletkezése, továbbá lehetőség van folyamatos termékeltételre.

A membrán gradosztát reaktor működési elvével és gyakorlati megvalósításával kapcsolatos kérdések közül kutatásom során a membrán inokulálására, *Streptomyces coelicolor* biofilm kialakítására fókuszáltam. A kísérleti munkám során kétféle (Pentair X-Flow és Microdyn-Nadir Ultradyne) kapilláris ultraszűrő membránmodulról megállapítottam, hogy az elégtelen sejtdhézis miatt – az alkalmazott kísérleti paraméterek mellett – nem alkalmazhatók membrán gradosztát reaktorként. A baktérium fermentlevének szűrési sajátosságait vizsgálva jellemeztem a pH, a viszkozitás és a szűrőlepeny fajlagos ellenállása közti összefüggéseket. A baktérium kolonizációs képességének megfigyelése során megállapítottam, hogy hidrofíli PVDF mikroszűrő lapmembránokon a *S. coelicolor* telepek terjedése a szilárd táptalajon történő növekedésnél lassabb, de a növekedési kinetika jellege a membrán hatására nem változik. Kidolgoztam a membrán gradosztát reaktor egyszerűsített modellrendszerét, melyre használati mintaoltalmat nyújtottam be. A modellrendszerben végzett kísérletek során a biofilm vastagságát és a membrán borítottságát együttesen értékelve a 3 g/l koncentrációban alkalmazott agaroldat ideális inokulálási segédanyagának bizonyult. A modellrendszer továbbfejlesztéseként kidolgoztam egy léptéknövelt reaktort többcsatornás kapilláris membránnal, melyben elsőként vizsgáltam SevenBore membrán alkalmazhatóságát membrán gradosztát reaktorként.

Abstract

The production of microbial secondary metabolites is typically triggered by environmental stress factors like nutrient limitation, the presence of competitive species, accumulation of inhibitory metabolites, etc. These compounds are of outstanding importance from both ecological and economic points of view. Among industrially relevant microorganisms, the members of *Streptomyces* genus are among the most significant species since they can produce antimicrobial and anti-tumor agents, immunosuppressants, enzymes, pigments and siderophores.

During industrial production, a sufficient amount of nutrients must be provided for microbial growth; on the other hand, limitation is required for product formation must be implemented. The balance between these two requirements during long-term operation is hard to maintain with conventional technologies, thus, their production mostly occurs in batch mode despite of the technical and economical benefits of continuous operation. A relatively new, less known equipment, the membrane gradostat reactor (MGR) offers a solution for this situation. Due to its special design, in the reactor, biofilm renewal and secondary metabolite production occur simultaneously; moreover, continuous product removal is possible.

From among the questions related to the MGR's operating principles and practical implementations, this study focuses on the inoculation of the membrane and the development of *Streptomyces coelicolor* biofilm. During experimental work, it was shown that two types of capillary ultrafiltration membrane modules (Pentair X-Flow and Microdyn-Nadir Ultradyne) are not applicable as membrane gradostat reactors because of insufficient cell adhesion – under the applied experimental circumstances. Investigating the filtration characteristic of the bacterium's fermentation broth, the relationship between pH, viscosity and specific cake resistance were described. During the observation of the bacterium's colonization ability, it was established that the colony spread of *S. coelicolor* on hydrophilic PVDF microfiltration flat sheet membranes was slower than on solid medium; however, the characteristic of growth kinetics had not been altered due to the membrane. A simplified model system of MGR had been developed and a utility model has been submitted for it. During the experiments carried out in the model system, agar solution applied in 3 g/L concentration proved to be an ideal inoculation additive considering biofilm thickness and membrane coverage collectively. As an improvement of the model system, a scaled-up reactor with multichannel capillary membrane was developed and for the first time, the applicability of SevenBore membrane as MGR was investigated in this equipment.

Zusammenfassung

Die Produktion der mikrobiellen Sekundärmetaboliten wird in der Regel durch Umweltstressfaktoren wie Nährstoffmangel, das Vorhandensein konkurrierender Arten, die Anreicherung hemmender Metaboliten usw. ausgelöst. Diese Verbindungen sind sowohl aus ökologischer als auch aus wirtschaftlicher Sicht von herausragender Bedeutung. Unter den industriell relevanten Mikroorganismen sind die Mitglieder der Gattung *Streptomyces* eine der bedeutendsten Arten, da sie antimikrobielle und antitumorale Wirkstoffe, Immunsuppressiva, Enzyme, Pigmente und Siderophore produzieren können.

Bei der industriellen Produktion muss eine ausreichende Menge an Nährstoffen für das mikrobielle Wachstum bereitgestellt werden; andererseits müssen die für die Produktbildung erforderlichen Einschränkungen umgesetzt werden. Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Anforderungen ist bei lang andauernden Prozessen mit herkömmlichen Technologien nur schwer aufrechtzuerhalten, sodass die Produktion trotz der technischen und wirtschaftlichen Vorteile eines kontinuierlichen Betriebs meist im Batch-Modus erfolgt. Eine relativ neue, weniger bekannte Anlage, der Membran Gradostat Reaktor (MGR), bietet eine Lösung für diese Situation. Aufgrund seiner speziellen Konstruktion finden im Reaktor die Erneuerung des Biofilms und die Produktion von Sekundärmetaboliten gleichzeitig statt; darüber hinaus ist eine kontinuierliche Produktentnahme möglich.

Unter den Fragen zu den Funktionsprinzipien und praktischen Anwendungen des MGR konzentriert sich diese Studie auf die Beimpfung der Membran und die Entwicklung des *Streptomyces coelicolor* Biofilm. Während der experimentellen Arbeit zeigte sich, dass zwei Arten von Kapillar Ultrafiltration Membranmodulen (Pentair X-Flow und Microdyn-Nadir Ultradyn) aufgrund unzureichender Zelladhäsion unter den angewandten Versuchsbedingungen nicht als Membran Gradostat Reaktoren geeignet sind. Bei der Untersuchung der Filtrationseigenschaften der Fermentationsbrühe des Bakteriums wurde der Zusammenhang zwischen pH-Wert, Viskosität und spezifischem Kuchenwiderstand beschrieben. Bei der Beobachtung der Kolonisationsfähigkeit der Bakterien wurde festgestellt, dass die Koloniausbreitung von *S. coelicolor* auf hydrophilen PVDF Mikrofiltration Flachmembranen langsamer war als auf festem Medium; die Charakteristik der Wachstumskinetik wurde jedoch durch die Membran nicht verändert. Es wurde ein vereinfachtes Modellsystem für MGR entwickelt und ein Gebrauchsmuster dafür angemeldet. Während der im Modellsystem durchgeführten Experimente erwies sich eine Agar-Lösung in einer Konzentration von 3 g/l als idealer Impfzusatz, wenn man die Biofilmdicke und die Membranbedeckung zusammen betrachtet. Als Verbesserung des Modellsystems wurde ein Scale-up-Reaktor mit Multi-Channel-Kapillarmembran entwickelt und erstmals die Anwendbarkeit der SevenBore Membran als MGR in dieser Anlage untersucht.

Tartalomjegyzék	
Absztrakt	1
Abstract	2
Zusammenfassung	3
Jelölésjegyzék.....	6
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. Mikrobiális szekunder metabolitok	9
2.2. <i>Streptomyces coelicolor</i>	12
2.2.1. Rendszertani besorolás, életmód.....	14
2.2.2. Morfológia	15
2.2.3. Életciklus különböző tápközegekben.....	17
2.2.4. <i>Streptomyces coelicolor</i> szekunder metabolizmusa.....	19
2.3. Membrán gradosztát reaktor.....	22
2.3.1. A rendszer felépítése, működési elve.....	23
2.3.2. Membránok és modulok az MGR-ben.....	26
2.3.3. Inokulálási technika	27
2.3.4. Biofilm és potenciális termelő törzsek az MGR-ben	28
2.3.5. MGR összehasonlítása szubmerz és szilárd fázisú fermentációkkal	30
3. Kísérleti munka felépítése és célkitűzései	34
4. Anyagok és módszerek	36
4.1. Felhasznált anyagok, membránok és membránmodulok	36
4.2. Mikroorganizmus, törzsfenntartás.....	39
4.3. Membrán gradosztát reaktor kialakítása és üzemeltetése	41
4.4. Szűrési kísérletek.....	43
4.4.1. Szűrés szűrőpapíron – módszerek.....	45
4.4.2. Szűrés kapilláris modulokon – módszerek.....	46
4.5. Biofilm terjedése lapmembránokon	48
4.6. Biofilm vizsgálata egyedi kapilláris membránszálakon.....	49
4.7. SevenBore reaktor	54
4.8. Analitikai eljárások	57

4.8.1.	Aktinorodin mennyiségének meghatározása	57
4.8.2.	Cukrok meghatározása	57
4.8.3.	EPS extrakciója és poliszacharid-tartalmának meghatározása	58
4.8.4.	Száraz sejt tömeg mérése	59
4.8.5.	Mikroszkópos vizsgálatok	60
4.8.6.	Viszkozitás és sűrűség mérése	60
5.	Eredmények	61
5.1.	Membrán gradosztát reaktor	61
5.2.	Fermentlé szűrhetőségének és kapilláris modulok MGR-ben való alkalmazhatóságának vizsgálata	62
5.2.1.	Fermentlevek általános jellemzése	63
5.2.2.	Szűrés szűrőpapíron – eredmények	65
5.2.3.	Szűrés kapilláris modulokon – eredmények	66
5.2.4.	Szűrési kísérletek eredményeiből levont konklúziók	68
5.3.	Biofilm terjedése lapmembránokon – eredmények és értékelésük	70
5.4.	Egyedi kapilláris membránszállakon végzett kísérletek eredménye	75
5.4.1.	Inokulálási segédanyagok biofilm-képződésre gyakorolt hatásának vizsgálata	75
5.4.2.	A3-as kapillárisok hosszútávú üzemeltetése	82
5.4.3.	Eltömődés a kapilláris belsejében	84
5.4.4.	Inhomogén tápanyag-eloszlás a kapillárisokban	86
5.5.	Biofilm kialakítása SevenBore membránon – léptéknövelt MGR	88
5.5.1.	A reaktorok üzemeltetése során tett megfigyelések	88
5.5.2.	A kísérlet leállítását követő analízis	90
5.5.3.	További megfontolások és fejlesztési lehetőségek	96
6.	Összefoglalás	97
7.	Tézispontok	100
8.	Irodalomjegyzék	102
9.	Publikációs jegyzék	110
10.	Köszönetnyilvánítás	112

Jelölésjegyzék

Rövidítések

A1, A3, A5	1, 3, ill. 5 g/l koncentrációjú agaroldat (inokulálási segédanyag)
C2, C5, C8	2, 5, ill. 8 g/l koncentrációjú CMC-oldat (inokulálási segédanyag)
CCR	karbon katabolit represszió (<i>carbon catabolite repression</i>)
CDA	kalciumfüggő ionofór antibiotikum (<i>calcium-dependent antibiotic</i>)
CMC	karboximetil-cellulóz
EPS	extracelluláris polimer anyagok (<i>extracellular polymeric substances</i>)
F1	48 óra fermentációs idejű fermentlé (szakaszos szűrés)
F2	96 óra fermentációs idejű fermentlé (szakaszos szűrés)
F3	48 óra fermentációs idejű fermentlé (szűrés kapilláris modulon)
F4	168 óra fermentációs idejű fermentlé (szűrés kapilláris modulon)
LiP	lignin-peroxidáz
MC	többszálas membrán gradosztát reaktor (<i>multicapillary</i>)
MGR	membrán gradosztát reaktor
MnP	mangán-peroxidáz
MPEC	mikroszemcsékkel segített tenyésztés (<i>microparticle enhanced cultivation</i>)
NMP	N-metil-2-pirrolidon
PC1, PC2	első, ill. második főkomponens
PCA	főkomponens-analízis (<i>principal component analysis</i>)
PCD	programozott sejthalál (<i>programmed cell death</i>)
PEG	polietilén-glikol
PES	poliéterszulfon
PF68	Pluronic F-68 (felületaktív anyag)
PFOB	perfluoro-oktil bromid
PhoP	foszfát regulátor
PSU	poliszulfon
PVDF	polivinilidén-fluorid
SC	egyszálas membrán gradosztát reaktor (<i>single capillary</i>)
SCM	a törzsfenntartáshoz használt tápközeg („ <i>Streptomyces coelicolor</i> maintenance”)

Jelölések

A	felület	[m ² , cm ²]
b_f	függőleges borítottság	[%]
b_v	vízszintes borítottság	[%]
$d_{\text{átlag}}$	átlagos biofilmvastagság	[mm]
d_{max}	maximális biofilmvastagság	[mm]
E	abszorbancia	[-]
J	fluxus	[m ³ /(m ² ·s)]
k	maximális területi növekedés relatív sebessége	[cm ² /nap]
l	küvetta vastagsága	[cm]
R	szűrési ellenállás (teljes)	[1/m]
R_G	gélréteg ellenállása	[1/m]
R_M	membrán ellenállása	[1/m]
R_P	póruseltömődésből származó ellenállás	[1/m]
t	idő	[s, h, nap]
V	térfogat	[m ³]
α	szűrőlepeny fajlagos ellenállása	[m/kg]
Δp	nyomásesés	[Pa]
ε	moláris extinkciós koefficiens	[1/(M cm)]
λ	lag-fázis időtartama	[nap]
μ	dinamikai viszkozitás	[Pa · s]
ρ	fermentlé szárazanyag-tartalma	[kg szárazanyag / m ³]

1. Bevezetés

Az ipari biotechnológia által előállított termékek kiemelkedő fontosságú csoportját képezik a mikrobiális szekunder metabolitok. Ezek a vegyületek a mikrobanövekedés későbbi fázisaiban, jellemzően kedvezőtlen környezeti körülmények – kis mennyiségű vagy nehezen hozzáférhető tápanyagok, szárazság, kompetitív fajok jelenléte, stb. – esetén keletkeznek, ennek megfelelően az adott faj védekezésében, túlélésében, fajon belüli és fajok közötti interakciókban vesznek részt. Ökológiai szerepük mellett jelentős gazdasági potenciállal is rendelkeznek, széles körben alkalmazhatók többek között humán- és állatgyógyászatban, mezőgazdaságban, környezetvédelemben, élelmiszerek és kozmetikumok előállításánál. A legjelentősebb termelő törzsek egyike a *Streptomyces* nemzetség, metabolitjaik közé tartozik számos biológiai aktivitással rendelkező vegyület – antimikrobiális és tumorellenes szerek, immun-suppresszánsok –, valamint hidrolázok, enzim inhibitorok, pigmentek, siderofórok és herbicidek.

A szekunder metabolitok – különösen az antimikrobiális szerek – ipari előállítása jellemzően szakaszos üzemmódban, szubmerz fermentációval történik, sok esetben az adott eljárás-hoz génmódosított törzssel. Ugyanakkor számos olyan metabolit létezik, mely csak szilárd felületi tenyészetben (biofilmben), a természetes körülményekhez hasonló feltételek mellett termelődik, tehát a szubmerz fermentáció ily módon korlátozza a potenciálisan előállítható vegyületek körét. Másrészt a folyamatos üzemmód megvalósítása műszaki és gazdasági előnyökkel is jár. Ezen célok elérését teszi lehetővé egy viszonylag új, kevésbé ismert berendezés, a membrán gradosztát reaktor, melyben a mikroorganizmus kapilláris membránok külső felületén biofilmet képezve növekszik, a tápanyagot pedig a membránon keresztül veszi fel, a természetes környezethez hasonlóan. Ez a kialakítás lehetővé teszi az extracelluláris termék folyamatos elvételét, továbbá ideális esetben egyidejűleg megvalósítható a biofilm megújulása és a szekunder metabolit termelése, tehát hosszútávon működtethető a rendszer.

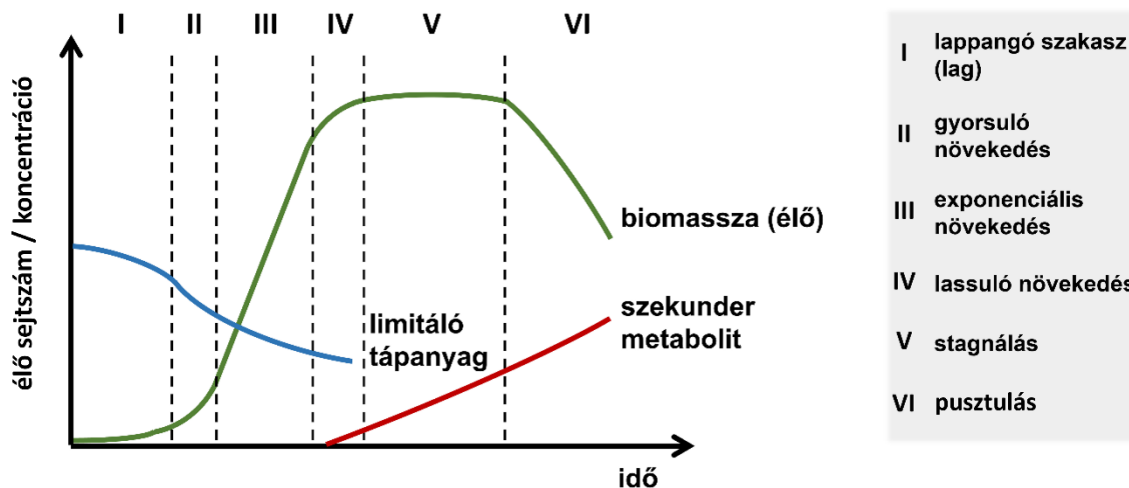
Mivel a membrán gradosztát reaktorral kapcsolatban jelenleg korlátozott számú publikáció áll rendelkezésre, mind az elméleti háttérrel, mind a gyakorlati megvalósítást illetően számos megválaszolatlan kérdés merül fel. Ezek közül a jelen kutatás elsődlegesen a membrán inokulálására, a biofilm kialakulásának folyamatára és az azt befolyásoló tényezőkre fókuszál. A kísérleti munkához választott mikroorganizmus a *Streptomyces* nemzetség egyik modell-szervezete, a *Streptomyces coelicolor* fonalas talajbaktérium, az alkalmazott membránok között pedig lapmembrán, egyedi kapilláris szál, többcsatornás kapilláris membrán, valamint kétféle ultraszűrő membránmodul is megtalálható.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Mikrobiális szekunder metabolitok

A mikrobiális szekunder metabolitok mikroorganizmusok által előállított, nem növekedéshez kötött anyagok, melyeknek változatos kémiai szerkezetük és fiziológiai szerepük van. A termelődésük időbeli természetét genetikailag meghatározott – jellemzően a mikrobanövekedés kései fázisában kezdődik –, de ezen gének expresszióját nagymértékben befolyásolják a környezeti tényezők [1].

A 2.1. ábra a mikrobanövekedés és a szekunder metabolizmus kinetikai viszonyát szemlélteti [2]. A mikrobiális növekedés lappangási (lag) szakaszában a környezethez való adaptáció zajlik, ami a következő fázisban is folytatódik, de emellett fokozatosan gyorsuló növekedés is megfigyelhető. Az exponenciális szakaszban maximális növekedési sebesség jellemzi a teljes sejttömeget, majd a korlátozó környezeti tényezők (rendelkezésre álló tér, tápanyag mennyisége, gátló anyagcsere-termékek felhalmozódása, kompetitív mikroorganizmusok jelenléte, stb.) a növekedés lassulását eredményezik, ezzel párhuzamosan pedig megkezdődik a szekunder metabolitok termelődése. A stagnálási és a pusztulási fázisban tovább folytatódik a szekunder metabolizmus, miközben a szaporodási rátát fokozatosan meghaladja a sejtek lízise [3].



2.1. ábra: Szekunder metabolitok termelése és a mikrobanövekedés kinetikája (az ábra Geris és mtsai. publikációjában [2] található ábra alapján készült)

Az egyik legáltalánosabb stresszfaktor a fenti ábrán is jelzett tápanyag-limitáció, ami jelentheti a szén-, nitrogén- vagy foszforforrás mennyiségét, illetve minőségi változását is. Emellett számos más tényező – kompetitív mikroorganizmus jelenléte, pH-változás, gátló anyagcsere-termék felhalmozódása, stb. – indukálhatja a sejtműködést szabályozó események kaskádját, ami morfológiai differenciálódást és a szekunder metabolitok termelődését eredmé-

nyezi [1]. (Mivel mind a környezeti szignálok, mind a lehetséges válaszreakciók rendkívül szerteágazóak, csupán a kutatásom tárgyát képező *Streptomyces* fajok szekunder metabolizmusát mutatom be részletesebben a 2.2.4. fejezetben.)

A másodlagos anyagcsere-termékek képződési körülményei szorosan összefüggenek biológiai szerepükkel, hiszen ezek a vegyületek a sejtek védekezési és túlélési mechanizmusában játszanak szerepet, valamint szabályozzák a populáción belüli és a fajok közti interakciókat [4]. A könnyen felvehető tápanyagok kimerülése esetén az extracelluláris hidrolázok megkezdik a komplex szubsztrátok lebontását, így azok hozzáférhetővé válnak a sejtek számára [5]. A fémionok felvételét különböző transzporterek segíthetik elő, melyek legismertebb képviselői a vasionok felvételét végző sziderofórok. A különböző antimikrobiális anyagok – antibiotikumok, gombaölő és vírusellenes vegyületek – gátolják a kompetitív fajok szaporodását, ami nemcsak a termelő mikroba, de a vele szimbiózisban élő növény számára is védelmet nyújt [6]. A további lehetséges biológiai funkciók közé tartozik a biofilm kialakulásának és terjedésének elősegítése, a toxikus hatásokkal szembeni védelem [7], spóraképződés és csírázás szabályozása [6], stb.

A szekunder metabolitok nem csak a mikroorganizmusok életében játszanak fontos szerepet, hanem gazdasági jelentőségük is megkérdőjelezhetetlen. Legismertebb képviselőik az antibiotikumok, de a gyógyászati alkalmazásokhoz tartoznak tumorellenes szerek, immunszuppresszánsok, koleszterinszint-csökkentő, gyulladáscsökkentő és diabétesz kezelésére szolgáló hatóanyagok is [8]. A humán- és állatgyógyászati hasznosítás mellett élelmiszerek, kozmetikumok előállításánál, fermentációs feldolgozás műveleteknél, növényvédelemben és egyéb mezőgazdasági, környezetvédelmi területeken is találkozhatunk szekunder metabolitokkal. Széleskörű alkalmazhatóságukat a **2.1. táblázat** példái szemléltetik a teljesség igénye nélkül.

A mikrobiális eredetű anyagok biokompatibilitásuknak és biológiai lebonthatóságuknak köszönhetően a hagyományos vegyipari termékekhez képest számos előnnyel rendelkeznek. A biopolimerek bevonatként, illetve csomagolóanyagként történő alkalmazásával csökkenthető a csomagolásból származó műanyag-hulladékok mennyisége, valamint gyógyszerhatóanyagok, vitaminok, probiotikumok egészségre ártalmatlan hordozóanyagaként funkcionálhatnak. A bioflokulánsok és felületaktív anyagok amellet, hogy széles pH- és hőmérséklet-tartományban alkalmazhatók, környezetbarát alternatívát jelentenek, hiszen nem vagy kevésbé toxikusak, biológiai úton lebomlanak, használatuk nem okoz másodlagos szennyezést, és előállításukhoz sok esetben megújuló forrásokat vagy ipari melléktermékeket is lehet alapanyagként hasznosítani. A mikrobiális flokkulálószerkeket nagyon finom részecskéket is képesek koagulálni, valamint a gyakorlatban elterjedt polialumínium-kloridhoz képest kevesebb iszap keletkezik a használatuk során. A komplex biológiai makromolekulák egyedi funkciók csoportjaiknak köszönhetően alkalmasak lehetnek különböző ipari szennyezők ártalmatlanítására [7]. Az antimikrobiális szerek és egyéb gyógyszerhatóanyagok jelentős részénél pedig a teljes kémiai szintézis a vegyületek komplexitása miatt gazdaságosan nem kivitelezhető. Bár létez-

nek félszintetikus antibiotikumok, valamint teljesen szintetikus helyettesítőkkel kapcsolatban is zajlanak kutatások [9], gyártásuk jelenleg alapvetően fermentációs úton történik.

2.1. táblázat: Mikrobiális szekunder metabolitok főbb típusai és alkalmazási területei

típus	kémiai szerkezet (példa)	felhasználási terület	alkalmazás	forrás
antimikrobiális szerek	aminosav- és szénhidrátszármazékok, kinonok, laktonok	gyógyászat	antibiotikumok, gombaölő, vírusölő, parazitaellenes szerek	[8]
		mezőgazdaság		
biopolimerek	poliszacharidok (xantán, dextrans, alginát)	élelmiszerek, gyógyszerek, kozmetikumok	stabilizátor, emulzifikáló	[7]
		gyógyászat	véralvadásgátló, koleszterinszint-csökkentő	
flokulánsok	poliszacharidok és / vagy fehérjék	vízkezelés	vízisztítás, szennyvízkezelés	[10]
		fermentációk	feldolgozási műveletek	
felületaktív anyagok	glikolipidek, lipoproteinek, foszfolipidek, zsírsavak	bioremediáció	olajszennyezések, nehézfémek eltávolítása	[11]
		élelmiszerek, gyógyszerek, kozmetikumok	emulzifikáló, detergens, habképző	[7]
		mezőgazdaság	tápanyagok (műtrágya) hozzáférhetőségének növelése	
		textilipar	mosó- és lágyítószer, festés hatékonyságának növelése	[12]
pigmentek	prodigiosin, antrakion	textilipar	festék	[13]
	karotinoidok (asztaxantin)	élelmiszerek, táplálékkiegészítők	antioxidáns színezék	

Ugyanakkor kedvező tulajdonságaik mellett számos tényező korlátozza a szintetikus vegyületekkel szembeni térhódításukat. A biológiai lebonthatóságuk bizonyos felhasználási területeken hátrányt is jelent, mivel idővel csökken a stabilitásuk, kisebb az eltarthatóságuk, például egyes biopolimerek nedvesség hatására lágyulnak. A bioflokulánsokat a megfelelő

hatékonyság eléréséhez a hagyományos vegyszerekhez képest nagyobb mennyiségben kell alkalmazni [7].

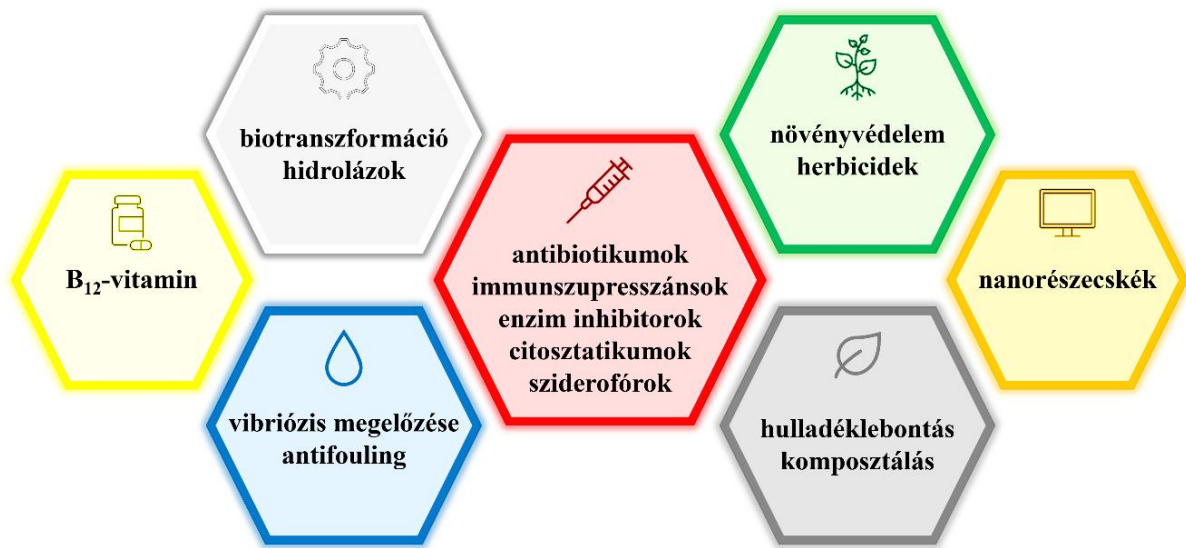
A biotechnológiai előállítások jellemző hátránya, hogy a termék egy komplex mátrixban van jelen alacsony koncentrációban, ami nehezíti a downstream műveleteket (a termék kinyerését, tisztítását) és költségessé teszi a technológiát. Az alacsony termékkoncentráció egyúttal nagy mennyiségű hulladékáramot is jelent, melynek megfelelő kezelése – különösen patogén mikroorganizmusokkal végzett fermentáció esetén – tovább növeli a gyártás komplexitását és költségeit [3]. A potenciális termelő törzsek körét korlátozza, hogy az élelmiszerek, gyógyszerek és kozmetikumok előállításánál alkalmazott fajoknak GRAS (*generally recognised as safe*, azaz általánosan biztonságosnak tekintett) besorolásúnak kell lenniük [14]. (A GRAS besorolás az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) által kiadott minősítés, ami vagy a régóta fennálló biztonságos használaton vagy egy meghatározott vizsgálati eljárás eredményén alapul. A GRAS besorolású mikroorganizmusok, illetve az általuk előállított termékek a tervezett felhasználás körülményei között nem patogének és nem toxikusak, használatuk nem jelent egészségügyi kockázatot. Az élelmiszeripari, gyógyszeripari termékek, illetve kozmetikumok előállításánál általános előírás a GRAS besorolás, amennyiben egy faj (vagy vegyület) nem rendelkezik vele, külön vizsgálati eljárás során kell igazolni a biztonságos használatot.)

A szakaszos, illetve rátáplálásos fermentációk kiváltása folyamatos üzemmódú technológiával megoldást jelenthet a gyártási és termékképzési eljárásokhoz kapcsolódó problémák jelentős részére. Folyamatos üzemmód esetén hosszú távon fenntartható az optimális termelési sebesség, nem lép fel a szarcsok közti leállásból származó termelés kiesés, valamint a folyamatos termékérvételnek köszönhetően a gyártási és feldolgozási műveletek párhuzamosan végezhetők. Éppen ezért egyre növekvő igény mutatkozik az ipar részéről a jól szabályozható, folyamatos fermentációs technológiák iránt [15]. A szekunder metabolitok fermentációja során azonban olyan körülményeket kell biztosítani, melyek egyfelől lehetővé teszik a mikrobák fejlődését és elegendő tápanyagot nyújtanak a komplex makromolekulák prekursorainak termelődéséhez, ugyanakkor gátló hatásuk révén kiváltják a termékképzéshez szükséges metabolikus folyamatokat. A tápanyaggal való ellátás és a limitáció közti törekeny egyensúly hosszú távú fenntartása a hagyományos fermentációs technológiákkal nehezen kivitelezhető, a stresszhatások egy idő után elkerülhetetlenül a mikroorganizmusok öregedéséhez, pusztulásához vezetnek [16].

2.2. *Streptomyces coelicolor*

A szekunder metabolit termelő mikroorganizmusok közül kiemelkedik a *Streptomyces* nemzetség, hiszen nekik köszönhetjük a klinikai gyakorlatban használt antimikrobiális és tumorellenes ágensek több mint felét [16], továbbá immunszuppresszánsokat, enzimeket – elsősorban hidrolázokat –, enzim inhibitorokat és siderofórokat is képesek előállítani [5]. Endofita fajaiknak fontos szerepük van a növényvédelemben, mivel antimikrobiális vegyületek ter-

melésével képesek megvédeni a gazdanövényt más mikroorganizmusoktól [17]. Az utóbbi években a B₁₂-vitamin *Streptomyces* fajokkal történő előállítása iránt is megnőtt az érdeklődés [18]. A nemzetség tagjai közül sokan termelnek különböző színű pigmenteket, melyek környezetbarát alternatívát jelenthetnek a hagyományos textilipari festékek helyett, valamint – egyéb biológiai aktivitásuktól függően – élelmiszeripari színezékként, antioxidánsként és antimikrobiális ágensként is funkcionálhatnak [13]. A *Streptomyces* fajok szekunder metabolitjainak főbb felhasználási területeit (a biotechnológiai ágazatok színeinek megfelelően) szemlélteti a 2.2. ábra.



2.2. ábra: *Streptomyces* fajok szekunder metabolitjainak főbb felhasználási területei [saját ábra]

Több mint 1100 fajával ez az egyik legnépesebb nemzetség a baktériumok között. Az 1940-es években a sztreptomycin, neomicin és tetraciklin felfedezése révén megnőtt az igény az életciklusuk és metabolizmusuk feltérképezése iránt, melynek során a *S. coelicolor* vált a nemzetség modell organismusává. Ezen faj ugyanis aktinorodint, egy intenzív kék színű pigmentet termel (a *coelicolor* a latin *ég / menny* és *szín* kifejezésekből származik), melynek révén vizuálisan is nyomon követhető a termelés folyamata, valamint jól elkülöníthetők a bioszintézis adott pontjain gátolt mutánsok [19]. A géntechnológiai kutatások eredményeként 2002-ben a faj teljes genomjának szekvenciáját publikálták [20], ami nagymértékben hozzájárult a metabolikus folyamatok és azok szabályozásának feltérképezéséhez.

2.2.1. Rendszertani besorolás, életmód

A *Streptomyces coelicolor* az Actinomycetota (más néven Actinobacteria) törzsbe, Actinomycetes osztályba, Kitasatosporales rendbe, Streptomycetaceae családba és a *Streptomyces* nemzetségbe tartozik. A rendszertani besorolást régebben fenotípusos jegyek alapján végezték, majd a szekvenálás terjedésével gyakoribbá vált a genetikai markerek használata [5]. A fenotípusos variabilitás, a nukleotid-variánsok és a horizontális géntranszfer miatt előfordulnak átfedések és bizonytalanságok, illetve a taxonok elnevezése is változhat. Így a *S. coelicolor* A3(2) törzsrre *S. violaceoruber*ként is hivatkoznak [21], illetve a Kitasatosporales rend 2022 előtt Streptomycetales néven volt ismert [22].

A *Streptomyces* nemzetség tagjai Gram-pozitív, kemoorganotróf, aerob baktériumok, melyek az azonos ökológiai fülkéhez való adaptáció következtében morfológiai és mikrobiológiai hasonlóságot mutatnak a fonalas gombákkal [23]. Elsődleges élőhelyük a talaj – egyes talajokban ezek a fajok képezhetik a domináns populációt [24] –, de emellett vízi ökoszisztémákban, főleg vízpartokon és tengeri üledékekben is megtalálhatók [5]. A fajok többsége mezofil és neutrofil, tehát 25 – 35 °C hőmérséklet és 6,5 – 8 pH-tartomány ideális számukra [25] (*S. coelicolor* esetén 28 °C a génbank által ajánlott tenyésztési hőfok [26]).

Szaprofita életmódjukból adódóan fontos szerepet töltenek be a természetben a lebontási folyamatokban, a tápanyagok körforgásában, hiszen olyan komplex makromolekulákat is képesek szubsztrátként hasznosítani, mint a lignin, lignocellulóz, kitin, keményítő, keratin és bizonyos aromás vegyületek [24]. Számos katabolikus útvonal indukálható bennük, melynek során különböző hidrolitikus enzimeket termelnek a tápanyag lebontása érdekében: többek között amilázokat, proteázokat, glukanázokat, cellobiázokat, xilanázokat, ligninázokat és kiti-názokat is képesek előállítani, jelentős részüket endo- és extracelluláris formában egyaránt [5]. Ennek köszönhetően bioremediációs folyamatokban többféle hulladék lebontására, polikiklusos aromás szénhidrogének (PAH) és nehézfémek eltávolítására is alkalmazhatók [27]. A *S. coelicolor* genomja több mint 800 szekréción fehérjét, köztük közel 150 hidrolázt kódol [28], valamint rendkívül nagy mennyiségű transzkripciós szabályozó molekulát: míg az *Escherichia coli* genomja 7, a *Bacillus subtilis* pedig 18 szigma-faktort kódol, a *S. coelicolor* esetében 66 szigma-faktort azonosítottak. Az összetett szabályozási rendszert egyfelől a komplex morfológia, életciklus és metabolizmus teszi szükségessé, másrészt ennek köszönhetően a mikroba képes adaptálódni a gyorsan változó fizikai és kémiai környezethez [19]. A *S. coelicolor* genomjában három olyan operont azonosítottak, melyek feltehetően az anaerob metabolizmusban szerepet játszó nitrát-reduktáz fehérjét kódolják, tehát a baktérium vélhetően rendelkezik az anoxikus vagy mikroaerob körülmények túléléséhez szükséges enzimrendszerrel [5].

2.2.2. Morfológia

A *Streptomyces* fajok fonalas szerkezetűek, a spóráikból kifejlődő hifák apikális (csúcs irányú) növekedéssel terjedve hosszú, sűrűn elágazó hálózatot, ún. szubsztrátmicéliumot hoznak létre. A körülmények kedvezőtlené válása esetén morfológiai és metabolikus differenciálódás veszi kezdetét, melynek eredményeként kialakul a légmicélium, ennek további kompartmentalizációjával pedig a spórák. Ebben az alfejezetben bemutatom az egyes morfológiák sajátosságait, majd a következő fejezetben ezek kapcsolatát, a *Streptomyces*ek komplex életciklusát ismertetem.

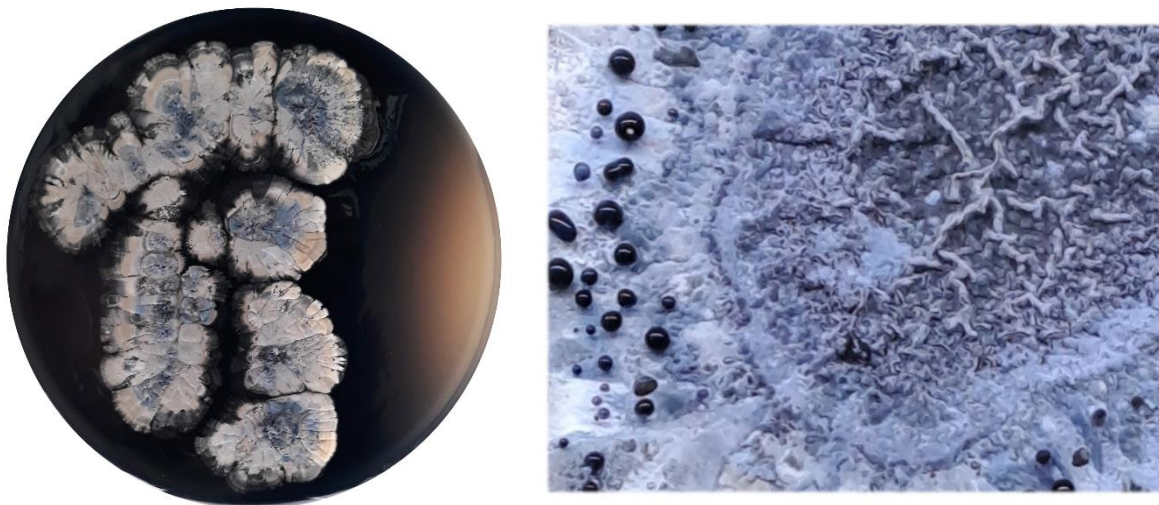
A spóra kifejezés az Actinobacteria törzs tagjai esetében magyarázatra szorul. A baktériumok általános tulajdonsága, hogy képesek ellenálló, nem-vegetatív képleteket létrehozni annak érdekében, hogy kedvezőtlen környezeti körülmények között is túléljenek; ezeket nevezük endo- vagy exospóráknak. Az Actinobacteria törzsre jellemző, általában spóráknak nevezett képletek viszont valójában konídiumok, hiszen elsődleges funkciójuk a szaporodás biztosítása – bár hosszú ideig képesek túlélni –, míg a többi faj spórái kizárólag túlélési funkciót látnak el. Ugyanakkor a szakirodalomban általánosan elterjedt a spóra kifejezés ezekre a képletekre, így a dolgozatban minden esetben spóráként hivatkozok rájuk [5].

A *Streptomyces* fajok tehát kezdetben „alvó állapotban”, spórákként vannak jelen a természetben, terjedésüket pedig – aktív mozgást biztosító sejtorganellum hiányában – szél, víz és ízeltlábú fajok biztosítják, elsősorban a spórákat tartalmazó talajszemcsék mozgásával. A nedves talaj eső utáni illataért felelős geozmint és 2-metil-izoborneolt is azért termelik ezek a baktériumok, hogy a spórák terjesztését végző ízeltlábúakat magukhoz vonzzák [19]. A talajszemcséken belüli kedvezőbb mikrokörnyezet felé történő mozgásban pedig egy nemrég felfedezett, mikrobafajok közti interakció játszik szerepet [29]. A szerzők által „stoppolásnak” (*hitchhiking*) nevezett transzport során flagellummal rendelkező fajok mozgatják a hozzájuk tapadt nem-motilis spórákat. Kísérleteik során elsődlegesen *S. coelicolor* spórák *Bacillus subtilis* és *Pseudomonas fluorescens* baktériumok által történő terjedését igazolták, de az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a nemzetség más fajaiban is jelenlévő, konzervált mechanizmusról van szó [30].

A spórákból kifejlődő vegetatív vagy más néven szubsztrátmicéliumnak kétféle megjelenési formája van (bár a publikációk jelentős részében nem különítik el ezeket). A korai szubsztrátmicélium teljesen kompartmentalizált, szemben a „többmagvú” másodlagos (késői) szubsztrátmicéliummal. Az angol nyelvű forrásokban a *multinucleated* kifejezés szerepel, melyet pontosabb magyar megfelelő híján többmagvúnak fordítok, de fontosnak tartom megjegyezni, hogy a *Streptomyces* fajok prokarióták, tehát nem rendelkeznek valódi sejtmaggal. A kifejezés jelen esetben arra utal, hogy az egyes sejtek nem különülnek el teljesen egymástól, hanem egy soksejtű struktúra jön létre, melyben a kompartmentek összeköttetésben vannak egymással, transzportcsatornák alakulnak ki bennük [31]. A vegetatív hifák átlagosan 0,62 µm átmérőjűek [32], és a többi baktériuménál jóval összetettebb citoskeletális rendszer-

rel rendelkeznek, mely nagy számban tartalmaz alfa-hélixekből felépülő strukturális elemeket. Ezek a fehérjék elsődlegesen az apikális növekedésben és az elágazások létrejöttében játszanak fontos szerepet [5].

Míg a vegetatív hifák a talaj belseje felé, illetve a felszín mentén terjednek, a légmicéliumok a felületi feszültséget legyőzve a levegő felé növekednek. A hifák fizikai támaszát a sejtek által termelt, elsősorban chaplin és rodlin fehérjékből felépülő, amfipatikus rodlet réteg biztosítja. A burok sejtfa felé néző oldala hidrofil, külső felülete pedig hidrofób karakterű, ami lehetővé teszi a levegő felé irányuló terjedést [33]. Egy adott légmicélium-mennyiséget elérve a kiterjedést felváltja a spóráképződés. A hifák erősen szabályozott módon felosztódnak előspóra kompartmentek hosszú láncolatává, amiből továbbfejlődnek az érett spórák. Az érés során vastag fal alakul ki a spóra körül, valamint a DNS-hez a spóra genetikai állományának védelmét erősítő fehérjék kapcsolódnak [5]. Az érett spórák láncolatai 10 – 50 vagy akár még több spórából is állhatnak láncként [24]. A rodlinrétegnek nem csak a légmicélium növekedésében, de a spórák terjedésében is fontos szerepe van, hiszen ehhez tudnak hozzátapadni a korábban említett „stoppolás” során a mozgatót végző baktérium flagellumai [30].



2.3. ábra: *S. coelicolor* telepek szilárd SCM táptalajon; egy Petri-csésze teljes felülete (bal) és egy tenyészet középső régiója (jobb) [saját fényképek]

Bár az egyes micéliumtípusok egymásból alakulnak ki, a fejlődés bizonyos fázisában a teljes telepen egyszerre több morfológia is megfigyelhető (2.3. ábra). A telepek „felgyűrődött” közepét légmicéliumok alkotják, melyeken szürkésfehér porszerű réteggént jelennek meg a spórák. A sötétkék területeken aktinorodin-termelő micélium helyezkedik el, míg a legkülső zónában aktívan növekvő vegetatív hifa található [34]. Az aktinorodin színe a tápközegben is megjelenik, illetve esetenként megfigyelhető, ahogy sötétkék cseppekben megül a tenyészet hidrofób felületén.

