



36. OTDK Biológia Szekció
2023

**Itakonsav túltermelő *Aspergillus terreus* mikrogomba szekunder
metabolit termelésének vizsgálata**

Készítette: Bokor Barbara, Műszaki menedzser MsC, 2022/23/1

Pannon Egyetem, Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató
Csoport

Témavezető: Hülberné Beyer Éva Anna

A pályamunka lezárásának dátuma: 2022. 11. 03.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. <i>Aspergillus terreus</i>	2
2.2. Kofermentációk jelentősége.....	4
2.3. Szekunder metabolitok	4
2.3.1. <i>Aspergillus terreus</i> szekunder metabolitjai	5
3. Anyagok és módszerek.....	8
3.1. Felhasznált anyagok és vegyszerek	8
3.2. Vizsgálati módszerek	9
3.2.1. <i>Agarkorongos kompatibilitási kísérlet</i>	9
3.2.2. <i>Kofermentáció rázatott lombikos módszerrel</i>	10
3.3. Analitikai módszerek	13
3.3.1. <i>Glükózkoncentráció meghatározása</i>	13
3.3.2. <i>Itakonsav koncentrációjának meghatározása</i>	14
3.3.3. <i>Szekunder metabolitok vizsgálata</i>	14
4. Eredmények és kiértékelésük.....	16
4.1. <i>Agarkorongos kompatibilitási kísérlet eredménye</i>	16
4.2. <i>Felületi szélesztés eredménye</i>	19
4.3. <i>A glükóz- és az itakonsav-tartalom alakulása</i>	20
4.4. <i>Szekunder metabolitok vizsgálatának eredménye</i>	22
5. Összefoglalás	26
Irodalomjegyzék	28
Mellékletek.....	30

1. Bevezetés

Az *Aspergillus terreus* az ipar számára hasznos itakonsav mellett számos, jó tulajdonságokkal rendelkező szekunder metabolitot is termel. Különböző kutatások rávilágítottak arra, hogy ha egy adott mikroorganizmust egyéb más mikrobával együtt szaporítunk, vagyis kofermentációt végzünk, akkor olyan vegyületek is keletkezhetnek, amelyek axenikus tenyészet esetében nem megfigyelhetők, illetve így nagyobb végső főtermék koncentráció érhető el. Kutatásom során két *Aspergillus terreus* törzzsel és két *Bacillus* fajjal szilárd tápközegben kompatibilitási kísérletet végeztem, amely alapján meghatároztam, hogy mely mikroorganizmusokkal érdemes tovább dolgozni. A kiválasztott mikrobákkal kofermentációs kísérletet indítottam és vizsgáltam az itakonsav, valamint a keletkező szekunder metabolitok mennyiségi változásait. A következőkben az elvégzett kísérleteket és azok eredményeit szeretném bemutatni.

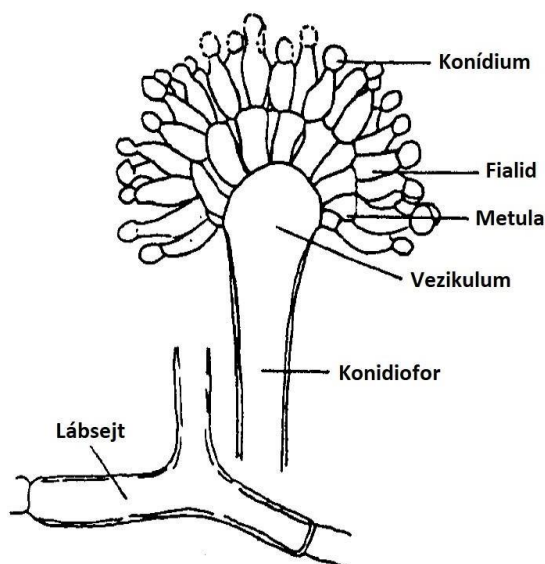
2. Irodalmi áttekintés

Az alábbiakban a kutatómunkához kapcsolódó szakirodalom alapján készített elméleti összefoglaló olvasható.

2.1. *Aspergillus terreus*

Az *Aspergillus* nemzetség több mint 185 fajt foglal magába. Ezek olyan fonalas gombák, melyek a természetben mindenütt megtalálhatóak, tehát kozmopolitának tekinthetők. Képviselői a talajban található elhalt növények és állatok szerves anyagaiból táplálkoznak, vagyis szaprofiták.

A nemzetséghez tartozó fajok megjelenésükben és egyéb jellemzőikben egyaránt nagyon változatosak, egymástól való megkülönböztetésükhöz és azonosításukhoz általában az egyes makroszkópikus tulajdonságokat; a növekedési sebességet, a kolónia színét és textúráját, valamint a hőtűrő képességet vizsgálják. Nem csak a makroszkópikus, hanem a mikroszkópikus struktúrátságban is megfigyelhetők hasonlóságok és eltérések az egyes fajok között. Minden fajra egyaránt jellemző, hogy a konidioforok a támasztó, hialinszerű hifákon elhelyezkedő bazális lábsejtből erednek és a csúcán hólyagocskákban végződnek, melyek a nemzetség jellegzetes képződményei (**1. ábra**). Ennek ellenére a konidioforok a különböző fajok esetében eltérő morfológiát és színt vehetnek fel [1]–[3].



