

37. OTDK Biológia Szekció



**DEBRECENI
EGYETEM**

Aspergillus terreus és az itakonsav egy zöldebb jövőért

Készítette: Faggyas Flóra

Témavezető:
Bíró Vivien
Egyetemi tanársegéd

Témavezető:
Dr. Márton Alexandra
Tudományos segédmunkatárs

**Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai kar
Biomérnöki Tanszék**

Tartalom

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
1. Fermentáció	4
2. <i>Aspergillus terreus</i> és itakonsav	4
3. Az itakonsav fermentációja és képződésének biokémiája	6
4. A fermentáció nehézségei.....	7
3. Célkitűzés	7
4. Anyagok és módszerek.....	8
1. Táptalajkészítés, átoltás.....	8
2. A fermentáció előkészítése	9
3. Erlenmeyer-lombikok előkészítése	10
4. Mintavétel	10
5. Eredmények és kiértékelésük	12
1. 5 literes Mn^{2+} - mentes (kontrol) fermentáció	12
2. Mn^{2+} - ionok hatása a fermentációra a 24. órában	13
3. Mn^{2+} - ionok adagolása különböző koncentrációkban és időpontokban	15
5. PO_4^{3-} hatás vizsgálata	17
6. PO_4^{3-} hatás vizsgálata különböző időpontokban	18
7. Morfológiai eredmények a $Mn(II)$ -mentes fermentáció során	20
8. Morfológiai eredmények 30 ppb Mangán(II)-iont adagolva.....	20
9. Morfológiai eredmények PO_4^{3-} és Mn^{2+} ionok jelenlétében	22
6. Diskusszió	23
7. Köszönetnyilvánítás	25
8. Irodalomjegyzék	26

1. Bevezetés

Az *Aspergillus terreus* itakonsav fermentációjának mélyreható tanulmányozása a gazdasági és ipari szektorban rendkívüli fontossággal bír. Az *Aspergillus* nemzetség tagjaiként az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus terreus* kimagasló szervessav termelők, és az itakonsav azutóbbival történő előállításával, az iparban meghatározó szerephez jutott az elmúlt hat évtized során.¹

Az itakonsav egyre növekvő jelentőségű a mindennapi életben, különféle területeken megvalósuló alkalmazása révén. Egyik fő előnye, hogy alkalmas lehet a kőolaj alapú műanyagok helyettesítésére, hozzájárulva a fenntartható fejlődés eléréséhez. Konjugált kettős kötésinek köszönhetően egy reaktív vegyület,² ezért könnyen polimerizálható, így ezt a szerves savat új generációs polimerek alapanyagaként ismerhetjük meg, amelyek környezetbarát alternatívákat kínálnak a hagyományos műanyagokkal szemben.³

Az itakonsav további potenciális alkalmazási területe az egészségügy, különösen a daganatos betegségek kezelése terén rejlik. Az itakonsav alapú hatóanyagok rendkívül szelektíven képesek behatolni a daganatos sejtekbe, minimalizálva ezzel a káros hatásokat a normál sejtekre. Ezáltal az itakonsav alapú készítmények érdekes alternatívát nyújthatnak a hagyományos rákterápiákhoz képest, elősegítve a hatékony és kevésbé invazív kezelési lehetőségek kifejlődését.⁴

Ezek a felfedezések nem csupán az *Aspergillus terreus* itakonsav fermentációjának mechanizmusát tárják fel, hanem kiemelkedő lehetőségeket nyújtanak a fenntartható ipar és az egészségügy terén is. Az itakonsav széleskörű alkalmazása által teremtett innovációs lehetőségek hozzájárulhatnak a jövő környezetbarát, illetve hatékony ipari és egészségügyi megoldásaihoz.

¹ Dr. Kolláth István (2022): Doktori disszertáció, 1. old

² Willke, T. and K.-D. Vorlop (2001): *Biotechnological production of itaconic acid*. Applied Microbiology and Biotechnology, 56(3-4), 292. old

³ Fekete Erzsébet – Karaffa Levente (2013): Ipari Biotechnológia, Lektorálta: Dr. Tóth László osztályvezető (TEVA Gyógyszergyár ZRt.), Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar Biomérnöki Tanszék, 9.old

⁴ Ivana Perković, Maja Beus, Dominique Schols, Leentje Persoons, Branka Zorc, (Received: 8 July 2020 / Accepted: 28 September 2020 / Published online: 11 October 2020): *Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents*, Springer Nature Switzerland AG 2020., 7. old

2. Irodalmi áttekintés

1. Fermentáció

A fermentáció egy biokémiai folyamat, ami során mikroorganizmusok, például gombák, baktériumok vagy akár emlőssejtek biológiai úton különböző termékeket állítanak elő. Ez az eljárás kémiai változásokat indukál az alkotóelemekben, például cukrok lebontásával és más komplex vegyületek képzésével. A fermentáció lehetőséget teremt a gazdaságos és specifikus reakciók elvégzésére, és széles körű alkalmazása révén játszik kulcsfontosságú szerepet az élelmiszeripartól kezdve, a gyógyszeriparon át, más iparágakig.⁵

2. *Aspergillus terreus* és itakonsav

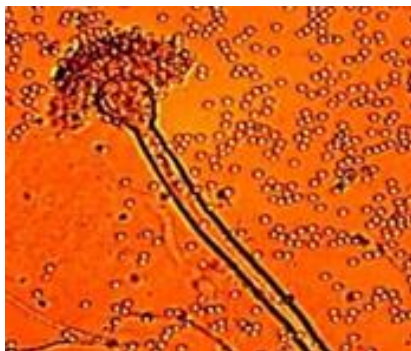
Az *Aspergillus* nemzetség tagjai a világ szinte minden táján előfordulnak. A nemzetség eddig leírt 350 tagjai között morfológiailag különbséget tenni szinte lehetetlen, így genomi szekvenciák alapján történik a fajmegkülönböztetés.⁶ Ezeknek a fonalas gombáknak fontos szerepük van a szerves anyagok körforgásában, mert széleskörű enzim expressziójuk hatására könnyen le tudják bontani a lignocellulózt, ezzel olyan monomerekké alakítva, amelyeket más élőlények is fel tudnak használni.⁷ Kiváló opportunisták, képesek alkalmazkodni különböző fizikai, kémiai és biológiai stresszhatásokhoz, ezért figyelhető meg jelenlétük a világ szinte bármely területén. Képesek lebontani a természetes és mesterséges szubsztrátokat is. Az *Aspergillus terreus* egy szaprofita életmódot folytató gomba, amely konídiospórák segítségével szaporodik. Fehér színű micéliumot képez, spórái pedig a kor előrehaladtával a fahéj barna egyre sötétebb árnyalataiban figyelhetők meg. Az *Aspergillus terreus* gazdasági jelentősége vitathatatlan, az izolátumokat a biotechnológiára épülő iparágakban itakonsav, illetve enzimgyártásra használják. Fontos megemlíteni, hogy ezen gombák számos másodlagos metabolitot termelnek, ezek közül az ismertebb a lovasztatin, amelyet

⁵ Szegedi Tudományegyetem (2018. Nov. 14.): Fermentációs technológiák az élelmiszeriparban, jegyzet, tankönyv, 3. old

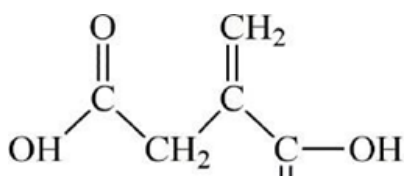
⁶ Scott E. Baker and Joan W. Bennett, (2007): "An Overview of the Genus *Aspergillus*," in *The Aspergilli*, 1st Edition., 12. old

⁷ Baker, S.E (2006): *Aspergillus niger* genomics : Past, present and into the future. Medical Mycology, 44(Supplement_1), 17-21. old

a magas koleszterinszint kezelésére, a szív- és érrendszeri betegségek kockázatának csökkentésére alkalmazzák.⁸



1. ábra: *Aspergillus terreus* mikroszkópos képe (saját ábra)



2. ábra: Az itakonsav szerkezeti képlete (saját ábra)