2.2.3. Életciklus különböző tápközegekben

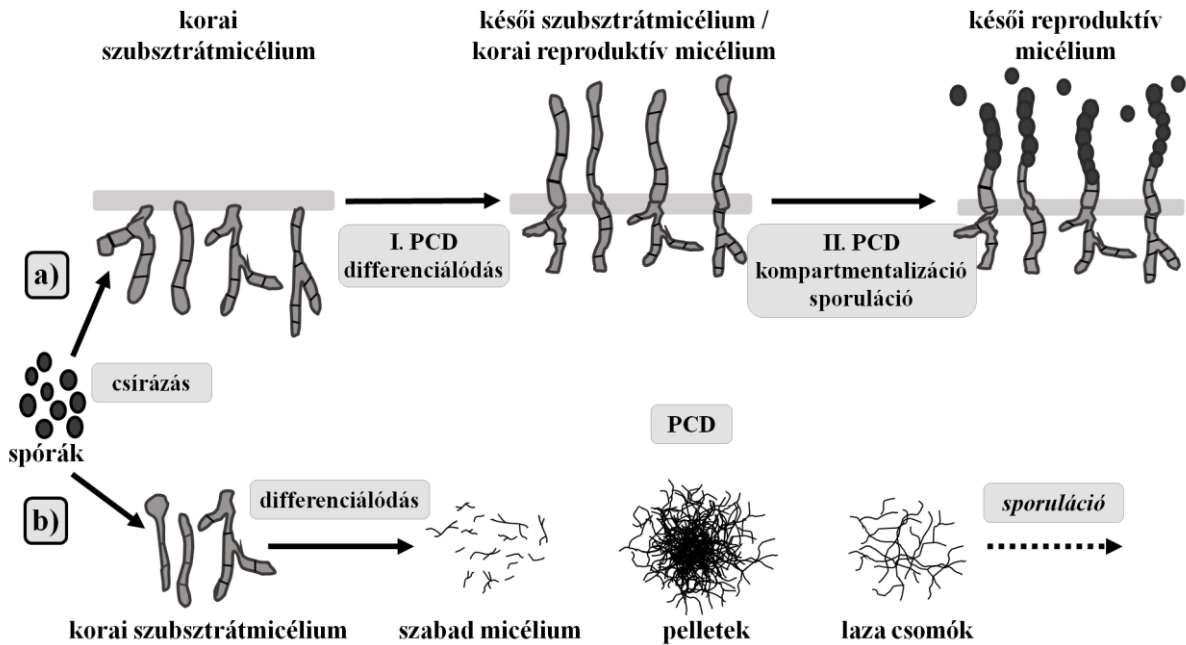
A *S. coelicolor* komplex életciklusa vegetatív és reprodukív fázisokra osztható, ugyanakkor a fejlődés bizonyos részletei eltérhetnek attól függően, hogy szilárd vagy folyékony tápközegben történik a tenyésztés (2.4. ábra).¹

Szilárd tenyészetek esetén az életciklus a spórák csírázásával kezdődik, az ezekből kifejlődő hifák képezik az elsődleges (korai) szubsztrátmicéliumot. A természetben a csírázás a baktérium számára kedvező környezeti körülmények esetén valósul meg, amiben számos tényező játszik szerepet: a speciális jelző faktorok mellett megfelelő mennyiségű exogén tápanyag és víz, valamint Ca^{2+} ionok jelenléte is szükséges [24]. A korai szubsztrátmicélium mélyen belenő a szilárd tápközegbe, és egy része a teljes életciklus alatt jelen van, igaz, különböző mértékben degenerált állapotokban [36], [37].

Egy idő után genetikailag programozott sejthalál (*programmed cell death*, PCD) megy végbe, melynek során a korai szubsztrátmicélium egy része degradálódási folyamaton megy keresztül [31]. A PCD az eukariótáknál és a baktériumok jelentős részénél is előforduló válaszreakció a környezeti stresszre, melynek a nagyobb populációk esetén a sérült sejtek eltávolításában is szerepe van. A *S. coelicolor* programozott sejthalálában a makromolekulák lebontását végző enzimek, regulátor fehérjék és stresszfehérjék is részt vesznek [5]. A folyamat során a hifa élő szegmensei szabályos mintázatot követve differenciálódnak többsejtmagvú micéliummá, melyet késői szubsztrátmicéliumnak vagy korai reprodukív micéliumnak is neveznek. Ebben a morfológiai alakban kezdetét veszi a szekunder metabolitok termelése, illetve további differenciálódás során a hifák egy részén hidrofób bevonat képződik és kialakul a légmicélium [31]. Végül egy második PCD megy végbe, melyet kompartmentalizáció, spóráképzés és a spórák érése követ [38], [39]. A légmicélium kialakulása és a spóráképzés során a vegetatív micélium kannibalizmusa az egyik legfontosabb tápanyagforrás, melynek eredményeként néhány mg vegetatív micéliumból több millió spóra alakulhat ki [5].

Bár a mesterséges tenyésztések során a fenti folyamatok rendszerint néhány hét alatt lezajlanak, a természetben a vegetatív micélium kedvező körülmények esetén akár hónapokig is jelen lehet, majd a környezeti stressz hatására a reprodukív micélium kialakulása és a sporuláció akár néhány nap alatt is végbemehet [31].

¹ A 2.2.3. és a 2.3.1. fejezetek egyes részeit a „The role of physical support in secondary metabolite production by *Streptomyces* species” című publikációmban [35] kifejtettem.



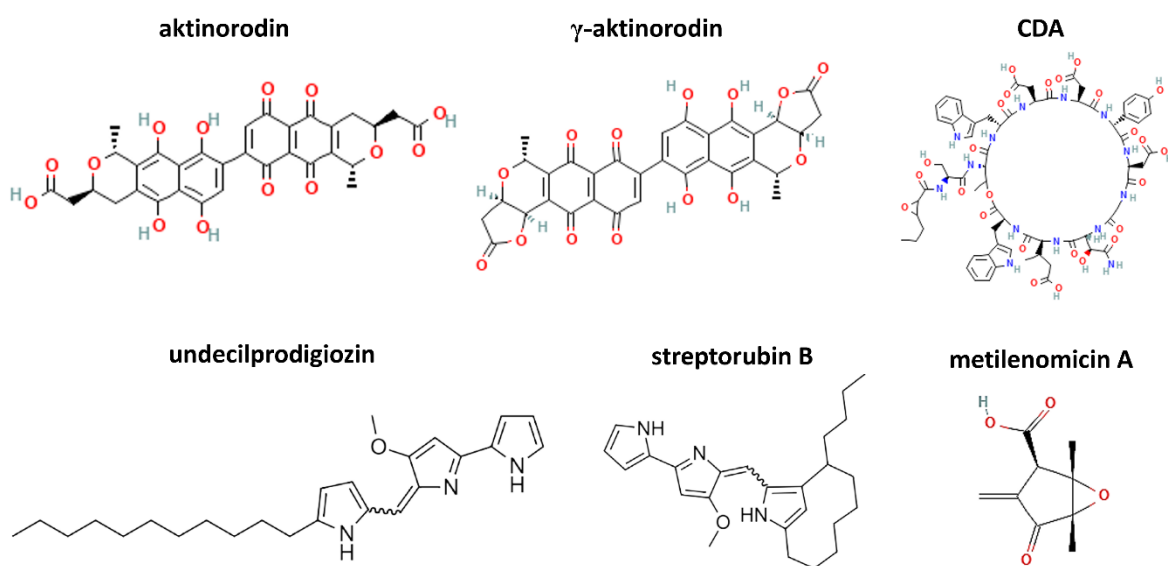
2.4. ábra: *Streptomyces coelicolor* életciklusa szilárd (a) és folyékony (b) tápközegben [35]

Folyékony tápközegben a csírázás és a szubsztrát micélium fejlődése meglehetősen hasonló a szilárd tenyészetekéhez. Ugyanakkor az ezt követő növekedés során különféle morfológiák alakulnak ki, melyek három fő típusa a szabadon úszó, eloszló micélium (mely leginkább egyedül álló sejtekként viselkedik), nyitott micéliumhálózat (szövedék) és a pelletek (kompakt struktúrák, gyakran tápanyag-hiányos középponttal) [40]. Utóbbi esetben programozott sejthalál megy végbe a pelletek közepén és másodlagos micélium differenciálódik a periferián. A legtöbb *Streptomyces* faj folyékony tápközegben nem képez légmicéliumot és spórákat, bár termelnek szekunder metabolitokat [39]. A jellemző morfológia és a spórázás megléte vagy hiánya fajoként eltérő lehet. A *S. coelicolor* elsődlegesen pelletes megjelenésű, szubmerz spórákat általában nem képez, bár nagy koncentrációban hozzáadott kalcium hatására kialakulhatnak spóraszerű képletek. A szubmerz fermentációk során kialakuló spórák sejtfala jellemzően vékonyabb és kevésbé strukturált a szilárd tenyészetek esetén megfigyelténél, feltehetőleg az eltérő rodletréteg miatt [40].

A morfológiai átalakulás szigorúan szabályozott folyamat, mely szorosan összefügg a metabolikus változásokkal. A nitrogén- és szénforrások csökkenése, a C/N/P arány változása, a Ca^{2+} ionok és a foszfátok (nukleotidok) aránya, valamint a mikrobiális interakciók egyaránt hatással vannak a folyamatra. Emellett általában véve elmondható az Actinomycetes osztályba tartozó fajokról, hogy az enyhén lúgos kémhatás kedvez a sporulációnak [5].

2.2.4. *Streptomyces coelicolor* szekunder metabolizmusa

A *S. coelicolor* régóta ismert antibiotikus hatású metabolitjai a kék színű aktinorodinok, a piros prodigiozinok, a spórák szürke pigmentje, a barna metilenomicin és a nem-pigmentált kalciumfüggő ionofór antibiotikum (*calcium-dependent antibiotic*, CDA) (lásd 2.5. ábra). Később a génszekvencia ismeretében, bioinformatikai analízissel több mint harminc szekunder metabolitot kódoló gént azonosítottak a genomjában, illetve plazmidjaiban. Az antibiotikus hatású anyagok mellett szerepelnek köztük a fémionok felvételét segítő sziderofórok, a fajon belüli és fajok közti kommunikációban szerepet játszó γ -butirolakton és geozmin, valamint számos ismeretlen funkciójú vegyület.



2.5. ábra: *S. coelicolor* főbb szekunder metabolitjainak szerkezeti képlete (az undecilprodigiozin és streptorubin B vegyületek képletének forrása Sarmiento-Tovar és mtsai. publikációja [42], a többi vegyületé pedig a PubChem online adatbázisa [43])

Ugyanakkor a génszekvencia alapján csak a potenciálisan termelődő metabolitok körét lehet meghatározni, adott körülmények között csak a gének egy része expresszálódik. Például a karotinoidok sötétben nem termelődnek, tehát feltehetőleg a fotooxidáció elleni védelemben játszanak szerepet [41]. Mivel a természetben a szekunder metabolizmus jelentős része más fajokkal való interakcióhoz kötődik, számos olyan vegyület van, mely a jellemzően monokultúrás laboratóriumi tenyésztés során nem figyelhető meg [5].

A *S. coelicolor* legismertebb antibiotikus hatású metabolitja az aktinorodin, mely jellemzően kétféle formában fordul elő a baktériumban: aktinorodinként, illetve γ -aktinorodinként, mely az előbbinek a laktonszármazéka. (Egy 1996-ban megjelent tanulmány [44] szerint a Göttingenben izolált törzs további négy aktinorodin variánst képes termelni. Erre vonatkozóan azonban mindössze egyetlen frissebb (2017-es) publikációt [45] találtam, melyben a vékonyréteg kromatográfiai eljárás során a dominánsan jelen lévő γ -aktinorodin mellett egyéb pH-

indikátor jellegű aktinorodin-pigmenteket lehetett elkülöníteni. További információt egyik kutatás sem adott a kérdéses komponensekkel kapcsolatban.) Amennyiben a tápközeg kémhatása 5 körüli, piros színű, intracelluláris aktinorodin keletkezik, míg semleges vagy lúgos kémhatás esetén kék γ -aktinorodin termelődik, mely intra- és extracellulárisan is felhalmozódik, vagyis a micélium és a tápközeg jellegzetes kék színéért valójában ez a komponens felelős. A piros színű tenyészetekhez lúgot adagolva megjelenik a kék szín, tehát az aktinorodin pH-indikátorként funkcionál [44]. A laktonszármazék szintézise a sejtben az aktinorodin átalakításával történik, feltehetőleg a metabolit transzportjához csatoltan [46]. (A disszertációban a kísérleti munka bemutatásánál – a publikációk döntő többségéhez hasonlóan – nem teszünk különbséget az említett vegyületek között, egységesen aktinorodinként hivatkozok a termelődő metabolitra.)

Az aktinorodin redox-aktív vegyület, a kinoncsoportjainak redukciója során keletkező elektronok a molekuláris oxigénnel reagálva szuperoxid gyököt képeznek, mely reaktív oxigénszármazékok keletkezéséhez vezet. A redox-aktivitásnak köszönhetően az aktinorodin szerepet játszik a telepek morfológiai változásában, mivel a peroxidok és egyéb reaktív elektrofil vegyületek jelenlétére adott sejtválasz regulátorai az aktinorodint is képesek érzékelni. Az erős kémiai reaktivitás következtében a vegyület hatása nem specifikus, ami hátrányossá teszi gyógyszer-hatóanyagként történő alkalmazását. Ugyanakkor a növekvő antibiotikumrezisztencia miatt szükségessé válhat a korábban mellőzött anyagok alkalmazhatóságának átgondolása, így a jövőben változhat az aktinorodin gyakorlati felhasználása [47].

A baktérium tenyésztésének korai fázisában – tenyésztési körülményektől függően – jellemző lehet a vöröses pigmentáltság, melyért a prodigiozinok felelősek. A bakteriális prodigiozinok (vagy prodigininek, az elnevezésben nincs teljes konszenzus) változatos vegyületcsaládot alkotnak, melybe lineáris és ciklusos komponensek is tartoznak. Ezek közül a *S. coelicolor* tenyésztésében elsődlegesen undecilprodigiozin és annak karbociklusos származéka, a streptorubin B keletkezik micéliumhoz kötötten [48]. (Emellett butil-cikloheptilprodiginin és egyéb származékok is kimutathatók [49].) A prodigiozinok – más bakteriális pigmentekhez hasonlóan – fontos szerepet játszanak az UV-sugárzás elleni védelemben, valamint oxidatív stresszt okozó vegyületek (H_2O_2 , bizonyos antimikrobiális anyagok) hatását is csökkentik. Ezzel összhangban a humán gyógyászati kutatások a vegyületek antitumorális, immunsuppresszáns és maláriaellenes aktivitására fókuszálnak, bár antimikrobiális hatásuk is ismert. Az undecilprodigiozin esetén mellrákos és tüdőrákos szövettényészetekben kimutatható volt in vitro a tumorelles hatása [48].

A *S. coelicolor* másodlagos anyagcseréje komplex, szigorúan szabályozott folyamatokból áll, melyeket befolyásolnak a környezeti körülmények, fajon belüli és fajok közötti interakciók, továbbá az egyes tényezők között kereszthatások is megfigyelhetők. A lehetséges szabályozási pontok közül a fermentációk során leggyakrabban a tápanyagok összetételét és koncentrációját állítják be a termékképződésnek kedvező módon, az optimális körülmények meghatározása azonban sokszor nem evidens. Például a foszfátlimitációra adott sejtválaszban fon-

tos szerepet játszó PhoP regulátor génjének a hiánya megnövekedett aktinorodin és undecilprodigiozin termeléshez vezethet R5 táptalajon, de csökkentheti az antibiotikum-termelést keményítővel kiegészített szintetikus táptalajon, tehát a PhoP hatása függ a tápközeg összetételétől. A foszfátnak nem csak a hiánya, de a többlete is hatással van a metabolizmusra: az optimálisnál magasabb (10 – 50 mM) foszfátkoncentráció ugyanis serkenti a metilénomicin képződését. A szénforrás típusa szintén fontos befolyásoló tényező, a gyorsan felvehető szénforrások általában kedveznek a gyors növekedésnek és a karbon katabolit represszió (*carbon catabolite repression*, CCR) révén gátolják a másodlagos anyagcsere-termékek keletkezését. (Ez a mechanizmus a természetben segíti a baktériumot, hogy több szénforrás esetén a könnyebben hozzáférhető hasznosítsa.) Bár a CCR az egész nemzetségre jellemző, a hatás mértéke fajonként és metabolikus útvonalanként eltérő lehet, például az aktinorodintermelést *S. lividans*-nál 0,1 % feletti glükóz már gátolja, míg *S. coelicolor*-nál 2,5 % glükóz mellett is termelődik. A nitrogénforrás típusa és koncentrációja szintén befolyásolja a szekunder metabolitok termelését, ráadásul a nitrogén- és foszfátanyagcsere szabályozási hálózatai között interakció van, ami a természetben biztosítja a tápanyagok változásához történő adaptációt, az ipari fermentációknál viszont nehezíti a tápközeg-optimalizációt [5]. Bizonyos aminosavak jelenléte is kiválthatja a termékképződést, például a minimál tápközeghez adagolt triptofán nem csak a CDA termelését segíti elő – mely triptofánszármazékokat tartalmaz –, de az aktinorodin képződésére is pozitív hatással van, holott a makromolekula szerkezetében ez az aminosav nem található meg [50]. Az általános aminosav-hiányra adott válaszreakció (*stringent response*) pedig olyan nukleotidok intracelluláris akkumulációjához vezet, melyek transzkripciós változások révén a növekedés átmeneti megszűnését eredményezik, illetve azon gének expresszióját serkentik, melyek a baktérium túléléséhez és a szekunder metabolizmusához kapcsolódnak [5].

A tápanyag-összetétel mellett a hőmérséklet, pH, szerves sók, illetve szubmerz fermentáció esetén a keverés és az oldott oxigén szint egyaránt befolyásolhatják a metabolikus folyamatokat. A paraméterek hatása egyes esetekben faj- és termékspecifikus lehet: a magas sókoncentráció *S. coelicolor* A3(2) törzs esetén stimulálja az undecilprodigizon termelését, *Serratia marcescens*-nél viszont gátolja a prodigiozin keletkezését. Még a fajon belüli törzsek esetén is megfigyelhetők szabályozásbeli különbségek: a savas pH-sokk *S. coelicolor* M511 törzsében növeli, az SJM1 törzsben viszont csökkenti az undecilprodigiozin mennyiségét [48].

Az antibiotikumok szintézisének szabályozásában kis molekulatömegű szerves vegyületek, például γ -butirolaktonok (GBL) is részt vehetnek quorum sensing (a populáció denzitásának érzékelése) révén. Ezek a vegyületek a korai exponenciális növekedési fázis során termelődnek, és a növekedéstől függő mértékben akkumulálódnak. Amikor a koncentrációjuk egy kritikus határértéket elér, fiziológiai és morfológiai változások kaszkádja megy végbe a baktériumban [5]. A γ -butirolakton az aktinorodin és az undecilprodigiozin génklasztereinek exp-

resszióját egyaránt befolyásolja, valamint maguk a termékek is képesek autoregulátorként saját szintézisüket szabályozni [41].

Más fajok által előállított antibiotikumok – gátló hatást kiváltó koncentrációnál kisebb mennyiségben alkalmazva – is elősegíthetik a *Streptomyces* fajok antibiotikum-termelését. *S. coelicolor* tenyésztésében a linkomicin növeli a keletkező aktinorodin mennyiségét, míg az anguciklin korai undecilprodigiozin-képződéshez és morfológiai differenciálódáshoz (spóra-képződéshez) vezethet [51].

2.3. Membrán gradosztát reaktor

Ahogy azt az előző fejezetekben kifejtettem, a másodlagos anyagcsere-termékek széleskörű felhasználási területtel rendelkeznek, az ipar részéről pedig jelentős igény lenne a folyamatos üzemmódú előállításuk iránt. Emellett – a *Streptomyces coelicolor* példáján keresztül – azt is szemléltettem, hogy a szekunder metabolizmus rendkívül komplex folyamat, melyet számos tényező, illetve gyakran azok kereszt hatásai is befolyásolnak. A hatékony fermentációhoz éppen ezért olyan technológiát kell létrehozni, mely minél több beavatkozási lehetőséget nyújt, mint például a pH és a hőmérséklet szabályozását, vagy a tápanyagok mennyiségének és összetételének akár a fermentáció közbeni változtatását. Másrészt, ha az adott mikroorganizmus természetes közegéhez hasonló körülményeket biztosítunk, nagy valószínűséggel aktíválni fognak a termékképződéshez szükséges metabolikus útvonalak. A mikroorganizmusok jelentős részének pedig – köztük a *Streptomyces*eknek is – ez a közeg a talaj, tehát nem folyadékban lebegve, hanem szilárd felülethez tapadva növekednek. A szubmerz és a szilárd fázisú fermentációkat összehasonlító tanulmány szerint a legtöbb vad törzs számára a szilárd fázisú tenyésztés kedvezőbb [52], sőt, egyes fajok csak ilyen körülmények között termelnek szekunder metabolitokat [53]. (Az iparban gyakran alkalmaznak genetikailag módosított törzseket, melyek a szubmerz fermentációkhoz optimalizált tulajdonságokkal rendelkeznek, a szükséges génmódosítást azonban minden eljárásra ki kell dolgozni, mely idő- és költségigényes feladat.) Ezen célok együttes megvalósítására kínál megoldást egy speciális membrán bioreaktor, a membrán gradosztát reaktor.

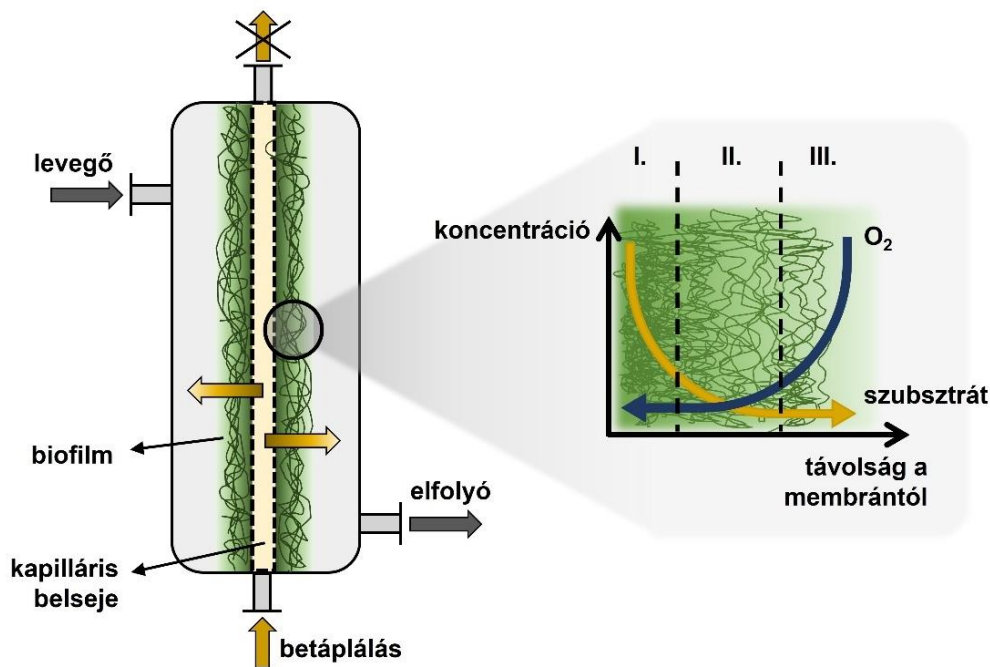
Általános definíció szerint a membrán bioreaktorok olyan berendezések, melyekben a biológiai reakció és a membrános eljárás integráltan jelen van. A membrán elsődleges szerepe a szeparáció, de katalitikus funkciója is lehet, ha enzimeket vagy sejteket rögzítünk a membránban vagy annak felületén; a membrán gradosztát reaktorok ez utóbbi kategóriába tartoznak [54].

Az 1980-as években Lowitt és Wimpenny [55] állt elő a gradosztát reaktor ötletével. Céljuk a folyótorkolatok ökoszisztémájának szimulálása volt azáltal, hogy lehetővé teszik a tápanyagok kétirányú áramlását a kísérleti edények között, melyek a természetes közeg különböző kompartmentjeit reprezentálják. Az alkalmazott berendezés képes volt fenntartani az adott komponensek koncentráció-gradiensét, ugyanakkor nem biztosított szilárd felületet a mikrobiális növekedéshez. Erre jelentett megoldást a membrán gradosztát reaktor, melyben a

membránnak kettős szerepe van: fenntartja a tápanyag-gradienst és lehetővé teszi a biofilm-képződést [56]. Az MGR-t 1999-ben szabadalmaztatták Leukes és mtsai. [57], akik extracelluláris enzimek termelésére fejlesztették ki a berendezést, konkrétan *Phanerochaete chrysosporium* fehér farohtaszto gombával állítottak elő lignin peroxidázt és mangán peroxidázt.

2.3.1. A rendszer felépítése, működési elve

Az MGR rendszer egy vagy több kapilláris szálból áll, melyeket egy fermentor belsejében rögzítenek. A membrán belső felületét ultraszűrő réteg borítja, melyet fedőréteg nélküli, porózus mikroszűrő réteg vesz körül. A külső felszínen található üregek és ujszerű bemélyedések nagy fajlagos felületet biztosítanak a mikrobiális adhézióhoz, miközben a belső réteg megakadályozza, hogy a sejtek bejussanak a lumenbe [58]. (Az ultraszűrő réteg meglétének fontosságát a kísérleteim során tett megfigyelések is alátámasztják, melyet az 5.4.3. fejezetben ismertettek.) A reaktor üzemeltetése során a tápanyagot a lumentérbe táplálják be, ahonnan a tápanyag-komponensek sugárirányú diffúzióval jutnak a kapillárisok külső felszínéhez. A levegő – vagy oxigén – az extrakapilláris térbe kerül bevezetésre, és diffúzióval halad a biofilmen keresztül a membrán felé, tehát az oxigén és a tápanyagok gradiense egymással ellentétes irányú [59]. A rendszer egyedi struktúrájának köszönhetően a mikroorganizmusok levegővel körülvett, szilárd felületen növekednek, a tápanyagot pedig a szilárd felületen keresztül veszik fel, hasonlóan a természetes körülményekhez. A reaktor felépítését és működési elvét a 2.6. ábra mutatja be (a könnyebb átláthatóság érdekében a rajzon csak egy kapilláris szálat tüntettem fel).



2.6. ábra: Membrán gradosztát reaktor működési elve
(a jobb oldali kinagyított ábrán a biofilmben kialakuló gradiensek láthatók) [60]

Ahogy a mikrobiális növekedés hatására a biofilm vastagodik, a hozzáférhető tápanyagok mennyisége a membrán felszínétől távolodva csökken, ennek megfelelően különböző rétegek alakulnak ki a biofilmben (lásd 2.6. ábra jobb oldal), melyek fiziológiai és morfológiai sajátágaikban eltérőek. A membrán felületéhez legközelebbi réteg (I.) elegendő tápanyaghoz jut, ezért folyamatos növekedés és szaporodás jellemzi. Ezt követi egy átmeneti zóna (II.), melyben a sejtek a növekedési kinetika stacioner fázisában vannak, míg a legkülső rétegben (III.) hanyatló fázisban vannak [61]. Ez a folyamatosan fenntartott tápanyag-gradiens lehetővé teszi a szekunder metabolitok termelését a tápanyagban szegény régióban, miközben folyamatosan megújul a biofilm [56].

Bár a membrán gradosztát reaktort már 25 éve szabadalmaztatták, csupán néhány kutatócsoport foglalkozik a témával, ebből adódóan pedig számos tisztázatlan kérdés merül fel mind az elméleti hátteret, mind a gyakorlati megvalósítást illetően. A 2.2 táblázatban összegeztem – növekvő időrendi sorrendben – a 2001 és 2024 között megjelent, kísérleti adatokat bemutató publikációkat. Emellett a rendszerre jellemző transzportfolyamatok matematikai modellezésének tárgykörében is jelentek meg publikációk [62], [63], [64]. (Az esetek egy részében a szerzők nem használják a *gradostat* kifejezést – mint például a táblázatban szereplő [65] esetén sem –, így a felsorolás nem feltétlenül teljeskörű.)

2.2. táblázat: Membrán gradosztát reaktortal végzett kísérleti publikációk

mikroorganizmus	termék	kutatás fókusz	MGR típus	membrán	forrás
<i>Neurospora crassa</i>	polifenol-oxidáz, lakkáz	fenol eltávolítása modell-szennyvízből (bioremediáció)	MC	<u>PSU</u>	[65]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP	méretnövelés; MnP produktivitását befolyásoló paraméterek meghatározása	SC és MC	<u>PSU</u>	[58]
	MnP	inokulálási eljárás (<i>reverse filtration</i>) kidolgozása	SC	<u>PSU</u>	[66]
	MnP, LiP	különböző membránok alkalmazhatóságának vizsgálata	SC	<u>PSU</u>	[67]
				titániumoxid	
Al_2O_3 , <i>cirkónium</i>					
-		biofilm növekedési kinetika jellemzése	SC	<u>PSU</u>	[68]

	-	spórakoncentráció és levegőztetés hatása biofilm-növekedésre	SC flow cell	<u>PSU</u>	[69]
	-	oxidatív sejtkárosodás, nyom-elem-felhalmozódás, etanol és β -glükán termelés	SC és MC	<u>PSU</u>	[59]
	-	oxigénátadási kinetika paramétereinek meghatározása, oldott oxigén eloszlásának matematikai modellezése	SC	<u>PSU</u>	[70]
-	-	áramlási viszonyok modellezése biofilm nélküli rendszerben	SC	PSU	[71]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	aktinorodin	biofilm hatása a hidraulikus permeabilitásra ([71] folytatása)	SC	kerámia	[72]
		biofilm növekedési kinetika jellemzése			[73]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, LiP	PFOB és PF68 hatása (oxigénfelvétel, oxidatív stressz, nyom-elemek feldúsulása)	SC	PSU	[74]
	MnP	tápközeg összetételének és oxigénbevezetés módjának hatása (biofilm-képződésre és termelésre)	SC	<u>PSU, NMP, PEG, metil-celloszolv, polivinil-pirrolidon</u>	[75]
	MnP	különböző tápanyag-limitációk hatása a növekedésre és termékképződésre	MC	<u>PSU</u>	[61]
<i>Aspergillus terreus</i>	lovasztatin	kétlépcsős betáplálás hatása (biofilmvastagságra, termék-képződésre)	SC	<u>PES, NMP, PEG keveré- ke</u>	[76]
		biofilm oxigén-ellátottságának javítása			[77]

A táblázatban a következő rövidítéseket használom: MnP (mangán-peroxidáz), LiP (lignin-peroxidáz), SC (single capillary, egyszálú rendszer), MC (multicapillary, többszálú rendszer), PSU (poliszulfon), PES (poliétersulfon), NMP (N-metil-2-pirrolidon), PEG (polietilén-glikol), PFOB (perfluoro-oktil bromid, oldott oxigénszint szabályozásában segít), PF-68 (Pluronic F-68, felületaktív anyag). A feltüntetett membránok közül a dőlt betűvel írtak cső

típusúak, a többi kapilláris, illetve aláhúzással jelölöm azokat, amelyek Jacobs és Leukes által publikált [78] eljárás szerint készültek (ezt a 2.3.2. fejezetben tárgyalom részletesebben).

2.3.2. Membránok és modulok az MGR-ben

Ahogy korábban írtam, az MGR-ben a membrán kettős feladatot lát el: szilárd felületet biztosít a sejtek növekedéséhez, valamint lehetővé teszi a tápanyag-gradiens fenntartását a biofilmben. Ennek megfelelően számos elvárás merül fel a membránt illetően [60]:

- a sejtadhézió szempontjából kedvező felületi tulajdonságok (hidrofobicitás, felületi egyenetlenség, fajlagos felület nagysága) [66];
- aszimmetrikus pórusszerkezet (a külső felszín felé növekvő pórusméret) és nagy porozitás;
- jó sterilizálhatóság;
- mechanikai stabilitás, mely elsősorban a hosszú távon üzemeltetett, méretnövelt MGR esetén fontos szempont.

Bár típusát tekintve cső vagy kapilláris kialakítású membránok is szóba jöhetnek, a kapilláris membránok lényegesen nagyobb fajlagos felülete miatt elsősorban ez a típus terjedt el. A membránmodulok egy vagy több kapilláriszálat is tartalmazhatnak, ennek megfelelően beszélhetünk egyszálás (SC, *single capillary*) és többszálás (MC, *multicapillary*) rendszerekről. A jövőbeni ipari alkalmazást tekintve a többkapillárisos rendszerek mindenképpen előnyösebbek, hiszen nagy mennyiségű termék előállítását teszik lehetővé. A kutatások során azonban az egyszálás rendszereket könnyebb kezelni, megfigyelni és modellezni, ezért gyakran találkozhatunk velük a publikációkban [79].

Kisméretű, egyszálás modul vizsgálható horizontális elrendezésben is [67], de alapvetően a vertikális pozíció a preferált. Vízszintes helyzetben ugyanis a gravitációs erő miatt a permeátum csak a membrán alsó felén távozik, ami egyenetlen tápanyag-eloszlást és biofilmnövekedést eredményez, valamint többszálás rendszer esetén a felső szálakról lecsöpögő permeátum is befolyásolhatja az alatta lévő szálak biofilm-képződését [56].

Leukes doktori disszertációjában [80] kifejti, hogy a hatékony inokuláláshoz szükséges a nagy permeabilitás – különben rendkívül lassú lenne a folyamat –, valamint a külső fedőréteg hiánya. Mivel az MGR – tudomásom szerint – az iparban még nem jelent meg, kereskedelmi forgalomban nem kapható kifejezetten erre a célra fejlesztett membrán. A kutatások többségében Jacobs és Leukes által publikált eljárás [78] szerint készített membránnal dolgoznak. Ez egy fázis inverziós technikával gyártott poliszulfon vagy poliétersulfon membrán, melynek belső fedőrétege a szerkezet integrális részét képezi. A sűrűn elhelyezkedő pórusok keresztmetszete a külső – fedőréteg nélküli – felszín felé haladva fokozatosan nő, így a sejtek könnyen behatolnak a pórusokba, illetve a nagy fajlagos felület elősegíti a sejtadhéziót.

Egyedi szerkezetének köszönhetően ez a membrán valóban alkalmas biofilm kialakítására, ahogy ezt a 2.2 táblázat példái is igazolják. Ugyanakkor a mechanikai stabilitása alacsony, valamint az újbóli felhasználása – megfelelő tisztíthatóság hiányában – nem lehetséges. Ebből

kiindulva, Sheldon és mtsai. kutatásukban olyan membránokat kerestek, melyekkel kiküszöbölhető az említett nehézségek [67]. A kísérleteikben *P. chrysosporium* gombával inokuláltak négyféle membránt (lásd **2.3. táblázat**): poliszulfon és titánium-oxid kapillárisokat, valamint cső típusú, tiszta alumínium-oxid és cirkóniummal kevert alumínium-oxid membránokat.

2.3. táblázat: Sheldon és mtsai. [67] által vizsgált membránok tulajdonságai

típus	kapilláris		cső	
anyag	Poliszulfon	Titánium-oxid	Alumínium-oxid, cirkónium	Alumínium-oxid
pórusméret (µm)	11	3	0,2	3
belső fedőréteg	van	van (0,9 nm pórusméret)	nincs	nincs

A poliszulfon kapillárison a várákosoknak megfelelően stabil biofilm alakult ki, a membrán elektronmikroszkópos keresztmetszeti képén látható volt, hogy a spórák behatoltak a pórusok belsejébe, majd onnan terjedve beborították a teljes külső felületet. A cső típusú membránok esetén jóval vékonyabb biofilmréteg alakult ki, a spórák nem hatoltak be a pórusokba (bár az átlagosan 2 µm átmérőjű spórák kisebbek a tiszta alumínium-oxid pórusainál). A 0,2 µm pórusméretű membránnak csak a felszínén történt növekedés, a 3 µm-es pórusokba – a spórákkal ellentétben – a gombafonalak egy része behatolt. A legvastagabb biofilm a kapilláris kerámiamembránon alakult ki, továbbá a kerámiamembránok kémiai tisztítás és gőzsterilizálás után elméletileg újrahasználhatók, bár a cikkből nem derül ki egyértelműen, hogy ezt a szerzők a gyakorlatban megvalósították-e. A kutatásuk további érdekes, bár részben elmentmondásos eredménye, hogy a csőmembránok esetén a lumenben is jelen volt a gomba, ami a 0,2 µm pórusméretű membrán esetén magyarázatra szorulna (hiszen a spórák átlagos átmérője 2 µm, a hifák pedig jellemzően ennél vastagabbak), különösen annak tükrében, hogy az elektronmikroszkópos felvételek alapján a membrán mátrixába nem hatoltak be a gombafonalak, a publikáció azonban nem ad további értékelést a jelenségről.

2.3.3. Inokulálási technika

Az MGR általánosan elterjedt inokulálási eljárása az angolul reverse filtration-nek, vagyis fordított irányú szűrésnek nevezett eljárás, melyre a továbbiakban a rászűrés kifejezést használom. Az angol kifejezés arra utal, hogy az inokulum az extrakapilláris térből a membránon keresztül áramlik a lumen felé, vagyis iránya éppen ellentétes a tápoldatnak a reaktor üzemeltetése során fellépő áramlásával. Az inokulumot szivattyú segítségével a köpenytérbe juttatják, majd megnövelik a nyomást ebben a térben, hogy az inokulumot a kapillárisok felé tereljék. A folyadékfázis átjut a lumenbe, a spórákat viszont visszatartja a membrán, így azok megtapadnak a membrán külső felületén, illetve pórusaiban. Az eljárást Govender és mtsai.

[66] fejlesztették ki *P. chrysosporium* fajjal dolgozva, a publikációk többségében ezt alkalmazták. Luke és mtsai. [65] ajánlása szerint a reaktor indítását követő huszonnégy órában érdemes a lument feltölteni a tápoldattal, majd a kivezetéseket lezárni. Ezalatt a kezdeti időszak alatt megindul a spórák csírázása és erősebben tapadnak a membrán felszínéhez, ezáltal elkerülhető, hogy a későbbi tápanyagáramlás kimossa a spórákat.

A hatékony inokuláláshoz nemcsak a megfelelő hajtóerő biztosítása szükséges, de lehetőség szerint el kell kerülni a folyadékáramlási csatornák kialakulását, ami egyenlőtlen spóra-eloszlást eredményezne. Ezt részben befolyásolhatja a reaktor konfigurációja [66], többszörös kapilláris rendszer esetén pedig a szálak távolsága, elrendezése is. Govender és mtsai. eredményei azt mutatják, hogy gyengén sikerült inokulálás esetén is többnyire képes volt a gomba a membrán teljes felületét kolonizálni, bár a pórusokba kevésbé hatolt be. Ugyanakkor ezekben az esetekben a mangán-peroxidáz produktivitás csak a negyede volt a legjobb rendszernél mértnek, tehát az inokulálásnak a későbbi termelés hatékonyságában is fontos szerepe van.

Bár a kutatások többségében spóraszuszpenziót alkalmaznak inokulumként, lehetőség van vegetatív micélium használatára is. A spórák méretüknél és alakjuknál fogva feltehetőleg könnyebben bejutnak a membrán pórusaiba, ugyanakkor elképzelhetőnek tartom, hogy a gombafonalak nagy fajlagos felületüknek és adhéziós tulajdonságaiknak köszönhetően könnyen megtapadnak a membrán felületén, illetve egységesebb eloszlás érhető el velük.

2.3.4. Biofilm és potenciális termelő törzsek az MGR-ben

A membrán gradosztát reaktor felépítéséből adódóan a potenciális termelő mikroorganizmussal szemben két fontos elvárás fogalmazódik meg: a kívánt szekunder metabolitot extracellulárisan kell termelnie, másrészt *megfelelő* biofilmet kell alkotnia a membrán felületén, ami alatt azt értem, hogy a biofilm:

- az egész membránfelületet beborítja;
- optimális vastagságú;
- elég stabilan tapad a membránhoz, ami a méretnövelt, hosszú távon üzemeltetett rendszerek esetén kiemelten fontos.

A teljes felületi borítottság nemcsak a membrán kihasználtságát javítja, hanem nélkülözhetetlen a gradiens megvalósulásához. Elégtelen borítottság esetén ugyanis a telepek közt átjutó tápoldat lecsorog a biofilm felületén, így a külső és belső réteg sejtszejtjei ugyanannyi tápanyaghoz jutnak, nem alakulnak ki a differenciált zónák. Az ideális borítottság elérésében a mikroorganizmus és a membrán tulajdonságai, valamint az inokulálási eljárás is szerepet játszanak.

A biofilm fejlődését, növekedésének kinetikáját vizsgálták *P. chrysosporium* esetén poliszulfon kapilláris membránon MGR-ben [68], illetve áramlási cellában (*flow-cell*) [69], valamint *S. coelicolor* esetén kapilláris kerámia membránon MGR-ben [73]. A gomba növekedése mindkét rendszerben kétfázisú kinetikával jellemezhető (két exponenciális növekedési szakasz, köztük egy átmeneti lag-fázis), amit *P. chrysosporium* biofilm kapcsán mások is megfi-

gyeltek [68]. A nagyobb inokulálási spórakoncentráció, illetve levegő áramlási sebesség alkalmazásakor korábban indult a második növekedési ciklus, valamint vastagabb biofilm alakult ki, ugyanakkor a második ciklusra jellemző növekedési sebesség minden esetben alacsonyabb volt az első ciklusnál mértnél. A köztes lag-fázis minden rendszerben közelítőleg egybeesett az ammóniumszint csökkenésével, vagyis ennek a tápanyagnak a kimerülése állhatott a biofilm-fejlődés változásának háttérében [69]. *S. coelicolor* esetén szintén két növekedési ciklust figyeltek meg, de köztes lag-fázis nélkül, illetve nem sikerült azonosítaniuk a limitáló tápanyagot. További publikációkkal összevetve feltételezhető, hogy a kétfázisú növekedés szilárd fázisú tenyészetekre jellemző, legalábbis szubmerz fermentációknál nem írtak le ilyen jellegű növekedési kinetikát [73].

A *S. coelicolor* biofilm fejlődése és a membrán hidraulikus permeabilitása közötti összefüggést vizsgálták Godongwana és mtsai [72]. Kísérleteik során megfigyelték, hogy a hidraulikus permeabilitás (és a transzmembrán fluxus) az első 72 órában a biofilm növekedésével párhuzamosan csökkent. Ezt követően azonban a permeabilitás közel azonos maradt a biofilm további vastagodásától függetlenül, amit a biofilm egyedi struktúrájával magyaráznak. Ahogy korábban írtam, a membrán felszínétől kiindulva három különböző réteg alakul ki a biofilmben: az elsődleges növekedési zóna, az átmeneti és a légmicéliumos zóna. A szerzők korábbi megfigyelései szerint az elsődleges zóna és a légmicélium csak a kezdeti időszakban – ez esetben az első 72 órában – növekednek, ebből adódóan a további biofilm-vastagodás az átmeneti zóna fejlődésének eredménye. Ugyanakkor a biofilm tömörségét, ezáltal pedig a hidraulikus permeabilitást jórészt az elsődleges zóna határozza meg, ennek a vastagsága pedig nem változik, így a hidraulikus permeabilitás is közel állandó marad.