1. ábra

Az Aspergillusok jellegzetes képződményei

Nemcsak fajok között, hanem egy adott fajon belül is többféle megjelenést figyelhetünk meg. Az *Aspergillus terreus* morfológiáját tekintve igen változatos, attól

függően, hogy milyen táptalajon és milyen körülmények között tartjuk, különböző alakot, színt és textúrát vehet fel. Burgonyadextróz agaron, 25 °C-os hőmérsékleten például a bézstől kezdve egészen a fahéj színig különböző árnyalatokban jelennek meg a telepek, míg a gomba hátoldala általában sárga színű. A konídiumok termelésének előrehaladtával a gombatelepek szemcséssé alakulhatnak. Az *A. terreus*ra – mint az *Aspergillus* nemzetség képviselőjére – általánosan jellemző, hogy konidioforjai sima falúak és hialinszerűek, többnyire gömbölyded hólyagocskákban végződnek. A gomba kicsi, gömbölyded, sima falú konídiumai a levegőben megtalálhatóak, könnyen szállnak és ezáltal humán megbetegedések forrásai lehetnek. Az *Aspergillus terreus* a fertőzés során egysejtű, úgynevezett járulékos konídiumokat termel, melyek szintén gömb alakúak. Főként azon emberekre jelentenek veszélyt, akik immunrendszerét tudatosan – például valamilyen szervátültetés során – legyengítették; jelentős fertőzést okozhat a légzőszervrendszerben, illetve a szemben és a fülben is. Az *Aspergillus terreus* az oxigénigényszempontjából az aerob gombák közé sorolható, vagyis fennmaradásához, anyagcsere folyamataihoz elengedhetetlen a légköri oxigén jelenléte, így, ha a gombát fermentációs folyamatok során termék előállítására szeretnénk felhasználni akkor is biztosítanunk kell számára a megfelelő mennyiségű oxigént. A fermentáléba beoldódott oxigén mennyiségét oxigénmérő elektróddal/szondával lehet meghatározni és ennek megfelelően a szükséges beavatkozást elvégezni, mellyel javítható a rendszer oxigén ellátottsága [4]–[7].

Az *Aspergillus terreus* egyes törzsei különböző termékek gyártására alkalmasak. Az ipar elsősorban itakonsav fermentációs úton történő előállítására használja, a gombának azonban számos más, az ipar számára hasznos szekunder metabolitja is ismert. Ilyen másodlagos anyagcseretermék például a lovasztatin, a monakolin L, a geodin és aterrein is. Szekunder metabolitoknak azokat a molekulákat nevezzük, melyeket az egyes mikroorganizmusok nem normál életfolyamataik következtében, hanem speciális környezeti körülmények között termelnek. Ezen vegyületek a mikrobák vegetatív működését illetően nem létfontosságúak, funkciójuk az előnyszerzés adott megromlott életkörülmények között, mint például a lecsökkent élettér és tápanyagmennyiség, valamint a megváltozott pH és hőmérséklet. Az egyes mikroorganizmusok az említett előnyszerzésre különböző stratégiákat alkalmaznak; a fonalas gombák – mint amilyen az *Aspergillus terreus* is – esetében terjeszkedő típusú növekedést figyelhetünk meg. A gombák megváltozott életkörülmények között gyors kolonizációs képességüket

használják ki, amennyiben rendelkezésükre áll a megfelelő félnedves szubsztrát, képesek mindent beborítani a penészfonalakkal és így jutnak előnyhöz [4].

2.2. Kofermentációk jelentősége

A fermentációs folyamat során valamilyen mikroorganizmus (például gomba vagy baktérium) a megfelelő körülmények között, szaporodása révén az ipar számára hasznos, intra-vagy extracelluláris terméket állít elő, mely a megfelelő technológiákat alkalmazva kinyerhető a fermentléből, és felhasználhatóvá válik. A kofermentáció pedig ennek megfelelően, kettő (vagy több) mikroorganizmus, ideális környezeti viszonyok melletti együttes szaporítását jelenti. A kofermentációk megvalósításának oka lehet például, hogy egy adott mikroorganizmus egy másik jelenlétében többféle terméket képes előállítani, mint axenikus tenyészetben, vagy az, hogy a primer anyagcseretermék mellett számos szekunder metabolitot is termel, de csak kis mennyiségben és ezek termelődését egyéb mikrobák képesek serkenteni, ezáltal több hasznos termék kinyerésére van lehetőség. Ennek alapja, hogy a mikroorganizmusok, például az egyes baktériumok és gombák különböző bonyolult ökoszisztémákban (vizekben, talajban) évmilliók óta együtt élnek, tehát evolúciójuk során kialakultak azon mechanizmusok, hogy érzékeljék egymást és hatékonyan reagáljanak a különböző mikrobák jelenlétére. A fermentáció során gyakorlatilag ezeket a természetes mikrobiális körülményeket próbáljuk szimulálni, mely során az élőlények hatással vannak egymásra, keresztezhetik egymás metabolikus útjait. A csendes bioszintetikus génklasztereket a környezeti ingerek transzkripcionálisan aktiválják. A más mikrobák által kibocsátott kémiai jelzések különböző védelmi válaszokat okozhatnak, beleértve például a micélium morfológiájának megváltozását, a másodlagos metabolitok szintézisét és az extracelluláris enzimek termelését. Valójában ezek az aktivált védekező anyagcseretermékek kémiai jelzéseként működhetnek, amelyek egy sor transzkripciós aktivációt indíthatnak el. Tehát a keletkező vegyületek is indukálhatják egymást és így nőhet az elsődleges termék hozama vagy új vegyületek is képződhetnek [8]–[10].