Az itakonsav (2-metilén butándisav) egy olyan szerves sav, amely előállítására az 1940-es évekig nyúlik vissza.⁹ Az itakonsav egy szobahőmérsékleten fehér színű kristályos anyag, konjugált kettőskötéseinek köszönhetően egy reaktív vegyület, ezért felhasználási lehetőségei széleskörűek: tisztítószer, lakkok, akril üvegek, festékek, műanyagok, polimerek előállításához használják. Az itakonsav jelentősége abban rejlik, hogy felhasználásával kiválthatóak olyan vegyületek, amelyeket jelenleg petrokémiai úton állítanak elő.¹⁰ Biotechnológiai eljárással, fermentációval termelik. A legjobb termelő törzs az *Aspergillus terreus* NRRL 1960, amit az amerikai Northern Regional Research Laboratory fejlesztett ki. 2004-ben az itakonsavat beválasztották a 12 legígéretesebb biotechnológiai vegyi anyag listájába, ami nagy érdeklődést váltott ki a tudományos közösségekben, és jelentős kutatásokat indított útjára a szerves sav termelésének és alkalmazásának javulására.¹¹

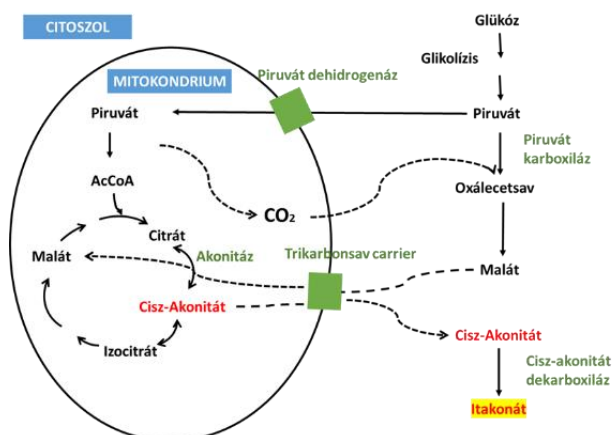
⁸ R.A.Samson, S.W.Peterson, J.C.Frisvad, J.Varga (2011): *New species in Aspergillus section Terrei*

⁹ Lockwood, L.B. and G.E. Ward (1945): *Fermentation Process for Itaconic Acid*. Industrial & Engineering Chemistry, 37(4), 405. old

¹⁰ Dr. Kolláth István(2022): Doktori disszertáció, 4. old

¹¹ Juliana Cunha da Cruz, Aline Machado de Castro, Eliana Flávia Camporese Sérvulo (2018):*World market and biotechnological production of itaconic acid*, 3 Biotech, Vol 8, Article 138, 4. old

3. Az itakonsav fermentációja és képződésének biokémiája



3. ábra: Az itakonsav bioszintézise (saját ábra)

Aspergillus terreus-ra specifikus enzim, az akonitát dekarboxiláz, a cis-akonitátot alakítja itakonáttá.¹²

A fermentáció során érdemes gyorsan hasznosuló szénforrást alkalmazni és ezeket is rendkívül nagy mennyiségben, ugyanis a termelés 100 g/l koncentráció alatt visszaesik. A legjobbnak a glükóz bizonyult, ugyanis ez a természetben leggyakrabban előforduló cukor, ezért hatékonyabb anyagcsereútvonalak alakultak ki a feldolgozására.¹³ A gyorsan hasznosuló szénforrások rendkívül drágák, így a fermentáció költségeinek jelentős hányadát teszik ki, gazdaságossági szempontból az iparban általában alternatív szubsztrátokat alkalmaznak. Az *Aspergillus terreus*, képes változatos összetételű szénforrásokon (glükóz, xilóz, galaktóz és ramnóz keverékei) termelni, továbbá képesek még növényi eredetű hidrolizátumokat, keményítőt, cukornádból vagy cukorrépából nyert melaszt hasznosítani, bár a konverziós rátát és a hozamot jelentősen visszaveti, ez a lehető legköltséghatékonyabb módja a szénforrás biztosításának.¹⁴

A termékhozamot nagyban befolyásolja a morfológia, amelyet a tápközegben lévő fémionok mennyisége és minősége határoz meg. Példának okáért a Mn^{2+} ionok jelenléte fonalas morfológiát eredményez, a micélium laza és elágazó lesz, ami növeli a fermentálé viszkozitását, míg a Mn^{2+} hiányában a gomba kicsi és sűrű pellet formájában nő.¹⁵

¹² Steiger, M. G., Blumhoff, M. L., Mattanovich, D., & Sauer, M. (2013): *Biochemistry of microbial itaconic acid production*. *Frontiers in microbiology*, 2. old

¹³ Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2019): *Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story?*, *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 3. old

¹⁴ Fekete Erzsébet and Karaffa Levente (2013): *Ipari biotechnológia*, Debreceni Egyetem

¹⁵ Dr. Kolláth István (2022): *Doktori disszertáció*, 15. old

Mangán(II)- ion limitált tenyészetekben – a növekedés limitációja mellett – drámaian megnő a keletkezett itakonsav mennyisége. Rendkívül magas hozamot lehet termeltetni, ha két kritikus paramétert: a gyorsan hasznosuló szénforrást és a Mn(II)-ionok koncentrációját megfelelő értéken tartjuk. A szénforrást magas (>10%), a Mn^{2+} - ionok esetében pedig extrém alacsony (<3 $\mu g/l$) értéken.¹⁶

4. A fermentáció nehézségei

Az *Aspergillus terreus* itakonsav fermentációja során nehézségek merülnek fel. Ha limitáljuk a mangán(II) ionok jelenlétét akár 90%-os specifikus moláris hozamot is elérhetünk. Viszont a mangán-mentes környezetet nehéz és költséges létrehozni, mert a fermentáció során, ahogy nő az itakonsav koncentrációja, azzal párhuzamosan csökken a pH, és az ionok a korróziós hatások miatt a fermentálébe szivároghatnak. Az iparban ezt egy olyan technológiával próbálják megoldani, hogy kálium-ferrocianid oldatot adnak a táptalajhoz, de ez veszélyes, mert magas hőmérsékleten történik az adagolás, illetve több lépcsővé teszi a folyamatot.¹⁷

3. Célkitűzés

A kutatásom fő célja a költséghatékonyság érdekében való fejlesztés, ennek kapcsán a Mn^{2+} és a PO_4^{3-} ionok együttes hatásának vizsgálata. A Mn^{2+} ionok jelenlétének negatív hatása meghatározott, viszont az effektus alaposabb megértéséhez széleskörű ismeretekre van szükség. Előzetes kutatások és irodalmi adatok támasztják alá, hogy a Mn^{2+} ionok felvételében egyes foszfát transzporterek is szerepet játszanak, ezért végeztünk kísérleteket PO_4^{3-} ionokkal is. Egy olyan kísérletsorozatot hoztunk létre, amely segít feltérképezni a mechanizmust és időprofil alapján meghatározni a termelést befolyásoló koncentrációkat. A kőolaj alapú vegyületek kiváltása a jövőre nézve elengedhetetlen, mivel a Föld kőolaj készletei korlátozottak, fontos a vegyiparinál fenntarthatóbb

¹⁶ L. Karaffa, R. Díaz, B. Papp, E. Fekete, E. Sándor, and C. P. Kubicek, (2015 Oct): "A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*," *Appl Microbiol Biotechnol*

¹⁷ Karaffa L, Díaz R, Papp B, Fekete E, Sandor E, Kubicek CP (2015): A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99:7937

biotechnológiai ágazat fejlesztése. A tenger is cseppekből épül fel, és a Mn(II) -ionok, illetve PO_4^{3-} ionok hatásának pontos megismerése is egy csepp ahhoz, hogy az itakonsavat költséghatékonyan lehessen előállítani, így széleskörben elérhető legyen.

4. Anyagok és módszerek

1. Táptalajkészítés, átoltás

Komponensek	Mennyiség (g/l)
Kukoricalekvár	20
NaCl	20
Agar	20
Glükóz	20
pH = 5	

1. táblázat: Szilárd táptalaj összetétele törzsfenntartás során

A törzsfenntartás során komplex (1. táblázat) táptalajt alkalmaztunk. A táptalaj komponenseit (a glükóz kivételével) kimértük, majd ioncserélt vízben oldottuk. Kevertetés közben laboratóriumi pH elektródával mértük, és HCl-oldat adagolásával beállítottuk a táptalaj-oldat megfelelő pH-értékét. Ezt követően hő- és nyomásálló üvegekbe osztottuk szét a tápoldatot, majd a megfelelő mennyiségű agarózt - rendkívül gyors ülepedési sebessége miatt - egyenként adagoltuk hozzá. A sterilizést 121°C -on 20 percig végeztük autoklávbán.