Ami a biofilm vastagságát illeti, feltehetőleg létezik egy optimális tartomány, amely esetén a fermentáció megfelelő hatékonyságú. A biofilmben egyfelől kellően vastagnak kell lennie, hogy kialakuljanak a különböző rétegek (belső – megújuló, külső – termelő). Másrészt viszont, aerob mikrobák esetén figyelembe kell venni, hogy az extrakapilláris térbe betáplált oxigénre a tápanyaggal ellentétes irányú gradiens jellemző, vagyis a külső (tápanyag-limitált) réteg kapja a legtöbbet, a membránhoz közeli belső réteg kevesebbet. Mivel az oxigénpenetráció nem korlátlan, létezik egy – feltehetőleg az adott fajra jellemző – határvastagság, aminél vastagabb biofilm esetén a belső rétegekben oxigénhiányos állapot léphet fel [76]. (Ntwampe és mtsai. [70] végeztek erre vonatkozó méréseket *P. chrysosporium* esetén). Ezek az oxigénhiányos zónák inaktiválódnak, a biofilm egyes részei leválhatnak a membránról és ezeken a helyeken a tápanyag átjut a membránon anélkül, hogy a biofilmen keresztül diffundálna, tehát nem alakul ki a gradiens [76].

Annak érdekében, hogy ezt az oxigénlimitációt megakadályozzuk, különböző stratégiákat lehet alkalmazni. Az egyik, hogy a biofilm vastagságát korlátozzuk valamilyen módon. A sejtek növekedéséhez, a biofilm vastagodásához ugyanis egy optimális C/N arányra van szükség, illetve megfelelő nitrogénforrásra; ezek megváltozása erősen korlátozza a biofilm további vastagodását. Ezt használja ki az úgynevezett „two-stage feeding strategy” (kétlépcsős betáp-

lálás): az inokulálást követő időszakban a C/N arány [76], illetve a nitrogénforrás [77] a biofilm növekedésének kedvező, majd az optimális vastagság elérése után ezen paraméterek változtatásával (más összetételű tápközeg betáplálásával) a biofilm növekedése megállítható. Illetőleg a sejtek belépnek a stacioner fázisba és a metabolikus útvonalakat eltolódnak a szekunder anyagcsere-termékek előállítására irányába [76]. A másik lehetséges megközelítés a biofilm struktúrájának változtatása. Az MPEC technológiában (mikroszemcsékkel segített tenyésztés, angolul *microparticle enhanced cultivation*) ismert, hogy mikrorészecskék hozzáadásával a sejtek morfológiája változtatható. Ezt kihasználva Mohseny és mtsai. [77] magnézium szilikát mikrorészecskéket adtak a tenyészetbe, ami a biofilm vastagságát nem befolyásolta jelentősen, viszont a szerkezete lazább lett, ezáltal az oxigén könnyebben bejutott a belső rétegekbe.

Ahogy a 2.2 táblázatból is látható, az eddigi kutatások során alapvetően fonalas mikroorganizmusokat alkalmaztak termelő törzsként. Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy ezek a fajok a szekunder metabolitok széles körét képesek előállítani, másrészt – ideális esetben – a filamentumok a pórusokba behatolva szorosan a membránhoz tapadnak, ezáltal stabil biofilmet képesek létrehozni. Ugyanakkor a fonalas morfológia a tápanyaggradiens kialakulása szempontjából hátrányos lehet. A gombák hifái apikális növekedéssel terjednek, melyet a mikrotubulusok és motorfehérjék által végzett intracelluláris transzportfolyamatok tesznek lehetővé, tehát a jobb tápanyag-ellátottsággal rendelkező sejtek képesek a tenyészetben belül továbbítani a szükséges komponenseket [81]. A hatékony belső transzport alapján megkérdőjelezhető, hogy a fonalas gombák alkotta biofilmben kialakulhat-e a tápanyagok gradiense és ebből eredően a megújuló és a szekunder metabolitot termelő zónák. A *Streptomyces*ek növekedése és belső transzportja a gombákéhoz hasonló, de – lévén prokarióta nemzetség – a citoskeletális rendszerük lényegesen egyszerűbb, így a tápanyagok transzportja feltehetően limitáltabb, és nagyobb eséllyel alakulhat ki gradiens [60]. A membrán gradosztát reaktorban alkalmazható mikroorganizmusokra, illetőleg a termelő törzs kiválasztását korlátozó tényezőkre vonatkozóan azonban még nem jelent meg tanulmány.

2.3.5. MGR összehasonlítása szubmerz és szilárd fázisú fermentációkkal

A fermentációs technológiák két fő típusa – a közeg halmazállapota szerint – a folyadék-kultúrák (szubmerz) és a szilárd fázisú fermentáció. Szubmerz rendszer esetén a tápanyagok és a mikroorganizmusok is vizes oldatban vannak jelen, míg szilárd fázisú fermentációnál a sejtek nedves, szilárd mátrix felületéhez tapadnak. Ez a szilárd felület lehet inert hordozó vagy vízben nem oldódó szubsztrát. A membrán gradosztát reaktor a mikroba életkörülményeit tekintve az inert mátrixú, szilárd fázisú fermentációhoz hasonlít, de az üzemeltetés szempontjából lényeges különbségek vannak a két rendszer között. Az alábbiakban a membrán gradosztát reaktort az említett két fermentációs eljárással hasonlítom össze abból a célból, hogy az ipari alkalmazás szempontjait is figyelembe véve komplexebb képet adjak erről a rendszerről. A három technológia főbb előnyeit és hátrányait a 2.4. táblázatban foglaltam

össze. (Az összehasonlítás során tett megállapításaim a szekunder metabolitok termelésére vonatkoznak.)

2.4. táblázat: Szubmerz és szilárd fázisú fermentációk, illetve MGR összehasonlítása

	szubmerz	szilárd fázisú	MGR
előny	<p>meglévő, ismert technológia</p> <p>jó szabályozhatóság</p>	<p>szekunder metabolizmusnak kedvező körülmények</p> <p>olcsó alapanyagok, hulladékok hasznosíthatók</p> <p>nagyobb produktivitás</p>	<p>szekunder metabolizmusnak kedvező körülmények</p> <p>folyamatos üzemmód lehetősége</p> <p>termék kinyerése egyszerű</p> <p>EPS frakció hasznosítható</p>
hátrány	<p>szakaszos üzemmód</p> <p>a természetestől eltérő körülmények</p>	<p>nehezen szabályozható</p> <p>komplex termékfeldolgozási műveletek</p> <p>komplikált méretnövelés</p>	<p>kidolgozatlan technológia</p> <p>speciális membrán bioreaktorra van szükség</p>

A mikroorganizmusok jelentős része – köztük a *Streptomyces* nemzetség is – a természetben szilárd felülethez tapadva, azon biofilmet képezve fordul elő, tehát a szilárd fázisú fermentáció és az MGR a mikrobák természetes életkörülményeihez hasonló feltételeket biztosít. Ez a tulajdonság a szekunder metabolizmus szempontjából is kedvező lehet, hiszen akár a szilárd táptalajon kialakuló morfológia és az ezzel összefüggésben lévő metabolikus folyamatok, akár a csökkent víztartalom mint környezeti szignál szerepet játszhat a termékképződésben [35]. A szilárd fázisú fermentáció esetében gyakran alkalmaznak élelmiszeripari melléktermékeket, szerves hulladékokat szubsztrátként, ami hulladékgazdálkodási és gazdasági szempontból is kedvező [82], továbbá a szubmerz fermentációhoz képest általában nagyobb produktivitás jellemzi. Ugyanakkor a méretnövelést és a szélesebb körű elterjedést korlátozza, hogy a fermentáció előrehaladtával inhomogenitások alakulhatnak ki mind a pH-t és a hőmérsékletet, mind a komponensek koncentrációját illetően, továbbá a komplex, szilárd mátrixból történő termékkinyerés általában bonyolult és költséges folyamat [83].

A szubmerz fermentáció jól szabályozható, általánosan elterjedt technológia, a fermentor és a kapcsolódó berendezések kidolgozottak, valamint számos gyakorlati tapasztalat áll rendelkezésre azok működéséről és irányításáról. Ezzel szemben a membrán gradosztát reaktor a laboratóriumi kutatások fázisában van, mind az elméleti alapok, mind a gyakorlati megvalósítás tekintetében számos megválaszolatlan kérdés van. Továbbá a technológia alapja egy olyan membrán bioreaktor, amelyhez a szükséges membrán gyártástechnológiája – a speciális igények miatt – eltér a jelenleg használt membránok többségének előállításától [80]. Ugyanakkor a szubmerz fermentáció leállításakor a termék kis koncentrációban van jelen egy komplex

összetételű fermentlében, nagy sejttömeg mellett, továbbá a fermentáció és a termékfeldolgozás – a szekunder metabolizmus sajátjaiból adódóan – jellemzően szakaszos üzemmódban történik. Az MGR elméletileg alkalmas folyamatos üzemmód megvalósítására a biofilm folyamatos megújulása révén, bár ennek a valós határaitól – a ténylegesen elérhető leghosszabb üzemeltetési időről – csak korlátozott információ áll rendelkezésre. Az üzemeltetés időtartamától függetlenül, a termék a permeátumba kerül, így annak gyűjtésével és rendszeres feldolgozásával a termékkinyerés folyamatossá válik, ráadásul a termék kevés sejt mellett és az idő előrehaladtával növekvő koncentrációban van jelen.

A táblázatban szereplő EPS az angol *extracellular polymeric substances*, azaz extracelluláris polimer anyagok kifejezés rövidítése, vagyis a mikroorganizmusok által termelt, és a sejten kívüli térbe kiválasztott polimer metabolitok sorolhatók ide. Prokarióta és eukarióta mikrobáknál egyaránt általánosan elterjedt az EPS-termelés, fajtól függően a biofilmben a teljes szerves anyag 50 – 90 %-át is kitehetik ezek a vegyületek. Kémiai összetételét tekintve poliszacharidok (40 – 95 %), fehérjék (1 – 60 %), nukleinsavak (1 – 10 %) és lipidek (1 – 10 %) alkotják, valamint a környezetből felvett humuszanyagokat is tartalmazhat [84]. Az EPS a biofilm strukturális elemeként védelmet nyújt a kiszáradással és mechanikai behatásokkal szemben, segíti a sejtek aggregációját, szilárd felületekhez történő kitapadását, fontos szerepet játszik a sejtek közti interakciókban és a horizontális géntranszferben, valamint az exogén tápanyagok, szerves ionok felvételében [84], [85].

Általában a biofilm-képződés, ennek részeként pedig az EPS-frakció káros lehet bizonyos iparágakban, illetve egészségügyi területeken: vízkezelési rendszerekben a vízminőség romlásához [85], membrános műveleteknél foulinghoz (a membrán eltömődéséhez) [84], egészségügyi intézményekben pedig ellenálló és visszatérő fertőzések kialakulásához [86] vezethet. Ugyanakkor az EPS-frakció nagy fajlagos felületének, jó lebonthatóságának és sokféle funkció csoportjának köszönhetően számos felhasználási területtel rendelkezik. A környezetvédelemben nehézfémek és szerves szennyezők megkötésére, valamint a talaj tápanyag-utánpótlására használható, élelmiszerekben és kozmetikumokban adalékanyagként, a gyógyászatban pedig antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antivirális és egyéb bioaktív hatóanyagként [87]. A lehetséges felhasználási területeket elsősorban a termelő mikroorganizmus határozza meg, például számos *Streptomyces* faj biofilmje talaj és víz bioremediációjában alkalmazható. Homero és mtsai. [85] kutatásukban *Streptomyces* nemzetség A5, MC1, A14 és M7 izolátumainak tumorellenes hatását vizsgálták különböző tumormodell sejteken. Az egyes törzsek biofilmjéből extrahált EPS-frakcióval történő kezelés minden esetben citotoxikus hatást fejtett ki, bár ennek mértéke törzsenként és rákos sejtvonalanként eltérő volt.

Szubmerz fermentáció esetén lehetőség van a fermentlé flokkulálószerként történő felhasználására, akár közvetlenül, akár tisztítást, kezelést követően. Bár ez esetben a teljes biomassza-tömeg jelen van, alapvetően az EPS-mátrix flokkuláló tulajdonságait használják ki. A közvetlen felhasználás meglehetősen olcsó, azonban a megfelelő hatékonysághoz és stabilitáshoz koncentrálnálási műveletekre – szűrésre, centrifugálásra –, bizonyos esetekben szárításra

van szükség, ami jelentősen növeli a költségeket [84]. A legtöbb említett felhasználási terület esetén pedig elengedhetetlen az EPS-frakció szeparálása, ami szilárd biofilmből történő kinyerés esetén is többlépcsős extrakciós eljárást jelenthet, hagyományos fermentációnál azonban a fázisszeparáció és koncentráció még komplexebbé teszi a technológiát. Az egyes fermentációk összehasonlításánál ezért a membrán gradosztát reaktor előnyeivel tüntettem fel az EPS-frakció hasznosíthatóságát, mert bár egyes alkalmazási területeken a szubmerz fermentáció során nyert fermentlé is felhasználható, az MGR esetében általában egyszerűbb és gazdaságosabb az EPS tiszta formában történő kinyerése.

Összefoglalva, az MGR jelenleg kidolgozatlan, de ígéretes technológia, melyet a folyamatos termékeltétel, a termék könnyebb kinyerése, tisztítása, és az EPS frakció feldolgozhatósága akkor is előnyössé tesznek, ha a gradosztát elvének megvalósítása (a megújuló és termelő biofilmrétegek kialakítása) nem teljesül.

3. Kísérleti munka felépítése és célkitűzései

Kutatásom általános célja a membrán gradosztát reaktor tanulmányozása, ezen belül pedig elsődlegesen az inokulálási eljárás fejlesztése a megfelelő biofilm kialakítása érdekében. Termelő törzsként a *Streptomyces coelicolor* talajbaktériumot alkalmaztam a 2.2. fejezetben ismertetett előnyös tulajdonságai miatt; a képződő szekunder metabolitok közül pedig az aktinorodin volt a céltermék. Mivel a kísérleti munka elég szerteágazó – négy különböző rendszerrel végeztem összesen ötféle kísérletet –, annak részletes ismertetése előtt átfogó képet szeretnék nyújtani arról, hogy mi volt az egyes kísérletek célja, illetve hogyan épülnek ezek egymásra.

A baktériumtörzs beszerzését követően először ferde agaros és Petri-csészés tenyészeteket készítettem, majd rázott lombikos kísérleteket végeztem. Ezen kísérletek során megismertem a baktérium morfológiáját szilárd és folyékony tápközegben, kidolgoztam az analitikai módszereket, tehát megalapoztam a későbbi munkálatokat, viszont nem vezettek új eredményre, így nem kerülnek bemutatásra.

A disszertációban ismertetett első kísérletem során egy ultraszűrő membránmodult (Pentair X-Flow) üzemeltettem membrán gradosztát reaktorként. A célom az volt, hogy mind a mikroorganizmust, mind a modult teszteljem, hogy alkalmasak-e MGR rendszer üzemeltetésére, sikeres kísérlet esetén pedig erre alapozva terveztem további méréseket végezni, a rendszert optimalizálni, hosszú távon működtetni, termékfeldolgozással csatolni, stb. Azonban a kísérlet többszöri megismétlésével sem sikerült megfelelő biofilmet kialakítanom, ezért a kutatás irányvonalát módosítva a továbbiakban azt vizsgáltam, mik azok a tényezők, amik a biofilm képződését, illetve az inokulálás hatékonyságát meghatározzák.

Mivel a reaktor inokulálása szűrési eljárással történik, következő lépésként a fermentlé szűrését befolyásoló paramétereket, valamint a szűrés során a membránon kialakuló – a későbbi biofilm alapját képező – szűrőlepenyt jellemeztem. Az MGR-ként már használt Pentair X-Flow modul mellett Ultradyn modullal is elvégeztem a szűrési kísérletet, melynek eredményeként a pórusok eltömődésének mértékéről, valamint a kialakuló gélréteg ellenállásáról kaptam információt. A mérést kétféle korú fermentlével végeztem el, így a fermentációs idő, közvetetten pedig a morfológia szerepét is vizsgáltam. A fermentlé szűrési sajátságainak jellemzéséhez – a kémhatás és a fermentációs idő hatását is nézve – szűrőpapíron, szakaszos üzemmódban szűrtem mindkét korú fermentlevet három különböző pH-n. A kísérletek során megállapítottam, hogy a szűrési folyamatot befolyásoló paraméterek között komplex kölcsönhatások zajlanak, az elvégzett mérésekre alapozva nem lehet egyértelműen meghatározni az inokulálás szempontjából optimális beállítást. Az viszont kiderült, hogy a vizsgált körülmények között egyik modul sem alkalmas MGR-ként való üzemeltetésre.

Mivel az első kísérletben a sejtek csak kis mértékben tapadtak meg a membránon, és egyáltalán nem terjedtek, a következőkben azt vizsgáltam, hogy a membrán hogyan befolyásolja a növekedés kinetikáját, gátolja-e – és ha igen, milyen mértékben – a kolonizációt. A könnyebb nyomonkövethetőség kedvéért kapilláris modul helyett szilárd táptalajra helyezett – kétféle hidrofobicitású és pórusméretű – lapmembránnal végeztem a kísérletet, kontrollként membrán nélküli rendszert alkalmazva. Az eredmények alapján a baktérium sikeresen kolonizálta a hidrofil membránokat, a növekedés kinetikája pedig megegyezett a kontroll rendszerénél tapasztaltakkal, csupán a terjedés sebessége csökkent. A vizsgált pórusméretek – 0,22 és 0,45 μm – között nem volt jelentős különbség a mért paramétereket illetően, a hidrofób membránokon viszont nem történt számottevő növekedés, tehát a membrán hidrofobicitása a sejtek megtapadása és terjedése szempontjából fontos tényező.

Bár a lapmembrán a felületi növekedés számszerű jellemzésére alkalmas volt, MGR-ben mindenképpen kapilláris szálakkal és folyékony tápközeggel lehet dolgozni, ezért a negyedik kísérletemben visszatértem a kapilláris membránhoz. Modul helyett ezúttal egyedi kapilláris szálakat alkalmazva kidolgoztam egy egyszerűsített MGR modellrendszert, mellyel nagy számú párhuzamos mérést lehet elvégezni. Ebben a rendszerben különböző inokulálási segédanyagoknak a biofilm kialakulására gyakorolt hatását teszteltem, a legjobb segédanyaggal pedig hosszú távú üzemeltetést is megvalósítottam.

Az utolsó kísérletben a kapilláris szálak tapasztalatai alapján kidolgoztam egy méret-növelt rendszert, melyben egy többcsatornás kapilláris membránt (SevenBore) alkalmaztam. Ebben a reaktorban biztosítani tudtam a belső anyagáramlást, a nagyobb biofilm-mennyiség pedig többféle analitikai eljárás alkalmazását tette lehetővé. Bár a tapasztalatok alapján a gradiens, illetve az eltérő fiziológiájú biofilmrétegek kialakulása nem igazolható, mind a membrán, mind az összeállított berendezés alkalmazható speciális membrán bioreaktorként, így a továbbiakban – a folyamatos termékeltétel megoldásával, és az analitikai módszerek fejlesztésével – akár laborkísérletekhez, akár pilot berendezés kidolgozásához ígéretes alternatívát jelent.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok, membránok és membránmodulok

A kísérleti munkám során felhasznált vegyszereket, azok tisztaságát és gyártóját a 4.1. táblázatban tüntettem fel.

4.1. táblázat: Felhasznált anyagok és vegyszerek

Név	Minőség	Gyártó
acetonitril	HPLC gradient grade	Supelco
agar	bakteriológiai	N/A
CaCO ₃	98,8 %	VWR
élesztőkivonat	mikrobiológiai célra	Sigma-Aldrich
etanol	technikai	VWR
fenol	98,0 %	Reanal
glükóz	a.r.	Sigma-Aldrich
H ₂ SO ₄	95 %	Merck
habzásgátló: antifoam 204	N/A	Sigma-Aldrich
HPLC tisztaságú víz	HPLC grade (< 1 µS/cm)	Chem-Lab
húspepton	mikrobiológiai célra	Biolab Zrt.
kationcserélő gyanta	N/A	Viresol Kft.
malátakivonat	mikrobiológiai célra	VWR
mannit	a.r.	VWR
NaCl	a.r.	VWR
NaOH	98,0 %	VWR
neomagnol	gyógyszertári	-
szacharóz	a.r.	VWR
Tween 80 (poliszorbát)	a.r.	Reanal



4.1. ábra: X-Flow (*bal*) és Ultradyn (*jobb*) membránmodulok [saját képek]

A 4.1. ábrán láthatók a fermentlevek szűrése során használt membránmodulok, melyek közül az X-Flow modult alkalmaztam membrán gradosztát reaktorként a 4.3. fejezetben leírt kísérletben. A modulok főbb paramétereit a 4.2. táblázat tartalmazza.

4.2. táblázat: Ultraszűrő kapilláris membánmodulok paramétereit

név	X-flow	Ultradyn
típus	RX300 0.83UFC	FB02-CC-FUY03A1
gyártó	Pentair	Microdyn-Nadir
membrán anyaga	PES/PVP (poliéter-szulfon / polivinil-pirrolidon) ²	PES (poliéter-szulfon)
felület [m ²]	0,08	N/A
hidraulikus átmérő [mm]	0,83	N/A
vágási érték [kDa]	150 - 200	20 - 200

² A PES hidrofób karakterű, ezért PVP hozzáadásával növelik a hidrofilitását; a fázis inverziós gyártás során a PVP-t pórusképzőként alkalmazzák [88].

A modulok mellett egyedi membránszálakat, valamint lapmembránt is vizsgáltam, ezek tulajdonságait a 4.3. táblázatban adtam meg. A vastagság a kapilláris szál esetében a gyártó által megadott érték, a lapmembrán vastagságát pedig Brütsch-Rüegger gyártmányú mikrométerrel mértem meg.

4.3. táblázat: Lapmembrán és kapilláris membránszálak jellemzői

típus	lapmembránok	kapilláris szál	SevenBore ZeeWeed 700B
gyártó	Nantong FilterBio Membrane Co., Ltd	Microdyn-Nadir	Veolia Water Technologies and Solutions
membrán anyaga	PVDF	polipropilén	poliétterszulfon
szál külső átmérője [mm]	–	1	3
aktív membránfelület [cm ²]	15,9	2,4 ± 0,1*	16 (I-es reaktor) 15,4 (II-es reaktor)
pórusméret [µm]	0,22 és 0,45	0,2	N/A**
membrán vastagsága [mm]	0,098	0,1	N/A
típus	mikroszűrő	mikroszűrő	ultraszűrő
hidrofobicitás	hidrofób és hidrofil	hidrofób	hidrofil

* A ± 0,1 cm²-es eltérés oka, hogy a viasszal történő rögzítés során nem pontosan ugyanakkora részét fedtem le a membránszálnak (lásd 4.6. fejezet).

** A gyártó (Veolia Water Technologies and Solutions) nem adott meg pontos adatokat a pórusméretre vonatkozóan. Ezt a modult jellemzően vízkezelési technológiákban alkalmazzák, mikroszűrés és reverz ozmózis eljárások köztes lépéseként, pórusmérete az ultraszűrő tartományban van.



4.2. ábra: SevenBore membránszál keresztmetszeti képe [saját kép]

A SevenBore membrán egy többszatornás kapilláris membrán, melyben a központi kapilláris szálát hat további kapilláris veszi körbe (4.2. ábra), innen ered a membrán elnevezése. A víztisztítási eljárások során belülről kifelé (*inside-out*) történő szűrést végeznek vele.

4.2. Mikroorganizmus, törzsfenntartás

Kutatásom során a *Streptomyces coelicolor* A3(2) törzs DSM 40783 letéti számú szubszpecieszével dolgoztam [26]. A törzs liofilizált ampulla formájában került beszerzésre, felélesztése után ferde agaros tenyészeteken tartottam fenn, negyedévenként átoltva. A törzsfenntartáshoz használt tápközeg összetételét (lásd 4.4. táblázat) a törzset forgalmazó cég által javasolt recept alapján határoztam meg a következő módosítással. Az eredeti recept által javasolt 12 g/l agart és 2 g/l kalcium-karbonátot alkalmazva a Roux-típusú tenyésztőedényben nem volt kellően stabil a gél, függőleges pozícióban összetört, ezért a megfelelő gélállapot kialakítása érdekében az agar mennyiségét növeltem, a kalcium-karbonátét pedig csökkentettem. (A tápközeget a továbbiakban a „*Streptomyces coelicolor* maintenance” kifejezésből származó SCM rövidítéssel jelölöm.)

4.4. táblázat: A törzsfenntartáshoz használt tápközeg (SCM) összetétele

Komponens	Koncentráció [g/l]
glükóz	4
élesztőkivonat	4
malátakivonat	10
CaCO ₃	0,5
agar	20

Az egyedi kapilláris membránszálakkal, illetve a SevenBore membránnal végzett kísérletek esetén ferde agaros tenyészetekről készítettem spóraszuszpenziót, melynek módját a 4.6. fejezetben részletezem. A membrán gradosztát reaktor inokulálásához, valamint a szűrés ki-

sérletekhez kapcsolódó fermentációkhoz nagyobb mennyiségű spóraszuszpenzióra volt szükség, melyet 185 cm² felületű, Roux-típusú tenyésztőedényben állítottam elő. Mivel a légmicéliumok, illetve a spórák felülete erősen hidrofób, desztillált vízzel, illetve fiziológiás sóoldattal – mechanikai behatás nélkül – nem lehet lemosni a spórákat. A spórák lemosásának elősegítésére különböző koncentrációkban teszteltem Tween 80-at (0,1 – 2 %), valamint glicerint (5 – 15 %), de egyik esetben sem nőtt jelentősen a lemosott spórák mennyisége. (A spóraszámot Petroff-kamrás sejtszámlálással állapítottam meg a 4.8.5. fejezetben leírt módon.) A Tween 80 alkalmazásának további hátránya, hogy a későbbi fermentáció során fokozott habzást eredményez. A spóraszuszpenzió készítése a fenti tapasztalatok alapján úgy zajlott, hogy steril vizet pipettáztam a tenyésztetre, majd a felszínét steril oltókaccsal óvatosan végigkaptam a spórák leválásának elősegítése érdekében. A Roux-edény szűk nyaka azonban nem teszi lehetővé, hogy a teljes felszín lekaparjam. Így a 4.4 fejezetben leírt F3 és F4 fermentációknál már Roux-edény helyett 4 db, egyenként 8 cm átmérőjű Petri-csészét alkalmaztam, melyek együttes felszíne közel megfelel a Roux-edényben elért agarfelületnek.

A kísérletekhez használt tápoldatok összetételét a 4.5. táblázatban tüntettem fel. A szakirodalom áttekintése során nem találtam olyan receptet, melyet általánosan használnának *Streptomyces coelicolor* végzett fermentációkhoz. Ezért az általam tanulmányozott publikációk közül kiválasztottam kettőt, melyeknél a többihez képest magasabb aktinorodinkoncentrációt (200 mg/l-t [89], illetve 400 – 800 mg/l-t [90]) értek el, illetve az alkalmazott tápoldatok összetétele is hasonló volt. Ezek alapján állítottam össze azt a receptet, melyet a membrán gradosztát reaktornál, valamint a szűrési kísérletek során alkalmaztam. A tapasztalat azonban azt mutatta, hogy a szacharóz jelentős része megmarad a fermentáléban még az aktív aktinorodintermelés folyamán is, ezért a további kísérleteknél a szacharózt 20 g/l-es koncentrációban alkalmaztam. Mivel a pepton mennyiségét változatlanul hagytam, a malátakivonat mennyiségét csökkentettem, hogy a C/N arány ne tolódjon el jelentősen az első tápközeghez képest (M. Elibol publikációja [89] alapján mind a pepton, mind a malátakivonat elegendő lehet az általam alkalmazottnál kisebb koncentrációban is, bár ez esetben további nitrogénforrásként élesztőkivonatot tartalmazott a tápközeg).

4.5. táblázat: Az egyes kísérletek során alkalmazott tápoldatok összetétele

Komponens	Koncentráció (g/l)	
	MGR és szűrési kísérlet	Egyedi kapilláris-reaktorok és SevenBore reaktorok
szacharóz	80	20
malátakivonat	23	10
pepton	10	10

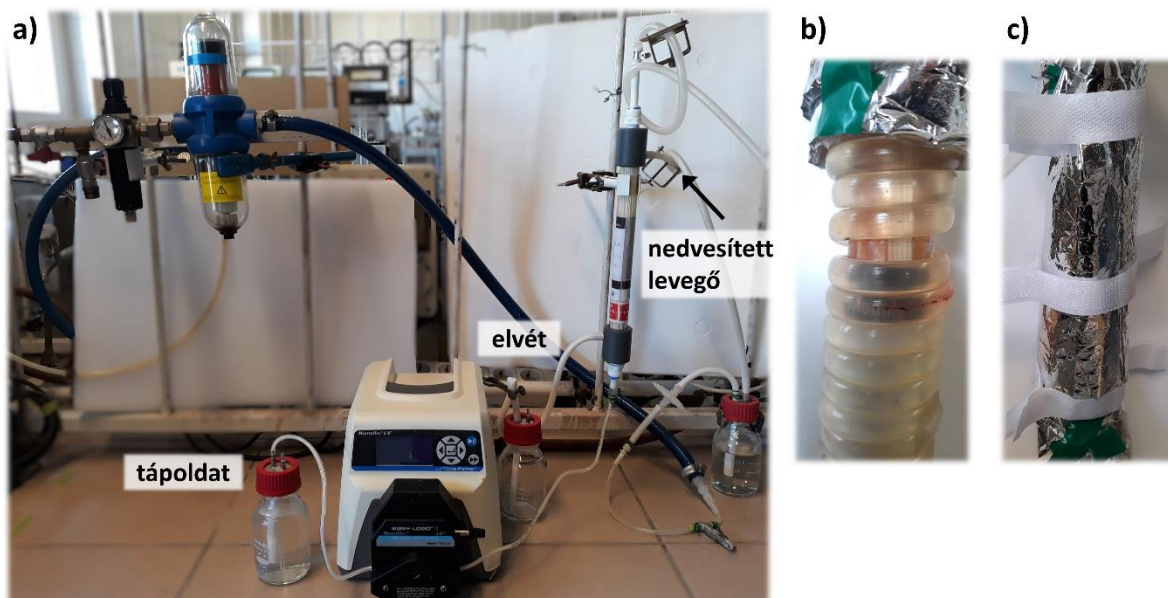
A tápközegek készítésénél minden esetben úgy jártam el, hogy a szacharózoldatot mérőlombikban elkészítettem, majd Schott-üvegbe átöntve sterilizáltam, és sterilizálás után öntöttem össze a tápoldat többi komponensét tartalmazó oldattal, így a cukrok és a fehérjék közt fellépő Maillard-reakciók egy részét elkerültem. (Teljesen nem küszöböltem ki, mivel a malátakivonat is tartalmaz különböző szacharidokat.)

4.3. Membrán gradosztát reaktor kialakítása és üzemeltetése

A membrán gradosztát reaktorral végzett kísérletekhez összeállított berendezés látható a 4.3. ábrán. Maga a reaktor a jobb oldalon elhelyezkedő Pentair X-Flow membrán modul volt, mely a lumen- és a köpenyoldalon is két kivezetéssel (egy alsó és egy felső) rendelkezett. A tápoldatot egy perisztaltikus pumpa továbbította 0,02 ml/min sebességgel az alsó csonkon át a kapillárisok belső terébe. A lumenoldali felső kivezetés a reaktor üzemeltetése során le volt zárva, így a tápoldat a kapillárisok falán keresztül diffundált a köpenyterbe. A permeátumot a köpenytér alsó csonkján keresztül egy steril Schott-üvegbe vezettem; a mintagyűjtő edényt hetente kétszer cseréltem.

A laborban található beépített sűrítettlevegő-hálózatból nedvesített steril levegőt vezettem a köpenyterbe. Az áramlási sebességet előzetes kalibráció alapján egy nyomásszabályozó segítségével állítottam be 2,4 l/h értékre. (A kalibráció úgy történt, hogy a nyomásszabályozó szelep adott beállításai során kialakuló levegőáramlási sebességet szappanbuborékos áramlásmérővel mértem közvetlenül a reaktor levegőbevezetési pontját megelőző csőszakaszon.) A nyomásmérő utáni szakaszra bekötött szűrőegység feladata az olajcseppek és egyéb szennyezők eltávolítása, az ezt követő 0,2 µm-es levegőszűrő pedig biztosította, hogy steril levegő kerüljön a reaktorba. A szűrt levegőt steril vízen átbuborékolatva vezettem a köpenyoldal felső csonkjához, így a nedvesítésnek köszönhetően a levegőáram nem szárította a membrán, illetve a biofilm felszínét. Mind a tápoldat, mind a levegő áramlási sebességét Godongwana és mtsai. publikációja [72] alapján határoztam meg.

A reaktor termosztálása a modul köré tekert szilikoncsőben keringetett fűtővíz révén valósult meg (4.3. ábra b) rész). A Julabo típusú termosztátot 33 °C-ra állítottam, így a modulban 28-30 °C-ot tudtam biztosítani, amihez a modul köré rögzített hőtükör fólia is hozzájárult (4.3. ábra c) rész). (A 4.3. ábra a) részén látható kép a termosztálás megvalósítása előtt készült. Közvetlenül a modulban nem tudtam mérni a hőmérsékletet, csak a kifolyó permeátumban, és ebből becsültem a modulban kialakuló hőmérsékletet.)



4.3. ábra: Membrán gradosztát reaktor (a), fűtőcső a modul körül (b), hőszigetelés (c)
[saját ábra]

A membránmodult és a hozzá kapcsolt szilikoncsőveket a kísérlet indítása előtt az alábbi módon sterilizáltam. A táplódat, illetve a permeátumgyűjtő helyére kebecid 306 ipari vízkezelő adalékanyag 1 %-os (vegyesszázalék) oldatát tartalmazó Schott-üveget kötöttem be olyan módon, hogy a modul felső kivezetéseit a megfelelő Schott-üveghez csatlakoztattam, tehát a távozó folyadékokat visszavezettem. A biocid hatású oldatokat három órán keresztül keringtettem mind a belső térben, mind a köpenytérben egy-egy perisztaltikus pumpa segítségével. Ezt követően a kebecid-oldatokat steril vízre cseréltem és visszavezetés nélkül átmostam a membrán mindkét oldalát.

A táplódat összetételét a 4.5. táblázatban tüntettem fel; az elkészítés után mért 6,2-es pH-értéket nem módosítottam. Inokulumként 50 ml, Roux-edényről készített spóraszuszpenziót adtam 70 ml táplódatához, majd rázóinkubátorban négy napig előfermentáltam 28 °C-on 200 rpm fordulatszámú keverés mellett.

Az inokulumot lamináris fülkében dolgozva áttöltöttem egy steril Schott-üvegbe, majd az üveget a modul köpenyterének alsó és felső csomkjaihoz csatlakoztattam. Az inokulumot perisztaltikus pumpával lassan keringtettem a köpenytérben, miközben a modul lumenoldali kivezetései zárva voltak. 15 perc elteltével – az inokulum további keringtetése mellett – a lumenoldali alsó csomkon keresztül perisztaltikus pumpával szívni kezdtem a folyadékot a lumenből, ezáltal csökkentettem a nyomást a kapillárisok belső terében. A membrán két oldala közti nyomáskülönbség hatására az inokulum folyadékfázisa a köpenytérből átszűrődött a lumenbe, míg a sejtek a köpenytérben maradtak a membrán felületére tapadva. (A Govender és mtsai. [66] által leírt inokulálási eljárás során a transzmembrán nyomás mint hajtóerő biztosítását a köpenytér nyomásának növelésével valósították meg, de az elv ugyanaz.) A szűrést

egy óra után leállítottam, a köpenytérből a visszamaradt folyadékot leengedtem, csatlakoztatam a tápoldatot tartalmazó edényt és a permeátumgyűjtőt, majd a betáplálás és a levegőztetés bekapcsolásával indítottam a kísérletet.

A kísérlet elvégzése után a biofilm eltávolításához és a modul tisztításához 0,1 M koncentrációjú NaOH-oldatot keringettem a membrán mindkét oldalán a sterilizálással egyező módon. Végül steril vizes mosást követően kebecid-oldattal feltöltve és lezárva tároltam a membránt.

4.4. Szűrési kísérletek

A szűrési kísérlethez szükséges fermentációt Sartorius Stedim BIOSTAT® Bplus típusú fermentorban végeztem, mely egy üvegből készült, két liter hasznos térfogatú, általános célú keverős bioreaktor (4.4. ábra). A fermentor saválló acél fedlapján található csomók lehetővé teszik a szenzorok (hőmérő, pH-elektrod, oldott oxigénmérő elektrod, stb.) bevezetését, a keverőtengely, elmenő levegő hűtő, oltólombik csatlakoztatását, a steril mintavételt és esetleges betáplálást (sav, lúg, habzsgátló adagolását). A levegőbevezetés a keverő alatt ívesen hajló acélcsövön keresztül történik. A keverőtengelyre két darab, egyenként hat lapátos Rushton turbinakeverőt szereltem, melyek a folyadékfázis homogenizálása mellett a buborékok aprítását és keveredését is segítik.



4.4. ábra: BIOSTAT fermentor [saját kép]

A fermentáció 1 liter / perc levegő-bevezetés és 250 rpm fordulatszámú keverés mellett, 28 °C-on zajlott, utóbbi értéket a termosztáló köpenytér biztosította. A kémhatás változását pH-mérő elektród segítségével nyomon követtem, de értékét nem szabályoztam. Az alkalmazott tápközeg összetétele a 4.5. táblázatban látható. A szacharóz-oldatot külön sterilizáltam, a többi komponens oldatához pedig sterilizálás előtt hozzáadtam antifoam 204 habzásgátlót 0,0075 % koncentrációban (150 µl-t az összesen 2 liter fermentlébe), ami a gyártó által megadott ajánlott tartomány közepe. A Roux-edényről (F1 és F2), illetve Petri-csészékről (F3 és F4) készített, 100 ml térfogatú spóraszuszpenziót oltóedényből juttattam a fermentorba.

A szűrési kísérletekhez összesen négy fermentlevet készítettem (4.6. táblázat), melyek a fermentáció idejében, illetve az ebből adódó mikrobiológiai (sejttömeg, morfológia) és egyéb (viszkozitás) sajátágaikban különböztek. A korábban végzett kutatások során azt tapasztaltam, hogy a fermentáció harmadik-negyedik napján a sejtek morfológiája jelentősen megváltozik, megjelennek a nagyobb pelletek és a sűrű micéliumhálózat. A fermentlé szűrési sajátosságait az említett morfológiai változás előtti (48 óra) és utáni (96 óra) állapotban is vizsgáltam. A tenyésztési körülmények azonossága ellenére – feltehetőleg a biológiai rendszerek változékonyságából adódóan – kisebb-nagyobb eltéréseket tapasztaltam mind a morfológia, mind a biomassza mennyiségét illetően egyforma fermentációs idő mellett is. Az F4-es fermentlé esetében a tenyészet fejlődése ismeretlen okból elmaradt a többitől, ezért később állítottam le a műveletet, hogy az F2-eshez hasonló tulajdonságú fermentlevet kapjak.

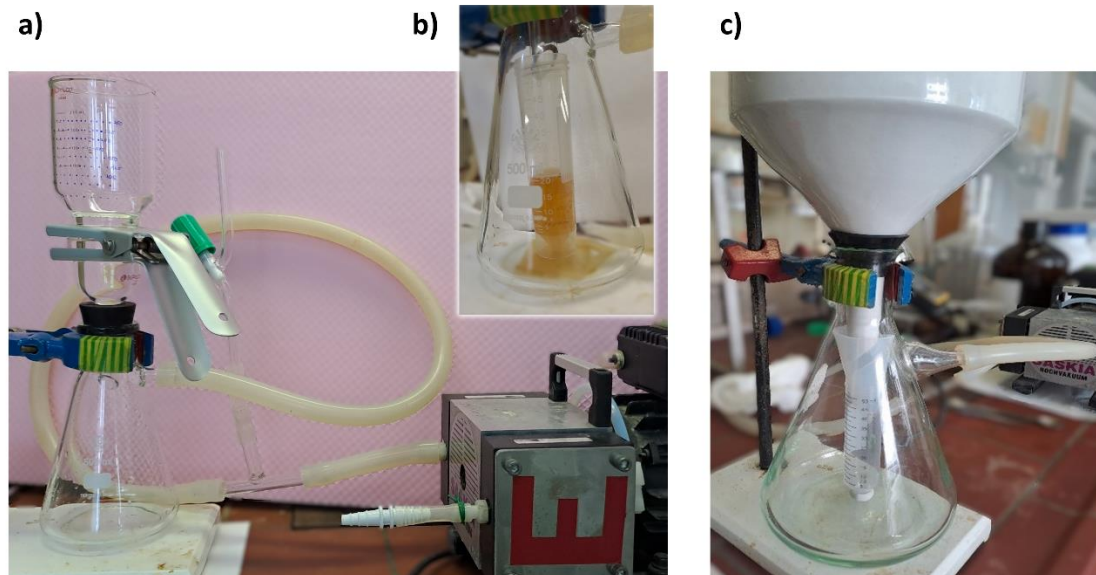
4.6. táblázat: A szűrési kísérletek során alkalmazott fermentlevek és eljárások

	F1			F2			F3	F4
idő [h]	48			96			48	168
pH-állítás	4	7	9	4	7	9	-	-
szűrési eljárás	szakaszos (dead-end) (szűrőpapíron)						rászűrés (<i>reverse filtration</i>) (X-Flow és Ultradyn modulokon)	

Kétféle szűrési eljárást alkalmaztam, mindegyiket kétféle – egy rövidebb és egy hosszabb fermentációs idejű – fermentlével végeztem el. A szakaszos szűrés esetében a pH-nak a szűrési folyamatra gyakorolt hatását is vizsgáltam, ezért a fermentleveket három részre osztottam, a kémhatásukat pedig rendre 4-es, 7-es és 9-es értékre állítottam 10 %-os kénsav-oldat, illetve 10 %-os nátrium-hidroxid-oldat hozzáadásával. (Mivel a 600 ml térfogatú fermentléhez néhány ml sav, illetve lúg hozzáadása elegendő volt, így a térfogatváltozásból eredő hígítást elhanyagolhatónak tekintettem.) A kapilláris modulokon történő szűrést 7-es pH-n végeztem.

4.4.1. Szűrés szűrőpapíron – módszerek

A szakaszos szűréshez vákuumszűrő berendezést alkalmaztam (4.5. ábra), valamint ALBET LabScience FP589/1 típusú szűrőpapírt, mely nagy tisztaságú cellulózból készült, gyors szűréshez alkalmazható szűrőpapír. A fermentlevet a szűrőfeltétbe töltöttem, majd a vákuumszivattyú bekapcsolása után mértem a szűrőpapíron átszívott szűrlet mennyiségét és a szűrési időt. Mivel a szűrőfeltéten a legkisebb beosztás 25 ml volt, a szívópalackban elhelyezett centrifugacső segítségével mértem a keletkező szűrlet mennyiségét, így kisebb térfogat mellett is több mérési pontot kaptam, és gyorsabbá vált az eljárás (a 4.5 ábra (b) részén látható fénykép félrevezető, a centrifugacső a valóságban teljesen függőleges volt). Egy mérés során 200 ml fermentléből kiindulva 30 ml szűrletet gyűjtöttem, minden mintával három párhuzamos mérést végeztem. A szűrést minden esetben új szűrőpapírral végeztem.



4.5. ábra: Vákuumszűrő berendezés összeállítása (a); szűrlet a szívópalackban elhelyezett centrifugacsőben (b); F2 (pH = 7) minta szűrése Büchner-tölcséren (c) [saját ábra]

A párhuzamos adatsoroknál átlagos és relatív szórást számoltam, és csak azokat az adatokat vettem figyelembe a későbbi számítások során, melyek 15 %-os szóráson belül voltak. Az első mérési pont általában 10 ml szűrlettérfogathoz tartozott, ekkorra pedig a szűrést meghatározó szűrőlepeny kialakult. (A szűrési adatokból készített At/V vs V/A diagramon minden esetben a lineáris tartományban volt.) Így a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának meghatározására az alábbi összefüggés alkalmazható:

$$t = \left(\frac{V - V_0}{A} \right)^2 \cdot \frac{\mu \cdot \rho \cdot \alpha}{2 \cdot \Delta p} + t_0 \quad (4.1.)$$

ahol t [s] a szűrési idő, V [m³] a szűrlettérfogat, t_0 és V_0 pedig ahhoz a ponthoz tartozó adatok, amikor a szűrőréteg feltételezhetően kialakult, A [m²] a szűrőfelület, μ [Pa · s] a fermentlé dinamikai viszkozitása, ρ [kg szárazanyag / m³] a fermentlé szárazanyag-tartalma, α [m/kg] a szűrőlepleny fajlagos ellenállása és Δp [Pa] a nyomásesés. (A szűréshez kétfokozatú vákuumszivattyút alkalmaztam, amellyel 3-4 mmHg vákuumot lehet elérni, ezért a kiértékelésnél 101325 Pa nyomáskülönbséggel számoltam.)