Az átoltást minden esetben lamináris áramlású steril fülke alatt végeztük el. Az előkészített steril táptalajhoz hozzáadtuk a glükóz oldatot, majd egyenletesen szétöntöttük Petri-csészékbe. A kísérleteink során *Aspergillus terreus* NRRL 1960 törzsszel dolgoztunk. Egy 4°C -on tárolt, gazdagon spórázó tenyészetről oltottunk át a frissen öntött táptalajra. Az átoltást követően a plateket 37°C -os inkubátorba helyeztük, 3-4 napig, ami megfelelő hőmérsékletet biztosított a tenyészetek spórázásához.

2. A fermentáció előkészítése

Az első kísérletünket Mn^{2+} limitált környezetben végeztük 5 l-es fermentorban. A Mn(II)-mentes vizet kationcserélő gyantával töltött oszlopon ioncserélt vízből állítottuk elő.

Az 5 l-es fermentor előkészítése a következő módon történt: a fermentor üveg testének savazása HCl-el, majd a rozsdamentes acél alkatrészek mosása Mn(II)-mentes vízzel. Ezt követően feltöltöttük a fermentort úgy, hogy a szenzorokat ellepje a Mn(II)-mentes víz, ami a sterilizálás során történő veszteség hatására se menjen a szenzor alá. Az összeszerelést követően a fermentort autoklávbán üresgőzös sterilizációval csíramentesítettük. Ezt a fajta folyamatot - táptalaj nélküli sterilizálás – a reaktor rozsdamentes acél ($\leq 2\% Mn^{2+}$) részei tették szükségessé. A hosszan tartó magas hőmérséklet és az alacsony pH tartományban zajló fermentációk korróziót idézhetnek elő, aminek hatására a fém alkatrész elveszítheti a króm-oxid védőrétegét, így a mangán(II)-ionok kioldódása figyelhető meg a folyadékban.¹⁸

A sóoldat és nyomelem oldat elkészítéséhez az adott komponensek megfelelő mennyiségének kiméréséhez analitikai mérleget használtunk, majd Mn(II)-mentes vízben feloldottuk és mágneses keverővel elkevertük. Szénforrásként steril 50 (w/v)%-os D-glükóz oldatot használtunk.

A spóraport Bűrker-kamrába vittük fel, és mikroszkóp segítségével határoztuk meg a fermentáció indításához szükséges spóra-suszpenzió térfogatát. A fermentáció kiindulási spórakoncentrációját 1×10^6 spóra/ml értékre állítottuk be.

Az inokulum előállításához az Erlenmeyer-lombikokat rázógépre helyeztük és paramétereit 200 rpm-re, illetve 33 °C -ra állítottuk. A fermentor leoltása 600 ml teljes térfogatú, 24 óráig előnevelt inokulummal történt a fermentáció meggyorsítása érdekében. A gombák az exponenciális növekedési fázisban a legaktívabbak, ekkor szaporodnak a leggyorsabban és a sejtszám exponenciálisan növekszik, ebből kifolyólag a tenyészet hamar eléri a kívánt biomassza tömeget. Ezzel ellentétben a spórával való leoltást követően hosszadalmas és időigényes folyamat, amíg a tenyészet az exponenciális növekedési fázisba kerül, ezáltal csökkentheti a termelési hatékonyságot és növelheti a fermentációs időt.

¹⁸ E. Fekete (2022. Aug.): *et al.*, "Bioreactor as the root cause of the 'manganese effect' during *Aspergillus niger* citric acid fermentations," *Front Bioeng Biotechnol* 13:17.

A kevertetést kezdetben alacsonyabb fordulatszámra állítottuk be (200 rpm), ugyanis erőteljes kevertetés során a keverőlapátok a sejteket roncsolhatják. A fermentorban a keverés sebességének fokozatos növelésének hatására a sejtek alkalmazkodni tudnak az új környezethez, ilyenkor már nincs olyan mértékű káros hatással, mint kezdetben.

3. Erlenmeyer-lombikok előkészítése

500 ml űrtartalmú, 100 ml munkatérfogatú Erlenmeyer-lombikokban is végeztünk fermentációt a kísérletek során. 1 M-os HCl-oldattal töltöttük meg és 3-4 órán át hagytuk állni azért, hogy az üveg falán kitapadt pozitív töltésű Mn^{2+} -ionokat eltávolítsuk. Az idő letelte után a lombikokat Mn(II)-mentes vízzel öblítettük, annak érdekében, hogy a savat teljesen kimossuk.

4. Mintavétel

A mintavétel a rázatott lombikok estében 24 óránként történt, 2 ml mintát vettünk le a fermentléből lamináris áramlású steril boxban. A folyamat alatt az oldott oxigénszintet a lombikok folyamatos, körkörös rázásával biztosítottuk, ugyanis ez kritikusán fontos, ahhoz, hogy az élősejtek ne pusztuljanak el. A levegőztetés, valamint a kevertetés intenzitása rendkívül fontos paraméter az itakonsav előállítása során, tekintve, hogy a keletkezett szerves sav mennyisége függ a rendelkezésre álló oldott oxigéntől.

Az 5 l-es fermentáció során a mintavételek körülbelül 12 óránként történtek, a sterilitás megőrzése érdekében a mintavételt megelőzően és követően a mintavevő csonkot alkoholba mártottuk. Felhasználástól függően 15-50 ml mintát vettünk egy-egy mintavétel alkalmával.

A fermentáció során a szénforrás fogyását és a termelődött itakonsav koncentrációját HPLC (magas nyomású folyadékkromatográfia) segítségével határoztuk meg. A minták megfelelő előkészítése nagyon fontos, ugyanis a HPLC kolonnájára nem engedhetünk rá szilárd szennyezőt. Eppendorf csőben 2-2- ml mintát centrifugáltunk, a tiszta felülúszót pipetta segítségével egy másik Eppendorf csőbe helyeztük. Ezt követően szűrt ioncserélt vízzel hígítást készítettünk. A gomba micéliumot (alulúszó) a mikroszkópos morfológiai vizsgálatoknál használtuk fel.

A fungális biomassa száraz sejtömegének (Dry Cell Weight= DCW)

meghatározására mintát vettünk a fermentléből, ezt követően körülbelül 20 ml mintát a már előre lemerített szűrőpapíron keresztül egy szivatópalackba szűrtük át, amit vákuum segítségével gyorsítottunk és a fennmaradó micéliumot ioncserélt vízzel alaposan átmostuk, tömegállandóságig szárítottuk és tömegét analitikai mérlegen lemerítettük.

	Sartorius BTwin 5 l fermentor	Rázott lombik
Mn ²⁺ limitált (<3 µg/l) környezet létrehozása	1 M HCl-oldat, majd Mn(II)-mentes vízzel mosás 3x	
Bruttó térfogat	6 l	500 ml
Nettó térfogat	5 l	100 ml
Szénforrás	120 g/l D-glükóz/	
Leoltás	Inokulum (10 ⁶ spóra/ml) - előnevelt tenyészet exponenciális növekedési fázisban	Spóraszuszpenzió 10 ⁶ spóra/ml koncentráció
Fermentációs paraméterek		
Keverés és levegőztetés	Kezdetben:200 rpm, majd DO szerinti szabályzás Levegő: 0,6 VVM (3 l/perc)	200 rpm Rotációs rázógép (Mintavétel közbeni körkörös rázás)
pH	nem szabályozott (kezdeti 3)	
Hőmérséklet	33 °C	
Mintavételek		
Mintavétel ideje	~12 óránként	24 óránként
Levett minta térfogata	15-50 ml	2-4 ml
Sterilitás biztosítása mintavétel közben	Mintavevő alkoholba mártása	Lamináris áramlású steril box