A számításokat excel programban, illetve annak Solver bővítményét alkalmazva végeztem el. Első lépésben t kivételével minden ismert adatot és egy véletlenszerűen választott alfa értéket behelyettesítettem a 4.1. egyenletbe, ezáltal létrejött egy szimulált idő adatsor. Ezt minden párhuzamos adatsorra elvégeztem, majd kiszámoltam a mért és a szimulált időértékek abszolút eltérését. A legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva ezen abszolút eltérést minimalizáltam az alfa értékének változtatásával, így végeredményként megkaptam azt az alfa értéket, mellyel a legpontosabban jellemezhető a figyelembe vett összes mérési pont.

Az F2-es fermentlé szűrése semleges pH-n rendkívül lassú volt, tíz perc alatt nem egészen 2 ml szűrlet keletkezett, az ezt követő egy órában pedig a szűrlet mennyiségének növekedését még analitikai mérleggel sem sikerült nyomon követni. A folyamat gyorsítása érdekében a mérést megismételtem üvegfeltét helyett Büchner-tölcsérral is, a megnövelt szűrőfelületen viszont fajlagosan jóval kevesebb fermentlé szűrődött át, így nem alakult ki a szűrés meghatározó szűrőlepleny. Ezt igazolja, hogy az At/V vs V/A diagramon nem értem el a lineáris összefüggéssel jellemezhető tartományt. (A szűrőlepleny kialakulásához szükséges mennyiségű fermentlé nem állt rendelkezésemre.) A számításoknál ezért az üvegfeltéttel kapott egyetlen mérési pontot vettem figyelembe azzal a megjegyzéssel, hogy az így kapott eredmény nem pontos érték, csupán nagyságrendi becslésre alkalmas.

4.4.2. Szűrés kapilláris modulokon – módszerek

Az Ultradyn modulon történő szűréshez összeállított berendezés a 4.6. ábrán látható. A fermentlevet tartalmazó választótölcsért a modul alsó köpenyoldali kivezetéséhez csatlakoztattam, míg a felső köpenyoldali csonkot a modul feltöltése után lezártam. A kapillárisok belső teréhez szintén két kivezető csonk tartozik, a felsőnél helyeztem el a nyomásmérőt, az alsón keresztül pedig gyűjtöttem a permeátumot szívópalack és vákuumszivattyú alkalmazásával. A szívópalackban található centrifugacső segítségével mértem a permeátum térfogatát a 4.4.1. fejezetben leírtakhoz hasonlóan.

X-flow modul esetében a kisebb pórusméret miatt kisebb nyomáskülönbségre volt szükség, ezért vákuumszivattyú helyett perisztaltikus pumpát alkalmaztam. Az összegyűjtött szűrletet egy táramérlegen elhelyezett főzőpohárba vezettem, a mért tömegeből pedig – a szűrlet sűrűségének meghatározása után – kiszámítottam a térfogatot.



4.6. ábra: Szűrés Ultradyne modulon [saját kép]

A szűrlet térfogatából (vagy tömegéből és sűrűségéből) a Darcy-törvény alapján kiszámítottam a fluxust, mely megadható az alkalmazott nyomáskülönbség, valamint a szűrési ellenállás és a viszkozitás hányadosaként is:

$$J = \frac{dV}{A \cdot dt} = \frac{\Delta p}{R \cdot \mu} \quad (4.2.)$$

ahol J [$\text{m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] a fluxus és R [$1/\text{m}$] a teljes szűrési ellenállás. A szűrés során fellépő eredő ellenállás tehát kiszámítható a fluxus, a nyomáskülönbség és a viszkozitás ismeretében. (A transzmembrán nyomás X-Flow modulon tiszta víz szűrésénél 20 mbar volt, fermentlé szűrésnél 30-40 mbar között változott, Ultradyne modulon 940 mbar körüli értékeket mértem.) A sorba kapcsolt ellenállások modellje [91] szerint az eredő ellenállás az alábbi komponensek összegeként írható fel:

- membrán ellenállás (R_M),
- a membrán felületén kialakuló gélréteg ellenállása (R_G),
- a póruseltömődésből származó ellenállás (R_P).

A kísérlet három szűrési és egy tisztítási műveletből állt, az egyes részfolyamatok során pedig csak bizonyos ellenállástagok léptek fel (lásd 4.7. táblázat), így azok értéke a háromféle szűrés során kapott ellenállások különbségéből meghatározható. Az 1. és 3. lépésnél három egymást követő szűrés eredményét átlagoltam, a 2. lépésnél a harmadik mérés során kapott

adatokkal számoltam (a folyamatos eltömődés miatt ebben az esetben nem lehet átlagolni a mért értékeket).

4.7. táblázat: Szűrési lépések és az ezekből meghatározható ellenállástagok

	Szűrési folyamat	Ellenállástag
1.	HPLC-tisztaságú víz szűrése (tisztá modulon)	R_M
2.	fermentlé szűrése	$R_M + R_G + R_P$
<i>a membrán felületének mechanikai tisztítása vizes mosással</i>		
3.	HPLC-tisztaságú víz szűrése	$R_M + R_P$

4.5. Biofilm terjedése lapmembránokon

A *Streptomyces coelicolor* tenyészet szilárd táptalajon, illetve membránon történő terjedésének vizsgálatát hidrofil és hidrofób PVDF lapmembránokkal végeztem, mindkét típusból 0,22 és 0,45 μm pórusméretűt is alkalmaztam. A membránokat sterilizálás céljából előzetesen 2 óráig 2 %-os (vegyesszázalék) Neomagnol-oldatba áztattam, a neomagnolt steril vízzel lemostam, ezt követte egy 30 perces áztatás 75 %-os etanololdatban, végül a lamináris fülke germicid lámpája alatt hagytam őket megszáradni. A többlépcsős sterilizálási eljárásra a gyakran fellépő fertőzések miatt volt szükség. Egy esetben a Neomagnol-oldatos kezelést kihagyva, csak etanolban áztattam a membránokat 72 órán keresztül. Az etanol azonban ennyi idő alatt szemmel láthatóan csökkentette a membránok hidrofilitását, ugyanis az eredetileg hidrofil membránokon is megült a spóraszuszpenzió cseppje, ahelyett, hogy – a korábbi tapasztalatok alapján vártak szerint – szétterült volna a felületén. A vizuális megfigyelést alátámasztja, hogy analitikai módszerekben való alkalmazás esetén a PVDF membránok aktiválására metanolos áztatást javasolnak [92], mely etanolos áztatással is kiváltható (hosszabb behatási idő mellett). A kezelés hatására a membrán hidrofób sajátosságai erősödnek, így könnyebben létesít kötést a vizsgált minták fehérjéivel.

A kísérlethez 80 mm átmérőjű Petri-csészékben készítettem szilárd SCM tápközeget, ezek közepére helyeztem egy-egy 4,5 cm átmérőjű lapmembránt. (A tápközeg összetétele megegyezett a 4.4. táblázatban leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a tápanyagok diffúziójának elősegítése érdekében az agar mennyiségét 20 g/l-ről 12 g/l-re csökkentettem.) A membrán – illetve a kontroll rendszerek esetén a táptalaj – közepére cseppenttem pipettával 100 μl spóraszuszpenziót, melyet ferde agaros tenyészetről, steril vízzel és oltókaccsal történő kaparással nyertem. Egy fehér lapra ismert átmérőjű, koncentrikus körökből álló skálát nyomtattam, ezt használtam háttérként a Petri-csészék felülnézeti fotózásához, melyet néhány naponta megismételtem. A fényképeket a klinikai és egyéb mikrobiológiai kutatásokban elterjedten használt [93], [94] ImageJ 1.54. nyílt forráskódú szoftverrel dolgoztam fel. Az elemzés

során először kijelöltem két pontot a skálán, megadtam a valós távolságukat, majd berajzoltam a telep körvonalát. A megadott távolság alapján a program kiszámította a körberajzolt telep területét, így nyomon tudtam követni a növekedés ütemét.

A telepek területét az idő függvényében ábrázoltam, majd az adatsorokra a Gompertz-kinetika [95] modelljét illesztettem, melyet az alábbi egyenlet ír le:

$$A(t) = A_0 + (A_{max} - A_0) \cdot e^{-e^{k \cdot (\lambda - t) + 1}} \quad (4.3.)$$

ahol $A(t)$ [cm²] a mikrobák által lefedett terület t időpontban, A_0 [cm²] a telep területe a kísérlet kezdetén, A_{max} [cm²] a maximálisan lefedhető terület (jelen esetben a Petri-csésze felülete), k [cm²/nap] a maximális területi növekedés relatív sebessége, λ [nap] a lag-fázis időtartama, t [nap] a kísérlet indításától eltelt idő.

A k és λ paraméterek meghatározása a szűrőpapíron végzett szűrésnél (4.4.1. fejezet) leírtakkal analóg módon történt. A Gompertz-kinetika egyenletébe behelyettesítettem az ismert adatokat és egy-egy, véletlenszerűen választott λ és k értéket, így generáltam egy modellezett terület-adatsort. Az excel program Solver bővítményével, a legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva minimalizáltam a mért és a modellezett adatsorok közti eltérést, így megkaptam a mérési adatokat legpontosabban leíró k és λ értékeket. (Mivel minden esetben legalább öt mérési pontot vettem figyelembe, a paraméterek számítási módszere egzaktnak tekinthető.)

4.6. Biofilm vizsgálata egyedi kapilláris membránszálakon

A *Streptomyces coelicolor* kapilláris szálakon történő biofilm-képzésének megfigyelésére olyan kísérleti elrendezést dolgoztam ki, mely lehetővé teszi párhuzamos rendszerek egyidejű vizsgálatát. Az elsődleges célom a sejtek megtapadásának, a biofilm kialakulásának vizuális nyomon követése volt.

A sejtadhézió elősegítése céljából háromféle segédanyagot teszteltem, melyek feltételezéseim szerint az alábbi módokon járulhatnak hozzá az említett folyamathoz:

- Tween 80: felületaktív sajátsága révén segíti az eltérő hidrofobicitású felületek közötti adhéziót – azaz a membrán felületén és pórusaiban a spórákból fejlődő mikrobátömeg megtapadását (Cheng és mtsai. [96] kutatásukban sikeresen alkalmazták szilárd felület bakteriális kolonizációjának elősegítésére);
- agar: az inokulumhoz kevert agar lehülve megszilárdul a kapillárison, így a spóraszuszpenzió vékony réteget képez a membrán teljes felületén (tehát az agar egyfajta „ragasztóanyagként” funkcionál);
- karboximetil-cellulóz (CMC): az agarhoz hasonlóan bevonatot képez a membrán felületén a hozzáadott spórákkal együtt.

Az általam vizsgált komponensek mindegyikét elterjedten használják a mikrobiológiai gyakorlatban, illetve az élelmiszeriparban (Tween 80-at fermentációk során emulzifikálóként [97], agart a tápközegek szilárdítására, CMC-t élelmiszer-adalékanyagként sűrítés, emulgeálás

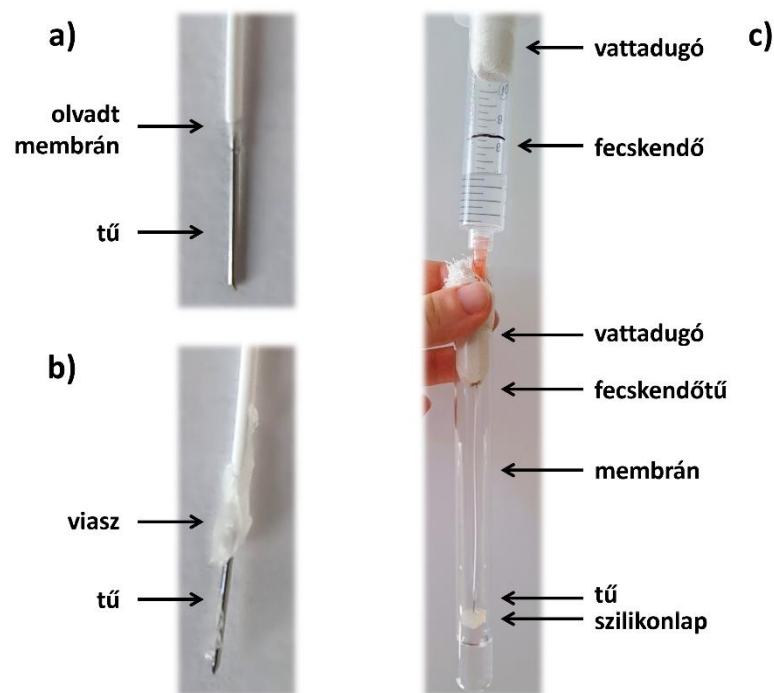
céljából). *S. coelicolor*ral végzett kutatásokban láthatunk példát a Tween 80 tápközeg-komponensként történő alkalmazására [97], továbbá Kulkarni és mtsai. publikációja [98] szerint ez a faj extracelluláris enzimeit révén képes lebontani és szénforrásként hasznosítani a CMC-t (bár ezt elsősorban könnyen felvehető szénforrás hiányában teszi), tehát a segédanyagok nem toxikusak a vizsgált baktériumra nézve. Mind az agar, mind a CMC esetében feltételezhető, hogy nagy mennyiségben adagolva a kialakuló bevonat olyan sűrű vagy vastag lesz, ami már a tápanyag diffúziójának limitálása révén gátolja a sejtek növekedését, szaporodását. Az optimális mennyiség meghatározása érdekében mindkét anyagot háromféle koncentrációban alkalmaztam (lásd 4.8. táblázat).

4.8. táblázat: Egyedi kapillárisok inokulálásához használt segédanyagok

jelölés	segédanyag	
	neve	koncentrációja
K (kontroll)	–	–
T	Tween 80	1 %
A1	agar	1 g/l
A3		3 g/l
A5		5 g/l
C2	CMC	2 g/l
C5		5 g/l
C8		8 g/l

A reaktorok teste egyszerű 17-18 mm átmérőjű, 16 cm hosszú boroszilikát kémcső volt, ezekbe került egy-egy kapilláris. Az egyes kapilláris-reaktorok felépítését mutatja be a 4.7. ábra c) része (a kép egy tesztrendszerrel készült, ami tápoldat helyett desztillált vízzel volt feltöltve). A membránszálat egy vattadugón átszúrt injekciós tű hegyére rögzítettem, így helyeztem a kémcsőbe; a kémcső aljába pipettáztam 1-2 ml vizet a megfelelő páras környezetet biztosított a tenyészet kiszáradásának elkerüléséhez. A vattadugón átszúrt fecskendő segítségével juttattam a lumenbe a tápoldatot, a fecskendőt pedig felül szintén vattadugóval zártam le, amely segítette a sterilitás fenntartásában, ugyanakkor nem zárt légmentesen, így nem gátolta a tápoldat fogyását. A membrán alsó végét egy szilikonlappal zártam le, ami megakadályozta a tápoldat átfolyását, emellett segítette elkerülni, hogy a kapillárisfal a kémcső falához tapadjon. A kapilláris-reaktor összeállítása előtt a membránt 0,1 M-os HCl-oldatban áztattam 24 órán keresztül, ezáltal olyan mértékben növeltem a hidrofilitását, hogy a tápoldat át tudott jutni a membrán falán.

Az inokulum elkészítéséhez 20 ml fiziológias sóoldatba bemértem a kiválasztott segédanyagot a 4.8. táblázatban leírt mennyiségben, majd sterilizáltam és 45 °C-ra állított termosztátba helyeztem, hogy a lehűlés mértékét kontrollálni tudjam. (A túl meleg oldat károsította volna az inokulumként használt tenyészetet, alacsonyabb hőfokon viszont az agar megszilárdul.) Ezt követően egy ferde agaros tenyészetet tartalmazó kémcsövet feltöltöttem az oldattal, és steril oltókaccsal óvatosan lekapartam a tenyészet felszínéről a spórákat. Az inokulálás során az így elkészített spóraszuszpenzióba mártottam az előzőleg tápoldattal feltöltött, majd a végén lezárt membránszállakat.



4.7. ábra: Egyedi kapilláris szálás rendszer felépítése [saját ábra]

A kapilláris-reaktorok összeállításának menete az alábbi lépésekből állt (a 4. ponttól kezdve minden felsorolt lépést lamináris fülkében végeztem):

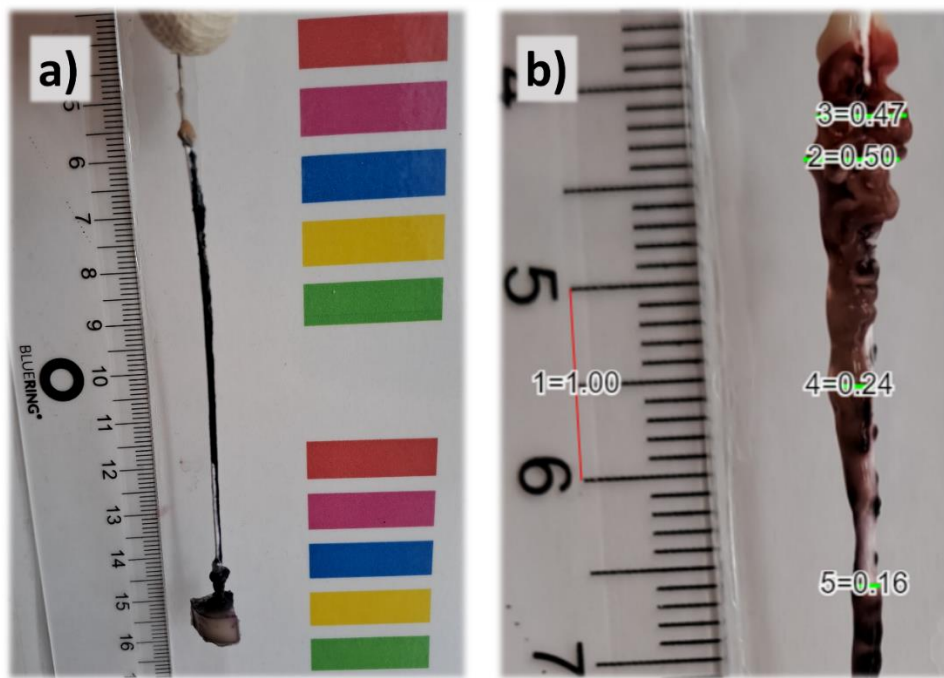
1. A membránszál alsó végébe bevezettem egy 1,5 cm hosszú fém injekciótűdarabot, amihez ezután néhány másodpercig hozzáérintettem egy előzőleg felhevített csipeszt. Ahogy a tű felmelegedett, a membránszál ráolvadt, amit az eredetileg fehér membrán elszíntelenedése jelzett (4.7. ábra a) rész). (Ha a membránt közvetlenül érte nagyobb hőhatás, hosszabb szakaszon megolvadt, deformálódott, ezért csak a tűt lehetett óvatosan melegíteni.)
2. A stabilabb rögzítés és a szivárgás elkerülése érdekében a membrán és a tű csatlakozási pontjára olvadt gyertyaviaszt csepegtettem (4.7. ábra b) rész).
3. Az így előkészített membránokat 2 %-os (vegyesszázalék) Neomagnol-oldattal feltöltött kémcsőbe állítottam sterilizálás céljából.

4. A kémcsövet lezáró vattadugón átfúrtam a steril fecskendőtüőt.
5. A membránszál felső végét az 1. és 2. pontban leírtak szerint rögzítettem a fecskendőtüőhöz, majd az egészet behelyeztem a kémcsőbe.
6. A steril fecskendőből kiszedtem a dugattyút, majd csatlakoztattam a tüőhöz.
7. A fecskendőbe 5 ml tápoldatot pipettáztam, és vattadugóval felül lezártam.
8. Egy-két csepp tápoldat kifolyása után a kapilláris alján lévő tüőt beleszúrtam egy kis darab szilikonlapba.
9. A membránt az előzőleg elkészített inokulumot tartalmazó kémcsőbe mártottam, majd néhány másodperc múlva kiemeltem és visszatettem a kémcsőbe.

Ahogy az a felsorolásból is kiderül, a kapillárisokat előbb feltöltöttem tápoldattal és csak utána zártam le a szilikonlappal, hogy a feltöltés során ne mosódjanak le a sejtek. Ez egyúttal ellenőrzési pontként is szolgált: ha pár perc alatt jelentős mennyiségű tápoldat átfolyt, az szivárgást jelzett. Fordított esetben, ha a kémcső aljában lévő desztillált vizet nem színezte el hosszabb idő után sem a tápoldat, az eltömődésre utalt. (Feltételezem, hogy vagy a fecskendőtüő tömődött el a vattadugó átszúrásánál, vagy a membrán belseje az olvasztásnál.)

A biofilm fejlődésének nyomon követése érdekében a kapillárisokat rendszeresen lefotóztam egy vonalzóval és színskálával ellátott, laminált fehér lap előtt (4.8. ábra a) része). A laminált lapot 70 %-os etanol-oldattal fertőtlenítettem, így a membránokat a kémcsőből kivéve is fotózhattam a lamináris boxban. A háttér alkalmazásával csökkenteni tudtam a különböző fényviszonyok mellett, illetve eltérő távolságból végzett fotózásból eredő hibákat. A háttér segítségével a tenyészet színe a színskálához viszonyítva – RGB-kódokra bontva – elvben meghatározható. Ugyanakkor a nagy mintaszám (nyolc beállítási pontban, három párhuzamosról három hét során készültek a fotók, képenként gyakran két-három jellemző szín is megállapítható) nehezen kezelhető mátrixot eredményezne. Mivel az egyes beállítások között nem volt jelentős eltérés a színfejlődésben, az említett elemzést nem végeztem el, de a fehér háttér és a színskála együttesen segített kevésbé szubjektívvé tenni az értékelést.

A biofilm „jóságának” egyik legfontosabb jellemzője, hogy milyen mértékben borítja be a membrán felületét. Ennek meghatározása a különböző irányokból készített fényképek vizuális elemzésével történt. A borítottságot százalékos formában, két komponensre (vízszintes és függőleges borítottság) bontva adtam meg. Bár a szubjektív értékelésből adódóan az adatok pontatlanok lehetnek, a kísérlet célja nem a borítottság mértékének precíz meghatározása, hanem az egyes beállítási pontok közötti különbségek megállapítása volt, melyet az egy ember által, azonos módon végzett értékelés lehetővé tesz.



4.8. ábra: A membránok fényképezéséhez alkalmazott háttér (a); vastagság mérése (b)
[saját ábra]

A biofilm vastagságának, pontosabban a membrán és az azt körülvevő telepek együttes átmérőjének meghatározása online képelemző program [99] segítségével történt, hasonlóan a Mohseny és mtsai. által leírtakhoz [77] (illetve a lapmembránokkal végzett kísérletnél alkalmazott eljáráshoz). Az elemzéshez egy egységnyi hosszúságú szakaszt kell meghatározni a képen a végpontok kijelölésével, a további szakaszok hosszát pedig a megadott egységhez viszonyítva számítja ki a program. Egységként a háttérben elhelyezett vonalzó egy centiméteres szakaszát adtam meg, a mért értékekből pedig levontam a kapillaris átmérőjét, így megkaptam a biofilm tényleges vastagságát. Minden esetben két paramétert határoztam meg, egy maximális és egy átlagos vastagságot; ez utóbbit öt – a maximumtól különböző – ponton mért érték átlagolásával számítottam ki.

Mind a borítottságot, mind a vastagságot a kísérlet végén (21. napon) készített fénykép alapján határoztam meg. Az egyes kapillarisokat tehát a végállapotra jellemző átlagos ($d_{\text{átlag}}$) és maximális (d_{max}) biofilm-vastagsággal, valamint a membrán függőleges (b_f) és vízszintes (b_v) borítottságával jellemeztem. Az adatok elemzését főkomponens-analízissel (principal component analysis, röviden PCA) végeztem, melynek lényege, hogy a mérések során meghatározott, nagyobb mennyiségű változót lineáris transzformáció révén kisebb számú, új független változóvá (ún. főkomponenssé) vonjuk össze a lehető legkisebb információvesztés mellett. A változók számának csökkentése megkönnyíti a rendszerek összehasonlítását és az eredmények grafikus megjelenítését. A főkomponensek (más néven faktorok) gyakorlati értelemmel nem bíró, matematikai változók, melyek megadják azokat az irányokat az n dimenziós térben – ahol n az eredeti vizsgált paraméterek száma – amely irányokban a legnagyobb a

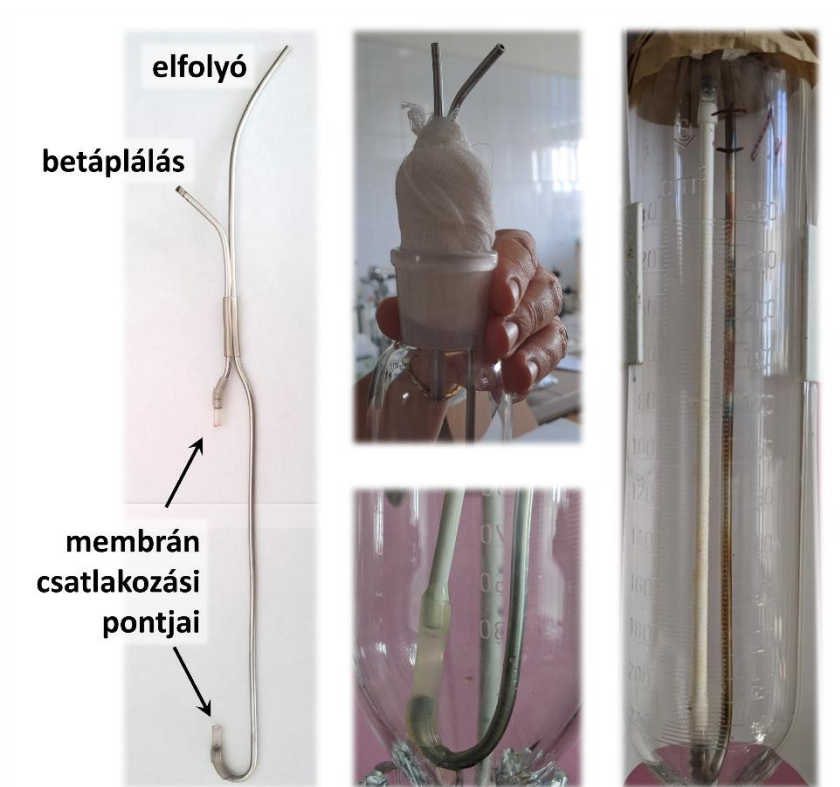
változótér varianciája. Az első főkomponens (PC1) irányában a legnagyobb a vizsgált adathalmaz varianciája, erre merőleges a második főkomponens (PC2), amerre a második legnagyobb a variancia, és így tovább. Általában – így az általam bemutatott kísérleti adatok esetében is – két főkomponens már kellő mértékben jellemzi a rendszert, ennek megfelelően az eredmények kétdimenziós koordináta-rendszerben ábrázolhatók [100].

Azért, hogy az eltérő értéktartományban lévő borítottság-, illetve vastagságértékeket össze tudjam hasonlítani, az analízis előtt normalizáltam a mért adatokat. A borítottságot eredetileg százalékos formában határoztam meg, ezek tizedes tört alakban felírva megegyeznek a normalizált értékkel. A maximális és az átlagos vastagságok esetén kiválasztottam az adott adatsor legnagyobb értékét, és ezzel leosztva az összes adatot 0 és 1 közötti értékeket kaptam. A normalizált adatsor alapján a Statistica 8.0 szoftver (gyártó: StatSoft Inc.) meghatározta a főkomponenseket. Az analízist a Statistica 8.0 szoftverrel végeztem, az itt kapott eredmények felhasználásával pedig a GraphPad Prism 8.0.1. programban (gyártó: GraphPad Software Inc.) készítettem el az ábrákat.

4.7. SevenBore reaktor

Az egyedi kapilláris membránszálakkal végzett kísérletek után egy léptéknövelt rendszert dolgoztam ki SevenBore típusú membrán felhasználásával. A reaktor teste 5 cm átmérőjű és 20 cm hosszú, henger alakú, üvegcsappal ellátott (250 ml-es) csepegtető tölcser volt (kiegyenlítő cső nélküli kialakítású). Az összeállítás közben készült képeken látható a reaktor belső felépítése (4.9. ábra). A függőleges elrendezésű membránszál mindkét végéhez egy-egy fémcsövet csatlakoztattam szilikoncső segítségével. A felső végéhez kapcsolt fémcsövön keresztül történt a betáplálás, az alsó végéhez csatlakoztatott csövet pedig ívben meghajlítottam, így a membránnal párhuzamosan helyezkedett el. A fémcsöveket felül egy közös szilikoncsövön átvezetve rögzítettem egymáshoz, majd a csöveket körbevevő, a reaktortest nyakához szorosan illeszkedő vattadugót készítettem, így a vattadugónál fogva tudtam mozgatni a belső vázat (valamint ezen keresztül zajlott spontán diffúzióval a steril légcseré). Ez az elrendezés nem csak a folyamatos betáplálást és a retentátum elvezetését – vagyis a belső tápanyag-áramlást – biztosította, hanem egyúttal növelte a mechanikai stabilitást is.

A permeátumot a csepegtető tölcser aljához rögzített szívópalackban gyűjtöttem. A tápoldatot tartalmazó, valamint a túlfolyó gyűjtésére szolgáló Schott-üvegeket szilikoncsövekkel kapcsoltam a reaktor megfelelő fémcsöveihez. A tápoldat összetétele megegyezett az egyedi kapilláris-reaktoroknál használttal (lásd 4.5. táblázat), a folyamatos betáplálást perisztaltikus pumpa biztosította 1 ml/h áramlási sebességgel. A szívópalack, illetve a Schott-üvegek szabadon maradt kivezetéseit 0,2 μm pórusméretű steril levegőszűrővel zártam le.



4.9. ábra: SevenBore reaktor belső felépítése [saját képek]

A teljes kísérleti elrendezés a 4.10. ábrán látható. Két párhuzamos reaktort indítottam, melyek közül az I-es termosztaltam a köpenytérben keringetett 31 °C-os fűtővíz segítségével. (A II-es reaktor hőmérséklete a labor hőmérsékletének megfelelően 20 és 24 °C között alakult.) A termosztálás hiányától eltekintve a II-es reaktor minden további üzemeltetési paraméterben megegyezett az I-es reaktoralal.

A membrán kivételével mindent autoklávban sterilizáltam 25 perc hőtartással, 121 °C-on, az ezt követő összeállítást pedig lamináris fülkében végeztem. A reaktorokhoz csatlakoztattam a szacharózmentes tápoldatot tartalmazó Schott-üveget, valamint az elfolyó gyűjtőedényét, így helyeztem az autoklávba. A szacharóz-oldatot külön Schott-üvegbe mértem be, és sterilizálás után, még forrón hozzáöntöttem a többi komponens oldatához. A szívópalackokat vattadugóval lezárva, a csepegtető tölcser mellett sterilizáltam, majd a membrán behelyezése és inokulálása után csatlakoztattam egymáshoz az üvegeszközöket.

A membránt sterilizálás céljából 75 %-os etanol-oldattal feltöltött kémcsőbe állítottam 30 percre, majd steril vízzel leöblítettem. Mivel az összeállítás során elkerülhetetlen volt, hogy – etanollal fertőtlenített – kézzel megfogjam a membránt, ezért inokulálás előtt a lamináris box beépített UV-lámpájával tíz percig sterilizáltam a fémcsövekhez csatlakoztatott membránt.



4.10. ábra: SevenBore reaktorok – összeállított rendszer [saját kép]

A spóraszuszpenziót a 4.5. fejezetben leírtakkal megegyezően készítettem el, inokulálási segédanyagként pedig agart alkalmaztam 3 g/l koncentrációban, mivel a korábbi kísérletekben ez bizonyult a legkedvezőbbnek. Az inokulálás úgy történt, hogy egy 10 ml-es pipettahegybe felszívtam a szuszpenzióból, majd a membránhoz érintve a hegy végében lévő cseppet, óvatosan végighúztam a hegyet a membrán mentén, miközben lassan adagoltam a szuszpenziót. Ezt a műveletet többször megismételtem, közben hagytam az agart szilárdulni, illetve a membránt kétszer elforgattam, hogy minden irányból egyenletes réteget tudjak képezni.

A kísérlet végén lekapcsoltam a termosztálást és a perisztaltikus pumpát, majd a reaktorokhoz csatlakozó szilikonsöveket leválasztottam. A felső vattadugót meglazítottam és óvatosan húzni kezdtem felfelé addig, míg egy csipesszel már meg tudtam fogni membrán felső végét, kihúztam a szilikonsövekből – amik a fémcsővel kötötték össze – és kiemeltem a reaktortestből. (Mivel a kísérlet végére a membrán meghajlott, helyenként el is érte a reaktor falát, így ha a fémvázzal együtt vettem volna ki, végighúztam volna a biofilmet az üvegedény csiszolatos nyakán.) Analitikai mérlegem megmértem a tömegét, majd egy vonalzó mellé téve lefényképeztem, hogy a biofilm vastagságát meg tudjam határozni az egyedi kapilláris szálak esetén is alkalmazott módszerrel (lásd 4.5. fejezet). Ezt követően hosszában óvatosan végigvágtam a biofilmet egy zsilettpengével, és kiemeltem belőle a membránt. A membrán tömegét lemértem, melyet az össztömegből kivonva megkaptam a teljes nedves sejttömeget. A biofilmet – fényképezés után – mozsárban homogenizáltam, majd két részre osztottam. Az egyik részt 80 °C-on tömegállandóságig szárítottam és mértem a száraz biomassza-tömeget, a má-

sikból pedig extraháltam az EPS frakciót és fenol-kénsavas eljárással meghatároztam a poliszacharid-tartalmát a 4.8. fejezetben leírtak szerint.

4.8. Analitikai eljárások

4.8.1. Aktinorodin mennyiségének meghatározása

Az aktinorodin mennyiségi analizisére elterjedten alkalmaznak különböző fotometriás eljárásokat [101], [102], [103], melyek közül a Holtmann és mtsai. által leírt módszert [90] választottam. A mérés során 1 ml mintához 1 ml, 1 M-os KOH-oldatot adtam, majd homogenizálást követően 5 percig 8000 rpm fordulatszámon centrifugáltam (VWR MicroStar 12 mikrocentrifugán). A felülúszó abszorbanciáját 640 nm-en mértem (Hach Lange DR3900 típusú spektrofotométeren), szükség esetén további hígítást végeztem 1 M-os KOH-oldattal. Mivel aktinorodin standard nem állt rendelkezésemre, az aktinorodin mennyiségét a moláris extinkciós koefficiens ismeretében az alábbi egyenlet alapján határoztam meg:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot l} \quad (4.4.)$$

ahol E az abszorbancia,

l a küvetta vastagsága [cm],

ε a moláris extinkciós koefficiens (értéke 640 nm-en 25320 l/(M cm)).

4.8.2. Cukrok meghatározása

A különböző membrán gradosztát rendszerek esetén kapott permeátumok cukortartalmának meghatározására HPLC-módszert alkalmaztam. A tápoldatban használt malátakivonat három kromatográfiás csúcsot adott, melyből a glükózt és a maltózt a retenciós idő alapján, standard oldatok segítségével be tudtam azonosítani. Az eredmények értékeléséhez kalibrációs sort készítettem szacharóz, glükóz, maltóz és malátakivonat ismert koncentrációjú oldatával. Az egyes komponensek retenciós idejét a 4.9. táblázatban tüntettem fel.

4.9. táblázat: Cukorkomponensek retenciós ideje

Komponens	Retenciós idő [perc]
glükóz	6,71
szacharóz	7,33
maltóz	8,01
malátakivonatból származó ismeretlen csúcs	9,61

A meghatározást YL9100 HPLC rendszerrel, Thermo Hypersil APS-2 kolonnán végeztem. A mintákat 0,2 µm-es fecskendőszűrőn sejtmertesre szűrtem, majd elvégeztem a szükséges hígításokat. Az eluens készítéséhez és a minták hígításához egyaránt HPLC-tisztaságú vizet használtam. A minták mérése automata mintaadagolóval, előre megadott programtábla szerint történt, a HPLC irányításához és a kromatogramok kiértékeléséhez pedig YL-Clarity 3.0.2.244 szoftvert (Young Lin Instrument Co., Ltd) használtam. Az eljárás további paramétereit a 4.10. táblázat tartalmazza.

4.10. táblázat: Cukormeghatározáshoz használt HPLC-módszer paraméterei

kolonna típusa	Thermo Hypersil APS-2 (ID: 4,6 mm, L: 250 mm, részecskeméret: 5 µm)
eluens (izokratikus módszer)	acetonitril és víz 65:35 térfogatarányú elegye
kolonna termosztálása	30 °C
áramlási sebesség	0,7 ml/min
futási idő	15 perc
injektálási térfogat	10 µl
detektor	refraktív index (RI)
tümosó folyadék (mintaadagoló)	metanol és víz 1:1 térfogatarányú elegye

4.8.3. EPS extrakciója és poliszacharid-tartalmának meghatározása

A biofilm-mátrix összetételének jellemzése érdekében az EPS-frakciót extraháltam, majd meghatároztam az extraktum poliszacharid-tartalmát. A szakirodalomban a biofilm EPS-frakciójának extrakciójára leírt módszerek közül az ultrahangos kezelést [85], a hőkezelést [84] és a kationcserélő gyantával történő feltárást [104] próbáltam ki. Az eljárások teszteléséhez lapmembránon növesztett *Streptomyces coelicolor* biofilm-szuszpenzióját használtam fel. Olyan eljárást kellett találnom, mely az EPS frakciót hatékonyan extrahálja, ugyanakkor a sejteket nem tárja fel. Az extrakció hatékonyságát a kinyert poliszacharid mennyiségével jellemeztem, emellett Folin-módszeres fehérjeméréssel [105] ellenőriztem, hogy a minták fehérjetartalma változott-e az egyes kezelések hatására. A fehérjetartalom ugrásszerű növekedéséből arra következtettem, hogy a sejtek lízisének eredményeként nagy mennyiségű fehérje került ki a citoplazmából. Az ultrahangos kezelés a lehető legkisebb amplitudó mellett is feltárta a sejteket, a kationcserélő gyanta pedig önmagában nem volt elég hatékony. Bár a hőkezelés mindkét szempontból megfelelőnek bizonyult, a kinyerhető poliszacharid mennyiségét tovább tudtam növelni, ha a hőkezelt mintát kationcserélő gyantás módszerrel tovább extraháltam, így végül a kétlépcsős eljárás mellett döntöttem.

A nedves biofilmet desztillált vízzel 0,2 g (nedves tömeg) / ml koncentrációjúra hígítottam, majd termosztálható (B.Braun Biotech International gyártmányú, Certomat S típusú) rázógépből 30 percig, 170 rpm fordulatszámon kevertetve, 60 °C-on hőkezelttem. Ezt követően bemértem 2 g kationcserélő gyantát egy 30 ml-es centrifugacsőbe, hozzáadtam 10 ml-t a hőkezelt biofilm-szuspenzióból, és rázógépből további 30 percig rázattam 170 rpm fordulatszámon (ekkor már nem alkalmaztam fűtést).

Az EPS-frakció poliszacharid-tartalmát fenol-kénsavas eljárással [106] határoztam meg, melynek során a kénsav a poliszacharidokat egyszerű cukrokra bontja, a fenollal lejátszódó színreakció révén pedig ezek mennyisége fotometriásan mérhető. Annak érdekében, hogy csak a poliszacharidból származó cukrok vegyenek részt a reakcióban, az extrahált mintában jelenlévő mono- és diszacharidokat dialízissal eltávolítottam. Ehhez az extrahált mintákat 20 percig, 14 000 rpm-en centrifugáltam (Herolab Unicen MR laboratóriumi centrifugán), majd a felülúszót egy celofánzacskóba pipettáztam, a lezárt zacskót pedig három liter desztillált vízzel feltöltött kannába állítottam, és mágneses keverővel kevertetem a vizet. A dialízist 24 óra után leállítottam, majd fenol-kénsavas eljárással meghatároztam a dializált minta poliszacharid-tartalmát.

A fenol-kénsavas módszer lépései az alábbiak voltak (a minták hígítását követően minden lépést elszívófülke alatt végeztem):

- kémcsőbe bemértem 0,5 ml – szükség esetén hígított – mintát;
- automata pipettával hozzáadtam 0,5 ml, 5 %-os fenol-oldatot, és vortex-keverő segítségével összekeverttem;
- mérőhengerrel hozzáadtam 2,5 ml tömény kénsavat, ismételten homogenizáltam vortex-keverővel;
- 30 percig elszívófülke alatt hagytam a mintákat, majd spektrofotométerben 490 nm-en mértem az abszorbanciájukat.

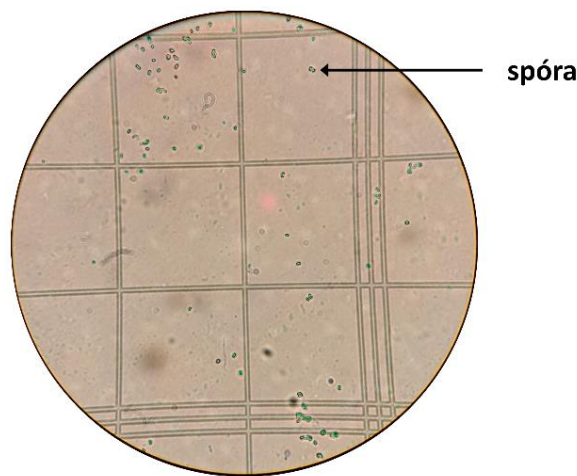
Az eredmények értékelése kalibráló sor segítségével történt, melyet 100 µg/ml koncentrációjú D-glükóz törzsoldat hígításával készítettem (20 – 100 µg/ml tartományban), vak mintaként pedig desztillált vizet alkalmaztam. A vak mintával és a kalibráló sor tagjaival egyaránt elvégeztem a fenol-kénsavas eljárás lépéseit.

4.8.4. Száraz sejttömeg mérése

A száraz sejttömeg (biomassza-koncentráció) meghatározásához 10 ml fermentlé mintát centrifugáltam 5 percig 12 000 rpm fordulatszámon (Herolab Unicen MR laboratóriumi centrifugán), a felülúszó eltávolítása után a kiülepedett sejteket felszuszpendáltam, mosást követően pedig ismét centrifugáltam és 80 °C-on tömegállandóságig szárítottam. A száraz sejttömegből a minta térfogatának ismeretében kiszámítható a száraz biomassza koncentráció. A fermentlé inhomogenitásából származó mintavételi hiba csökkentése érdekében három párhuzamos mérés eredményét átlagoltam.

4.8.5. Mikroszkópos vizsgálatok

A folyadékkultúras tenyészetek tisztaságának ellenőrzését, valamint a mikroorganizmus morfológiájának és fejlődésének megfigyelését fénymikroszkóppal végeztem. A vizsgálatokhoz fázis kontraszt feltétellel ellátott, Zeiss Primo Star típusú áteső fényes mikroszkópot használtam négyszázszoros, illetve ezerszeres nagyítással. A spóralemosási eljárás kidolgozásánál a spóraszám megállapítását Petroff-kamrás sejtszámlálással végeztem. A mérés során minden esetben legalább 300 spórát számoltam meg 400-szoros nagyítás mellett (4.11. ábra), majd a rácsok területének és mélységének, vagyis a kamrák térfogatának ismeretében meghatároztam a spóraszámot.



4.11. ábra: Spóraszámolás Petroff kamrával (400-szoros nagyítás) [saját ábra]

4.8.6. Viszkozitás és sűrűség mérése

Az 5.2.1. fejezetben leírt fermentlevek dinamikai viszkozitásának meghatározását Szigeti Márton (Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, Természettudományi Központ, Korrozíós Kutatócsoport) végezte Myr Y2L típusú rotációs viszkoziméterrel (Myr Viscotech). A berendezésben két, koncentrikusan elhelyezett egység található; a külső, rögzített hengerben helyezkedik el a vizsgálandó minta, ebbe merül a forgatható mérőfej, mely egy torziós rugóval kapcsolódik az eszköz motorjához. A mérőfej forgását a minta a viszkozitásától függően hátráltatja, a kifejtett ellenállás mértékéből tehát meghatározható a viszkozitás értéke. A fermentlevek vizsgálata 20 - 200 rpm fordulatszám-tartományban, 28 °C-on termosztálva történt. Egy méréshez 18 ml minta szükséges, minden esetben három párhuzamos mérés eredményét átlagoltam.

A sűrűség meghatározásához a fermentléből homogenizálást követően mintát vettem, amivel egy 100 ml térfogatú, ismert tömegű mérőlombikot jelre töltöttem, majd analitikai mérleggel megmértem a fermentlé és a mérőlombik együttes tömegét. Végül a fermentlé tömegéből és térfogatából kiszámoltam a sűrűséget.

5. Eredmények

5.1. Membrán gradosztát reaktor

A 4.3. fejezetben bemutatott membrán gradosztát reaktort tizenkét napig üzemeltettem. Mivel az elkészített spóraszuszpenziót előzetesen négy napig rázott lombikban tenyésztettem, a reaktor inokulálását követő harmadik napon már lilák voltak a megtapadó telepek. A termelő aktinorodinnak köszönhetően a telepek elhelyezkedése vizuálisan jól nyomon követhető volt.



5.1. ábra: MGR inokulálási kísérlet [saját képek]

Ahogy az az 5.1. ábrán látható, az alkalmazott inokulálási eljárással nem sikerült egybefüggő biofilmréteget kialakítani a kapillárisok felszínén. A baktérium egyedi, elszórt telepeket hozott létre, melyek eloszlása nem egyenletes, bizonyos régiókban nagyobb csoportosulások figyelhetők meg. Ezek elhelyezkedése feltehetően az inokulálási folyamatra jellemző áramlási viszonyok mintázatát követi: az inokulum keringtetésekor szemmel láthatóan kialakultak nagyobb áramlási sebességű folyadékcsatornák és pangó zónák, melyek a szűrés hatékonyságát, a sejteknek a pórusokba való bejutását, illetve a membrán felületén történő megtapadását befolyásolhatták. Amint azt az irodalmi áttekintésben említettem, Govender és mtsai. [66] is beszámoltak róla, hogy bizonyos reaktor-konfigurációk esetén olyan folyadékáramlási csatornák alakultak ki, melyek egyenlőtlen spóra-eloszlást eredményeztek. Az általam használt rendszer esetében ezt elsősorban a modul belső kialakításának, a szálak elhelyezkedésének tulajdonítom.

A kísérlet előrehaladtával a sejtek nem kolonizálták a membrán felületét, hanem a kiindulási helyükön maradva léptek át az élekciklusuk további fázisaiba. Ideális esetben az inokulálás végén a sejtek egyenletesen eloszanak a membrán felszínén, az ezt követő terjedésük és növekedésük eredményeként pedig egy idő után a teljes felületet beborítják. Ugyanakkor a *Streptomyces* fajok evolúciósan arra rendezkedtek be, hogy egy szűkebb régióban maximalizálják a tápanyagfelvételt és megvédjék magukat a környező mikroorganizmusoktól, ami egyfelől azt eredményezi, hogy ez az egyik legfontosabb szekunder metabolit termelő nemzetség, másrészt azonban kolonizációs képességük – a rendkívül energiaigényes spórázástól eltekintve – erősen korlátozott [107]. Bizonyos környezeti körülmények esetén megfigyelhető egy speciális „felfedező” (*exploratory*) viselkedés, melynek lényege, hogy a vegetatív micéliumhoz hasonló, de nem elágazó hifák a talaj (ill. szilárd tápközeg) felszínén terjedve – akár más baktériumtelepeken és abiotikus felületeken is áthaladva – keresik a számukra kedvezőbb területeket. Ennek a viselkedésnek a mechanizmusa még nem ismert pontosan, de feltehetőleg más fajok jelenléte, illetve ezzel összefüggésben a tápanyagszint csökkenése és egyes illékony szerves vegyületek megjelenése is szerepet játszik benne [107], [108]. Az általam elvégzett kísérletben azonban csak a *S. coelicolor* volt jelen, valamint a tápanyag-utánpótlás is folyamatos volt, tehát a felfedező terjedést kiváltó tényezők nem valósultak meg.

A kísérlet eredménye alapján tett további fontos megállapításom, hogy az antibiotikum termelődése megfelelő tápanyag-ellátás esetén is végbemehet. Az elszórtan elhelyezkedő telepek között ugyanis akadálytalanul átjutott a tápoldat a membránon, így a tervezett limitáció nem alakult ki. A 2.2.4. fejezetben említett quorum sensing ugyan kiválthatja a szekunder metabolitok termelődését, ezt azonban jelen esetben valószínűtlennek tartom, mivel a telepek mérete és vastagsága nem változott szemmel látható mértékben, tehát nem beszélhetünk a populáció denzitásának jelentős növekedéséről. (Ugyanakkor a quorum sensing meglétét vagy hiányát nem tudom igazolni, tehát nem zárható ki a szerepe.) Az antibiotikum termelődése feltételezésem szerint genetikai programnak megfelelően történt, melyben a sejtek öregedése, esetleg valamilyen metabolit(ok) intracelluláris felhalmozódása is közrejátszott.

5.2. Fermentlé szűrhetőségének és kapilláris modulok MGR-ben való alkalmazhatóságának vizsgálata

Mivel az előző fejezetben bemutatott kísérletek során nem sikerült egybefüggő biofilmet kialakítani a membrán felületén, a továbbiakban az inokulálási eljárás vizsgálatára, a folyamatot befolyásoló tényezők meghatározására irányuló méréseket végeztem. Ennek során a már alkalmazott X-Flow modul mellett az Ultradyn modult is teszteltem, melynek kisebb a pórusmérete és lazábban helyezkednek el benne a membránszálak. A kapilláris modulokkal végzett szűrési kísérlet során meghatároztam a szűrési ellenállás tényezők egymáshoz képesti viszonyát kétféle fermentációs idejű fermentlé esetén. Emellett a fermentációs időnek és a pH-nak a fermentlé szűrési sajátságaira gyakorolt hatásáról is pontosabb képet akartam kapni.

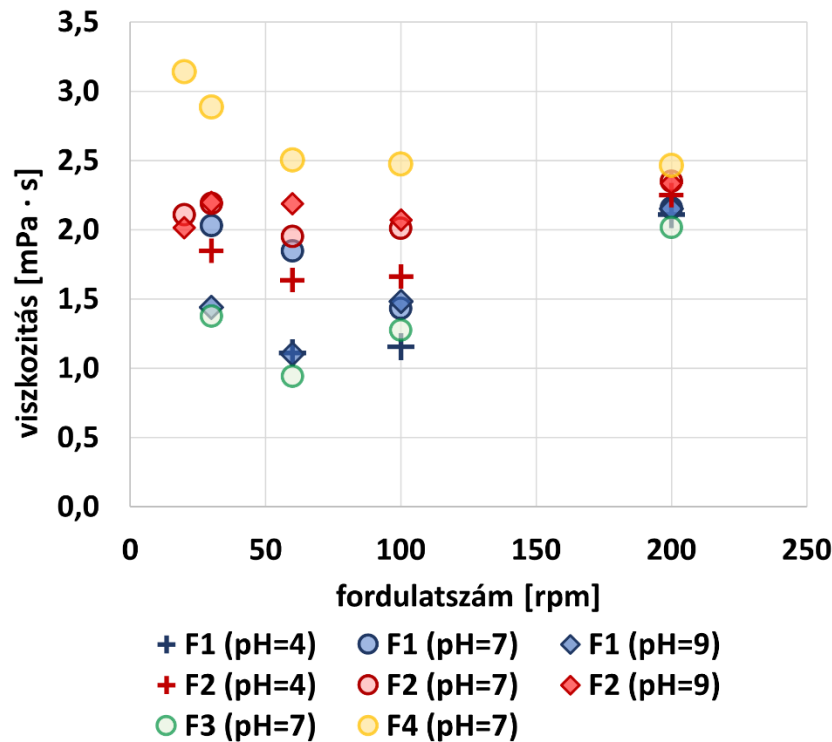
Ez azonban a modulok geometriája, a nehezen leírható áramlási viszonyok miatt a kapilláris modulokban bonyolult lett volna, ezért vákuumszűrő berendezésben végzett szakaszos (dead-end) szűréssel jellemeztem a fermentleveket. A kétféle kísérlet során kapott eredményeket mutatom be ebben a fejezetben.

A szakaszos szűréshez beállított pH-értékek (4, 7 és 9) kiválasztásakor a következő szempontokat vettem figyelembe. Mivel a művelet célja jelen esetben nem a fermentlé feldolgozása, hanem a gradosztát reaktor inokulálása, ezért olyan tartományban kellett dolgoznom, mely nem károsítja a sejteket. Amennyiben a fermentáció során nem szabályozzuk a kémhatást, az első néhány napban közel semleges értéket mérhetünk, majd a másodlagos anyagcse-reutak aktiválódásával egyidejűleg a kémhatás eltolódik a lúgos, döntően 8-10 közötti tartományba. Ez alapján választottam a szűréshez a 7-es és 9-es pH-értékeket, melyek standard körülmények között jellemzőek a fermentlére. (A kapilláris modulokon végzett szűréshez szintén a 7-es pH-t választottam, így a kétféle szűrés eredményei összevethetők.) Harmadik beállítási pontként a savas tartományból választottam a 4-es pH-értéket Kim és mtsai. publikációja alapján [109], amely szerint sikeresen alkalmaztak savas pH-sokkot az aktinordintermelés fokozása érdekében. Tehát az általuk beállított 4-es pH-t a baktérium bizonyítottan tolerálja, sőt – sikeres inokulálás esetén – akár a későbbi termelésre is kedvező hatással lehet.

5.2.1. Fermentlevek általános jellemzése

Ahogy azt a 4.4. fejezetben említettem, mindkét típusú szűrést kétféle fermentlével végeztem el, melyek az általam meghatározott paraméterek közül csak a fermentációs időben tértek el, illetve ennek eredményeként a biomasza mennyiségében és morfológiájában. A rövidebb fermentációs idejű fermentlevek – F1 és F3 – mikroszkópos vizsgálata során rövid filamentumokat, kis méretű, laza pelleteket figyeltem meg, valamint elvéve spórák is jelen voltak. A hosszabb fermentáció ezzel szemben nagyobb, tömöttebb pelleteket eredményezett – amint az irodalom alapján várható volt [40] –, valamint jelentős volt a szabadon úszó micéliumhálózat aránya is. Ezek a különbségek megmutatkoztak a viszkozításban, és a szűrőle-pény fajlagos ellenállásában is.

Az egyes fermentlevek (4.6. táblázat) különböző fordulatszámokon (a 4.8.6. fejezetben leírt módon) mért viszkozitását mutatja be az 5.2. ábra. A hosszabb fermentációs idő általában véve nagyobb viszkozitást eredményezett, ami magyarázható egyrészt a nagyobb biomasza-tömeggel, de leginkább a kis pelleték és a kiterjedt micéliumhálózat eltérő reológiai sajátságaival. Ez összhangban van Kumar és mtsai. [110] *Streptomyces toxytricini* fermentációja során tett megfigyelésével, miszerint a fermentlé a kísérlet előrehaladtával pszeu-doplasztikussá vált és viszkozitása megnőtt. Általában véve igaz a nemzetségre, hogy a micélium fejlődése a viszkozitás növekedésével jár [40].



5.2. ábra: Fermentlevek viszkozitása a fordulatszám függvényében (F1, F3: 48 órás; F2: 96 órás; F4: 168 órás fermentlé) [saját ábra]

A rövid fermentációs idejű fermentlevek viszkozitáspofilja pH-tól függetlenül közel azonosnak mondható, csak a 7-es pH-jú F1 fermentlé 30 és 60 rpm-en mért viszkozitása tért el jelentősen a többtől. (Bár a viszkozitást nézve a 7-es pH-jú F1 és F3 minták szignifikánsan eltérnek, a viszkozitás a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának számításában szerepel, tehát az ebből adódó különbség megjelenik az eredményekben. Továbbá a fermentáció körülményei azonosak voltak, a mikroszkópos megfigyelés alapján a morfológiai sajátosságok is jó közelítéssel megegyeztek, ezért összességében párhuzamosnak tekintetem a mintákat.) Ezzel szemben F2 esetén nagyobb különbségeket tapasztaltam, illetve a trendek sem egyeztek meg, bár aránylag szűk tartományban mozogtak az értékek. F4 esetén pedig mind az egyes értékek, mind a trend eltért a többi fermentlétől. Úgy tűnik tehát, hogy a pH-nak a viszkozításra gyakorolt hatása az öregebb fermentlé esetén erőteljesebb – feltehetően a fonalas morfológia vagy a nagyobb sejttömeg miatt.

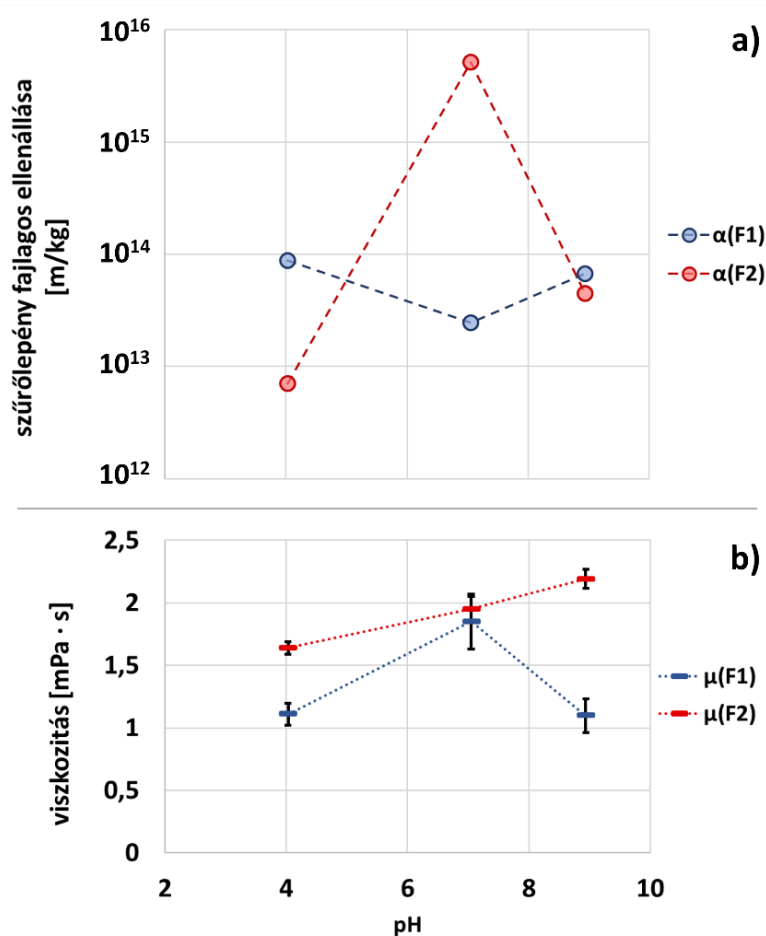
200 rpm-en viszont már kortól és pH-tól függetlenül minden minta viszkozitása 2,0 és 2,5 mPa s között volt. Mivel a fermentlé heterogén, többfázisú rendszer, nagyobb forgási sebességnél a centrifugális erő szeparálja a levet. Így a mérőfejet a gyakorlatban egy „sejtmentes” folyadékfázis veszi körül, aminek a viszkozitása minden esetben hasonló.

Az eredményekből látszik, hogy a fermentlevek nem-newtoni jelleget mutatnak, hiszen a viszkozitásuk a nyíróerővel változik. Mivel a szűrési kísérletek során nem történt keverés, a mért viszkozítások közül a legkisebb sebességhez tartozó jellemzi a legpontosabban a leveket a kísérleti körülmények között. Azonban a minták egy részét 20, ill. 30 rpm-en nem lehetett

vizsgálni – viszkozitásuk a mérhető tartomány alatt volt –, ezért az egységesség kedvéért minden fermentlénél a 60 rpm-en mért értékkel végeztem a későbbi számításokat.

5.2.2. Szűrés szűrőpapíron – eredmények

Az alábbiakban a lapmembránon végzett szakaszos szűrés eredményeit ismertetem, melyet kétféle fermentációs idejű fermentlével – 48 óra (F1) és 96 óra (F2) –, három különböző pH-n (4, 7 és 9) hajtottam végre.



5.3. ábra: A szűrőlepleny fajlagos ellenállásának (a), valamint a fermentlé viszkozitásának (b) pH-függése (a viszkozitásnál az átlagos értékeket és a szórást is feltüntettem) [saját ábra]

Bár az összes viszkozitásadatot feltüntettem az 5.2. ábrán, F1 és F2 fermentlevek 60 rpm-en mért viszkozitását külön kiemelem az 5.3. ábrán, hogy a pH, a viszkozitás és a szűrőlepleny fajlagos ellenállása közti összefüggést be tudjam mutatni. A trendeket illetően elmondható, hogy míg F2 esetében a viszkozitás a pH növelésével enyhén nőtt, F1 viszkozitásának 7-es pH-n maximuma volt. A viszkozitásadatokat STATISTICA szoftverben, Tukey HSD teszttel (*honest significance test*) elemeztem, melynek eredményeként megkaptam, hogy $p < 0,05$ szignifikanciaszint mellett mely fermentlevek viszkozitása tér el egymástól szignifikánsan:

- F1 esetében a 7-es pH-n mért érték eltér a 4-es és 9-es pH-n mértől;
- F2 esetében a 4-es és 9-es pH-n mért értékek különböznek egymástól;
- F1 és F2 egymástól 4-es és 9-es pH-n tér el szignifikánsan.

Ami a szűrőlepeny fajlagos ellenállását illeti, F1 esetében a görbe lefutása a viszkozitásával ellentétes: 4-es és 9-es pH-n mindkét paraméter közel hasonló értékű, viszont 7-es pH-n alfa egy nagyságrenddel kisebb a többinél, a viszkozitásnak pedig maximuma van. Ezzel ellentétben F2-nél az alfa minimuma a viszkozitásnak nem a maximumával, hanem a minimumával esett egybe. F2 esetén az alfa értéke 7-es pH-n volt a legnagyobb, lúg, ill. sav hozzáadásának hatására is jelentősen csökkent. Ez utóbbi jelenség összhangban van Hooper és mtsai. kutatásával [111], akik *Streptomyces rimosus* fermentlével végeztek szűrési kísérleteket. (Az általuk alkalmazott fermentációs körülmények az F2-es fermentációval összevethetők). Amikor a levet 7-ről 4-re lesavazták, a filamentumokból álló aggregátumok irreverzibilisen széthasadtak, így a lé reológiája megváltozott, könnyebben szivattyúzható lett.

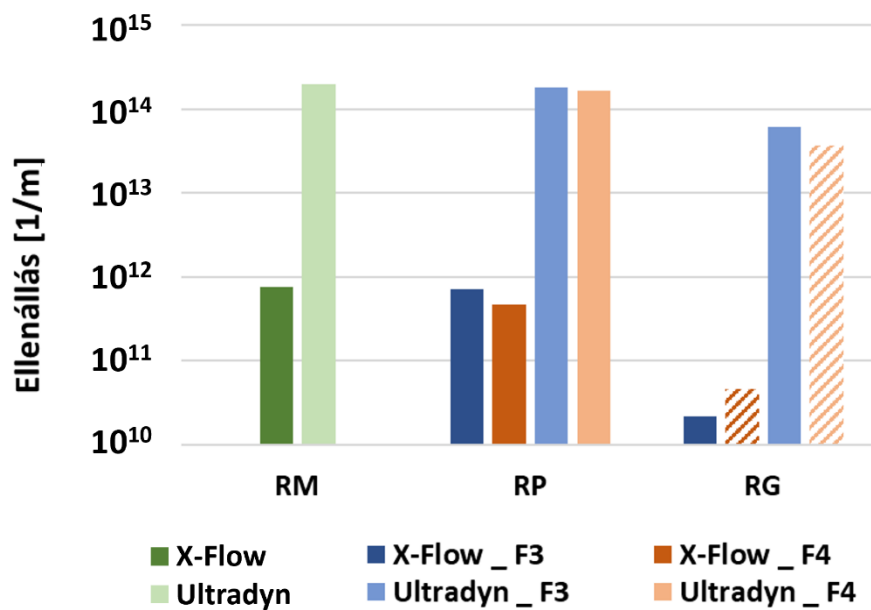
Ha a két fermentlevet összehasonlítjuk, 4-es és 9-es pH-n is az F1 szűrőlepenyének fajlagos ellenállása nagyobb (bár utóbbi esetben azonos nagyságrendbe esnek). 7-es pH-n viszont F2 szűrőlepenyének fajlagos ellenállása két nagyságrenddel nagyobb F1-nek mind az azonos pH-n mért értékével, mind a maximálisan mért értékével. Ez megfelel a gyakorlati tapasztalatnak is, miszerint ezt a levet volt a legnehezebb szűrni, ahogy azt a 4.4.1. fejezetben leírtam. A különböző korú fermentlevelek esetén a szűrőlepeny fajlagos ellenállása tehát ellentétes trendet mutat: 7-es pH-n F1-nek minimuma, F2-nek maximuma van.

Összefoglalva az alábbi megállapításokat tehetjük a szűrőlepeny fajlagos ellenállása, a viszkozitás és a pH kapcsolatáról. A 4.1. egyenlet szerint a szűrőlepeny fajlagos ellenállása fordítottan arányos a viszkozitással, vagyis nagyobb viszkozitás kisebb ellenálláshoz vezet. Ugyanakkor ez a fajta összefüggés nem figyelhető meg egyértelműen a mérési adatokban, hiszen a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának minimuma és a viszkozitás maximuma csak F1-nél esett egybe, F2-nél nem. Emellett a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának lefutása F1 és F2 esetén eltérő volt, ami arra enged következtetni, hogy a fermentlé izoelektromos pontja a fermentlé korával változik. Mindebből arra következtettek, hogy mind a pH, mind az öregedés komplex hatással van a szűrési sajátságokra. Nem csak a viszkozitást befolyásolják, de a morfológiát, a sejtek, ill. a sejt és a membrán felülete közti interakciókat, ezek eredményeként pedig a szűrőlepeny kialakulását, struktúráját és kompresszibilitását [112].

5.2.3. Szűrés kapilláris modulokon – eredmények

Az 5.4. ábrán látható a teljes szűrési ellenállás három tagja mindkét modul, illetve fermentlé esetén. Mivel a membránellenállás mérése HPLC-tisztaságú vízzel történt, ennek értéke a fermentlétől független, a membránra jellemző adat. Ahogy azt a vágási érték (lásd 4.2. táblázat) alapján vártam, az Ultradyn modul esetében két nagyságrenddel nagyobb membránellenállást kaptam az X-Flow modulhoz képest.

A póruseltömődésből származó ellenállás mindkét modul esetén közel megegyezett a membrán saját ellenállásával. F3 esetén picit nagyobb értékeket kaptam, mint F4-nél, de ez a különbség nem volt olyan jelentős, mint vártam volna. Az előzetes feltételezésem az volt, hogy a rövid filamentumok jobban beülnek a pórusokba, mint a nagy pelletek, ezáltal nagyobb R_P -t okozva, de az eredmények azt mutatják, hogy a szűrőlepeny képződésében más mechanizmusok domináltak. Emellett azt is elképzelhetőnek tartom, hogy másik modul esetében, ahol a pórusméret közelebb áll a fermentlére jellemző átlagos sejtmérethez, vagy más a pórusok geometriája, igaz lehet a feltételezésem.



5.4. ábra: Szűrési ellenállások [saját ábra]

A kialakuló gélréteg ellenállása a fiatalabb fermentlé esetén a póruseltömődésből származó ellenálláshoz képest kisebb volt. Ultradyn modul esetén ez háromszoros, X-Flow esetén harmincszoros különbséget jelent, tehát az Ultradyn membránon nagyobb ellenállású gélréteg alakult ki, bár a többi ellenállástaghoz képest ez sem mondható jelentősnek.

F4 esetében, ha a teljes fermentlére jellemző viszkozitással ($2,5 \text{ mPa s}$) végeztem a számításokat, a gélréteg ellenállása mindkét modul esetén negatívnak adódott (X-Flow esetén $-4,90 \cdot 10^{11}$, Ultradyn esetén $-1,70 \cdot 10^{14}$). Az eredmény háttérében a következő jelenség állhat. A fermentlé szűrése során a biomassza főtömege szemmel láthatóan nem tapadt a membrán felületéhez, hanem a kapilláris szálaktól távolabb lebegett a folyadékfázisban (5.5. ábra). Tehát ténylegesen egy nagyon alacsony biomassza-tartalmú fermentlevet szűrtem, aminek a viszkozitása valahol a teljes fermentlé és a szűrlet viszkozitása közé esik, de pontos értékét nem lehet meghatározni, hiszen a mintavétel ebből a rétegből nem kivitelezhető. Mivel a kiindulási fermentlé és a szűrlet viszkozitásának átlagával számolva is negatív lenne az eredmény, végül a szűrlet viszkozitásával számoltam, és az így kapott értékeket tüntettem fel az 5.4.

ábrán. Ez azonban egy becsült érték, a valós R_G ennél kisebb; sőt, a fent részletezett gyakorlati tapasztalat alapján nullának is tekinthető.



5.5. ábra: F4 szűrése X-Flow modulon [saját kép]

Összességében mind a számítások, mind a megfigyelések azt igazolják, hogy egyik esetben sem alakult ki a szűrési ellenállás szempontjából számottevő gélréteg. Továbbá, a pórusok eltömődése sem okozott a membrán ellenállásához képest nagyságrendi növekedést a teljes ellenállásban.

5.2.4. Szűrési kísérletek eredményeiből levont konklúziók

A szűrési kísérletek során tett megfigyelésekből és számszerűsíthető eredményekből további konklúziók vonhatók le a fermentlé egyes tulajdonságainak kapcsolatáról, valamint a membránmodulok inokulálására gyakorolt hatásáról. Az alábbiakban ezeket a megállapításokat ismertetem.

A szakaszos szűrés eredményei alapján elmondható, hogy a tápközeg pH-ja hatással van a sejtek morfológiájára, ezen keresztül pedig a fermentlé viszkozitására és a szűrőlepeny fajlagos ellenállására is. A hatás jellege és mértéke pedig függ a fermentlé korától. Éppen ezért a szűréssel történő inokulálás kidolgozásánál a pH változtatása egy egyszerű és hatékony szabályozási mód lehet, a kedvező pH-értéket azonban az adott korú fermentlére kell meghatározni.

Bár a viszkozitás és a szűrőlepeny fajlagos ellenállása között fennáll a szűrési egyenlet által leírt fordított arányosság, ez az összefüggés csak a fermentlé egy adott állapotának leírásá-

ra alkalmas, de ez alapján a viszkozitás változásából önmagában nem lehet megjósolni a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának változását. Az elvégzett kísérletek során a pH-ban, a sejttömegben, illetve a morfológiában fellépő változások ugyanis nem csak a viszkozitás változtatásán keresztül hatottak a szűrőlepeny fajlagos ellenállására, hanem egyéb mechanizmusok révén is. Ilyen folyamat lehet például a pH-nak a sejtek aggregációjára, illetve a sejtek és a membrán közti interakciókra gyakorolt hatása, melyek a szűrési sajátságokat befolyásolják. Ezt támasztja alá Graves és mtsai. [113] *Bacillus subtilis* mikroszűrése során tett megfigyelése, miszerint pH-növelés hatására megváltozott a sejtek aggregációja, ezáltal pedig a szűrőlepeny fajlagos ellenállása. Egy másik fontos tényező lehet az EPS mennyisége, ami a fermentáció előrehaladtával növekszik, a nagyobb EPS-koncentráció pedig általában véve intenzívebb membrán-eltömődést (fouling) [114] és megnövekedett viszkozitást [115] eredményez. Emellett a morfológia, a sejtek hidrofobicitása és a sejtek felületi töltése is befolyásolhatja a szűrőlepeny tulajdonságait [112].

Az általam vizsgált fermentlevek közül a hosszabb fermentációs idejű, 7-es pH-jú fermentlé volt a legnehezebben szűrhető mind a gyakorlati tapasztalat, mind a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának értéke alapján. Ugyanakkor a membránmodulok inokulálása során ugyanilyen paraméterek mellett nem fejlődött gélréteg és a pórusok sem tömödtek el jelentős mértékben. Tehát nem azért volt lassú a szűrés, mert a sejttömeg nagyon szorosan tapadt a membrán felületéhez és eltömte a pórusait, ezáltal akadályozva a szűrést – ami a kívánt állapot lenne az inokulálás végén –, hanem egy nehezen ülepedő réteg alakult ki a membrán felületétől távolabb. Vagyis a fermentlé szűrhetősége nem egyértelmű indikátora az inokulálás sikerességének.

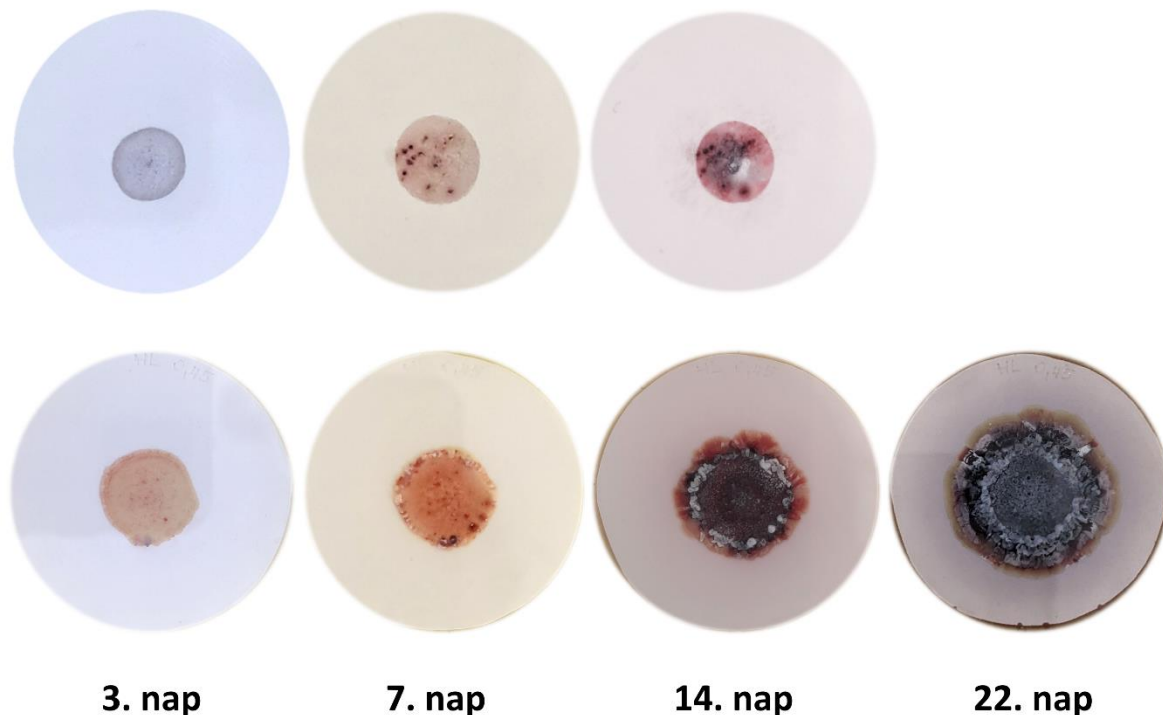
Végző soron azt a konklúziót vontam le az elvégzett kísérletekből, hogy a rendelkezésemre álló membránmodulok a vizsgált körülmények között nem alkalmasak *Streptomyces coelicolor* baktériummal történő inokulálásra. A szakaszos szűrésnél tett megállapítások alapján elképzelhető, hogy a pH változtatásával javítható az eredmény, hiszen a sejtek felületi tulajdonságai (töltés, hidrofobicitás) a sejtek aggregációját és a membránhoz való kötődését is meghatározzák [112]. Ugyanakkor a bemutatott szűrési kísérleteken túl egyéb tényezőket is figyelembe véve úgy gondolom, ezek a modulok jelen formájukban nem alkalmasak membrán gradosztát reaktor kialakítására, ezért nem végeztem további kísérleteket velük. Ezt a megállapítást egyrészt a modulok belső elrendezésére, másrészt a gyártási eljárásukra alapozom. Az X-flow modul esetében ugyanis a kapilláris szálak szorosan egymáshoz tapadva helyezkednek el, nincs köztük elég távolság ahhoz, hogy az egyes szálakon elkülönülten fejlődjenek a telepek. Ha viszont csak a membránszálak kötegének felületén alakul ki biofilm, a felületi kihasználtság rendkívül alacsony lesz. Az Ultradyn modul kialakítása ebből a szempontból kedvezőbb, ugyanakkor a kisebb vágási értékből következően a sejtek nehezebben hatolnak be a membrán pórusaiba. (A kapillárisok közti optimális távolságról tudomásom szerint nem jelent meg tanulmány, bár feltételezésem szerint ezt elsősorban a várható biofilmvastagság határozza meg, ami az alkalmazott mikroorganizmustól is függ.)

A vízkezelési és egyéb ipari szűrési művelet többségénél a mikroorganizmusok megtelepedése a membrán felszínén káros folyamat, hiszen a fluxus csökkenéséhez, a szeparáció hatékonyságának romlásához, egyes esetekben akár a membrán anyagának károsodásához is vezethet. Ezért a kereskedelmi forgalomban kapható membránokat úgy tervezik, hogy az eltömődését minél inkább megelőzzék: a felület érdességének csökkentésével, hidrofobicitásának és felületi töltésének módosításával, a megtapadást gátló (*antifouling*) réteg kialakításával egyaránt hátráltatják a sejtadhéziót [116]. A membrán gradosztát reaktorban viszont a célunkkal ellentétes, hiszen a sejtek megtapadása elengedhetetlen a stabil biofilm kialakulásához. Mivel biofilmes reaktorhoz fejlesztett membrán beszerzésére, illetve saját modul gyártására nem volt lehetőségem, a továbbiakban lapmembránnal, egyedi kapilláris szálal membránnal, illetve többcsatornás kapilláris membránnal végeztem kísérleteket.

5.3. Biofilm terjedése lapmembránokon – eredmények és értékelésük

A Membrán gradosztát reaktor című fejezetben bemutatott kísérletben azt tapasztaltam, hogy a membrán felületén elszórtan megtapadt sejtek nem kolonizálták a membrán felületét, így nem csak az inokulálást követően, hanem az üzemeltetés későbbi szakaszában sem alakult ki egybefüggő biofilm. A telepek terjedésének további vizsgálatát szilárd táptalajra helyezett lapmembránokon végeztem, kontroll rendszerként membrán nélküli táptalajt alkalmaztam. Összesen négyféle membránnal – hidrofil és hidrofób, 0,22 és 0,45 μm pórusméretű – dolgoztam, minden esetben három párhuzamos rendszert indítottam, a további számítások során pedig ezek átlagát vettem figyelembe. Bár a kísérleti körülmények több szempontból is különböznek a membrán gradosztát reaktornál leírtaktól – folyékony helyett szilárd tápközeget alkalmaztam, illetve kapilláris helyett lapmembránt –, ebben a rendszerben egyszerűen és egzakt módon tudtam nyomon követni a telepek terjedését.

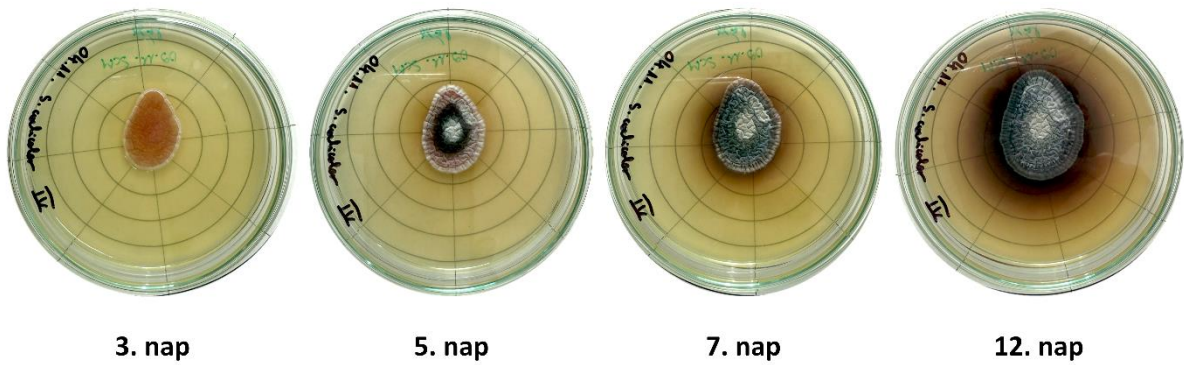
A hidrofób membránokon pórusmérettől függetlenül a spóraszuszpenzió cseppje kezdetben megült a membránon, és csak lassan – akár több, mint egy nap után – „simult bele” a membrán síkjába. A területe azonban ekkor sem változott, így valódi szétterülés helyett inkább azt tartom valószínűnek, hogy a víz többsége elpárolgott belőle. A folyadékcsepp területe az első hét során egyik mintánál sem nőtt, viszont a baktériumtelepek sötét pontként jelentek meg, majd az idő előrehaladtával egyre látványosabban elkülönültek a szintén pirosodó háttértől. Bár a pontszerű telepek szemmel láthatóan növekedtek, a spóraszuszpenzió kezdeti cseppjének területe két hét után sem változott, ezért a hidrofób membránoknál kapott adatokkal további számításokat nem végeztem (illetve két hét után már fénykép sem készült a telepekről, ezért az 5.6. ábra felső sorában csak három kép látható).



5.6. ábra: Biofilm fejlődése 0,45 μm pórusméretű hidrofób (*felső sor*) és hidrofil (*alsó sor*) lapmembránokon [saját ábra]

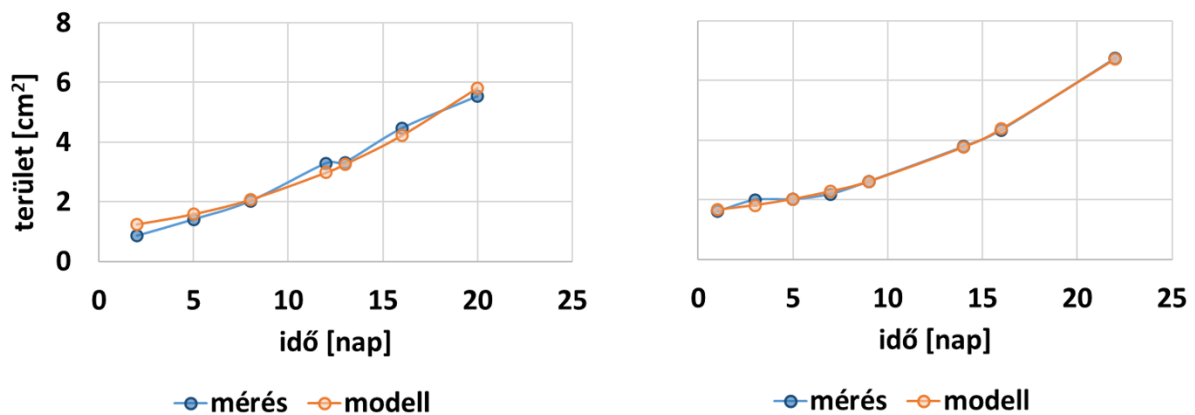
A hidrofil membránoknál ezzel szemben a spóraszuszpenzió cseppje szétterült a membránon. A tenyészet már a harmadik napon pirosodni kezdett, majd egyre gyorsuló ütemben növekedett és sötétedett, a második hét végén pedig a spóráképződés is szemmel láthatóvá vált (szürkésfehér területek). A 22. napon készült képen jól megfigyelhetők a különböző fejlődési szakaszban lévő sejtekből álló, koncentrikus zónák: a legkülső körben a biofilm sugárirányban terjedő, világos (tehát kevés aktinorodint termelő) sejtekből áll, míg befelé haladva egyre erőteljesebben felgyűrődő és spórázó régiók találhatók. Középen található egy, a kiindulási folyadékcseppel közel megegyező méretű, kör alakú terület, melyben szintén jól látható az aktinorodintermelés és a spóráképződés, de nem gyűrődik fel a biofilm. A kétféle pórusméretű membrán esetén a biofilm-fejlődés megfigyelt menete hasonló volt, melyet az 5.6. ábrán a 0,45 μm pórusméretű membránnal szemléltettek.

Membrán nélkül a szilárd táptalajon fejlődő kolónia színváltozása a hidrofil membránoknál tapasztaltnál hasonló volt, de már az 5. napon megjelentek a spórák, illetve kevésbé volt intenzív a felgyűrődés (5.7. ábra). A második hét során az agar is egyre sötétebb lett, ahogy az aktinorodin-termelés fokozódott, a harmadik hét végére már a teljes táptalaj sötétlila volt. A telep kezdeti alakját az határozta meg, hogy a csepp milyen alakban folyt szét az agar felületén, később azonban sugárirányban egyforma mértékben növekedett. A telep terjeszkedése a membránokon zajló növekedéshez képest szemmel láthatóan gyorsabb volt.



5.7. ábra: Biofilm fejlődése szilárd táptalajon (membrán nélkül) [saját ábra]

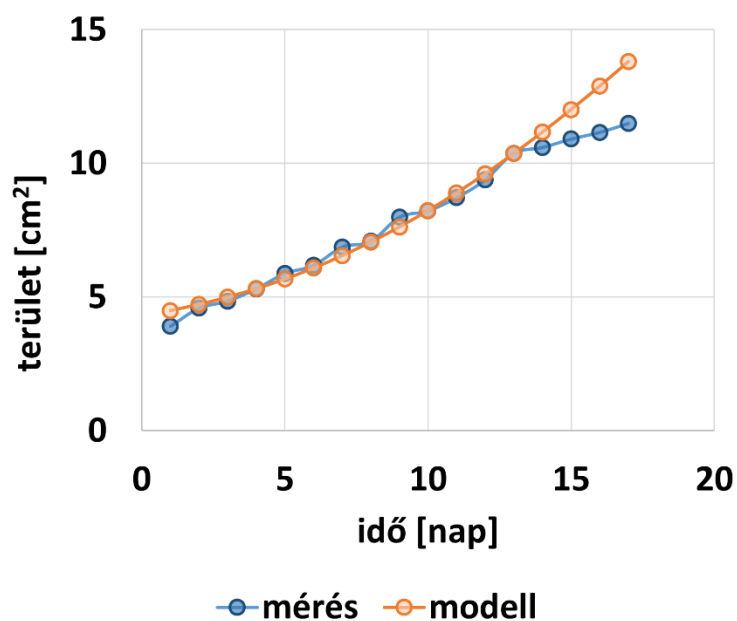
A pontos összehasonlítás érdekében a mért területek időbeli változását diagramon ábrázoltam, majd a növekedést Gompertz-kinetikával jellemeztem. A Gompertz-modellt elterjedten alkalmazzák a biotechnológiában mikrobiális növekedés és termékképződés kinetikájának leírására [95]. A modell szerint a kezdeti lassú terjedést (lag-fázis) egy intenzív növekedési periódus követi, majd a terjedés lelassul, ahogy a kolóniák eléri a rendelkezésre álló maximális területet. Az itt bemutatott kísérletben a modell a biofilm felületi növekedésének első két fázisát (lag-fázis és intenzív növekedés) írja le.



5.8. ábra: Telepnövekedés 0,22 μm (*bal*) és 0,45 μm (*jobb*) pórusméretű, hidrofíllapmembránon [saját ábra]

A biofilm által lefedett területek – a mért és a modellezéssel kapott értékek – időbeli változása hidrofíllapmembránok esetén az 5.8. ábrán, míg a kontroll rendszerénél az 5.9. ábrán látható. A Gompertz-kinetika modellje a membránok esetében végig jól illeszkedett a mért adatokra, valamint a területek nagysága és a görbék lefutása jó közelítéssel azonosnak mondható a kétféle pórusméretű membránt tekintve.