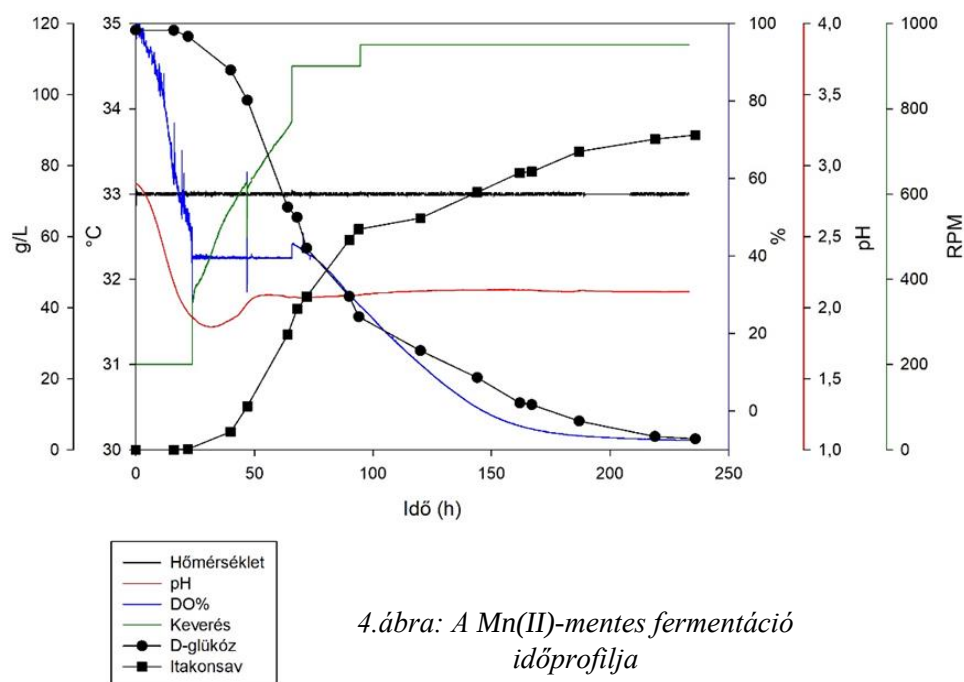
2. táblázat: Összefoglaló táblázat a fermentáció előkészületeiről és paramétereiről

5. Eredmények és kiértékelésük

1. 5 literes Mn^{2+} - limitált (kontrol) fermentáció

Idő (óra)	D-glükóz koncentráció (g/l)	Itakonsav koncentráció (g/l)	Végő DCW (g/l)
0	118,13	0	0,887
22	116,37	0,23	2,180
47	98,41	12,24	4,640
68	65,45	39,65	N. A.
90	43,17	59,08	6,540
120	27,9	65,25	6,547
144	20,31	72,49	7,167
162	13,19	78,01	7,347
187	8,07	83,97	7,26
219	3,74	87,48	8,25
236	3,07	88,61	8,42

3. táblázat: D-glükóz fogyás és itakonsav termelődés időbeli változása



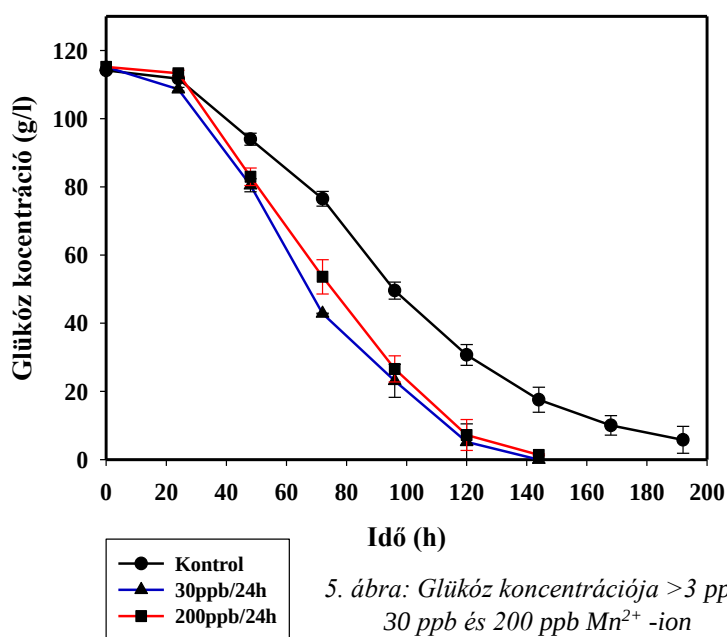
4. ábra: A $Mn(II)$ -mentes fermentáció időprofilja

Összegzés	
Szénforrás	120 g/l D-glükóz
Inokulum	600 ml (teljes lombik tartalmával)
Kezdő térfogat	5 l
DO	Kezdetben 200 rpm, majd 40%-on szabályzás Levegő: 0,6 VVM (3 l/perc)
pH	nem szabályozott (kezdeti 3)
Moláris konverzió	87,3% (236 óra)
DCW (g/l)	8,42

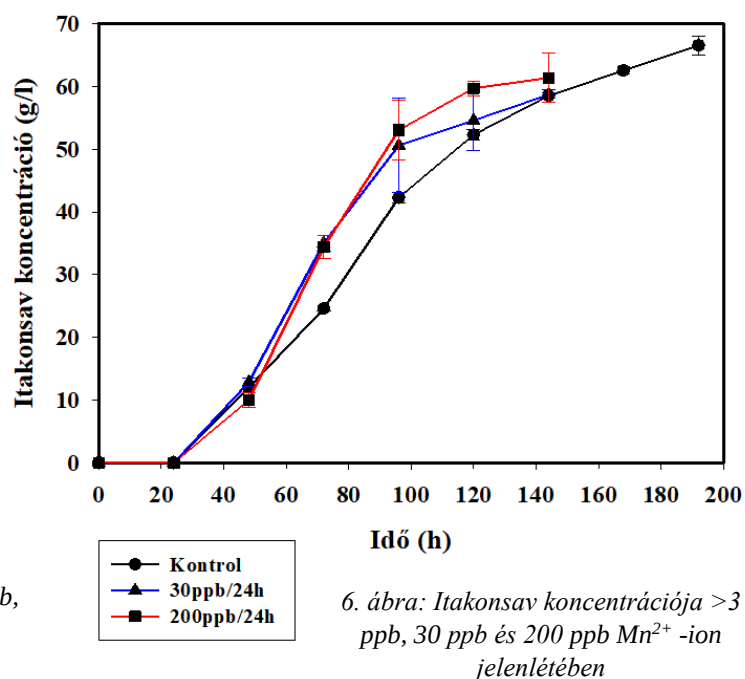
4. táblázat: Összefoglaló táblázat a D-glükózon végzett 5l-es fermentáció adatairól

A Mn(II)-mentes fermentáció 236. órájában az itakonsav koncentrációja meghaladta a 88 g/l-t. Ezek az adatok is azt mutatják, hogy Mn^{2+} -mentes közegben nagyon magas specifikus moláris hozamot lehet elérni.

2. Mn^{2+} - ionok hatása a fermentációra a 24. órában

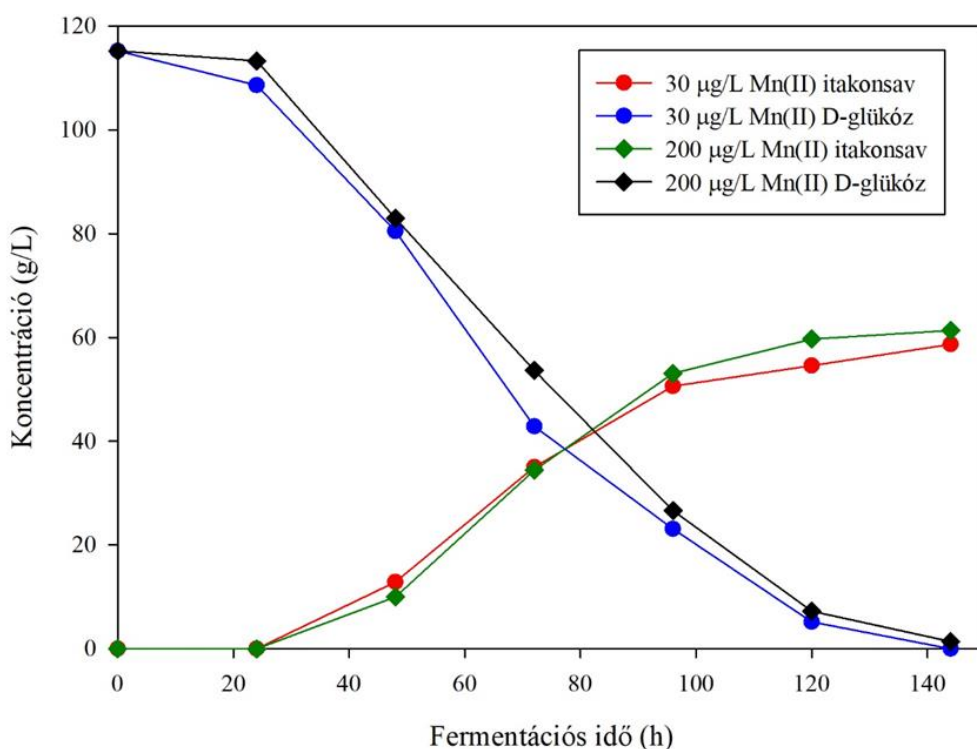


5. ábra: Glükóz koncentrációja >3 ppb, 30 ppb és 200 ppb Mn^{2+} -ion jelenlétében



6. ábra: Itakonsav koncentrációja >3 ppb, 30 ppb és 200 ppb Mn^{2+} -ion jelenlétében

A kísérletünk során 30 illetve 200 $\mu\text{g/l}$ Mn^{2+} -iont adtunk a fermentációhoz a 24. órában. A grafikonokon megfigyelhető, hogy a glükóz mennyisége hamarabb elfogyott, ezáltal a fermentációs idő lerövidült, viszont ha megvizsgáljuk az itakonsav koncentrációját megállapíthatjuk, hogy nem értünk el olyan magas hozamot, mint a kontrol mangán(II)-mentes fermentáció során.