A kontroll rendszerrel ezzel szemben csak a 13. napig megfelelő a modell illeszkedése a mért adatsorra, ezt követően a növekedés egyre jobban elmarad a modell alapján várhatótól. (Bár az adatsorokat a 17. napig ábrázoltam, a biofilm fejlődését több, mint három hétig követtem nyomon, és ezen időszak alatt egy folyamatos, de a korábbinál lassabb növekedést mértem.) Ennek feltételezett oka egyrészt a párolgás miatti kiszáradás, másrészt a táptalaj összetétele is változott eddigre (a telep körül szemmel láthatóan felhalmozódott az aktinorodin, valamint a hozzáférhető tápanyagok mennyisége csökkent). Emellett a sejtek nem csak a tápközeg felületén terjedtek, hanem a belsejébe is szemmel láthatóan behatoltak, így elképzelhetőnek tartom, hogy egy idő után a felületi terjedés mellett hangsúlyosabbá vált az agar alsóbb régiói felé irányuló növekedés (ugyanakkor mérési eredmény csak a felületi növekedésről áll rendelkezésemre, így a két folyamat időbeliségét nem tudom összehasonlítani). Mivel a célom membránok felületén és a kontroll rendszerben megvalósuló növekedés összehasonlítása volt, a Gompertz-kinetika paramétereinek számításakor csak a modellel jól jellemezhető szakaszt – az első 13 napot – vettem figyelembe.



5.9. ábra: Telepnövekedés membrán nélkül [saját ábra]

A kinetikai egyenletben (4.3. egyenlet) szereplő A_0 értékét az határozta meg, hogy az inokulálásnál a spóraszuszpenzió a cseppentés után mennyire terült el a felületen: a hidrofil membránok esetében ez $0,7 - 1,3 \text{ cm}^2$ közötti érték volt, míg membrán nélkül átlagosan $3,6 \text{ cm}^2$. A_{\max} -nak minden esetben a Petri-csésze területét, azaz 50 cm^2 -t választottam, hiszen egyéb fizikai gátja nem volt a terjedésnek (a membrán nélküli esetben a limitáló környezetben zajló növekedést pedig nem vettem figyelembe). A λ paraméter a lag-fázis időtartamát adja meg, vagyis azt a kezdeti periódust, amíg a mikroorganizmus alkalmazkodik a környezethez, és a területnövekedés nem indul meg jelentősen. A k a maximális területi növekedés relatív

sebessége, vagyis azt mutatja meg, milyen gyorsan növekszik a lefedett terület, miután a sejtek kiléptek a lag-fázisból. A kétféle pórusméretű, hidrofil membrán, valamint a kontroll rendszer esetében kapott kinetikai paramétereket az 5.1. táblázatban foglaltam össze.

5.1. táblázat: Gompertz-kinetika paraméterei

	k [cm ² /nap]	λ [nap]	$k \cdot \lambda$
hidrofil 0,22 μ m	0,038	15,2	0,58
hidrofil 0,45 μ m	0,038	16,4	0,63
membrán nélkül	0,060	7,2	0,43

Ahogy a diagramok alapján is vártam, a membrán pórusmérete nem befolyásolta számottevően a terjedés kinetikáját, hiszen a növekedés sebessége megegyezett, a lag-fázisban pedig egy nap különbség volt a kétféle pórusméretű membrán között. A kinetikai paraméterek megerősítették azt a megfigyelést is, miszerint membrán nélkül gyorsabb a kolonizáció folyamata: míg a lag-fázis a membránoknál mérthez képest a felére csökkent, k értéke másfélszeresére nőtt, tehát rövidebb alkalmazkodási időszakot követő, gyorsabb növekedés jellemzi a rendszert.

Ugyanakkor a kinetika egyenletében (4.3. egyenlet) szereplő $k \cdot \lambda$ szorzat mindhárom esetben egy nagyságrendbe esik, ami arra utal, hogy a növekedési kinetika jellege nem változott meg. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a sejtek elsődlegesen nem a membrán belsejében, hanem annak felületén növekedtek. Mivel a pórusok mérete a hifák átmérőjével (átlagosan 0,7 μ m) egy nagyságrendbe esik, illetve kisebb annál, a külső környezethez képest a membrán pórusaiban eltérőek a körülmények – térbeli gátlás lép fel, más a tápanyagok, víz, oxigén elérhetősége –, amihez a baktériumnak metabolikusan is alkalmazkodnia kellene, és feltehetőleg másfajta növekedési kinetika jellemezné. (Bár a pórusméret alapján eleve kizárhatónak tűnik a sejtek behatolása a membránba, Wolf és mtsai. kutatásukban [117] azt tapasztalták, hogy a *Streptomyces coelicolor* és a nemzetség több faja képes áthatolni a 0,2 μ m pórusméretű membránon a hifa összehúzódása révén. Erre a jelenségre az 5.4.3. fejezetben még kitérek.) Ezt a feltételezést az is alátámasztja, hogy a kétféle pórusméretű membrán között nem tapasztaltam különbséget. A membrán tehát a növekedés karakterisztikáját nem módosítja, csak lassítja a folyamatot. A lassabb növekedés pontos okát az elvégzett kísérlet alapján nem lehet megállapítani, de feltételezésem szerint a membrán által fizikailag hátráltatott tápanyagfelvétel, valamint az agar és a membrán eltérő felületi tulajdonsága is szerepet játszhat benne. Fontosnak tartom kiemelni, hogy az itt bemutatott modell egyfajta korlátozott Gompertz-kinetikai leírás, hiszen csak a felületi növekedést jellemzi, a kontroll rendszer esetében azonban a tápközeg belseje felé is terjedt a mikroorganizmus, ahogy arra korábban utaltam.

5.4. Egyedi kapilláris membránszalakon végzett kísérletek eredménye

A lapmembránokkal végzett kísérletek alapján megállapítottam, hogy a baktérium a membrán felületén a szilárd táptalajon való növekedéshez hasonló kinetikájú, bár lassabb növekedést mutat. A pórusméret a vizsgált tartományban nem befolyásolta az eredményeket, viszont az erősen hidrofób membránon nem történt növekedés, csak a hidrofilen. (Az MGR-ként használt X-flow modul hidrofilitásáról nem áll rendelkezésemre gyártói adat, viszont mivel elsősorban vizes oldatok szűrésére használják, feltételezem, hogy inkább hidrofil jellegű. Viszont a pórusmérete ultraszűrő tartományban van, illetve a lapmembrántól anyagában és feltehetőleg egyéb felületi tulajdonságaiban is eltér.) A következő kísérletekben a lapmembránoknál bevált 0,2 µm-es pórusméretű, de kapilláris kialakítású membránon vizsgáltam a biofilm-képződést. Mivel a felületi tulajdonságokat meghatározónak tartom az eddigi tapasztalatok alapján, a membrán és a sejtek közti adhéziót elősegítő anyagokat teszteltem ebben a rendszerben, majd a legjobbnak bizonyult anyaggal hosszú távú, „folyamatos üzemmódú” működést is megvalósítottam.

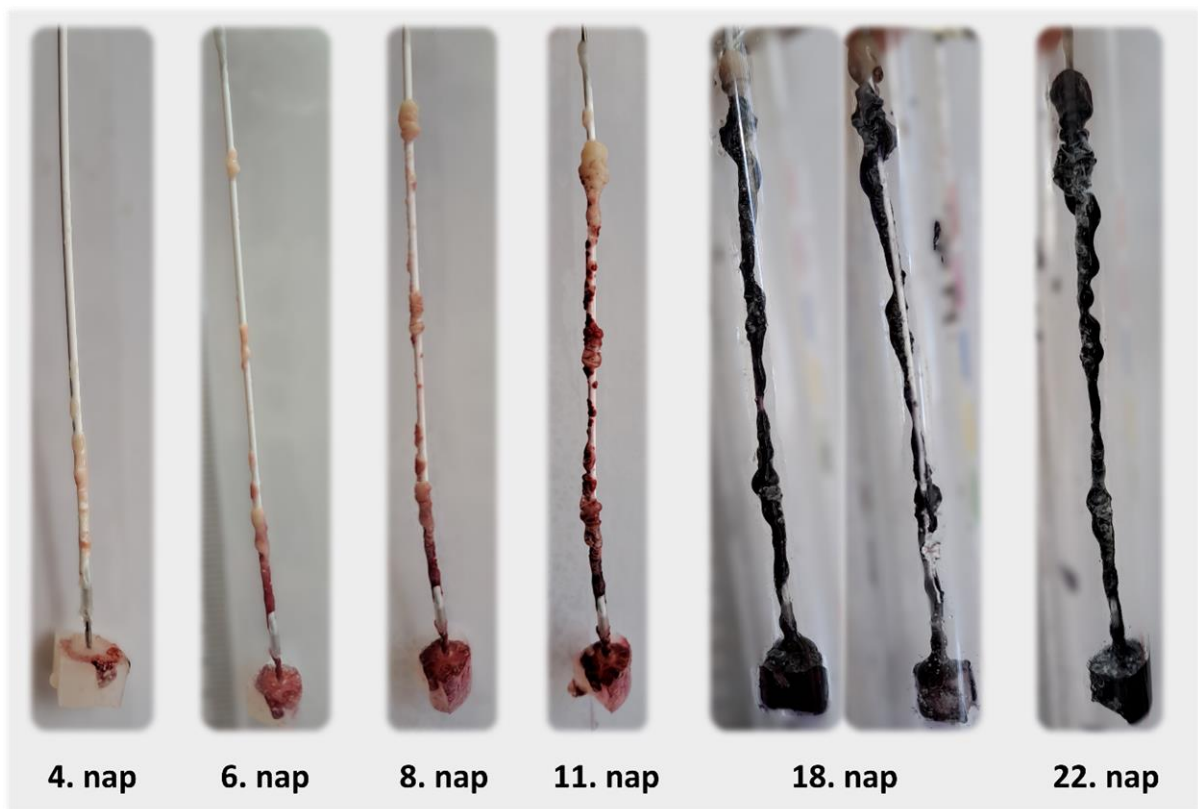
5.4.1. Inokulálási segédanyagok biofilm-képződésre gyakorolt hatásának vizsgálata

Az inokulálási segédanyagok – agar, CMC, Tween 80 – tesztelésére irányuló kísérlet során három hétig követtem nyomon az egyes biofilmek fejlődését. A 4.8. táblázatban feltüntetett beállítási pontok mindegyikénél három párhuzamos kapillárist terveztem vizsgálni, hogy a vizsgált változók hatását megbízhatóbban el tudjam különíteni a biológiai rendszerek változékonyságából eredő eltérésektől. A kísérlet során azonban számos olyan probléma lépett fel, amely értékelhetetlenné tette az adott rendszert. Ezek részben konstrukciós hiányosságok voltak – pl. a membrán és az injekciós tű illesztése elengedett, a kapilláris hozzáért a kémcső falához és a sejtek az üvegfelülethez tapadtak, stb. –, valamint a membránszál eltömődése is többször előfordult, ez utóbbi jelenséget az 5.16. ábra kapcsán részletesebben is tárgyalom. Továbbá az is előfordult, hogy ismeretlen okból egyáltalán nem vagy csak elvétve jelentek meg telepek a kapillárisokon. A felmerült nehézségek miatt a teljes kísérletsorozatot megismételtem azonos körülmények között, és az ily módon megduplázott mintaszámból választottam ki az analizálható rendszereket. Az összehasonlítható párhuzamosok száma így is több esetben háromnál kevesebb volt, ezért a kapott eredményeket kellő körültekintéssel kell kezelni.

A biofilm fejlődésének üteme az alkalmazott segédanyagtól függetlenül minden esetben közel azonos módon zajlott, ezért a folyamatot a C8-as beállítás egyik párhuzamosával szemléltetem (5.10. ábra). (Egy-két nap eltérés előfordult a fejlődés sebességében, de ez nem mutatott összefüggést az inokulálási segédanyagokkal, a biológiai rendszerek változékonysága és egyéb, egyelőre nem azonosított tényezők állhattak a háttérben.)

A kísérlet indításától számított első két napon nem történt szemmel látható változás, hasonlóan a lapmembránokkal végzett kísérletekhez. A harmadik napon már általában megfi-

gyelhető volt egy halvány, krémszínű réteg, mely az ezt követő három-öt nap során először halvány rózsaszín, majd egyre sötétedő barnás-vörös árnyalatúvá vált. A tenyésztés korai szakaszában tapasztalt vöröses pigmentáltság prodigiozinok jelenlétére utal, amint azt a 2.2.4 fejezetben ismertettem. A második hét végén már az aktinorodinra jellemző, sötétlila szín dominált, majd a 16-18. nap között megjelentek a halványszürke spórák. A biofilm felülete a második hét folyamán sok esetben barázdálttá vált, ennek időpontja azonban változó volt, nem is következett be minden mintánál. A vastagabb biofilmeknél jelentősebbnek tűnt a barázdáltság, ami a membrán felületegységére jutó nagyobb sejttömeggel vagy a vastagság miatt erőteljesebb tápanyag-limitációval is összefüggésben lehet. Emellett a víztartalom is szerepet játszhat a folyamatban, mivel a szárazabb felületű (kevésbé nyálkás) telepek barázdáltabbak voltak. (Ugyanakkor könnyen lehet, hogy pusztán a vastagabb és szárazabb felületű biofilmen feltűnőbb a jelenség.)



5.10. ábra: Biofilm kialakulása és növekedése (C8-as beállítás egyik mintáján bemutatva)
[saját ábra]

Szinte kivétel nélkül megfigyelhető volt a membrán felső szakaszán, a betápláláshoz közel egy vastagabb csomó, mely két hét után is még a kezdeti intenzív növekedésre jellemző, halványsárga színű volt, miközben a biofilm többi része szekunder anyagcserét folytatott, illetve spórázott. (Erre a jelenségre még az 5.4.4. alfejezetben kitérek.)

Az első telepek elszórtan vagy javarészt összefüggő filmet alkotva is megjelenhettek. Az idő előrehaladtával a membrán borítottsága jellemzően javult, de ahogy a fenti ábrán is látható, a sejtek elsődlegesen a kitapadási helyükön növekedtek, sok esetben a kísérlet végére sem kolonizálták a teljes felületet. Az is gyakran előfordult, hogy membrán teljes hosszában elterjedt a biofilm, de csak az egyik oldalon. Általában véve elmondható, hogy a telepek kezdeti eloszlása a végső borítottságot jelentősen meghatározta.

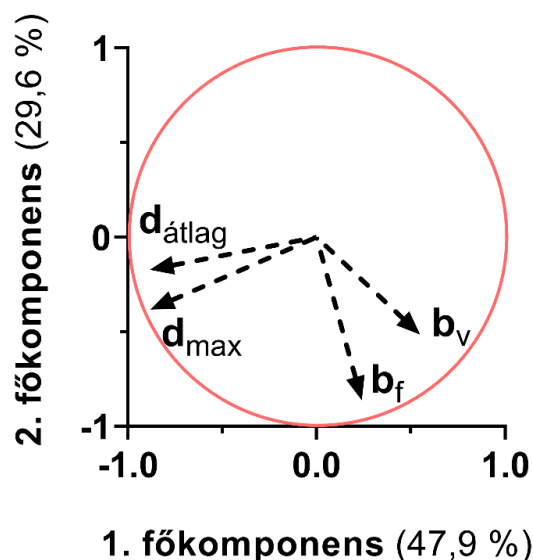
5.2. táblázat: Inokulálási segédanyagok hatása a biofilm vastagságára és homogenitására (minták jelölése: K = kontroll, T = tween, A1, A3, A5 = 1, 3, 5 g/l koncentrációjú agaroldat, C2, C5, C8 = 2, 5, 8 g/l koncentrációjú CMC-oldat; az azonos beállítási ponthoz tartozó párhuzamosokat *a*, *b*, *c* betűk jelölik)

minta	borítottság [%]		vastagság [mm]	
	függőleges b_f	vízszintes b_v	átlagos d_{átlag}	maximális d_{max}
K_a	100	70	0,3	1,5
K_b	100	55	1,9	4,6
K_c	100	60	0,5	3,3
T_a	90	70	2,0	4,2
T_b	100	85	0,7	3,5
A1_a	80	60	0,2	1,1
A1_b	65	40	0,7	2,5
A3_a	100	80	1,2	4,3
A3_b	100	60	1,8	4,4
A3_c	100	60	1,1	4,7
A5_a	95	100	0,1	0,2
A5_b	100	60	1,1	2,8
C2_a	50	75	1,4	3,0
C2_b	100	80	1,8	4,5
C5_a	80	40	1,0	3,4
C5_b	80	70	1,4	3,9
C8_a	40	50	2,4	4,3
C8_b	100	60	2,5	4,6
C8_c	100	50	0,8	4,6

A színanyag termelődésében tehát nem tapasztaltam számottevő eltérést az egyes beállítási pontok között, a kialakuló biofilm vastagságában és a membrán borítottságában ezzel szemben megmutatkozott az inokulálási segédanyagok hatása. Ugyanakkor az adatok változottsága miatt nem egyértelmű, hogy melyik beállítási pont az optimális, ezért az 5.2. táblázatban feltüntetett adatokkal elvégeztem a főkomponens-analízist a 4.5. fejezetben leírt módon.

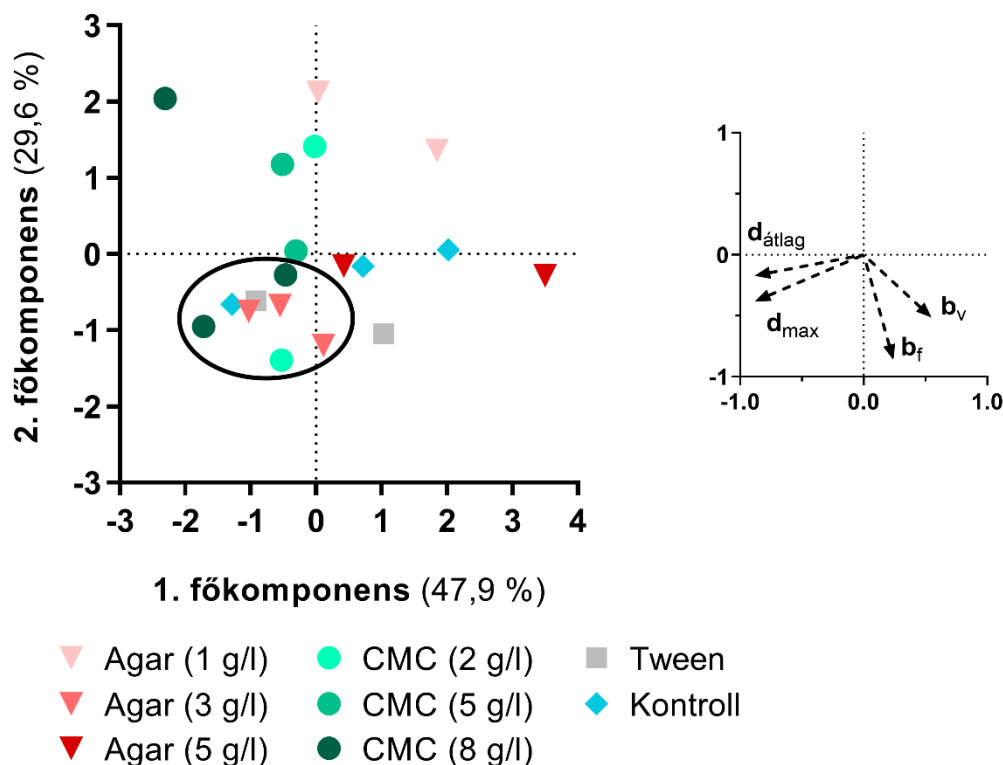
A négy vizsgált paraméter információtartalmát két főkomponenssel írtam le, melyek közül az első főkomponens variáciája 47,9 %, a másodiké pedig 29,6 %. Tehát a két főkomponens együttesen a teljes variancia 77,5 százalékát írja le, amely – figyelembe véve az adatsor sajátosságait – megfelelő kompromisszumnak tekinthető.

A változók vektorainak a faktorsíkra eső vetülete látható az 5.11. ábrán. A vektorok hossza arra nézve ad információt, hogy a hozzájuk tartozó változót milyen pontosan írja le az analízis. Ennek érzékeltetését segíti a piros vonallal jelölt, egységsugarú korrelációs kör: minél jobban megközelíti egy vektor a körvonalat, annál nagyobb mértékben írja le a variációját a két választott főkomponens. A fenti ábra alapján a maximális vastagságot szinte teljesen, a átlagos vastagságot és a függőleges borítottságot jó közelítéssel jellemzi az analízis, míg a vízszintes borítottság variációját már gyengébben magyarázza. A vektorok iránya azt mutatja meg, hogy milyen erős a korrelációs együttható a főkomponensek és az egyes változók között. Az átlagos és a maximális vastagság vektora a vízszintes tengellyel közel párhuzamos, így az első főkomponens elsődlegesen ezekről ad információt, míg a második főkomponens inkább a borítottság – különösen annak függőleges tagjának – variációját foglalja magában.



5.11. ábra: Változók leképezése a faktorok síkjában ($d_{\text{átlag}}$ és d_{max} = átlagos és maximális biofilmvastagság, b_v és b_f = vízszintes és függőleges borítottság) [saját ábra]

Az egyes vektorok által bezárt szögből következtetni lehet a változók közti korrelációra. Azonos irányba mutató vektorok esetén pozitív, ellentétes irány esetén negatív korreláció áll fenn, míg az egymásra merőleges vektorok között nincs a statisztika által leírható kapcsolat. Az általam vizsgált változókról megállapítható, hogy az átlagos és a maximális vastagság között pozitív korreláció áll fenn, tehát a nagyobb átlagos vastagság általában nagyobb maximális vastagsággal párosul. A borítottság két komponensénél kevésbé erőteljes ez a kapcsolat, ahogy azt a vizuális megfigyeléseim alapján vártam is, hiszen gyakori volt az inhomogén biofilm-képződés, a membrán egyik oldalán történő növekedés, ami jó függőleges és gyengébb vízszintes borítottsággal jellemezhető. Az 5.11. ábra alapján a vastagság és a borítottság között nincs kimutatható összefüggés, feltehetőleg különböző tényezők határozzák meg a biofilm ezen tulajdonságait. Ezt a megállapítást a további fejlesztések során fontos szem előtt tartani, hiszen más paraméterek változtatására lehet szükség attól függően, hogy melyik tulajdonságot szeretnénk befolyásolni. Ahogy arra korábban is utaltam, a borítottságot elsődlegesen az határozta meg, hogy kezdetben hol tapadtak meg a spórák, tehát az inokulálási eljárás optimalizálásával lehetne javítani az eredményt. A biofilm növekedésében, fejlődésében nagyobb szerepet játszanak a tenyésztés körülményei – a tápanyag-ellátottság, hőmérséklet, stb. –, ennek vizsgálatára a későbbi kísérletek során térek ki.



5.12. ábra: Főkomponens-analízis eredménye [saját ábra]

A változók helyett az egyes mintákat is megjeleníthetjük a faktorok síkjában, ennek eredménye látható az 5.12. ábra bal oldalán. Ideális esetben az azonos beállításhoz tartozó párhuzamosok egymáshoz közel (egy csoportban, vagyis klaszterben) helyezkednek el. Minél távolabb jelenik meg két minta egymástól az ábrán, annál nagyobb az eltérés köztük a vizsgált változókat illetően. Az elemzésénél fontos figyelembe venni, hogy az első főkomponens mentén nagyobb a variancia, tehát a vízszintes tengelyen mért távolságok nagyobb valódi eltérést jelentenek, mint a függőleges tengelyen mérték. Az 5.12. ábra alapján az egyes inokulálási segédanyagok hatása nehezen határozható meg, mivel a párhuzamosok szórása miatt a klaszterek megállapítása nem evidens. Például a Tween és az 1 g/l-es agar egyértelműen külön csoportba sorolható, ugyanakkor a 2 g/l-es CMC mindkét csoporthoz közel esik.

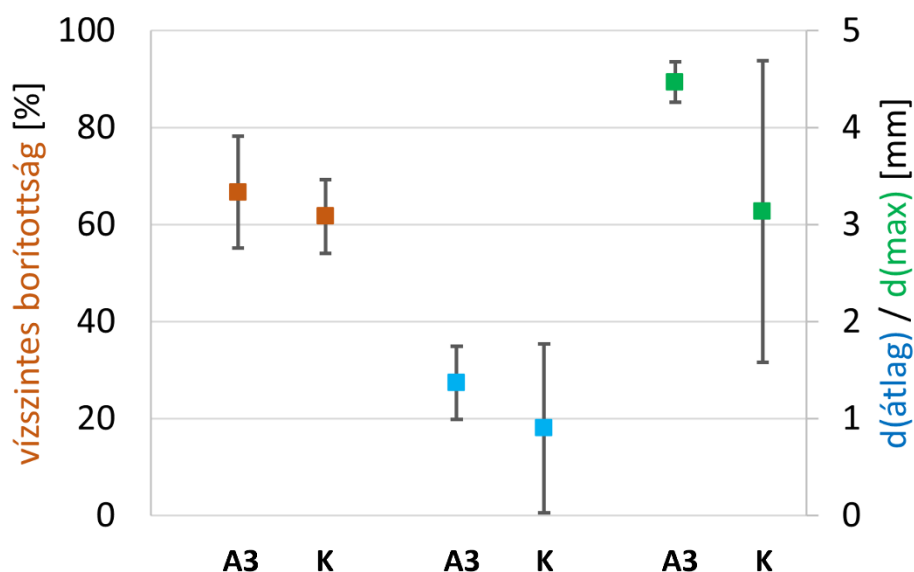
Az optimális segédanyag és koncentráció kiválasztásához a minták és a változók faktorsíkra eső vetületét együttesen kell vizsgálni (ennek megkönnyítése érdekében az 5.11. ábrát is feltüntettem az 5.12. ábra jobb oldalán). A gradosztát reaktor koncepciójának megvalósításához a membrán felületét minél nagyobb mértékben lefedő, megfelelő vastagságú biofilm kialakítására van szükség. (Amint azt a 2.3.4. fejezetben kifejtettem, a vastagság bizonyos határérték felett limitálhatja az oxigénpenetrációt. Ugyanakkor a jelenlegi kísérleti fázisban, ahol a cél a minél jobb fedés és a termelő biofilm kialakítása, a nagyobb átlagos biofilmvastagságot tekintem kedvezőbbnek, feltételezve, hogy egyik esetben sem érem el az ideális tartomány felső határértékét.) Eszerint a vizsgált beállítások közül azok jöhetnek számításba, melyek d_{\max} és b_f vektorok által közrezárt területen helyezkednek el, ezt jelöli a bal oldali ábrán a fekete körvonal. Ide tartoznak a 2 g/l-es és 8 g/l-es CMC, a Tween és a kontroll beállítások egyes mintái, ugyanakkor a megfelelő párhuzamosaik távol esnek a kijelölt régiótól, így nem mondható egyértelműen pozitívnak ezen segédanyagok – illetve azok hiányának – hatása. A 3 g/l koncentrációban alkalmazott agar párhuzamosai viszont mindhárom esetben egymáshoz közel és az optimális tartományban helyezkednek el, ezért ezt ítélem a legsikeresebbnek. Bár ez a beállítás az 5.12. ábra alapján a kontroll rendszerhez képest – annak összes mintáját figyelembe véve – mind a vastagság, mind a borítottság tekintetében kedvezőbbnek tűnik, a segédanyag hatásáról pontosabb képet akartam kapni, ezért további elemzést végeztem a kétféle beállítás összehasonlításához.

Az A3-as és kontroll rendszerek eredményeit STATISTICA programban Tukey HSD teszttel paraméterenként összehasonlítottam, így megállapítható, hogy az egyes változók esetén tapasztalt eltérés statisztikailag szignifikáns-e. A kapott p-értékeket az 5.3. táblázatban tüntettem fel. (Mivel a borítottság függőleges komponense a két rendszer mindhárom párhuzamosánál száz százalékos volt, e tekintetben nem mutatkozott eltérés, ezért csak a másik három paraméterre végeztem el az elemzést.)

5.3. táblázat: Változók p-értéke (A3-as és kontroll rendszerek összehasonlítása)

változó	p-érték
vízszintes borítottság	0,566
átlagos vastagság	0,443
maximális vastagság	0,216

Az adatok alapján $p < 0,05$ szignifikanciaszint mellett egyik paramétert tekintve sem mondható statisztikailag szignifikánsnak a két beállítás közötti eltérés. A maximális vastagság esetén kaptam a legkisebb p-értéket, tehát itt a legerősebb a segédanyag hatása, míg a borítottságot nézve a mért eltérések nagy valószínűséggel véletlen hatásnak tudhatók be. A két rendszer szemléletesebb összehasonlítása érdekében egy közös diagramon ábrázoltam a három változónál mért átlagos értékeket és szórásokat (5.13. ábra).



5.13. ábra: A3-as és kontroll beállítások összehasonlítása

(minden esetben a három párhuzamos átlagát és a szórást tüntettem fel) [saját ábra]

A vízszintes borítottságot nézve az A3-as rendszer átlagos értéke nagyobb, de ez az eltérés tíz százalék alatti, miközben a szórás öt százalékkal nagyobb, tehát ez az összehasonlítás megerősíti a p-érték alapján tett megállapítást, miszerint a vízszintes borítottságban tapasztalt különbségek véletlenszerűek, feltehetőleg a biológiai rendszerek változékonyságából adódnak. A biofilm vastagságát leíró paramétereknél azonban – a szignifikanciaszintnél magasabb p-értékek ellenére – valószínűsíthető a segédanyag pozitív hatása. Az A3-as minták átlagos és maximális vastagsága egyaránt mintegy másfélszerese a kontroll rendszerénél mért értékeknek,

ami jelentős különbségnek számít. A kontroll rendszer esetében rendkívül magas, 97 és 50 %-os szórásokat mértem $d(\max)$, illetve $d(\text{átlag})$ esetén, míg az A3-as beállításnál ugyan ezen paraméterek szórása 28, illetve 5 %-os. Ez egyrészt magyarázatot ad arra, hogy a Tukey HSD teszt miért nem mutatja szignifikánsnak ezen változók esetén a segédanyag hatását – hiszen a szórások közt átfedés van –, másrészt megállapítható, hogy agar hozzáadásával csökkenthető a biofilm vastagságában tapasztalt bizonytalanság, tehát javul a reprodukálhatóság.

Az inokulálási segédanyagok vizsgálatára irányuló kísérletsorozatban tehát a 3 g/l-es agaroldat összességében pozitív hatással volt a biofilm-képződésre, ezért a további kísérletek során ezt alkalmaztam. Emellett több olyan beállítási pont lehetséges – különös tekintettel a 8 g/l-es CMC-re –, melyek szintén javíthatják a biofilm tulajdonságait, ezek igazolásához azonban további kísérletek szükségesek, melyek nem képezik részét a disszertációban bemutatott további kutatásaimnak.

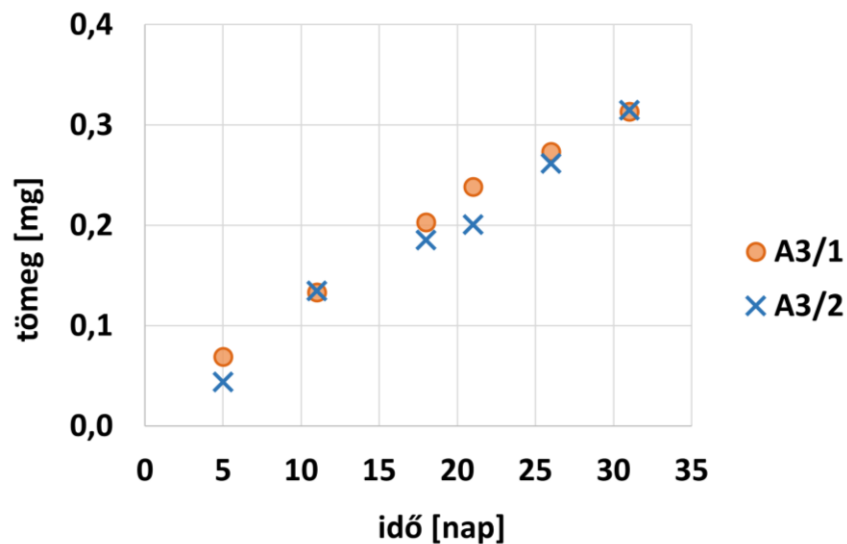
5.4.2. A3-as kapillárisok hosszútávú üzemeltetése

A membrán gradosztát reaktor koncepciójának egyik legfontosabb eleme, hogy elvileg folyamatos üzemmódban, hosszútávon megvalósítható benne a szekunder metabolitok termelése. Ennek gyakorlati megvalósításáról azonban tudomásom szerint mindössze két publikáció jelent meg: Luke és mtsai. [65] *Neurospora crassa* penészgombával végeztek egy közel két hónapig tartó bioremediációs kísérletet, valamint De Jager és mtsai. [73] vizsgálták 18 napos kísérletben *S. coelicolor* növekedési kinetikáját (a keletkező aktinorodin mennyiségéről azonban nem közöltek adatot). A hosszútávú üzemeltetésről tehát rendkívül kevés információ áll rendelkezésünkre, éppen ezért a biofilm-fejlődés szempontjából legsikeresebbnek bizonyult A3-as (3 g/l agarkoncentrációjú spóraszuszpenzióval inokulált) rendszereket az 5.4.1. fejezetben bemutatott kísérletet követően további 25, tehát összesen 45 napig üzemeltettem.

Az inokulálástól számított 14. naptól kezdve további analízis céljából gyűjtöttem a kémcső aljában összegyűlő permeátumot a következő módon:

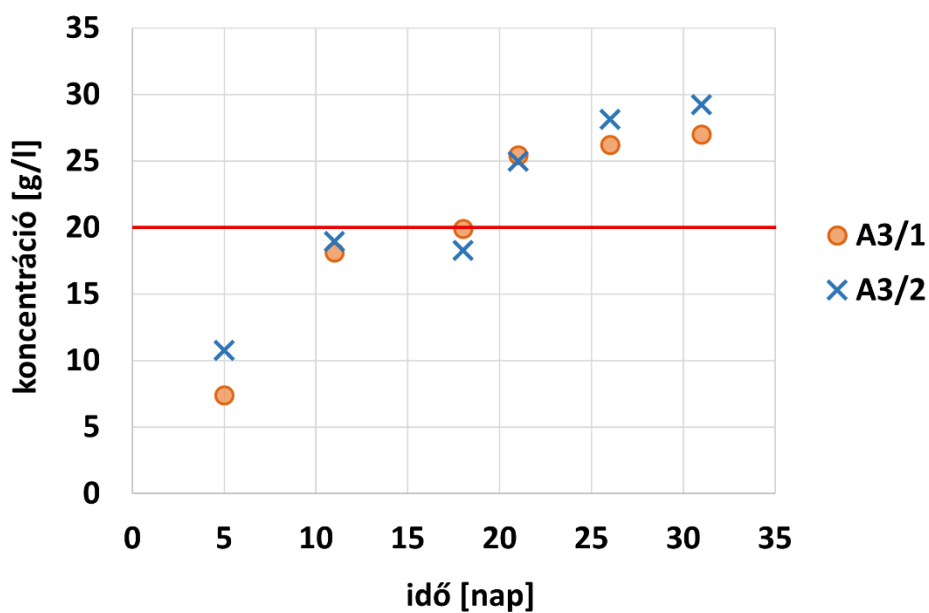
- egy tiszta, száraz kémcső tömegét analitikai mérlegen lemértem,
- a kémcsövet autoklávban sterilizáltam (121 °C-on, 20 perc hőtartással),
- a kapillárist a kémcsövet lezáró vattadugónál fogva kiemeltem a kémcsőből, és a teljes rendszert (fecskendővel együtt) áthelyeztem az ismert tömegű kémcsőbe,
- a permeátumot tartalmazó kémcső tömegét ismét lemértem, az üres kémcső tömegének ismeretében pedig megkaptam a permeátum tömegét.

A kémcsövek cseréjét 3-5 naponta, összesen hét alkalommal megismételtem. Az első 14 nap permeátumát nem analizáltam, tehát összesen hat mintát kaptam. A mintákban mértem a keletkező aktinorodin és a tápoldatból visszamaradó cukrok koncentrációját a 4.8. fejezetben leírt módon. (A permeátum sűrűségét a víz sűrűségével azonosnak tekintettem, így a mért tömeget át tudtam váltani térfogatra.) Három párhuzamost terveztem ilyen módon üzemeltetni, az első kémcsőcsere során azonban az egyik membrán leszakadt a felső tőről, így két párhuzamos kapilláris eredményeit mutatom be.



5.14. ábra: Aktinorodin-termelés A3-as kapillaris rendszerekben (A3/1 és A3/2 jelöli a két párhuzamost) [saját ábra]

Az 5.14. ábra mutatja a permeátum gyűjtésének kezdetétől, azaz a kísérlet 14. napjától – mely az x tengelyen a 0. napnak felel meg – összesen keletkezett aktinorodin mennyiségét. Az A3/1-es kapillárisnál az első húsz napban a termékmennyiség lineárisan növekedett, majd kismértékben csökkent a képződési sebesség. Az A3/2-es rendszerben a termelés üteme enyhén hullámzó volt, de a teljes kísérletet nézve ebben az esetben is jól közelíthető a termékképződés lineáris függvényvel. Az elért végső termékmennyiség a két rendszer esetén megegyezett, az adatsorok párhuzamosnak tekinthetők.



5.15. ábra: Szacharóz koncentrációja a permeátumban [saját ábra]

Az aktinorodinon kívül a tápoldatból fel nem használt cukrok koncentrációját is mértem a permeátumban. A malátakivonatra jellemző kromatográfiás csúcsok egyik mintában sem jelentek meg, tehát az inokulálástól számított 14. napra olyan biofilm alakult ki, mely a membránon lassan átjutó tápoldatból teljes mértékben hasznosítja a malátakivonat cukorkomponenseit.

Az 5.15. ábrán láthatók a permeátumokban mért szacharózkoncentrációk, valamint vízszintes piros vonallal tüntettem fel a tápoldatba bemért szacharóz koncentrációját (20 g/l). Az adatsorok ebben az esetben is jó egyezést mutatnak, csak az utolsó mintánál tapasztaltam nagyobb eltérést a két párhuzamos rendszer között. Az első három minta szacharózkoncentrációja 20 g/l alatti volt, a 21. naptól kezdve viszont végig 20 és 30 g/l tartományba esett, vagyis meghaladta a kiindulási tápoldatra jellemző értéket. Az ellentmondásosnak tűnő adatok értelmezéséhez szükséges az a megfigyelés, miszerint az ekkorra kialakult aránylag vastag, barázdált biofilm felületén a membrán felől érkező cseppek hosszan megültek, mielőtt a kémcső aljába kerültek volna. Ez idő alatt feltehetőleg annyi víz párologott el a 28 °C-on termosztált kémcsőből, mely az átlagosan 0,5 – 1 ml térfogatú mintáknál már arányaiban jelentős mennyiségnek bizonyult. Az ismeretlen mértékű töményedés miatt a mért koncentrációk számértéke nem értelmezhető. Ugyanakkor a növekvő trendet, mely mindkét párhuzamosra jellemző, valószínűleg fogadom el, és a jelenségre az alábbi két magyarázatot tartom lehetségesnek:

- a biofilm fejlődése lelassult, az előregedő tenyészet pedig a fiatalabb sejtekhez képest kevesebb szacharózt használt fel;
- az idő előrehaladtával – a vastagodás és a barázdálódás következtében – a biofilm felülete nő, illetve hidrofobicitása változik, ez pedig a párologási viszonyokra is hatással lehet.

Az említett okok csupán feltételezések, melyek igazolására nem volt módomban; ezek együttes hatása vagy egyéb folyamatok is állhatnak a töményedés hátterében.

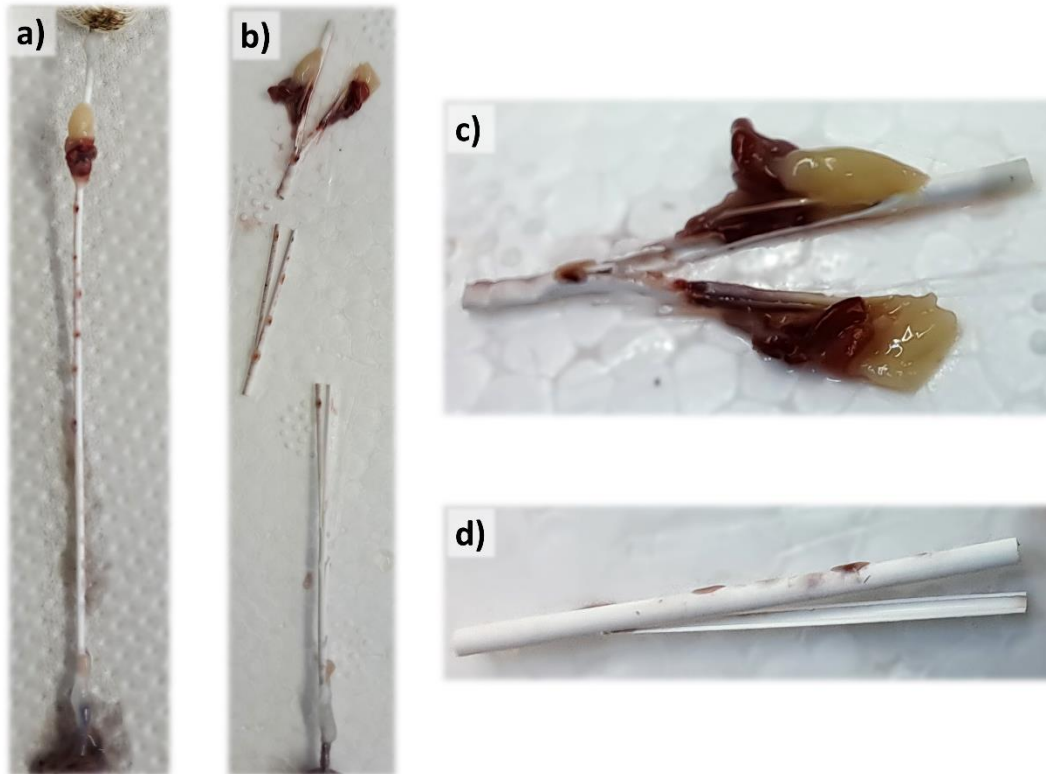
Összességében elmondható, hogy az egyedi kapilláriszálal rendszereket 45 napon keresztül sikeresen üzemeltettem, a termékképződés sebessége pedig a kísérlet végére sem csökkent jelentősen, tehát a kidolgozott berendezés hosszútávú működtetésre alkalmas.

5.4.3. Eltömődés a kapilláris belsejében³

Az egyedi kapilláris szálakkal végzett kísérletek során több esetben is azt tapasztaltam, hogy a membrán felső végén, egy csomóban vagy rövidebb szakaszon fejlődött a biofilm, míg a betáplálási ponttól távolabb eső szakaszon csak néhány telep jelent meg elszórtan, azok is csak minimális fejlődést mutattak a kísérlet előrehaladtával (5.16. ábra a) rész). A jelenség okának felderítése érdekében az egyik ilyen membránt keresztben elvágtam két ponton, majd az így kapott szakaszokat hosszában kettévágtam. Ahogy a fényképeken is látszik, a biofilmmel borított szakaszon a kapilláris belsejét teljes keresztmetszetében kitöltötték a sejtek, míg

³ Az 5.4.3. fejezetben leírtakat a „The concept and practical challenges of membrane gradient reactors” című publikációmban kifejtettem.

az alsóbb régióban nem volt szabad szemmel látható telep. Ebből arra következtettem, hogy a baktérium átjutott a membrán falán, megtapadt a belső felületen, intenzív növekedésének eredményeként pedig elzárta a kapilláris belsejét, így az alsóbb régióba nem jutott tápanyag és nem fejlődött ki a biofilm.



5.16. ábra: Eltömődés a kapilláris belsejében [saját képek]

Az említett jelenség azért érdekes, mert az alkalmazott membrán átlagos pórusmérete $0,2\ \mu\text{m}$, tehát a membrán elvben visszatartja a baktériumokat, hiszen a spórák jellemzően $1,2\ \mu\text{m}$ [118], a hifák pedig $0,62\ \mu\text{m}$ [32] (egy régebbi forrás szerint $0,7\ \mu\text{m}$ [117]) átlagos átmérőjűek. Ugyanakkor a gyártási eljárás (fázis inverzió) során kis számban keletkeznek az átlagosnál jóval nagyobb méretű – akár néhány μm -es – pórusok is, melyek egy hagyományos vegyipari műveletben – a szelektivitás enyhe csökkentésétől eltekintve – nem okoznak problémát. Biológiai rendszerek esetén azonban már néhány, a membrán falán átjutó sejt is képes lehet elszaporodni, ami a lumen eltömődéséhez vezethet.