7. ábra: Itakonsav koncentrációja 30 illetve 200 ppb Mn^{2+} -ion jelenlétében

Ha megfigyeljük az itakonsav koncentrációját abban az esetben, amikor 30, illetve 200 ppb mangán(II)-iont adagoltunk a fermentációhoz a 24. órában, láthatjuk, hogy olyan szignifikáns különbség nincs a két érték között. Tehát elmondhatjuk, hogy ebben az esetben a Mn^{2+} -ionok koncentrációja közötti különbség nem számottevő.

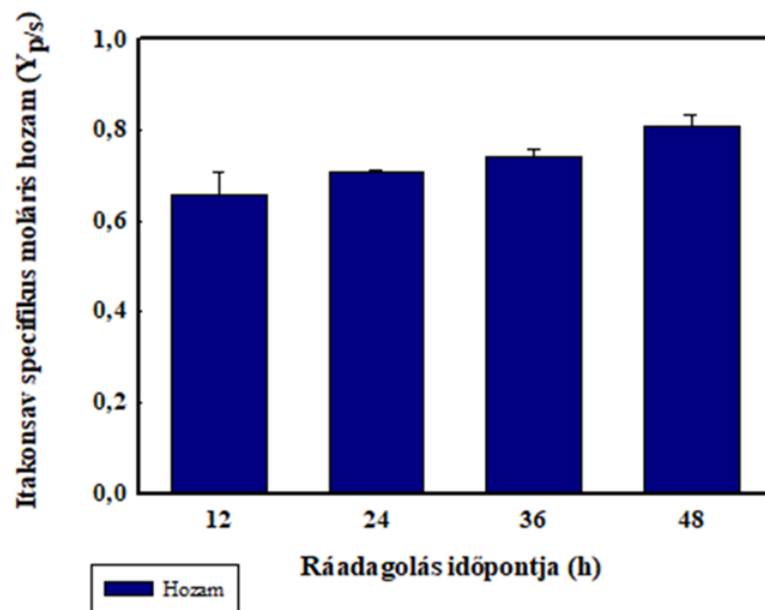
3. Mn^{2+} - ionok adagolása különböző koncentrációkban és időpontokban

	Itakonsav specifikus moláris hozam ($Y_{p/s}$)		
Ráadagolás időpontja (óra)	30 $\mu g/l$	100 $\mu g/l$	700 $\mu g/l$
12	$0,66 \pm 0,047$	$0,58 \pm 0,002$	$0,62 \pm 0,016$
24	$0,71 \pm 0,003$	$0,66 \pm 0,061$	$0,67 \pm 0,004$
36	$0,74 \pm 0,0165$	$0,73 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,004$
48	$0,81 \pm 0,024$	$0,72 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,005$
72	-	$0,77 \pm 0,004$	-

4. táblázat: Itakonsav specifikus moláris hozama, Mn^{2+} -iont különböző koncentrációkban és különböző időpontokban adagolva

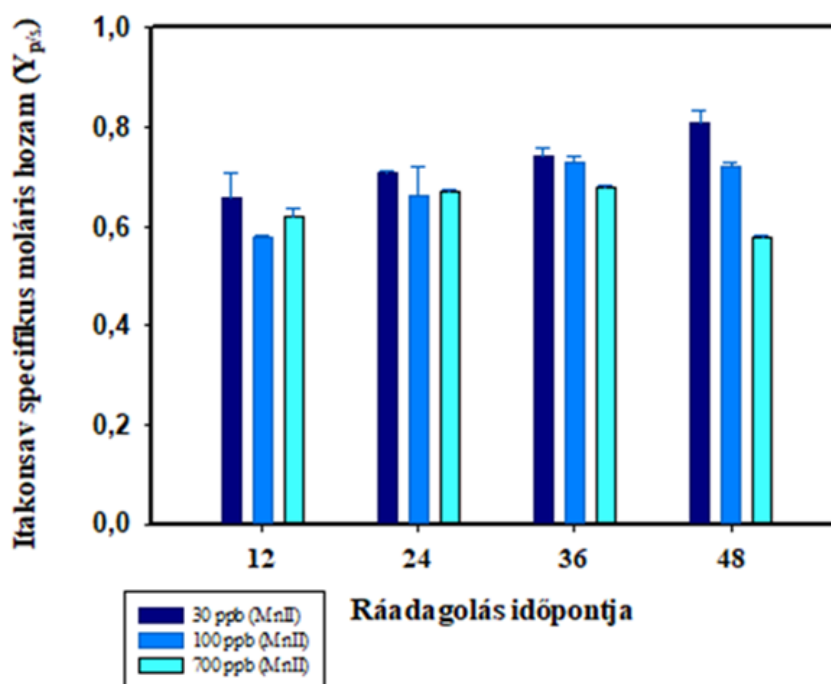
A táblázat adatait megfigyelve láthatjuk, hogy amikor a 12. órában adagoltunk 30 $\mu g/l$ Mn^{2+} -iont a fermentációhoz, a specifikus moláris hozam a fermentáció végén 66% lett, viszont, amikor később, a 48. órában adagoltuk az ionokat a specifikus moláris hozam magasabbnak, 81%-nak bizonyult. Összevetve azokkal az adatokkal, amikor 100 $\mu g/l$ mangán(II)-iont adagoltunk a fermentációhoz, mindkét esetben megállapítható, hogy abban az esetben, ha a Mn^{2+} -ionok később kerültek a fermentációhoz a specifikus moláris hozam értéke megnőtt, ezáltal elmondható, hogy minél később kerülnek a mangán(II)-ionok a fermentáléba a negatív hatásuk annál kevésbé érvényesül.

30-, illetve 100 $\mu g/l$ mangán(II)-iont adagolva a fermentáció végén megállapított itakonsav specifikus moláris hozama között nincsen számottevő különbség. Amikor felemeltük az itakonsav koncentrációját 700 $\mu g/l$ -re egy szignifikáns csökkenést tapasztaltunk.



8. ábra: Különböző időpontokban történő 30 µg/l Mn(II)-ion adagolás hatása a specifikus moláris hozamra

A következő diagramm jól szemlélteti, hogyan függ az itakonsav specifikus moláris hozama a Mn^{2+} adagolás időpontjától. A diagram és az előző táblázat adatai alapján megállapíthatjuk, hogy minél későbbi időpontban történik a ráadagolás, annál kevésbé érvényesül az ionok negatív hatása. Ennek megfelelően a legmagasabb hozamot azok a sejtek érték el, amelyek a 48. órában kaptak Mn^{2+} -ionokat, míg a legkisebb hozamot a 12. óras adagolás esetén érte el a rendszer.



9. ábra: Itakonsav specifikus moláris hozama, Mn^{2+} -iont különböző koncentrációkban és különböző időpontokban

Az egymás melletti oszlopok sorban a 30-100-700 ppb ($\mu\text{g/l}$) koncentrációjú mangán(II) tartalmat jelzik az egyes fermentációkban, ami alapján megállapítható, hogy a Mn^{2+} koncentráció növekedésével csökkent a specifikus moláris hozam értéke. A diagrammot megfigyelve, nem kizárható, hogy magasabb koncentrációjú Mn(II) jelenlétében a ráadagolási idő előrehaladtával sem csökken jelentősen az ionok negatív hatása.