Egy másik lehetséges magyarázat a fenti jelenségre a *Streptomyces* fajok azon különleges képessége, miszerint a hifa átmérőjénél lényegesen kisebb pórusokon is képesek átjutni. Wolf és mtsai. [117] tíz különböző *Streptomyces* fajjal végzett kutatásuk során megállapították, hogy ezek a mikroorganizmusok bizonyos mértékű flexibilitást mutatnak, melynek révén a $0,7\ \mu\text{m}$ átlagos átmérőjű hifák képesek akár $0,2\ \mu\text{m}$ átmérőjű fonalakká összehúzódnival, ezáltal átjutnak a hagyományos mikroszűrő membránokon. (A természetben feltételezhetően a talajszemcsékbe való bejutást teszi lehetővé ez a képességük.)

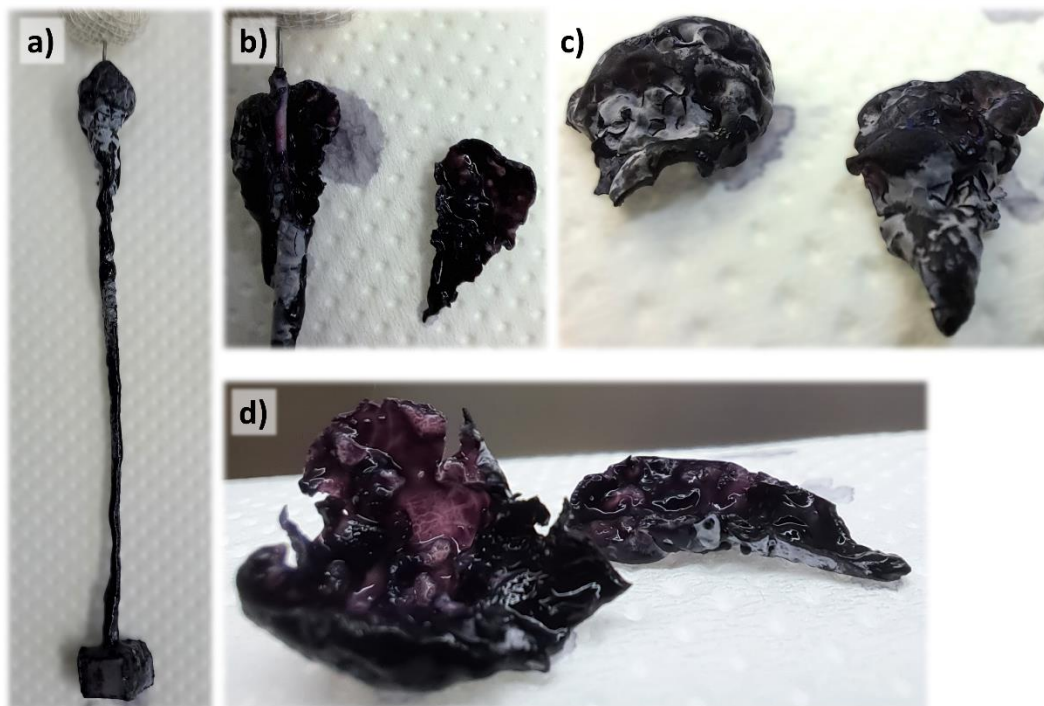
Bármelyik magyarázat is a helytálló jelen esetben, a tapasztalat azt mutatja, hogy a membrán gradosztát reaktorban alkalmazott membránok esetén az ultraszűrő belső réteg megléte elengedhetetlen a sejtek bejutásának megakadályozásához – legalábbis *Streptomyces* fajok esetén mindenképpen.

5.4.4. Inhomogén tápanyag-eloszlás a kapillárisokban

Ahogy azt a kapillárisokon kialakuló biofilm jellemzésénél említettem (lásd 5.4.1. fejezet), az esetek többségében a membrán felső végénél a biofilm erősen megvastagodott. Ez a csomó a színe alapján ítélve tovább maradt az intenzív növekedés fázisában, később kezdett aktinorodint termelni, mint a biofilm többi része.

A rendszer felépítéséből adódóan úgy gondolom, a csomó kialakulásának oka az inhomogén tápanyag-eloszlás a lumenben. A reaktor összeállításánál a kapillárist feltöltöm tápanyaggal, majd alul lezárom. Ha a membrán külső felületén is jelen van egy vékony folyadék-réteg, a folyadék membránon keresztüli áramlásának hajtóereje csupán a folyadékoszlop hidrosztatikai nyomása, ami a reaktor méretéből adódóan rendkívül kicsi (néhány mbar nagyságrendű). Ennek eredményeként abiotikus körülmények között a tápoldat átszivárgása a membránon – tehát a tápanyag-utánpótlás – rendkívül lassú folyamat. Az inokulálási kísérletek megkezdése előtt végeztem méréseket arra vonatkozóan, hogy pontosan milyen gyors a folyadéktranszport a membránon keresztül, illetve befolyásolja-e a folyamatot a segédanyagok használata. A fecskendőbe 5 ml desztillált vizet töltve egy hét alatt 1 – 1,5 ml permeátum keletkezett minden esetben, tehát az alkalmazott segédanyagoktól függetlenül valóban rendkívül lassú a folyadéktranszport. Inokulált rendszerek esetében viszont a membrán külső felületén megtapadó baktériumok felveszik a tápanyagokat, ezáltal koncentrációgradiens alakul ki, ami több nagyságrenddel is megnövelheti a transzport hajtóerejét. Amennyiben a betáplálási ponthoz közel lévő sejtek hatékonyan felveszik a tápoldat komponenseit, a membrán alsóbb régióiba – belső keringetés hiányában – egy tápanyagban szegényebb folyadék kerül. Ennek eredménye a betáplálási ponthoz közeli, intenzíven növekedő csomó (5.17. ábra a) rész), és a vékonyabb, hamarabb öregedő biofilm a membrán többi szakaszán.

Hasonlóan, Sheldon és Small [67] is azt tapasztalta dead-end üzemmódban alkalmazott kapilláris membránok esetén, hogy a kialakuló biofilm a betáplálási ponttól távolodva egyre vékonyodik, feltehetőleg a koncentráció-gradiens eredményeként (bár ők nem különálló csomóról, hanem folyamatos elvékonyodásról számoltak be).



5.17. ábra: A membrán felső végén kialakult csomó struktúrája (A3-as kapilláris esetén)
[saját ábra]

Azért, hogy a csomó belső struktúrájáról is képet kapjak, az A3/1-es biofilmet a 45 napos kísérlet végén pengével óvatosan kettévágtam. Előzetesen egy többé-kevésbé tömör, esetleg különböző rétegekből álló biofilmre számítottam. Ehelyett azonban a felvágáskor sötétlila, enyhén kocsonyás folyadék távozott a belsejéből, és csak egy vékony, barázdált burok maradt a csomóból (5.17. ábra). Az elvégzett kísérletből nem derült ki számomra, hogy kezdettől fogva így nőtt a biofilm, vagy csak egy későbbi fázisban, a sejtek öregedésének eredményeként folyósodott el a belső réteg. Ennek kiderítése olyan kísérlettel lenne lehetséges, melynek során egyszerre inokulált, párhuzamos kapillárisokból adott időközönként egyet felvágunk, így a belső struktúra fejlődése nyomon követhetővé válna.

Az egyedi kapilláris szálak rendszer korlátai – inhomogén tápanyag-eloszlás, nehézkes léptéknövelés, kevés számszerűsíthető mérési adat, stb. – miatt szükségessé vált egy mechanikailag stabilabb, léptéknövelt rendszer kidolgozása, ahol a felmerült problémákat részben orvosolni tudtam.

5.5. Biofilm kialakítása SevenBore membránon – léptéknövelt MGR

Az egyedi kapilláris szálakkal végzett kísérletek fő tanulságai közé tartozik, hogy:

- a membrán gradosztát reaktorban ultraszűrő – vagy belső ultraszűrő réteggel rendelkező – membránra van szükség;
- dead-end üzemeltetés esetén az inhomogén tápanyageloszlás korlátozza a biofilm fejlődését, a membrán hossza mentén egyenlőtlen növekedéshez vezet;
- a biofilm vastagsága és a membrán felületének borítottsága az inokulumhoz 3 g/l koncentrációban adagolt agarral növelhető.

Ezen megállapítások alapján, SevenBore membrán felhasználásával alkottam meg azt a léptéknövelt membrán gradosztát reaktort, melynek eredményeit és tapasztalatait ebben a fejezetben bemutatom.

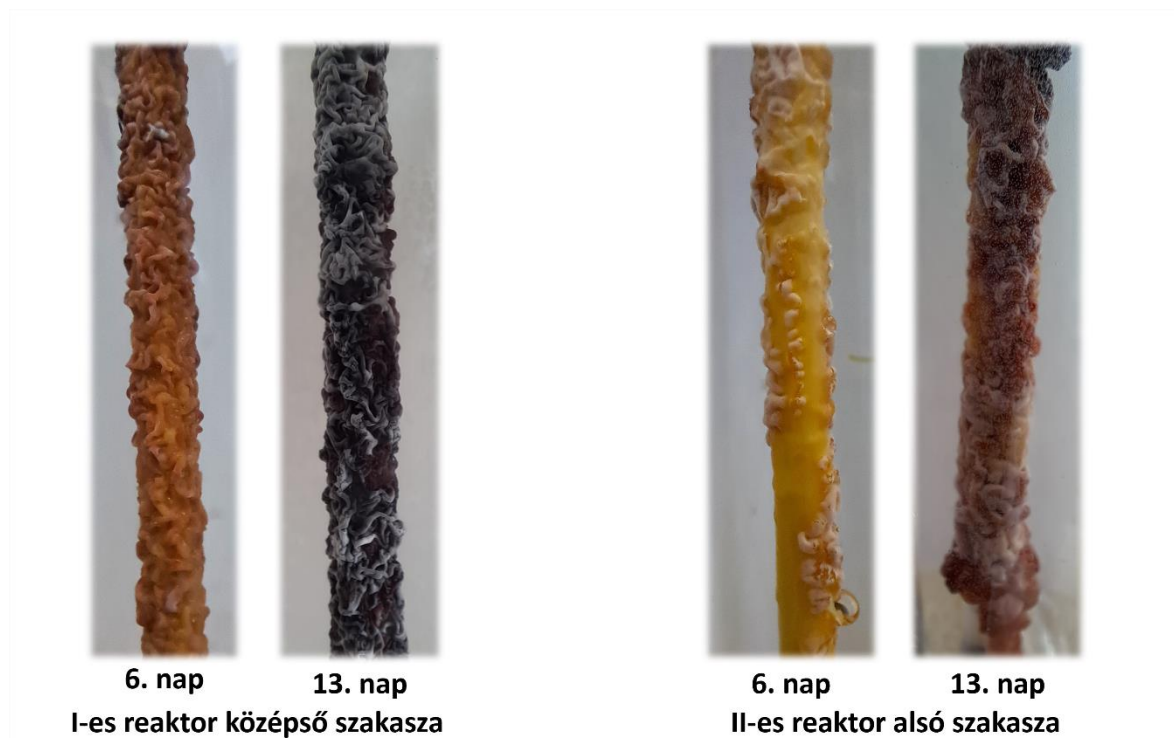
5.5.1. A reaktorok üzemeltetése során tett megfigyelések

A kísérlet során fertőzés nem lépett fel, tehát a sterilizálási eljárások sikeresnek bizonyultak. A permeátum kezdetben teljesen tiszta, áttetsző volt, majd hozzátétőlegesen a tizedik nap környékén kis mennyiségű lebegő anyag jelent meg benne. A kísérlet ezen fázisában ugyanis a biofilm külső rétegében lévő, előregedett sejtek egy része levált, a membránon átjutó tápoldattal lemosódott, és így bekerült a permeátumgyűjtőbe is. A II-es reaktor permeátumgyűjtője 500 ml térfogatú volt, ezért egy alkalommal kiürítettem az edényt, hogy beleférjen a permeátum. (Ehhez steril fecskendőtüvel átszűrtam az üvegedényt és a steril levegőszűrőt összekötő szilikoncsövet, és a fecskendővel kiszívtam a folyadékot.)

Az előzetes feltételezésem az volt, hogy a biofilm idővel eltömi a membránt és olyan mértékben akadályozza a tápoldat átjutását, hogy a folyadék egy része továbbhalad a membrán alsó végéhez csatlakozó fémcsövön át az elfolyó-gyűjtőbe. Ez az edény azonban a kísérlet végéig üres maradt, tehát a biofilm nem tömítette el a membrán pórusait. (Ezt a megállapítást a kísérlet leállítását követő megfigyelések is alátámasztják.)

Az indítást követő második napon váltak láthatóvá a telepek, kezdetben vékony, sárga filmet képezve a membrán felületén, majd ez a filmréteg vastagabbá, felülete barázdálttá vált. Mindkét membrán esetében teljes borítottságot sikerült elérni már az üzemeltetés elején. A telepek színének változása az egyedi kapillárisoknál leírthoz (5.4. fejezet) hasonlóan alakult, de akadtak eltérések. A fejlődés üteme a SevenBore reaktorok esetén jelentősen gyorsabb volt, ami a folyamatos betáplálásból származó jobb tápanyag-ellátottsággal magyarázható. Míg a kapillárisokon a kezdeti világos, krémszínű réteg néhány nap után rózsaszín, majd piros árnyalatúvá vált, a SevenBore esetében egy élénksárgából barnába történő átmenetet figyeltünk meg (5.18. ábra). Az ezt követő egyre sötétülő lila szín minden rendszerre jellemző volt. További különbség az egyedi kapillárisoknál tapasztaltakhoz képest, hogy itt már a 6. napon, a még sárgásbarna telepeken megjelentek spórázó részek, míg a kapillárisoknál csak a sötétlila, tehát aktinorodint nagyobb mennyiségben termelő sejtek spóráztak.

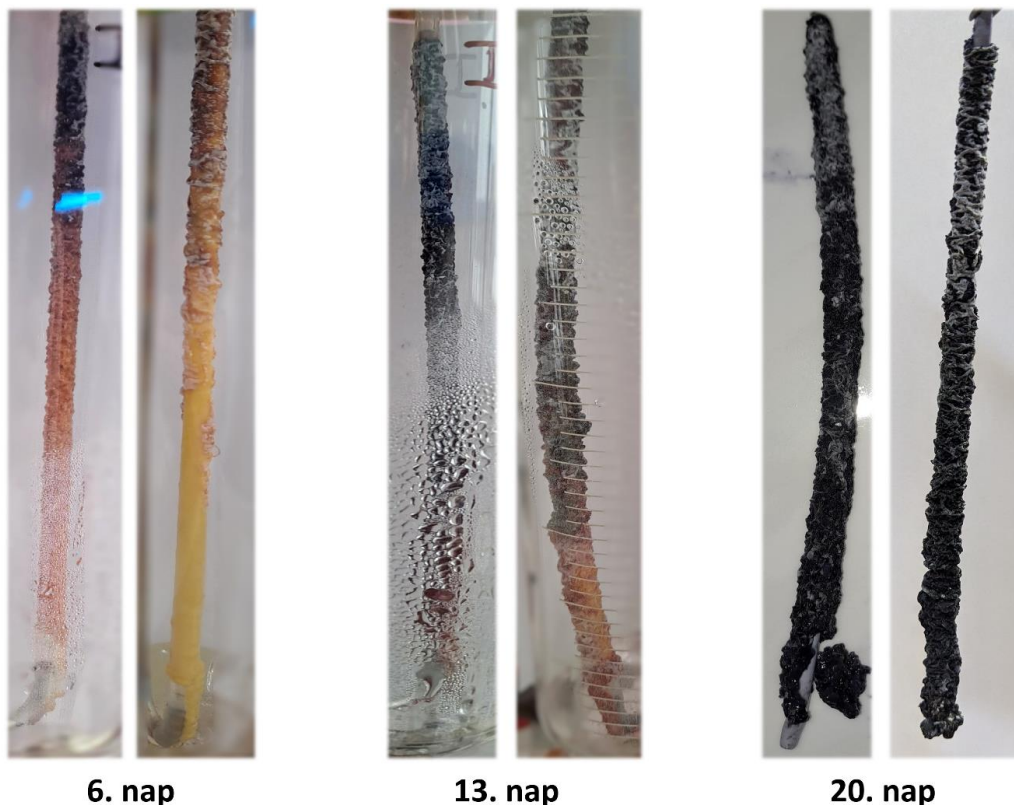
A színt és a spórázást illető különbségek arra engednek következtetni, hogy a sejtek génexpresszióját – a metabolittermelés profilját, a spóráképződés megindulását – befolyásolták a két rendszer közti különbségek, feltehetőleg a jobb tápanyag-ellátás, illetve a nagyobb sejttömeg.



5.18. ábra: Színváltozás és spórázás a termosztált (*bal oldali, I-es*) és a nem termosztált (*jobb oldali, II-es*) reaktorokban [saját ábra]

Mindkét reaktor esetén megfigyelhető volt egy vertikális gradiens a biofilm fejlődésében: a felső, betáplálási ponthoz közeli rész néhány nappal hamarabb érte el az egyes fejlődési fázisokat, mint az alsóbb szakaszok. Az I-es és II-es reaktorok azonos fázisokon mentek keresztül, viszont a termosztált rendszer (I-es) gyorsabban változott, és ez esetben kisebb volt az alsó és felső zónák közti különbség (5.19. ábra).

A második hét során a membránok elkezdtek kifelé görbülni, a harmadik héten már látványosan meghajlottak, a II-es hozzá is ért a reaktor falához, valamint a reaktortestet és a szívópalackot összekötő szakaszon jelentős mennyiségű telep jelent meg (szintén a sejtek lemosódásának következményeként), így a 20. napon leállítottam a kísérletet.



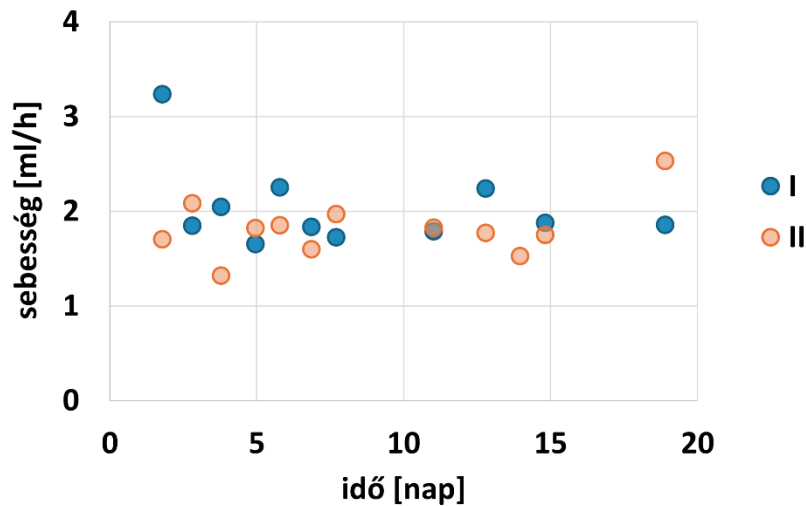
5.19. ábra: Biofilmfejlődés menete (a képpárok bal oldali tagja az I-es, a jobb oldali a II-es rendszerről készült) [saját ábra]

5.5.2. A kísérlet leállítását követő analízis

Az alábbiakban a reaktorok szétszerelése során szerzett tapasztalataimat, valamint a biofilm és a permeátum analízisének eredményeit mutatom be.

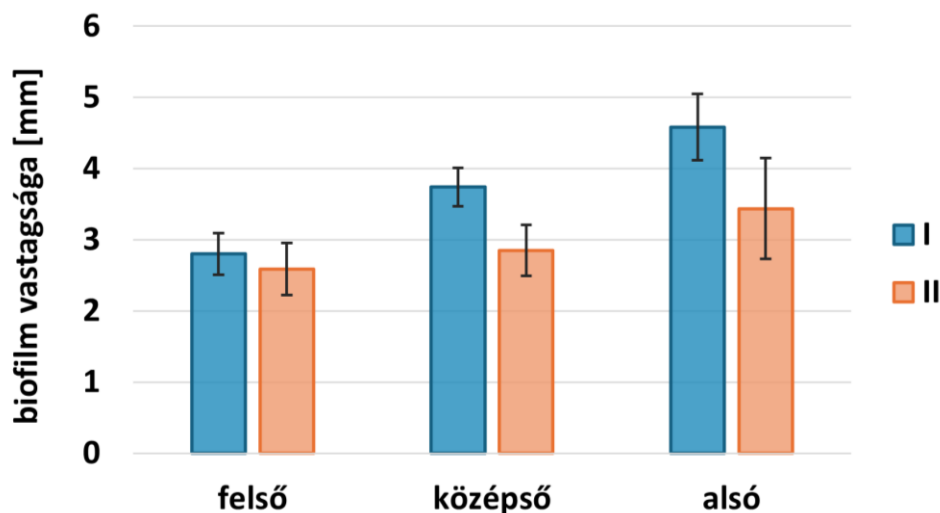
Amikor a pumpafejből kivettem a szilikoncsöveket, a II-es reaktorhoz tartozó betápcsőbe visszaáramlott néhány ml sötétkék folyadék a lumenből. A folyadékból mintát vettem mikroszkópos analízishez, és megállapítottam, hogy nem tartalmaz sejteket, ami igazolja, hogy a membrán sikeresen visszatartja a sejteket.

Az üzemeltetés során rendszeresen bejelöltem a tápoldatot tartalmazó edény oldalán a folyadékszintet és feljegyeztem az időpontot, a leállítást követően pedig meghatároztam az egyes szintjelölésekhez tartozó térfogatot. Az így kapott adatokból kiszámítottam a tápoldat fogyasztásának sebességét. Amint az 5.20. ábrán látható, a tápoldat a kísérlet teljes időtartama alatt közel azonos sebességgel fogyott, a kialakuló biofilm nem volt rá hatással. (A perisztaltikus pumpán 1 ml/h értéket állítottam be, a valóságban ez 2 ml/h körül ingadozott. Az eltérés oka, hogy a megadott értéket csak megfelelő átmérőjű, Masterflex cső esetén biztosítja a szivattyú, ez a csőtípus azonban tapasztalataim szerint sterilizálás hatására deformálódhat, a hozzá csatlakoztatott csonkokról könnyen lecsúszik vagy azokhoz közel elszakad. Ezért helyette sterilizálható szilikoncsővel dolgoztam, amivel viszont nem lehet pontos áramlási sebességet beállítani.)



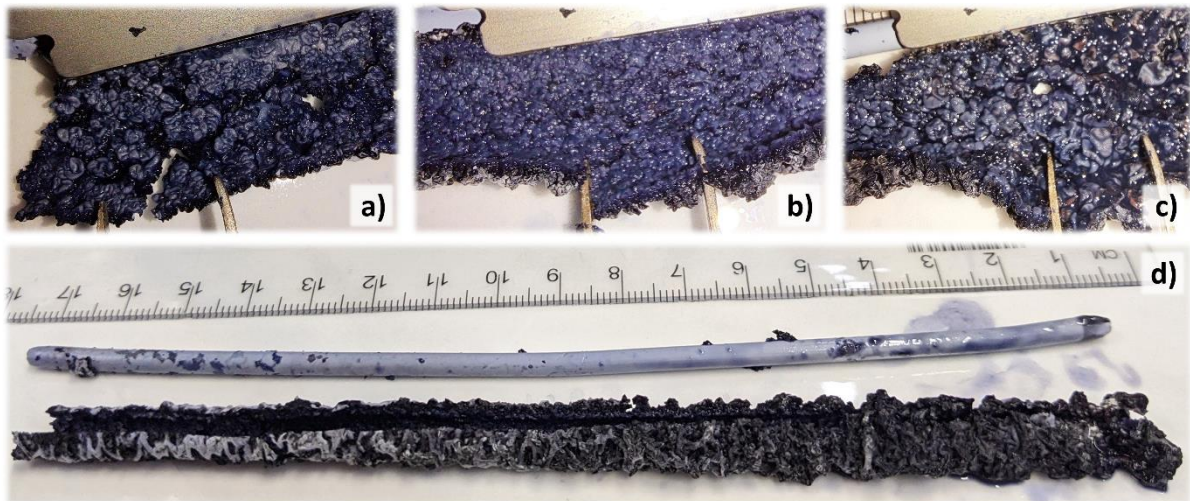
5.20. ábra: Tápanyag fogyasztási sebessége [saját ábra]

A 5.21. ábra szemlélteti a biofilm átlagos vastagságát mindkét rendszer esetén három szakaszra tagolva. Minden szakaszon öt különböző pontban végeztem mérést, ezekből számoltam átlagot, illetve szórást. Az öregedésnél megfigyelhető vertikális gradiens a vastagságban is megmutatkozott: az alsó régió átlagos vastagsága az I-es rendszerénél 1,6-szerese, a II-esnél 1,3-szerese a felsőnek. A termosztált rendszer esetén a középső és alsó zónákat tekintve nagyobb vastagságot sikerült elérni a nem termosztálthoz képest. Az erősen barázdált felszín miatt az árkokban és a barázdák külső élénél mért átmérők között jelentős különbség van, mely jelenség a membrán alsó szakaszán hangsúlyosabb, ez okozza a nagy szórásokat.



5.21. ábra: Biofilmek átlagos vastagsága felső, középső és alsó szakaszra bontva [saját ábra]

Ahogy azt a 4.7. fejezetben leírtam, a biofilmet egyik oldalán hosszában átvágtam, hogy ki tudjam emelni a membránt. A leválasztás meglepően könnyen ment, a sejtek a membránhoz lazán, egymáshoz viszont szorosan kötődtek, így a biofilm a membrán kiemelése után egyben maradt (5.22. ábra d) rész). A felső szakasz szárazabb, rugalmasabb, míg az alsó régió nedvesebb volt, könnyebben szétesett, kenődött. Ez a megfigyelés mindkét rendszerre igaz, de a II-es esetében hangsúlyosabb volt a különbség az egyes területek között, a termosztált rendszerben a felső szakasz is nedvesebb maradt.



5.22. ábra: A biofilm felső (a), középső (b) és alsó (c) szakaszáról, valamint a membránról készült kép a rendszer leállítását követően (II-es reaktor) [saját ábra]

A membránt keresztben és hosszában is több helyen elvágtam, eltömődést nem tapasztaltam, viszont az aktinorodin a membrán külső és belső felszínét, illetve az anyagát egyaránt lilára színezte (5.23. ábra). Ahogy azt korábban említettem, a kísérlet előrehaladtával a membránok kifelé meghajlottak – feltehetőleg a biofilm súlyától –, a leállítás után azonban visszanyerték eredeti alakjukat, tehát csak átmeneti duzzadás és meghajlás történt.



5.23. ábra: SevenBore membrán hossz-és keresztmetszeti képe a használat előtt (felső sor) és utána (alsó sor) [saját ábra]

A permeátumból – térfogatmérés után – mintát vettem az aktinorodin, valamint a tápoldatból visszamaradó cukrok koncentrációjának meghatározásához. Mivel a II-es reaktornál a permeátumgyűjtőt a kísérlet közben is ki kellett üríteni, ezért ennél a rendszerrel kétféle minta állt rendelkezésemre: az első a 14. napig, a második a 14. és 20. nap között összegyűlt permeátumot jellemzi. Az 5.4. táblázatban tüntettem fel az egyes minták cukorkoncentrációit, valamint a keletkezett aktinorodin mennyiségét.

5.4. táblázat: Permeátumok összetétele

reaktor	t [nap]	visszamaradó cukrok [g/l]			aktinorodin [mg]
		szacharóz	glükóz	maltóz	
I.	20	18,6	0,3	4,6	3,8
II.	14	17,8	0,5	6,0	0,5
	20	18,4	0,4	4,8	3,0

A HPLC kalibrációja során a 10 g/l koncentrációjú malátakivonat kromatogramján – mely a kiindulási tápoldatnak felel meg – 0,4 g/l-es glükóz és 9,8 g/l-es maltóz csúcsokat kaptam. Ennek tükrében a permeátum összetételéről elmondható, hogy a glükóz mennyisége közel megegyezett a kiindulási értékkel, a maltóz koncentrációja pedig a 20 napos minták esetében mintegy 50 százalékkal, a 14 napos mintánál 40 százalékkal csökkent. A tápoldat szacharózmennyiségének szintén közel 90 százaléka megmaradt minden esetben.

A kísérlet kezdeti fázisában – amíg nem fejlődnek nagyobb mennyiségben a telepek – a tápoldat szinte változatlanul áthalad a membránon, és a permeátum összetétele jó közelítéssel megegyezhet a tápoldatével. Ugyanakkor a II-es reaktor második mintája alapján megállapítható, hogy a cukortartalom jelentős része akkor sem hasznosul, amikor már kialakult az egybefüggő, aránylag vastag biofilm. Ez alapján a jövőben érdemes megfontolni az áramlási sebesség csökkentését, vagy kevésbé koncentrált tápközeg alkalmazását a veszteség csökkentése érdekében.

A permeátum színe kezdetben megegyezett a tápoldatével, majd egy hét elteltével ez a sárga szín pirosodni kezdett, a 11. napra pedig barnászörös lett. A kísérlet végéig még erőteljesebb lett a piros szín, a magas aktinorodin-koncentrációra jellemző sötétlila árnyalat azonban nem jelent meg. Ugyanakkor mind a biofilm, mind a leállításkor a lumenből visszaáramló folyadék sötétlila volt, tehát a permeátum világosabb színe azzal magyarázható, hogy a nagy mennyiségben átjutó tápoldat miatt sokkal hígabb oldatot kaptam, mint az egyedi kapilláriszálak esetén. A II-es rendszer esetén az első két hétben 0,5 mg aktinorodin termelődött, az ezt követő hat nap folyamán pedig ennek a hatszorosa, ami megfelel mind a színváltozás, mind a szekunder metabolizmus karakterisztikája alapján vártnak. Az I-es reaktorban közel tíz százalékkal több termék keletkezett, tehát a termosztálás kedvezően hatott a folyamatra.

5.5. táblázat: SevenBore reaktorok összehasonlítása

paraméter	reaktor		mértékegység
	I	II	
termosztált	igen	nem	
biofilm tömege (nedves)	4 655	3 763	[mg]
nedves biofilm tömeg / membrán hossza	274	231	[mg/cm]
biofilm tömege (száraz)	604	707	[mg]
biofilm víztartalma	87,03	81,21	[%]
száraz biofilm tömeg / membrán hossza	36	43	[mg/cm]
átlagos vastagság (felső-alsó szakasz)	2,8 - 4,6	2,6 - 3,4	[mm]
EPS-ből kinyert poliszacharid / száraz sejttömeg	5,44	5,30	[μ g/mg]
aktinorodin (összesen keletkezett)	3,8	3,5	[mg]
aktinorodin / száraz sejttömeg	6,3	4,9	[mg/g]

A permeátum mellett a biofilm tömegét, szárazanyag-tartalmát és EPS frakciójának poliszacharid-tartalmát is elemeztem. Ehhez a biofilmet – a nedves tömeg lemerése és homogenizálás után – két részre kellett osztanom, de feltételeztem, hogy a homogenizálásnak köszönhetően az egyes részekben mért víztartalom, illetve cukorkoncentráció az egész biofilmre jellemző adatok. A két reaktor számszerű jellemzésére és összehasonlítására alkalmas eredményeket az 5.5. táblázatban foglaltam össze.

A biofilmek vastagságát az 5.21. ábra kapcsán már részleteztem, de az összehasonlítás kedvéért itt is feltüntettem a felső és alsó szakaszokon mért átlagos értékeket. Mivel a két membrán hossza a reaktorok eltérő mérete miatt különbözött – az I-es membrán 17 cm-es, a II-es 16,3 cm-es volt –, a biofilmek tömegét egységnyi membránhosszra vonatkoztatva is megadtam. A nedves tömeg az I-es reaktor esetében mintegy húsz százalékkal nagyobb volt a II-eshez képest, a száraz biofilm-tömeg viszont ezzel ellentétesen a II-es reaktor esetén volt közel húsz százalékkal nagyobb. A termosztálás hatására ugyanis a biofilm víztartalma magasabb volt, amit a szétvágás során is éreztem, hiszen az I-es reaktorhoz képest itt kevésbé száradt ki a tenyészet felső szakasza.

A biofilmet alkotó mikroorganizmusok számára elengedhetetlen a megfelelő mennyiségű víz jelenléte: fenntartja az ozmotikus nyomást, továbbá fontos szerepe van az oldott tápanyagok és a sejtek által termelt extracelluláris vegyületek transzportjában [119]. Ugyanakkor a csökkent víztartalom mint környezeti stressz kiválthatja bizonyos szekunder metabolitok termelését [120]. Roux-edényeken készített tenyészetek esetén megfigyeltem, hogy a táptalaj szárazabb régióiban hamarabb kezdődött mind az aktinorodin termelése, mind a spóráképződés, ugyanakkor nem végeztem a víztartalom hatására irányuló vizsgálatokat, illetve szakirodalomban sem találtam erre vonatkozó információt. A SevenBore membránon kialakult biofilm esetén a magasabb víztartalom fokozottabb aktinorodin-termeléssel járt, tehát a szárazságnak a szekunder metabolizmust elősegítő hatásáról ez esetben nem beszélhetünk.

Az EPS frakció poliszacharid-tartalmát a két rendszernél közel azonosnak találtam – mindössze három százalék a különbség köztük –, tehát a termosztálásnak nem volt hatása erre a paraméterre. Homero és mtsai. [85] négy különböző *Streptomyces* törzs esetén azt találták, hogy az EPS-nek 32 – 60 %-át teszik ki a poliszacharidok, tehát a nemzetségen belül is elég nagy a változatosság. Az adatokat egységnyi EPS-tömegre vonatkoztatva adták meg, a biofilmből kinyert EPS mennyiségét azonban nem közölték, így az értékeket nem tudom összehasonlítani az általam kapott eredményekkel (melyeket száraz biofilmtömegre vetítve számoltam ki). A továbbiakban ezt szem előtt tartva a biofilm EPS-tartalmát is célszerű meghatározni.

Összességében megállapítható, hogy a termosztálás magasabb víztartalmú és nagyobb átlagos vastagságú biofilmet eredményezett, továbbá a biofilm fejlődésének üteme is gyorsabb volt. A termosztált reaktorban összesen tíz százalékkal több aktinorodin keletkezett a nem termosztálthoz képest, a száraz sejtömegre vetítve pedig 28 százalékos a különbség.

5.5.3. További megfontolások és fejlesztési lehetőségek

A membrán gradosztát reaktor koncepciója szerint az inokulálás során a membrán külső felületén lévő pórusok belsejében és felszínén megtapadnak a sejtek, kolonizálják a teljes felületet, majd idővel olyan vastagságú biofilmet képeznek, melynek egyes rétegei a mikroba-növekedési kinetika eltérő fázisában vannak. Ez az elképzelés több szempontból sem valósult meg a SevenBore membránok esetén. Egyrészt a membrán anyagába, pórusaiba nem hatoltak be a sejtek, nem tapadtak szorosán a membrán felületéhez, ezt igazolják a fényképek, a lumenből származó folyadékminta sejtmentessége, valamint az a tapasztalat, hogy a membrán a biofilmtől könnyen elválasztható volt a kísérlet végén. Másrészt a biofilmben nem voltak szabad szemmel jól elkülöníthető rétegek. Bár a membrán felőli oldala nedvesebb volt, a spórák pedig a külső, levegővel érintkező felületen képződtek (hiszen a spórák légmicéliumokon fejlődnek), a biofilm teljes keresztmetszetében az aktinorodinra jellemző, sötétlila színű volt. Sajnos nem álltak rendelkezésemre olyan mikroszkópos eljárások, melyekkel pontosabb képet kaphattam volna a struktúráról, a hagyományos festési technikák pedig a pigmentált termék miatt nem alkalmazhatóak. A biofilm feldarabolására, belső rétegeinek megfigyelésére pedig csak a kísérlet végén volt lehetőségem, tehát a fenti megállapításaim csak a három hetes állapotra érvényesek. Elképzelhetőnek tartom, hogy a kísérlet korábbi fázisaiban kialakulnak az elméletben részletezett, különböző rétegek, de az idő előrehaladtával a belső sejtek is előregesznek a megfelelő tápanyag-ellátottság ellenére.

Az ipari megvalósítás szempontjából fontos kérdés a membrán újrahaználhatósága. Ha az inokulálás eredményeként a sejtek eltömítik a pórusokat és nagyon erősen tapadnak a membrán felületéhez, leállításkor a biofilm eltávolítása komplex feladat lehet. Különösen akkor, ha nem csak a membrán tisztítása a cél, hanem a biofilm anyagát, annak EPS frakcióját is hasznosítani szeretnénk, hiszen ez esetben roncsolásmentes, kíméletes eljárásokat kell választani. Esetleg több lépcsős tisztítási technológiát lehet kidolgozni, első lépésben kíméletesen, például valamilyen mechanikai eljárással eltávolítani a biofilm nagy részét, majd erős lúggal mosni a membránt (amennyiben annak anyaga ezt lehetővé teszi). Ez azonban növeli a veszteséget és a költségeket, ahogyan a membrán gyakori cseréje is jelentősen megdrágíthatja a technológiát. Ugyanakkor az általam elvégzett kísérlet tapasztalata azt mutatja, hogy a SevenBore membránról nagyon könnyen eltávolítható a biofilm. Bár arra vonatkozóan nem végeztem vizsgálatokat, hogy az aktinorodin milyen módszerrel és mértékben távolítható el a membrán anyagából, illetve az esetlegesen visszamaradó termék gátolja-e az újbóli felhasználást, a biofilm könnyű szeparációja mindenképpen előnyössé teszi az ipari alkalmazás során. Összességében tehát van némi ellentmondás membránnal kapcsolatos elvárásainkat illetően a gradosztát reaktor üzemeltetése és a downstream műveletek során. Amennyiben viszont nem elvárás a „gradosztát elv” megvalósulása, a SevenBore típusú membrán ideális választás lehet ehhez a technológiához.

6. Összefoglalás

Kutatásom során egy speciális, kevésbé ismert berendezés, a membrán gradosztát reaktor vizsgálatával foglalkoztam, melyet szekunder metabolitok előállítására fejlesztettek ki. Az irodalmi áttekintésben ismertettem ezen vegyületek ökológiai és társadalmi jelentőségét, továbbá a kísérleteimben is alkalmazott termelő mikroorganizmus, a *Streptomyces coelicolor* – illetve a teljes nemzetség – legfontosabb jellemzőit. Emellett bemutattam az MGR felépítését, működési elvét, valamint összegeztem az elérhető publikációk főbb eredményeit.

A kutatás fő célja a membrán felületén zajló biofilmképződés vizsgálata, az inokulálás sikerességét befolyásoló tényezők meghatározása, az inokulálási eljárás fejlesztése volt. Az elvégzett kísérletek az alábbiak voltak:

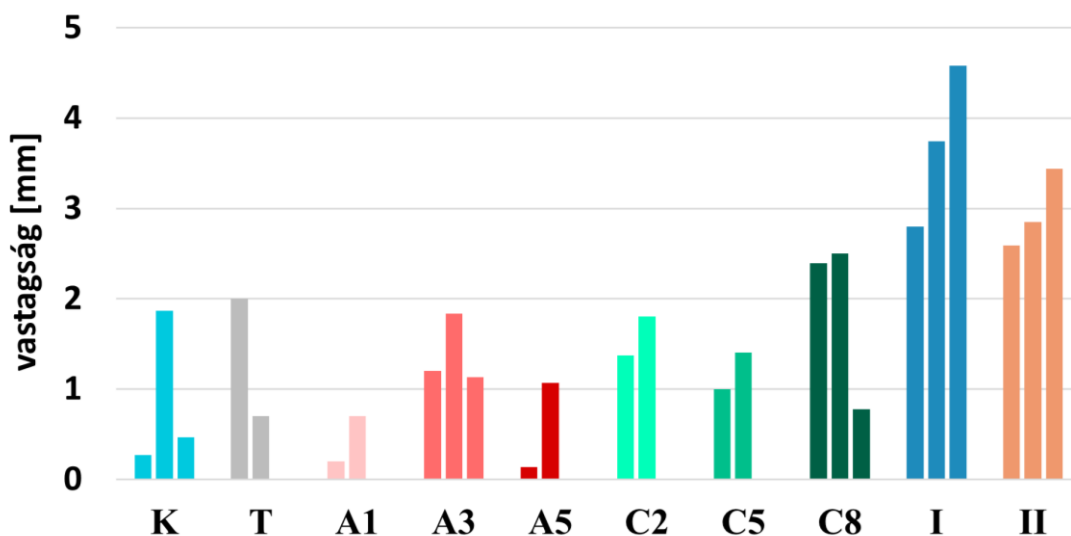
- ultraszűrő membránmodul alkalmazása membrán gradosztát reaktorként;
- fermentlé szűrési sajátosságainak, valamint a modulok inokulálásának – mint szűrési eljárásnak – jellemzése;
- *S. coelicolor* telepek terjedésének nyomon követése lapmembránokon;
- egyedi kapilláris szálak modellrendszer megalkotása;
 - inokulálási segédanyagok tesztelése,
 - hosszútávú működtetés megvalósítása,
- SevenBore membránnal kialakított, méretnövelt MGR üzemeltetése, és a termosztálás hatásának vizsgálata.

Az elért eredményeket az egyes kísérleteknél részletesen ismertettem, azonban néhány jelenség vizsgálata több kísérleten is átível, így ezeket külön kiemelve összefoglalom a jelen fejezetben.

A membrán gradosztát reaktornál tett megfigyeléseim bemutatásánál (5.1. fejezet) már említettem, hogy az aktinorodin termelődéséhez nem szükséges a tápanyag-limitáció, hiszen az inokulálás sikertelensége folytán az aktinorodint termelő telepek is akadálytalanul hozzáfértek a betáplált oldathoz. Ezt a megállapítást alátámasztja, hogy az egyedi kapilláris szálakban megfigyelt eltömődés esetén (5.4.3. fejezet) a lumenben lévő sejtek színe megegyezett a membrán külső felületén megtapadt sejtek piros színével, holott a lumenben közvetlenül érintkeztek a tápoldattal. Továbbá mind a hosszú távon üzemeltetett egyedi kapilláris szálak (5.4.2. fejezet), mind a SevenBore membránokkal kialakított MGR (5.5. fejezet) esetén a cukorkomponensek jelentős része megtalálható volt a permeátumban a szekunder metabolitot termelő biofilmek esetén is (bár az egyéb tápanyagok, nyomelemek mennyiségéről nincs információ). Az aktinorodin képződését kiváltó pontos okot a mért adatok alapján nem lehet meghatározni, feltételezésem szerint a sejtek öregedésével, esetleg bizonyos metabolitok intracelluláris felhalmozódásával összefüggő, genetikai program szerinti termelés zajlott.

Az inokulálást követően a telepek növekedése és terjedése a kísérleti körülményektől függően eltérő módon alakult. Az ultraszűrő membránmodulon nem történt szemmel látható növekedés, a telepek a kiindulási helyükön maradván léptek az élelciklus későbbi fázisaiba. A hasonló geometriájú, de más anyagú egyedi kapilláris szálak esetén az idő előrehaladtával jellemzően javult a membrán borítottsága, bár a teljes felület kolonizációja néhány kivételtől eltekintve nem történt meg. A lapmembránokkal végzett kísérletek során megállapítottam, hogy a hidrofíl membránokon a szilárd táptalajhoz képest lassabban, de azonos növekedési kinetikával zajlik a terjedés, hidrofób membránon viszont – az ultraszűrő modulhoz hasonlóan – nem tapasztaltam számottevő növekedést. Összességében tehát arra a következtetésre jutottam, hogy bár a *Streptomyces* fajokra valóban kevésbé jellemző az erőteljes kolonizáció, a sejtek terjedését jelentősen meghatározza a membrán anyaga és felületi tulajdonságai, hidrofíl vagy hidrofób karaktere.