5. PO_4^{3-} hatás vizsgálata

PO_4^{3-} koncentráció (g/l)	Szénforrás	Mn^{2+} koncentráció ($\mu\text{g/l}$)	Végső DCW (g/l)	Moláris hozam $Y_{(P/S)}$	% Y
0,09	glükóz	<3	10,276 $\pm$ 1,61	0,7400 $\pm$ 0,033	74,00 $\pm$ 3,3
0,1	glükóz	<3	10,58 $\pm$ 0,34	0,7919 $\pm$ 0,046	79,19 $\pm$ 4,6
0,3	glükóz	<3	12,700 $\pm$ 0, 83	0,5062 $\pm$ 0,067	50,62 $\pm$ 6,7
0,5	glükóz	<3	14,112 $\pm$ 3,59	0,4215 $\pm$ 0,0136	42,15 $\pm$ 1,36
1	glükóz	<3	16,068 $\pm$ 5,16	0,3739 $\pm$ 0,027	37,39 $\pm$ 2,7
0,09	glükóz	100	34,516 $\pm$ 7,25	0,6128 $\pm$ 0,0389	61,28 $\pm$ 3,89
0,1	glükóz	100	28,397 $\pm$ 5,17	0,6055 $\pm$ 0,0451	60,55 $\pm$ 4,51
0,3	glükóz	100	36,368 $\pm$ 3,11	0,0094 $\pm$ 0,0261	0,94 $\pm$ 2,61
0,5	glükóz	100	37,627 $\pm$ 2,78	0,0000	0,00
1	glükóz	100	39,560 $\pm$ 2,37	0,0000	0,00

6. táblázat: A foszfát- mangán hatása különböző koncentrációkban

A fentebb látható táblázat szemlélteti a fermentáció során a Mn^{2+} és PO_4^{3-} ionok hatását a specifikus moláris hozamokra.

A %Y és DCW oszlopokat megfigyelve egyértelműen látszódik, hogy a foszfát-ion koncentráció emelésével a sejttömeg arányosan emelkedik, a hozamok pedig szignifikánsan csökkennek. Számottevő különbség állapítható meg Mn^{2+} -ion mentes (Mn^{2+} koncentráció $<3 \mu g/L$) és Mn^{2+} -ionnal terhelt fermentációk során. Míg Mn(II)-mentes környezetben a DCW eredmények legmagasabb értéke $16,068 g/l$ volt, addig $100 \mu g/L$ Mn^{2+} jelenlétében ez majdnem a $40 g/l$ -t érte el. Továbbá nem csak a sejttömeg tükrözi azt a megállapítást, hogy a Mn^{2+} és PO_4^{3-} ionok együttesen negatívabb hatást fejtenek, ki mint a Mn^{2+} önmagában, hanem a moláris hozamok számadatai is. Erre egyértelmű példa, hogy Mn(II)-mentes fermentáció során $1 g/l$ PO_4^{3-} jelenlétében a hozam $37,39\%$ volt, addig $100 \mu g/l$ Mn^{2+} - és magas PO_4^{3-} -iont tartalmazó lombikok hozama 0% eredményt adott.

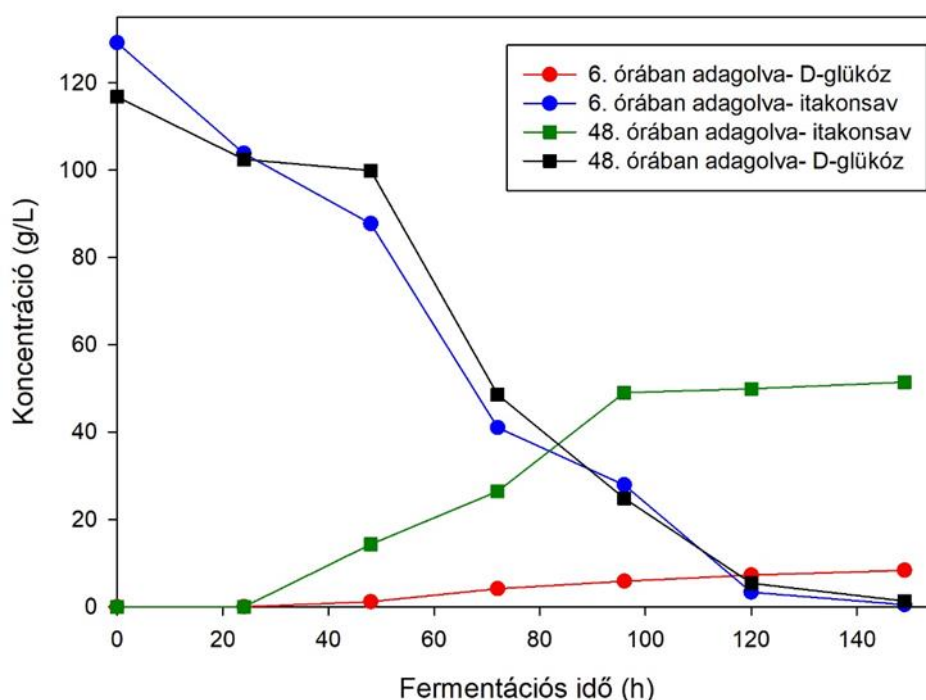
6. PO_4^{3-} hatás vizsgálata különböző időpontokban

Idő (h)		<3		3h		6h		48h		72h
0	0	121,12	0	117,86	0	129,16	0	116,77	0	120,2
24	0	117,93	0	90,58	0	103,81	0	102,47	0	113,71
48	13,03	94,2	1,11	78,39	1,17	87,74	14,31	99,87	13,49	102,73
72	26,76	57,64	4,86	39,84	4,15	41,02	26,43	48,56	31,42	61,03
96	46,06	61,66	5,71	23,72	5,86	27,86	49,03	24,83	49,70	24,90
120	48,69	38,05	7,11	6,11	7,26	3,35	49,89	5,41	55,55	7,00
149	56,06	26,86	9,32	0	8,33	0,47	51,41	1,31	53,163	1,19
167	59,59	19,36								
Y(p/s)		80,54		10,88		8,90		61,24		64,98

7. táblázat: $0,1 g/l$ PO_4^{3-} - $30 \mu g/l$ Mn^{2+} hatása különböző időpontokban

Vizsgáltuk a PO_4^{3-} ionok hatását Mn^{2+} -ionok jelenlétében. A kísérletünk során $0,1 g/l$ PO_4^{3-} és $30 ppb$ Mn^{2+} - iont adagoltunk a fermentációhoz különböző időpontokban. Az első oszlop a Mangán(II)- mentes fermentációt szemlélteti. Ha a fermentáció elején, a 3., illetve a 6. órában adagoltuk az ionokat, a specifikus moláris hozam nagyon alacsony lett, viszont,

amikor később adagoltuk az ionokat, a hozam magasabbnak bizonyult. Ezek az adatok szintén azt bizonyítják, hogy amennyiben az ionok később kerülnek a fermentációhoz a negatív hatásuk kevésbé érvényesül. Ennek ellenére a későbbi adagolás alkalmával sem értünk el olyan magas specifikus moláris hozamot, mint amikor csak Mangán(II) ionokat adagoltunk a fermentációhoz, ezáltal ezek az adatok azt támasztották alá, hogy az ionok szinergikusak, tehát együttesen negatívabb hatást fejtenek ki, mint külön-külön.

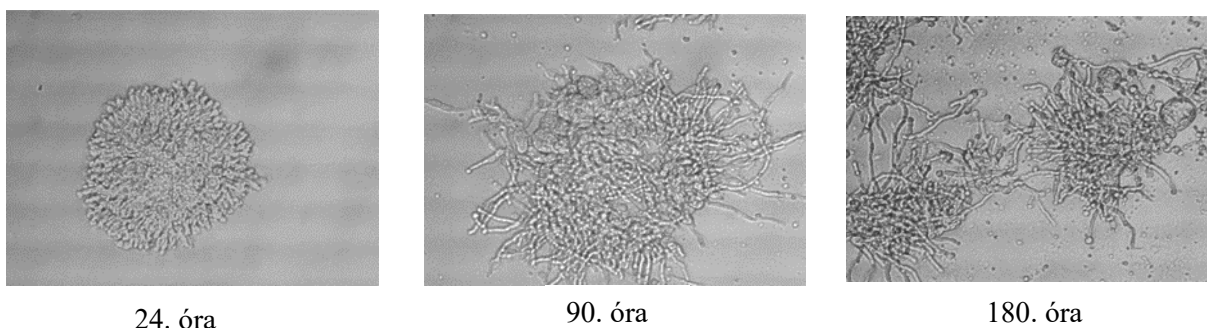


12. ábra: 0,1 g/l PO_4^{3-} , illetve 30 μ g/l Mn^{2+} a 6. és a 48. órában adagolva

Az alábbi grafikon azt szemlélteti, amikor 0,1 g/l PO_4^{3-} , és 30 μ g/l Mn^{2+} iont adagoltunk a fermentációhoz a 6., illetve a 48. órában. Abban az esetben, ha az ionok a fermentáció elején kerültek a rendszerbe az itakonsav koncentrációja még a 10 g/l-t sem érte el. A grafikonról továbbá az is leolvasható, hogy, amikor a 48. órában adagoltuk az ionokat, a fermentáció elején fokozatosan növekedett az itakonsav koncentrációja, viszont nagyjából a 90. órában, amikor az ionok kifejtették a negatív hatásukat ez a növekedés szinte teljesen leállt.

7. Morfológiai eredmények a Mn(II)-mentes fermentáció során

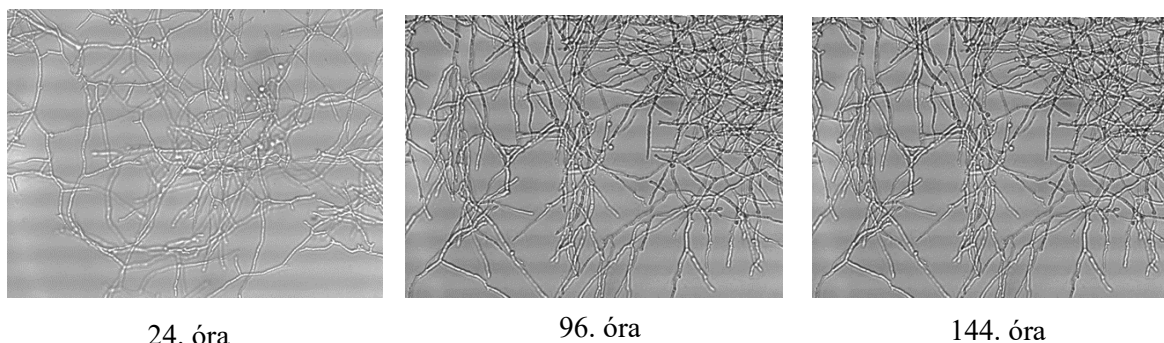
Kísérleteink során a morfológiai változásokat folyamatosan nyomon kísértük. Mangán(II)-limitált (kevesebb, mint 3 µg/l) környezetben a sejtek kompakt, pelletes morfológiát vesznek fel. A sejtek morfológiája nagymértékben befolyásolja az anyagátvitelt és az oxigén felvételt. A fermentáció során amennyiben a biomasszát alkotó sejtekre a fonalas morfológia a jellemző, akkor szignifikáns mértékben megnövelhetik a fermentálé viszkozitását ezáltal nehezebbé teszik a megfelelő kevertetést így a keverőlapátok energiaszintjét megnövelik, ezzel költségesebbé teszik a fermentációt, továbbá a közeg oldott oxigén szintjét is csökkentik.¹⁹



13.ábra: Mn(II)-limitált fermentáció során vett minták mikroszkópos képe

A Mn(II)-limitált fermentációk morfológiai változásának nyomon követése során készített mikroszkópos képeken jól megfigyelhető a Mn^{2+} -mentes környezet hatására kialakuló tömör pelletes morfológia. Az idő előrehaladtával a pellet csomók szélein fonalasodás látható.

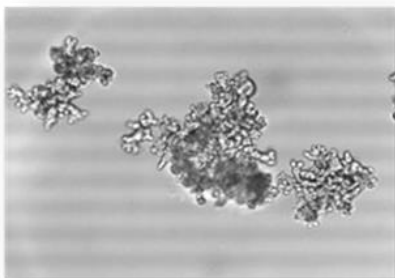
8. Morfológiai eredmények 30 ppb mangán(II)-iont adagolva



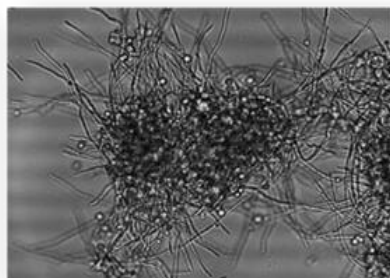
14.ábra: A 3. órában adagolt 30 µg/l Mn^{2+} eredménye

¹⁹ I. S. Kolláth (2019 July): *et al.*, "Manganese deficiency is required for high itaconic acid production from D-xylose in *Aspergillus terreus*," *Front Microbiol*

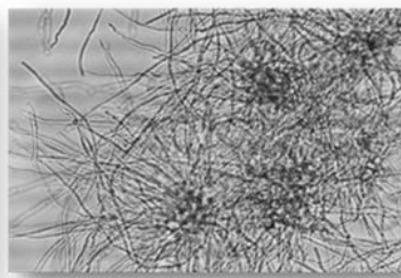
A mikroszkópos képek szemléltetik a 3. órán történt mangán ráadagolás hatását, amelyeken jól láthatóan a fonalas morfológia dominál.



24. óra



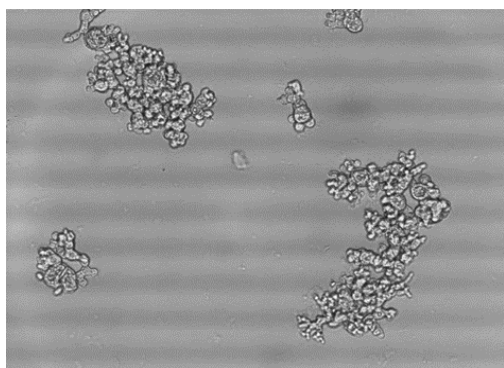
96. óra



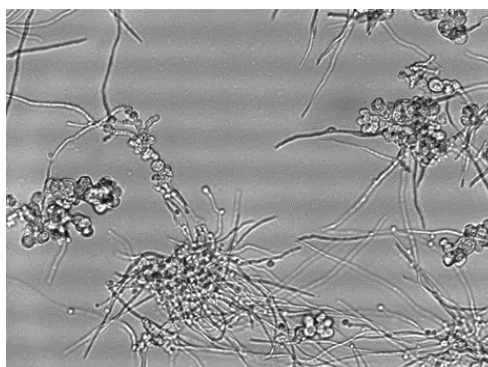
144. óra

15.ábra: 48. órában adagolt 30 ppb Mn(II) morfológiai eredménye

Az első képen látható pelletes morfológia, annak köszönhető, hogy a sejtekre a Mn^{2+} -ionok ekkor még nem voltak hatással, azonban a 96. órában vett minta mikroszkópos képén már jól látható, hogy a kezdeti pelletes forma részben megmaradt, de fonalasodásnak indult a tenyészet, a 144. órában pedig még kevesebb pelletet és több fonalat figyelhetünk meg.



48. óra



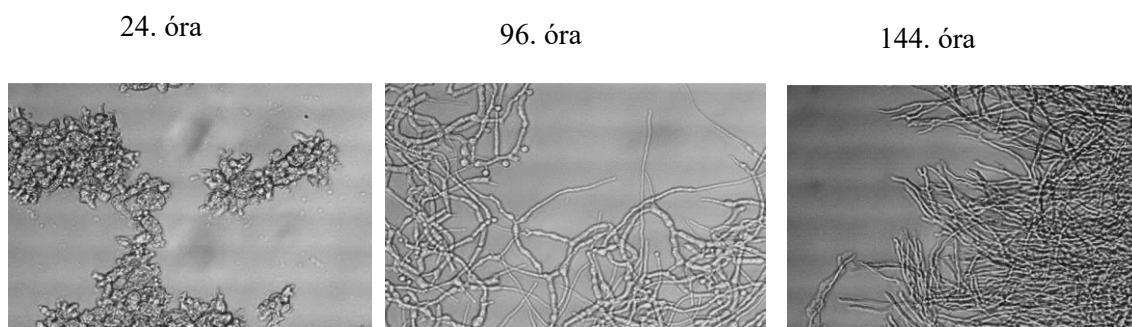
96. óra

16.ábra: 72. órában adagolt 30 ppb Mn(II)-ion hatása

A 72.órán ráadagolt Mn^{2+} -ionok hatása látható a 96. órában vett mintán. Az előzőleg ismertetett vizsgálatokhoz hasonlóan, itt is jól látható, hogy a pelletes morfológia dominál mindkét mintában, azonban a 96. órás mikroszkópos képen már a fonalak is megfigyelhetők.

Morfológiai eredményeink alapján megállapítható, hogy a mangán(II)-ion koncentráció a gyors növekedési fázisban sokkal nagyobb mértékben befolyásolja a tenyészet morfológiáját, mint a későbbi időpontokban ráadagolt Mn^{2+} -ionok. A mikroszkópos képek szemmel láthatóan azt bizonyítják, hogy minél későbbi időpontban történik a mangán ráadagolása, annál kisebb mértékben alakul ki fonalas morfológia, ezáltal az ionok negatív hatása kevésbé érvényesül.