A biofilm vastagságát illetően érdemes összehasonlítani az egyedi kapilláris szálak és a SevenBore membránok esetén elért eredményeket, melyeket a 6.1. ábra szemléltet. (A kapilláris szálaknál a párhuzamosok átlagos vastagságait, a SevenBore membránoknál a három szakasz átlagos vastagságait mutatják az egyes oszlopok.) A kísérletek időtartamának azonosságának – 20, illetve 21 nap – köszönhetően a különböző rendszereknél mért értékek egymással összehasonlíthatók.



6.1. ábra: Egyedi kapilláris szálak és SevenBore membránok esetén elért biofilmvastagságok összehasonlítása [saját ábra]

Az adatok alapján a SevenBore membránok esetén jellemzően 2 – 5-szöröse az elért vastagság a kapillárisoknál mértnek. Mivel az A3-as kapillárisokhoz képest – vagyis azonos inokulálási segédanyag esetén – is 2-3-szoros növekedést tapasztaltam, a nagyobb biofilmvastagság a két rendszer különbségeinek, feltehetően a jobb tápanyag-ellátottságnak, illetve a membrán tulajdonságainak az eredménye.

Fontosnak tartom kiemelni, hogy a C8-as beállításnál két párhuzamos minta eredménye is jó közelítéssel megegyezik mindkét SevenBore felső szakaszán mért értékkel. Ez tovább erősíti a kapillárisok kiértékelésénél tett megjegyzésemet, miszerint a 8 g/l koncentrációban alkalmazott CMC-vel érdemes lehet további kísérleteket végezni. (Bár a 6.1. ábra alapján a C8-as beállítás kedvezőbben tűnhet az A3-asnál, ez az elemzés nem veszi figyelembe a membrán felületének borítottságát, ami a gradosztát koncepciója szempontjából az egyik leglényesebb paraméter.)

A kutatásom során elért számszerűsíthető eredmények mellett legalább ilyen fontosnak érzem a gyakorlati munka során tett megfigyeléseket és a kevésbé sikeres kísérletekből levont tanulságokat, melyek nagymértékben hozzájárulhatnak a membrán gradosztát reaktorban lezajló folyamatok megértéséhez és a technológia további fejlesztéséhez.

7. Tézispontok

Szűrési kísérletek

- I. *Streptomyces coelicolor* fermentlé szakaszos üzemmódú (dead-end) szűrése során igazoltam, hogy a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának pH-függését a fermentlé kora befolyásolja, továbbá megállapítottam, hogy a szűrési egyenlet szerinti összefüggés, miszerint a szűrőlepeny fajlagos ellenállása fordítottan arányos a viszkozitással, csak korlátozottan érvényesül.**
- A szűrést 4-es, 7-es és 9-es pH-értékeken végezve, a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának 48 órás fermentlé esetén minimuma, 96 órás fermentlé esetén pedig maximuma volt 7-es pH-értéken.
 - 96 óra fermentációs idő esetén a szűrőlepeny fajlagos ellenállásának minimuma és a fermentlé viszkozitásának maximuma nem esett egybe.
- II. Megállapítottam, hogy Pentair X-Flow és Microdyn-Nadir Ultradyn membránmodulok a kísérleti paraméterek mellett az elégtelen sejtdhézio miatt nem alkalmazhatók membrán gradosztát reaktorként.**
- Streptomyces coelicolor* baktérium 48 óra, illetve 168 óra fermentációs idejű, 7-es pH-jú fermentleve a rászűrési inokulálás során sem a pórusedződés, sem a gélrétegképződés nem volt számottevő.

A szűrési kísérletekhez tartozó tézispontok az alábbi publikációban jelentek meg:

P. Lajtai-Szabó, É. Hülber-Beyer, V. Z. Vonyó, M. G. Szigeti, N. Nemestóthy, and K. Bélafi-Bakó, 'Novel Insights into Filtration Studies of *Streptomyces Coelicolor* Fermentation Broth for Inoculation of Membrane Gradostat Reactor', *J. Membr. Sci. Res.*, vol. 11, no. 1, 2025, doi: 10.22079/jmsr.2024.2041305.1680.

Lapmembrános kísérletek

- III. Megállapítottam, hogy 0,22 és 0,45 μm pórusméretű, hidrofil PVDF membránokon a *Streptomyces coelicolor* telepek terjedése a szilárd táptalajon történő növekedésnél lassabb, de a növekedési kinetika jellege a membrán hatására nem változik az első 13 nap során.**
- A Gompertz-modell maximális területi növekedés relatív sebessége (k) és lag-fázis időtartama (λ) paramétereinek szorzata (mely a növekedési kinetika jellegére jellemző adat) 0,22 és 0,45 μm pórusméretű membránon, illetve szilárd táptalajon egy nagyságrendbe esik (értékük rendre 0,58; 0,63 és 0,43).

Egyedi kapilláris szálak

A membrán gradosztát reaktor vizsgálatára kidolgozott modellrendszer alkalmas az egyedi kapilláris membránszálakon kialakuló biofilmek megfigyelésére, nagyszámú párhuzamos mérés elvégzésére. A kísérleti modellrendszerre használati mintaoltalmat nyújtottam be.

IV. A fenti rendszerben kialakított *Streptomyces coelicolor* biofilm vastagságát és a membrán felületének borítottságát vizsgáló kísérletek során igazoltam, hogy a vastagság és a borítottság között – főkomponens-analízis módszert alkalmazva – nincs korreláció. Továbbá a biofilm vastagságát és a membrán felületének borítottságát együttesen figyelembe véve a 3 g/l koncentrációban alkalmazott agaroldat bizonyult a legmegfelelőbbnek.

- i. A vizsgált inokulálási segédanyagok – tween 80 (1 %), agar (1, 3 és 5 g/l) és karboximetil-cellulóz (2, 5 és 8 g/l) – közül egyedül a 3 g/l-es agaroldat mintái estek a főkomponensek síkjának optimális tartományába mindhárom párhuzamos esetén.

A IV. tézispontot a 19. Aachener Membran Kolloquium (Németország, Aachen, 2024.12.03-05.) konferencián mutattam be poszter formájában:

Piroska Lajtai-Szabó, Éva Hülber-Beyer, Nándor Nemestóthy: Inoculation techniques of single capillary membrane with *Streptomyces coelicolor*.

V. *Streptomyces coelicolor*ral elsőként üzemeltettem hosszútávon membrán gradosztát reaktort. A termékképződés a kísérlet teljes időtartama (45 nap) alatt folyamatos volt, a termékképződési sebesség 2,2 és 6,3 $\mu\text{g} / (\text{nap} \cdot \text{cm}^2 \text{ membránfelület})$ értékek között változott.

Az V. tézispontot az alábbi konferencián mutattam be:

Lajtai-Szabó Piroska: Inokulálás és biofilm-fejlődés vizsgálata membrán gradosztát reaktor modellrendszerben, Műszaki Kémiai Napok'25 (Veszprém, 2025.04.15-17.)

SevenBore

VI. Elsőként vizsgáltam SevenBore típusú membrán alkalmazhatóságát membrán gradosztát reaktorban, és *Streptomyces coelicolor* baktériummal inokulálva stabil, egybefüggő biofilmet alakítottam ki a membrán felületén, míg a lumen sejtmentes maradt.

- i. A rendszer általános membrán bioreaktorként alkalmazható a gradiens igazolható kialakulása nélkül.
- ii. A 31 °C-os termosztálás eredményeként a biofilm víztartalma 6 %-kal, az összesen keletkező aktinorodin mennyisége (száraz biofilmre vetítve) 29 %-kal növekedett a termosztálás nélküli rendszerhez képest.

A VI. tézispont a MEMSEP & PERMEA 2025 (Chorzów, Lengyelország, 2025.06.24-26.) konferencián került bemutatásra poszter formájában:

Éva Hülber-Beyer, Piroska Lajtai-Szabó, Viktória Zoltána Vonyó: Cultivation of actinorodin producing *Streptomyces coelicolor* on microstructured PES membrane surface.

8. Irodalomjegyzék

- [1] B. Ruiz *et al.*, ‘Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source’, *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 146–167, 2010, doi: 10.3109/10408410903489576.
- [2] R. Geris, V. Jesus, A. Ferreira da Silva, and M. Malta, ‘Exploring Culture Media Diversity to Produce Fungal Secondary Metabolites and Cyborg Cells’, *Chem. Biodivers.*, vol. 21, p. e202302066, Feb. 2024, doi: 10.1002/cbdv.202302066.
- [3] B. Sevella, *Biomérnöki műveletek és folyamatok*, 2. javított kiadás. Budapest: Typotex, 2011.
- [4] B. B. Marks, M. A. Nogueira, and M. Hungria, ‘Microbial Secondary Metabolites and Their Use in Achieving Sustainable Agriculture: Present Achievements and Future Challenges’, *Agronomy*, vol. 15, no. 6, 2025, doi: 10.3390/agronomy15061350.
- [5] J. Wink, F. Mohammadipanah, and J. Hamed, *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. 2017. doi: 10.1007/978-3-319-60339-1.
- [6] A. L. Demain and A. Fang, ‘The Natural Functions of Secondary Metabolites’, in *History of Modern Biotechnology I*, A. Fiechter, Ed., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000, pp. 1–39. doi: 10.1007/3-540-44964-7_1.
- [7] S. M. Abdel-Aziz, M. M. A. Elsoud, and A. A. H. Anise, ‘Chapter 2 - Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products’, in *Food Biosynthesis*, A. M. Grumezescu and A. M. Holban, Eds., in Handbook of Food Bioengineering. , Academic Press, 2017, pp. 25–54. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811372-1.00003-8>.
- [8] R. De Souza Rodrigues *et al.*, ‘Biotechnological potential of actinomycetes in the 21st century: a brief review’, *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 117, no. 1, p. 82, Dec. 2024, doi: 10.1007/s10482-024-01964-y.
- [9] P. M. Wright, I. B. Seiple, and A. G. Myers, ‘The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery’, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, no. 34, pp. 8840–8869, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201310843>.
- [10] K. Okaiyeto, U. U. Nwodo, S. A. Okoli, L. V. Mabinya, and A. I. Okoh, ‘Implications for public health demands alternatives to inorganic and synthetic flocculants: bioflocculants as important candidates’, *MicrobiologyOpen*, vol. 5, no. 2, pp. 177–211, Apr. 2016, doi: 10.1002/mbo3.334.
- [11] Y. Raheja, P. Sharma, P. Gaur, V. K. Gaur, and J. K. Srivastava, ‘Advancing bioremediation: biosurfactants as catalysts for sustainable remediation’, *Biodegradation*, vol. 36, no. 3, p. 33, Jun. 2025, doi: 10.1007/s10532-025-10128-2.
- [12] J. C. V. dos Santos, A. F. de Santana Costa, T. A. de Lima e Silva, L. A. Sarubbo, and J. M. de Luna, ‘New Trends in the Textile Industry: Utilization and Application of Biosurfactants’, in *Advancements in Biosurfactants Research*, R. Aslam, M. Mobin, J. Aslam, and S. Zehra, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2023, pp. 215–223. doi: 10.1007/978-3-031-21682-4_11.
- [13] M. P. Narsing Rao, M. Xiao, and W.-J. Li, ‘Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications’, *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 1113, Jun. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01113.
- [14] ‘U.S. Food & Drug Administration hivatalos weboldala’. Accessed: Jun. 18, 2025. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>
- [15] D. Xie, ‘Continuous biomanufacturing with microbes — upstream progresses and challenges’, *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 78, p. 102793, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.copbio.2022.102793.

- [16] G. Liu, K. F. Chater, G. Chandra, G. Niu, and H. Tan, ‘Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*’, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, no. 1, pp. 112–143, 2013, doi: 10.1128/membr.00054-12.
- [17] Khushboo, P. Kumar, K. K. Dubey, Z. Usmani, M. Sharma, and V. K. Gupta, ‘Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites’, *Biofuels Bioprod. Biorefining*, vol. 16, no. 1, pp. 244–264, 2022, doi: <https://doi.org/10.1002/bbb.2294>.
- [18] C. Rex M, B. Akshaya, L. Ravi, and K. Krishnan, ‘Production of Vitamin B12 from *Streptomyces* Species’, 2022, pp. 661–666. doi: 10.1007/978-1-0716-1728-1_97.
- [19] S. Schlimpert and M. A. Elliot, ‘The Best of Both Worlds—*Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces venezuelae* as Model Species for Studying Antibiotic Production and Bacterial Multicellular Development’, *J. Bacteriol.*, vol. 205, no. 7, pp. e00153-23, Jul. 2023, doi: 10.1128/jb.00153-23.
- [20] S. D. Bentley *et al.*, ‘Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)’, *Nature*, vol. 417, no. 6885, pp. 141–147, 2002, doi: 10.1038/417141a.
- [21] P. A. Hoskisson and G. P. Van Wezel, ‘*Streptomyces coelicolor*’, *Trends Microbiol.*, vol. 27, no. 5, pp. 468–469, May 2019, doi: 10.1016/j.tim.2018.12.008.
- [22] M. Göker, ‘Filling the gaps: missing taxon names at the ranks of class, order and family’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 72, no. 12. Microbiology Society, 2023. doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005638>.
- [23] S. Barbuto Ferraiuolo, M. Cammarota, C. Schiraldi, and O. F. Restaino, ‘Streptomycetes as platform for biotechnological production processes of drugs’, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 105, no. 2, pp. 551–568, Jan. 2021, doi: 10.1007/s00253-020-11064-2.
- [24] M. Goodfellow, ‘Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov.’, 2012, pp. 33–2028. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4_3.
- [25] A. Gunjal and D. S. Bhagat, ‘Chapter 7 - Diversity of actinomycetes in Western Ghats’, in *Microbial Diversity in Hotspots*, A. Gunjal and S. Shinde, Eds., Academic Press, 2022, pp. 117–133. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90148-2.00007-9>.
- [26] ‘DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH’. [Online]. Available: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-40783>
- [27] N. Makarani and R. S. Kaushal, ‘Advances in actinobacteria-based bioremediation: mechanistic insights, genetic regulation, and emerging technologies’, *Biodegradation*, vol. 36, no. 2, Apr. 2025, doi: 10.1007/s10532-025-10118-4.
- [28] R. E. De Lima Procópio, I. R. Da Silva, M. K. Martins, J. L. De Azevedo, and J. M. De Araújo, ‘Antibiotics produced by *Streptomyces*’, *Braz. J. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 5, pp. 466–471, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.014.
- [29] A. R. Muok and A. Briegel, ‘Intermicrobial Hitchhiking: How Nonmotile Microbes Leverage Communal Motility’, *Trends Microbiol.*, vol. 29, no. 6, pp. 542–550, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.tim.2020.10.005.
- [30] A. R. Muok, D. Claessen, and A. Briegel, ‘Microbial hitchhiking: how *Streptomyces* spores are transported by motile soil bacteria’, *ISME J.*, vol. 15, no. 9, pp. 2591–2600, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41396-021-00952-8.
- [31] P. Yagüe, M. T. López-García, B. Rioseras, J. Sánchez, and Á. Manteca, ‘Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives’, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 342, no. 2, pp. 79–88, May 2013, doi: 10.1111/1574-6968.12128.
- [32] R. Del Sol, I. Armstrong, C. Wright, and P. Dyson, ‘Characterization of Changes to the Cell Surface during the Life Cycle of *Streptomyces coelicolor*: Atomic Force Mic-

- roscopy of Living Cells’, *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 6, pp. 2219–2225, Mar. 2007, doi: 10.1128/JB.01470-06.
- [33] A. Dragoš, Á. T. Kovács, and D. Claessen, ‘The Role of Functional Amyloids in Multicellular Growth and Development of Gram-Positive Bacteria’, *Biomolecules*, vol. 7, no. 3, p. 60, Aug. 2017, doi: 10.3390/biom7030060.
- [34] P. A. Hoskisson, F. Barona-Gómez, and D. E. Rozen, ‘Phenotypic heterogeneity in *Streptomyces* colonies’, *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 78, p. 102448, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.mib.2024.102448.
- [35] P. Lajtai-Szabó, É. Hülber-Beyer, N. Nemestóthy, and K. Bélafi-Bakó, ‘The role of physical support in secondary metabolite production by *Streptomyces* species’, *Biochem. Eng. J.*, vol. 185, p. 108495, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.bej.2022.108495.
- [36] K. Flärdh and M. J. Buttner, ‘*Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium’, *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 1, pp. 36–49, Jan. 2009, doi: 10.1038/nrmicro1968.
- [37] Á. Manteca, M. Fernández, and J. Sánchez, ‘A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*’, *Microbiology*, vol. 151, no. 11. Microbiology Society, pp. 3689–3697, 2005. doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28045-0>.
- [38] Manteca Angel, Alvarez Ruben, Salazar Nuria, Yagüe Paula, and Sanchez Jesus, ‘Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*’, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 12, pp. 3877–3886, Jun. 2008, doi: 10.1128/AEM.02715-07.
- [39] Á. Manteca and P. Yagüe, ‘*Streptomyces* Differentiation in Liquid Cultures as a Trigger of Secondary Metabolism’, *Antibiotics*, vol. 7, no. 2, 2018, doi: 10.3390/antibiotics7020041.
- [40] D. Van Dissel, D. Claessen, and G. P. Van Wezel, ‘Morphogenesis of *Streptomyces* in Submerged Cultures’, in *Advances in Applied Microbiology*, vol. 89, Elsevier, 2014, pp. 1–45. doi: 10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9.
- [41] G. Van Keulen and P. J. Dyson, ‘Production of Specialized Metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2)’, in *Advances in Applied Microbiology*, vol. 89, Elsevier, 2014, pp. 217–266. doi: 10.1016/B978-0-12-800259-9.00006-8.
- [42] A. A. Sarmiento-Tovar, L. Silva, J. Sánchez-Suárez, and L. Diaz, ‘*Streptomyces*-Derived Bioactive Pigments: Ecofriendly Source of Bioactive Compounds’, *Coatings*, vol. 12, no. 12, 2022, doi: 10.3390/coatings12121858.
- [43] ‘Szekunder metabolitok szerkezeti képlete’, PubChem (National Library of Medicine). Accessed: Jun. 25, 2025. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [44] L. V. Bystrykh, M. A. Fernández-Moreno, J. K. Herrema, F. Malpartida, D. A. Hopwood, and L. Dijkhuizen, ‘Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2)’, *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 8, pp. 2238–2244, Apr. 1996, doi: 10.1128/jb.178.8.2238-2244.1996.
- [45] N. M. Nass *et al.*, ‘Revisiting unexploited antibiotics in search of new antibacterial drug candidates: the case of γ -actinorhodin’, *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 17419, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17232-1.
- [46] H. Onaka and S. Asamizu, ‘7.24 - Metabolite Induction via Microorganism Symbiosis and Co-Culturing: A Potential Way to Enhance Chemical Diversity’, in *Comprehensive Natural Products III*, H.-W. (Ben) Liu and T. P. Begley, Eds., Oxford: Elsevier, 2020, pp. 487–501. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14692-X>.
- [47] S. Mak and J. R. Nodwell, ‘Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells’, *Mol. Microbiol.*, vol. 106, no. 4, pp. 597–613, 2017, doi: <https://doi.org/10.1111/mmi.13837>.

- [48] N. Stankovic, L. Senerovic, T. Ilic-Tomic, B. Vasiljevic, and J. Nikodinovic-Runic, 'Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 9, pp. 3841–3858, May 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5590-1.
- [49] G. A. Islan, B. Rodenak-Kladniew, N. Noacco, N. Duran, and G. R. Castro, 'Prodigiosin: a promising biomolecule with many potential biomedical applications', *Bioengineered*, vol. 13, no. 6, pp. 14227–14258, Jun. 2022, doi: 10.1080/21655979.2022.2084498.
- [50] E. Palazzotto *et al.*, 'Tryptophan promotes morphological and physiological differentiation in *Streptomyces coelicolor*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 23, pp. 10177–10189, 2015. doi: 10.1007/s00253-015-7012-4.
- [51] D. Kong, X. Wang, J. Nie, and G. Niu, 'Regulation of Antibiotic Production by Signaling Molecules in *Streptomyces*', *Front. Microbiol.*, vol. 10, Dec. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02927.
- [52] U. Hölker, M. Höfer, and J. Lenz, 'Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, no. 2, pp. 175–186, Apr. 2004, doi: 10.1007/s00253-003-1504-3.
- [53] V. Kumar, V. Ahluwalia, S. Saran, J. Kumar, A. K. Patel, and R. R. Singhanian, 'Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions', *Bioresour. Technol.*, vol. 323, p. 124566, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2020.124566.
- [54] L. Giorno, L. De Bartolo, and E. Drioli, 'Membrane Bioreactors', *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, vol. 2. 2011. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00101-X.
- [55] R. W. Lovitt and J. W. T. Wimpenny, 'The Gradostat: a Bidirectional Compound Chemostat and its Application in Microbiological Research', *Microbiology*, vol. 127, no. 2. Microbiology Society, pp. 261–268, 1981. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-127-2-261>.
- [56] S. K. O. Ntwampe, M. S. Sheldon, and H. Volschenk, 'The Membrane Gradostat Reactor: Secondary metabolite production, bioremediation and commercial potential', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 6, no. 10, pp. 1164–1170, May 2007, doi: 10.5897/AJB2007.000-2155.
- [57] W. D. Leukes, E. P. Jacobs, P. D. Rose, S. G. Burton, and R. D. Sanderson, 'Method of producing secondary metabolites', US005945002A, 1999
- [58] S. Govender, E. P. Jacobs, W. D. Leukes, and V. L. Pillay, 'A scalable membrane gradostat reactor for enzyme production using', *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, pp. 127–131, 2003.
- [59] S. K. O. Ntwampe, M. S. Sheldon, and H. Volschenk, 'Limitations of a membrane gradostat bioreactor designed for enzyme production from biofilms of *Phanerochaete chrysosporium*', *Water Sci. Technol.*, vol. 58, no. 11, pp. 2259–2270, Dec. 2008, doi: 10.2166/wst.2008.586.
- [60] P. Lajtai-Szabó and É. Hülber-Beyer, 'The Concept and Practical Challenges of Membrane Gradostat Reactors', *Hung. J. Ind. Chem.*, vol. 53, no. 1, pp. 61–66, Jun. 2025, doi: 10.33927/hjic-2025-07.
- [61] S. Govender, 'Biofilm productivity and concomitant cell autolysis in a membrane bioreactor', *Biotechnol. Lett.*, vol. 33, no. 2, pp. 263–271, Feb. 2011, doi: 10.1007/s10529-010-0443-1.
- [62] B. Godongwana, 'Effectiveness Factors and Conversion in a Biocatalytic Membrane Reactor', *PLOS ONE*, vol. 11, no. 4, p. e0153000, Apr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153000.

- [63] B. Godongwana, D. Solomons, and M. S. Sheldon, 'A solution of the convective-diffusion equation for solute mass transfer inside a capillary membrane bioreactor', *International Journal of Chemical Engineering*. 2010. doi: 10.1155/2010/738482.
- [64] B. Godongwana, M. Sheldon, and D. Solomons, 'A Theoretical Analysis of Solute Transport through a Membrane Bioreactor', *Proceedings of the 2nd International Conference on Fluid Flow, Heat and Mass Transfer*. Ottawa, Ontario, Canada, Apr. 30, 2015. [Online]. Available: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85146697369&partnerID=40&md5=adc9359af34e004a33fc3a5c4d651884>
- [65] A. K. Luke and S. G. Burton, 'A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols', *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 29, no. 6–7, pp. 348–356, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0141-0229(01)00390-8.
- [66] S. Govender, E. Jacobs, W. Leukes, B. Odhav, and V. Pillay, 'Towards an optimum spore immobilisation strategy using *Phanerochaete chrysosporium*, reverse filtration and ultrafiltration membranes', *J. Membr. Sci.*, vol. 238, no. 1–2, pp. 83–92, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.memsci.2004.03.023.
- [67] M. Sheldon and H. Small, 'Immobilisation and biofilm development of on polysulphone and ceramic membranes', *J. Membr. Sci.*, vol. 263, no. 1–2, pp. 30–37, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.memsci.2005.04.014.
- [68] S. K. O. Ntwampe and M. S. Sheldon, 'Quantifying growth kinetics of *Phanerochaete chrysosporium* immobilised on a vertically orientated polysulphone capillary membrane: Biofilm development and substrate consumption', *Biochem. Eng. J.*, vol. 30, no. 2, pp. 147–151, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.bej.2006.03.001.
- [69] M. S. Sheldon, K. Mohammed, and S. K. O. Ntwampe, 'An investigation of biphasic growth kinetics for *Phanerochaete chrysosporium* (BKMF-1767) immobilised in a membrane gradostat reactor using flow-cells', *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 42, no. 4, pp. 353–361, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.10.017.
- [70] S. K. O. Ntwampe, M. S. Sheldon, and H. Volschenk, 'Oxygen mass transfer for an immobilised biofilm of *Phanerochaete chrysosporium* in a membrane gradostat reactor', *Braz. J. Chem. Eng.*, vol. 25, no. 04, 2008.
- [71] B. Godongwana, M. S. Sheldon, and D. M. Solomons, 'Momentum transfer inside a vertically orientated capillary membrane bioreactor', *J. Membr. Sci.*, vol. 303, no. 1–2, pp. 86–99, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.memsci.2007.06.070.
- [72] B. Godongwana, D. De Jager, M. S. Sheldon, and W. Edwards, 'The effect of *Streptomyces coelicolor* development on the hydrodynamics of a vertically orientated capillary membrane gradostat reactor', *J. Membr. Sci.*, vol. 333, no. 1–2, pp. 79–87, May 2009, doi: 10.1016/j.memsci.2009.01.051.
- [73] D. De Jager, M. S. Sheldon, and W. Edwards, 'Modelling growth kinetics of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in a pressurised membrane gradostat reactor (MGR)', *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 45, no. 6, pp. 449–456, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.08.010.
- [74] S. K. O. Ntwampe and M. S. Sheldon, 'Effect of a perfluorocarbon-Pluronic F 68-based emulsion on a *Phanerochaete chrysosporium* biofilm immobilised in a membrane gradostat bioreactor', *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 1, pp. 101–110, Jan. 2010, doi: 10.1002/apj.383.
- [75] S. Govender, V. L. Pillay, and B. Odhav, 'Nutrient manipulation as a basis for enzyme production in a gradostat bioreactor', *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 46, no. 7, pp. 603–609, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.007.
- [76] S. Kargar, S. Mohseny Takloo, H. Jalili, J. NoorMohammedi, A. Babaei, and M. Bizukoje, 'Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in membrane gradostat bioreactor

- with two-stage feeding strategy', *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 53, no. 3, pp. 247–254, Mar. 2023, doi: 10.1080/10826068.2022.2076242.
- [77] S. Mohseny Takloo, S. Kargar, H. Jalili, A. Babaei, and A. Amrane, 'Novel approaches to improve lovastatin production in membrane gradostat bioreactor', *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 59, p. 103273, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.bcab.2024.103273.
- [78] E. P. Jacobs and W. D. Leukes, 'Formation of an externally unskinned polysulfone capillary membrane', *J. Membr. Sci.*, vol. 121, no. 2, pp. 149–157, Dec. 1996, doi: 10.1016/s0376-7388(96)00172-x.
- [79] P. Lajtai-Szabó, 'Membrán gradosztat reaktorok', *Membrántechnika És Ipari Biotechnológia*, vol. XII, no. 2, pp. 21–25, 2021.
- [80] W. D. Leukes, 'Development and Characterisation of a Membrane Gradostat Bioreactor for the Bioremediation of Aromatic Pollutants using White Rot Fungi', PhD diss., Rhodes University, Makhanda, Eastern Cape, South Africa, 1999.
- [81] J. Shoji, T. Kikuma, and K. Kitamoto, 'Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity', *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 20, pp. 1–9, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.03.002>.
- [82] M. Perwez and S. Al Asheh, 'Valorization of agro-industrial waste through solid-state fermentation: Mini review', *Biotechnology Reports*, vol. 45, 2025. doi: 10.1016/j.btre.2024.e00873.
- [83] A. Sánchez *et al.*, 'Solid-state fermentation: a review of its opportunities and challenges in the framework of circular bioeconomy', *Afinidad*, vol. 81, no. 601, pp. 50–56, 2024. doi: 10.55815/424209.
- [84] T. T. More, J. S. S. Yadav, S. Yan, R. D. Tyagi, and R. Y. Surampalli, 'Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications', *J. Environ. Manage.*, vol. 144, pp. 1–25, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.jenvman.2014.05.010.
- [85] U. Homero, G. Tortella, E. Sandoval, and S. A. Cuozzo, 'Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Streptomyces* sp. biofilms: Chemical composition and anticancer properties', *Microbiol. Res.*, vol. 253, p. 126877, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.micres.2021.126877.
- [86] O. Grari *et al.*, 'A comprehensive review on biofilm-associated infections: Mechanisms, diagnostic challenges, and innovative therapeutic strategies', *Microbe (Netherlands)*, vol. 8, 2025. doi: 10.1016/j.microb.2025.100436.
- [87] S. Wu, H. Huo, Y. Shi, F. Zhang, T. Gu, and Z. Li, 'Extraction and application of extracellular polymeric substances from fungi', in *Advances in Applied Microbiology*, vol. 125, Elsevier, 2023, pp. 79–106. doi: 10.1016/bs.aambs.2023.08.001.
- [88] Y. Kourde-Hanafi *et al.*, 'Influence of PVP content on degradation of PES/PVP membranes: Insights from characterization of membranes with controlled composition', *J. Membr. Sci.*, vol. 533, pp. 261–269, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.03.050>.
- [89] M. Elibol, 'Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology', *Process Biochem.*, vol. 39, no. 9, pp. 1057–1062, May 2004, doi: 10.1016/S0032-9592(03)00232-2.
- [90] D. Holtmann *et al.*, 'Effects of particle addition to *Streptomyces* cultivations to optimize the production of actinorhodin and streptavidin', *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 5, pp. 67–71, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.scp.2016.09.001.
- [91] C. Wang *et al.*, 'Membrane fouling mechanism in ultrafiltration of succinic acid fermentation broth', *Bioresour. Technol.*, vol. 116, pp. 366–371, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.099.

- [92] R. Petron, 'Why Soaking PVDF Membranes in Methanol?' Accessed: May 15, 2025. [Online]. Available: <https://petronthermoplast.com/blogs/why-soaking-pvdf-membranes-in-methanol/>
- [93] A. M. Pavone *et al.*, 'Digital Pathology: A Comprehensive Review of Open-Source Histological Segmentation Software', *BioMedInformatics*, vol. 4, no. 1. pp. 173–196, 2024. doi: 10.3390/biomedinformatics4010012.
- [94] R. Chotaliya, N. Mishra, A. Buch, and N. Prasad, 'A Review of Ocular Surface Impression Cytology Along with the Recommended Methodology', *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil Vidyapeeth*, vol. 18, no. 2. pp. 187–193, 2025. doi: 10.4103/mjdrdypu.mjdrdypu_265_24.
- [95] J. Wang and X. Guo, 'The Gompertz model and its applications in microbial growth and bioproduction kinetics: Past, present and future', *Biotechnology Advances*, vol. 72. 2024. doi: 10.1016/j.biotechadv.2024.108335.
- [96] Y. Cheng, J. Chen, M. Bao, L. Zhao, and Y. Li, 'The proliferation and colonization of functional bacteria on amorphous polyethylene terephthalate: Key role of ultraviolet irradiation and nonionic surfactant polysorbate 80 addition', *Chemosphere*, vol. 291, p. 132940, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132940>.
- [97] M. Finger *et al.*, 'Insights into *Streptomyces coelicolor* A3(2) growth and pigment formation with high-throughput online monitoring.', *Eng. Life Sci.*, vol. 23, no. 1, p. e2100151, Jan. 2023, doi: 10.1002/elsc.202100151.
- [98] J.-H. Lim, C.-R. Lee, V. Dhakshnamoorthy, J. S. Park, and S.-K. Hong, 'Molecular characterization of *Streptomyces coelicolor* A(3) SCO6548 as a cellulose 1,4- β -cellobiosidase', *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 363, no. 3, p. fnv245, Feb. 2016, doi: 10.1093/femsle/fnv245.
- [99] L. Kayser, 'Measure in photo online'. Accessed: Sep. 13, 2024. [Online]. Available: <https://eleif.net/photomeasure>
- [100] A. Vargha, *Többváltozós statisztika dióhéjban: Változó-orientált módszerek*. Pólya Kiadó, 2019.
- [101] T. M. Ndlovu, A. C. Ward, J. Glassey, J. Eskildsen, and G. Akay, 'Bioprocess intensification of antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in micro-porous culture', *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 799–806, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.01.052.
- [102] M. Li, T.-J. Kim, H.-J. Kwon, and J.-W. Suh, 'Effects of extracellular ATP on the physiology of *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 286, no. 1, pp. 24–31, Sep. 2008, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01248.x.
- [103] M. Moffa, D. Pasanisi, E. Scarpa, A. R. Marra, P. Alifano, and D. Pisignano, 'Secondary Metabolite Production from Industrially Relevant Bacteria is Enhanced by Organic Nanofibers', *Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 11, p. 1700313, Nov. 2017, doi: 10.1002/biot.201700313.
- [104] S. Jachlewski, W. D. Jachlewski, U. Linne, C. Bräsen, J. Wingender, and B. Siebers, 'Isolation of Extracellular Polymeric Substances from Biofilms of the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*', *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, Aug. 2015, doi: 10.3389/fbioe.2015.00123.
- [105] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, 'Protein measurement with the Folin phenol reagent.', *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, Nov. 1951.
- [106] A. K. Saha and C. F. Brewer, 'Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method', *Carbohydr. Res.*, vol. 254, pp. 157–167, Feb. 1994, doi: 10.1016/0008-6215(94)84249-3.

- [107] S. E. Jones and M. A. Elliot, ‘Streptomyces Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours’, *Trends Microbiol.*, vol. 25, no. 7, pp. 522–531, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.tim.2017.02.001.
- [108] S. E. Jones, L. Ho, C. A. Rees, J. E. Hill, J. R. Nodwell, and M. A. Elliot, ‘Streptomyces exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals’, *eLife*, vol. 6, p. e21738, Jan. 2017, doi: 10.7554/eLife.21738.
- [109] Y. J. Kim, J. Y. Song, M. H. Moon, C. P. Smith, S.-K. Hong, and Y. K. Chang, ‘pH shock induces overexpression of regulatory and biosynthetic genes for actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)’, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 76, no. 5, pp. 1119–1130, Oct. 2007, doi: 10.1007/s00253-007-1083-9.
- [110] P. Kumar and K. K. Dubey, ‘Mycelium transformation of *Streptomyces toxytricini* into pellet: Role of culture conditions and kinetics’, *Bioresour. Technol.*, vol. 228, pp. 339–347, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.002.
- [111] L. A. Hooper, H. C. Hollein, and C. S. Slater, ‘Microfiltration of *Streptomyces rimosus*: Cell Harvesting Process Studies’, *Sep. Sci. Technol.*, vol. 33, no. 12, pp. 1747–1765, Jan. 1998, doi: 10.1080/01496399808545903.
- [112] G. Foley, ‘A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions’, *J. Membr. Sci.*, vol. 274, no. 1–2, pp. 38–46, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.memsci.2005.12.008.
- [113] K. Graves, G. Rozeboom, M. Heng, and C. Glatz, ‘Broth conditions determining specific cake resistance during microfiltration of *Bacillus subtilis*’, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 2, pp. 346–352, Jun. 2006, doi: 10.1002/bit.20868.
- [114] K.-J. Hwang and M.-H. Tsai, ‘Cross-Flow Microfiltration of *Bacillus Subtilis* Broths under Various Culture Times’, *Sep. Sci. Technol.*, vol. 49, no. 6, pp. 803–810, Apr. 2014, doi: 10.1080/01496395.2013.871037.
- [115] X. Yang *et al.*, ‘The viscosity behaviors of bacterial suspensions or extracellular polymeric substances and their effects on aerobic granular sludge’, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 26, no. 29, pp. 30087–30097, Oct. 2019, doi: 10.1007/s11356-019-06012-1.
- [116] N. AlSawaftah, W. Abuwatfa, N. Darwish, and G. A. Husseini, ‘A Review on Membrane Biofouling: Prediction, Characterization, and Mitigation’, *Membranes*, vol. 12, no. 12, 2022, doi: 10.3390/membranes12121271.
- [117] H. Wolf and H. Schoppmann, ‘Streptomyces can grow through small filter capillaries’, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 57, no. 3, pp. 259–263, Feb. 1989, doi: 10.1111/j.1574-6968.1989.tb03345.x.
- [118] Y.-H. Yang *et al.*, ‘A novel function of *Streptomyces* integration host factor (sIHF) in the control of antibiotic production and sporulation in *Streptomyces coelicolor*’, *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 101, no. 3, pp. 479–492, Mar. 2012, doi: 10.1007/s10482-011-9657-z.
- [119] K. Quan *et al.*, ‘Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions’, *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 283–302, May 2022, doi: 10.1080/1040841X.2021.1962802.
- [120] S. De Silva, L. Kariyawasam Hetti Gamage, and V. R. Thapa, ‘Impact of Drought on Soil Microbial Communities’, *Microorganisms*, vol. 13, no. 7, 2025, doi: 10.3390/microorganisms13071625.

9. Publikációs jegyzék

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk, előadások

1. P. Lajtai-Szabó and É. Hülber-Beyer, ‘The Concept and Practical Challenges of Membrane Gradostat Reactors’, Hung. J. Ind. Chem., vol. 53, no. 1, pp. 61–66, Jun. 2025, doi: 10.33927/hjic-2025-07. **(Q4 besorolás, IF = 0,5)**
2. P. Lajtai-Szabó, É. Hülber-Beyer, V. Z. Vonyó, M. G. Szigeti, N. Nemestóthy, and K. Bélafi-Bakó, ‘Novel Insights into Filtration Studies of *Streptomyces Coelicolor* Fermentation Broth for Inoculation of Membrane Gradostat Reactor’, J. Membr. Sci. Res., vol. 11, no. 1, 2025, doi: 10.22079/jmsr.2024.2041305.1680. **(Q3 besorolás)**
3. P. Lajtai-Szabó, É. Hülber-Beyer, N. Nemestóthy, and K. Bélafi-Bakó, ‘The role of physical support in secondary metabolite production by *Streptomyces* species’, Biochem. Eng. J., vol. 185, p. 108495, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.bej.2022.108495. **(Q2 besorolás, IF = 3,8)**
4. P. Lajtai-Szabó, ‘Membrán gradosztát reaktorok’, Membrántechnika És Ipari Biotechnológia, vol. XII, no. 2, pp. 21–25, 2021.

Előadás:

1. Szekunder metabolitok előállítása *Streptomyces coelicolor* baktériummal; 50. Műszaki Kémiai Napok; 2022. április 26-28., Veszprém
2. Inokulálás és biofilm-fejlődés vizsgálata membrán gradosztát rektor modellrendszerben; 53. Műszaki Kémiai Napok; 2025. április 15-16., Veszprém

Posztterek:

1. 19. Aachener Membran Kolloquium (Aachen, Németország, 2024.12.03-05.); Piroska Lajtai-Szabó, Éva Hülber-Beyer, Nándor Nemestóthy: Inoculation techniques of single capillary membrane with *Streptomyces coelicolor*
2. MEMSEP & PERMEA 2025 (Chorzów, Lengyelország, 2025.06.24-26.); Éva Hülber-Beyer, Piroska Lajtai-Szabó, Viktória Zoltána Vonyó: Cultivation of actinorhodin producing *Streptomyces coelicolor* on microstructured PES membrane surface

Egyéb, a disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk, előadások

1. L. Koók et al., ‘Electrochemical and microbiological insights into the use of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-functionalized anion exchange membrane in microbial fuel cell: A benchmarking study with Nafion’, Sep. Purif. Technol., vol. 237, p. 116478, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116478>.

2. N. Nemestóthy, P. Bakonyi, P. Lajtai-Szabó, and K. Bélafi-Bakó, 'The Impact of Various Natural Gas Contaminant Exposures on CO₂/CH₄ Separation by a Polyimide Membrane', *Membranes*, vol. 10, no. 11, 2020, doi: 10.3390/membranes10110324.
3. L. Koók, P. Lajtai-Szabó, P. Bakonyi, K. Bélafi-Bakó, and N. Nemestóthy, 'Investigating the Proton and Ion Transfer Properties of Supported Ionic Liquid Membranes Prepared for Bioelectrochemical Applications Using Hydrophobic Imidazolium-Type Ionic Liquids', *Membranes*, vol. 11, no. 5, 2021, doi: 10.3390/membranes11050359.
4. P. Takács, N. Nemestóthy, I. Petrinic, and K. Bélafi-Bakó, 'Akvaporin membránok a vízkezelésben', *Membrántechnika És Ipari Biotechnológia*, vol. XI, no. 2, pp. 17–22, 2020.
5. P. Lajtai-Szabó, N. Nemestóthy, and L. Gubicza, 'The Role of Water Activity in Terms of Enzyme Activity and Enantioselectivity during Enzymatic Esterification in Non-conventional Media', *Hung. J. Ind. Chem.*, vol. 48, no. 2, pp. 9–12, Dec. 2020, doi: 10.33927/hjic-2020-22.
6. K. Bélafi-Bakó, P. Takács, and N. Nemestóthy, 'Újabb trendek a membránszeparációs műveletek területén', *Magy. Kémikusok Lapja*, vol. LXXV, no. 9, 2020.
7. K. Bélafi-Bakó and P. Takács, 'Akvaporinok – Biomimikri a vízkezelésben', *Termész. Világa*, vol. 151, no. 8, 2020.
8. P. Lajtai-Szabó, 'Tükörképek a biotechnológiában - Királis enzimek és membránok', *Termész. Világa*, vol. 152, no. 5, 2021.
9. P. Lajtai-Szabó, 'Királis fenilpropanol előállítása egész sejtes élesztő katalizátor alkalmazásával', *Membrántechnika És Ipari Biotechnológia*, vol. XII, no. 4, pp. 43–46, 2021.
10. K. Bélafi-Bakó and P. Lajtai-Szabó, Eds., *Biokatalízis az élelmiszeriparban és a könnyűiparban*. Veszprém: Pannon Egyetemi Kiadó, 2021.

Előadások:

1. Királis fenilpropanol előállítása élesztő katalizátorral; Műszaki Kémiai Nap 2021; 2021.04.21., Veszprém
2. Oxidoreduktáz enzimrendszerrel katalizált enantioszelektív reakció vizsgálata; Mérnöki Kari Konferencia; 2021.09.15., Veszprém
3. Production of chiral L-phenylpropanol by enantioselective biocatalysts; Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia; 2021.11.12-13., Pécs

10. Köszönetnyilvánítás

Bár a doktori képzés során önálló kutatási tevékenységet folytattam, a dolgozat és a benne foglalt eredmények nem jöhettek volna létre az alábbi személyek támogatása nélkül.

Elsőként dr. Nemestóthy Nándornak köszönöm meg a teljes egyetemi tanulmányaimat végigkísérő témavezetői munkáját. Az elmúlt tíz év során az elméleti és gyakorlati tudás átadása mellett teret adott a közös ötletelésnek, szakmai vitáknak is, és a legreménytelenebb helyzetekben is segített megtalálni a tovább vezető utat.

Hálával tartozom Bélafiné dr. Bakó Katalinnak, aki intézetvezetői szerepén messze túlmenően támogatott, és irodájának ajtaja mindig nyitva állt előttem.

Külön köszönöm Hülbérné dr. Beyer Évának, hogy „mentori” munkájának eredményeként mélyebben megismertem és megszerettem a mikrobiológiát. Számos kísérlet alapötletét és sikeres megvalósulását köszönhetem neki.

Köszönet illeti továbbá dr. Gubicza Lászlót a lektorálásért, dr. Koók Lászlót a statisztikai kiértékelésben és a tézispontok megfogalmazásában nyújtott segítségével, Szigeti Mártont a viszkozitásmérés elvégzéséért, dr. Komáromy Pétert a kísérletek során felmerülő technikai akadályok elhárításáért, Vonyó Viktória és Hujber Barbara hallgatókat a kísérleti munkában való részvételükért, valamint a Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutatóintézet valamennyi munkatársát, amiért részese lehettem a jó hangulatú szakmai közösségnek.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak, különösen Lajtai-Szabó Gergelynek és Takács-Nagy Júliának, hogy lehetővé tették a családi élet és a kutatás összehangolását.