9. Morfológiai eredmények PO_4^{3-} és Mn^{2+} ionok jelenlétében



17. ábra: 48. órában adagolt $0,5 \text{ g/l PO}_4^{3-}$, 100 ppb Mn^{2+}

Ha megfigyeljük a morfológiai eredményeket, amikor 48. órában adagoltunk PO_4^{3-} és Mn^{2+} ionokat, láthatjuk, hogy a 24. órában, amikor még nem voltak jelen az ionok pelletes morfológia alakult ki, viszont a 96. órában már csak fonalakat figyelhetünk meg, a 144. órában pedig még több fonalat láthatunk. A morfológiai eredmények is alátámasztják, hogy a PO_4^{3-} és Mn^{2+} ionok szinergikusak, azaz együtt sokkal negatívabb hatást fejtenek ki a fermentációra, mint külön-külön.

6. Diskusszió

Az *Aspergillus* nemzetség tagjainak szervessav termelő képessége kimagasló. Az *Aspergillus terreus* kiváló itakonsav termelő képessége miatt játszik kulcsfontosságú szerepet az ipari szektorban megvalósuló használata révén.

Az itakonsav széles körben felhasználható műanyagok, polimerek előállítására. A kőolaj alapú vegyületek kiváltása a jövőre nézve elengedhetetlen, fontos a vegyiparinál fenntarthatóbb biotechnológiai ágazat fejlesztése. Az itakonsav széleskörű alkalmazása által teremtett innovációs lehetőségek hozzájárulhatnak a jövő környezetbarát, illetve hatékony ipari és egészségügyi megoldásaihoz.

Kutatásunk fő irányát a mangán-foszfát együttes hatása határozta meg. A Mn(II)-ionok negatív szerepe jól meghatározott, viszont az effektus mélyebb felderítéséhez széleskörű ismertekre van szükség. Irodalmi kutatások alapján kiderült, hogy a Mn^{2+} -ion felvételében bizonyos foszfát transzporterek is szerepet játszanak, így azt a célt tűztük ki, hogy felderítsük a mechanizmust, időprofil alapján meghatározzuk a termelést befolyásoló koncentrációkat, valamint összehasonlítsuk az együttes effektust.

Kísérleteinket az *Aspergillus terreus* NRRL 1960 törzsszel végezzük. A termeléshez 5 l hasznos térfogatú bioreaktorokat és 500 ml Erlenmeyer lombikokat használunk. A reaktorban szabályozható a pH, oldott oxigén szint és a hőmérséklet. Kísérleteink során rendkívül nagy figyelmet biztosítottunk a sterilitás megőrzésére, valamint Mn(II)-limitált fermentációk esetében a Mn(II)-mentes környezet létrehozására. A fogyott cukor és termelt itakonsav koncentrációkat magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) vizsgáltuk.

A Mn^{2+} -limitált kontrol fermentációk során a moláris konverzió 87,3 %-nak adódott. A mangán terhelt fermentációk vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a hozam nem volt olyan magas, mint a kontrol Mangán(II) limitált fermentáció végén. Továbbá Mn^{2+} ráadagolását végeztük különböző időpontokban, különböző koncentrációkban. Ha a későbbi órákban adagoltuk az ionokat a fermentációhoz a negatív hatásuk kevésbé érvényesült. Továbbá megállapítottuk, hogy magasabb Mn(II) koncentráció jelenlétében a specifikus moláris hozam lecsökkent.

Vizsgáltuk a PO_4^{3-} -ionok hatását Mn^{2+} -ionok jelenlétében. Mind a sejttömeg, mind a moláris hozamok számadatai azt támasztották alá, hogy az ionok szinergikusak, tehát együttesen negatívabb hatást fejtenek ki, mint önmagában a Mn^{2+} -ionok.

A morfológiai eredményeink alátámasztották a mangán limitáció hatására kialakuló kedvezőbb pelletes morfológia megjelenését. Továbbá azt, hogy minél később történik a ráadagolása, annál kisebb mértékben alakul ki fonalas morfológia, ezáltal azt, hogy minél később kerülnek az ionok a fermentációhoz a negatív hatásuk annál kevésbé érvényesül.

Megállapítottuk, hogyha az ionok jelen vannak, a gomba a szénforrást arra fordítja, hogy a saját sejttömegét gyarapítsa, nem arra, hogy az itakonsavat termelje. Kutatásunk eredményei által reméljük, hogy hozzájárulhatunk a mikroorganizmusok által végzett szerves savak termelésének hatékonyabbá tételéhez és ezáltal egy fenntartható ipar létrehozásához.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Karaffa Leventének a Debreceni Egyetem Biomérnöki Tanszék vezetőjének, és Prof. Dr. Fekete Erzsébet tanszékvezető helyettesnek, hogy részt vehettem az itt folytatott kutatómunkában.

Külön köszönöm Bíró Viviennek és Márton Alexandrának, akik mindenben támogattak és bízattak. Azon túl, hogy rengeteget tanultam tőlük, bármikor fordulhattam hozzájuk a kérdéseimmel és egy olyan munkakörnyezetet teremtettek, ahol nagyon jól éreztem magam. Nagyon hálás vagyok nekik, hogy a versenyek és konferenciák alatt mindig mellettem álltak és bátorítottak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani a Tóth Árpád Gimnázium tanárainak: Szemerédyné Baksa Zsuzsánna Tanárnőnek és Surányi László Tanár Úrnak. Külön köszönöm Sárközi Bianka Tanárnőnek, hogy lelkesedésével és odaadással megtartott óráin nagyon jó szakmai alapokat adott, valamint, hogy segített a pályamunka megírásában, amivel bekerültem a Debreceni Egyetem TTK Nyári Táborába, ezáltal a Biomérnöki Tanszékre.

8. Irodalomjegyzék

Baker, S.E (2006): *Aspergillus niger* genomics : Past, present and into the future. Medical Mycology, 44(Supplement_1), 17-21. old

Dr. Kolláth István (2022): Doktori disszertáció, 1. old

E. Fekete (2022. Aug.): et al., “Bioreactor as the root cause of the ‘manganese effect’ during *Aspergillus niger* citric acid fermentations,” Front Bioeng Biotechnol 1317.old

Fekete Erzsébet – Karaffa Levente (2013): Ipari Biotechnológia, Lektorálta: Dr. Tóth László osztályvezető (TEVA Gyógyszergyár ZRt.), Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar Biomérnöki Tanszék, 9.old

Fekete Erzsébet and Karaffa Levente (2013): Ipari biotechnológia, Debreceni Egyetem Ivana Perković, Maja Beus, Dominique Schols, Leentje Persoons, Branka Zorc, (Received: 8 July 2020 / Accepted: 28 September 2020 / Published online: 11 October 2020): Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents, Springer Nature Switzerland AG 2020., 7. old

Juliana Cunha da Cruz, Aline Machado de Castro, Eliana Flávia Camporese Sérvulo (2018):World market and biotechnological production of itaconic acid, 3 Biotech, Vol 8, Article 138, 4. old

Karaffa L, Díaz R, Papp B, Fekete E, Sandor E, Kubicek CP (2015): A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*, Appl Microbiol Biotechnol, 99:7937

Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2019): Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story?, Applied microbiology and biotechnology, 103, 3. old

Lockwood, L.B. and G.E. Ward (1945): Fermentation Process for Itaconic Acid. Industrial & Engineering Chemistry, 37(4), 405. old

R.A.Samson, S.W.Peterson, J.C.Frisvad, J.Varga (2011): New species in *Aspergillus* section Terrei

S. Kolláth (2019 July): et al., “Manganese deficiency is required for high itaconic acid production from D-xylose in *aspergillus terreus*,” Front Microbiol

Scott E. Baker and Joan W. Bennett,(2007): “An Overview of the Genus *Aspergillus*,”

in The Aspergilli, 1st Edition., 12. old

Steiger, M. G., Blumhoff, M. L., Mattanovich, D., & Sauer, M. (2013): Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Frontiers in microbiology*, 2. old

Szegedi Tudományegyetem (2018. Nov. 14.): Fermentációs technológiák az élelmiszeriparban, jegyzet, tankönyv, 3. old

Willke, T. and K.-D. Vorlop (2001): Biotechnological production of itaconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 292. old