2.3. Szekunder metabolitok

A kofermentációk során keletkező új vegyületeket „Natural Products” -oknak (NP), vagyis „természetes termékeknek” nevezik, melyek számos gyógyszer és egyéb kémiai hatóanyag fontos forrásai. A keletkező termékek közül jelentős számú vegyület jó biológiai aktivitással rendelkezik, például rákellenes, baktériumellenes, parazitaellenes és

szabadgyökfogó hatású, sőt, közülük néhányat klinikai kutatások után gyógyszerként forgalomba is hoztak. Huiqin Chen és munkatársai az egyiptomi Wadi-tó üledékéből kinyert *Aspergillus terreus* szilárd, rizs táptalajon együtt tenyésztették *Bacillus subtilis* illetve *Bacillus cereus* baktériumtörzsekkel. Aztapasztalták, hogy az együttes tenyésztés során a konstitutívan termelt anyagok mennyisége megsokszorozódott a gomba axenikus módon történő tenyésztéséhez képest. A keletkező mátrix tartalmazott két új butirolakton-származékot (izobutirolakton II és 4-O- demetilizobutirolakton II) is az N-karboximetil-antranilsav mellett, amelyek nem voltak jelen az axenikus gombatenyésztéssel, illetve a kétféle *Bacillus*-szal külön-külön végzett kontroll tenyésztések során, vagyis ezek a termékek csak a kofermentációk során észlelhetők. A kísérlet második részében az *Aspergillus terreus* *Streptomyces lividans*-szal és *Streptomyces coelicolor*-ral szaporították együtt, mely során azt tapasztalták, hogy ezek a mikroorganizmusok nem indukálták azoknak a „természetes termékek” -nek a képződését, melyek a *Bacillus*-okkal történő együttes növesztés során keletkeztek [9], [11].

Napjainkban már rendkívül sok hasznos másodlagos anyagcseretermék ismert és ezek előállítására több lehetőség is rendelkezésre áll. A különböző metabolitok szintetizálhatóak kémiai úton vagy izolálhatóak valamilyen természetes forrásból, de fermentációs úton is előállíthatóak és kinyerhetőek az adott metabolitot termelő mikroba felhasználásával. A fermentációs előállítás nagy előnye, hogy a gyártás kíméletes körülmények között zajlik és veszélyes anyagok nem kerülnek felhasználásra [4], [12].

2.3.1. *Aspergillus terreus* szekunder metabolitjai

Az *Aspergillus terreus* számos hasznos másodlagos anyagcsereterméket termel, az *Antibase adatbázis*ban a gomba nevére rákeresve 165 különböző kémiai szerkezetet kapunk eredményül (2014-es adat). Az *A. terreus* szekunder metabolitjai közül ipari szempontból az egyik legfontosabb **lovasztatin** ($C_{24}H_{36}O_5$), amely hatékony humán koleszterincsökkentő anyag. Megjelenését tekintve fehér színű, nem higroszkópos, kristályos por. Vízben nagyon rosszul, acetonban és etanolban gyengén, míg kloroformban nagyon jól oldódik. A lovasztatin tehát egy lakton metabolit, amely koleszterinszint csökkentő hatással rendelkezik. Ezt úgy képes kiváltani, hogy aktív béta-hidroxisavvá hidrolizálódik, ami kompetitív módon, reverzibilisen gátolja a koleszterin bioszintézisében részt vevő 3-hidroxil-3-metil-glutaril-koenzim reduktazt. Ezen kívül potenciális antineoplasztikus hatással is rendelkezik, ugyanis valószínűsíthető, hogy

indukálja a tumorsejtek apoptotikus halálát, valamint gátolja ezen sejtek terjedését. A sejtciklust már a korai fázisban megállítja, így a beteg sejtek az ionizáló sugárzásokkal szemben érzékenyebbé válnak [13].

A gomba által termelt további hasznos metabolitok például a **geodin**, a **terrein**, a **monakolin L** és az **aspulvinon E**, melyek fizikai-kémiai tulajdonságai a (1. táblázat)-ban találhatók. Azt azonban fontos megemlíteni, hogy a szekunder metabolitok képződése főként a törzstől, valamint a tenyésztés körülményeitől függ. Marcin Bizukojc és munkatársa például *Aspergillus terreus* ATCC 20542-vel végeztek kísérletet, úgy, hogy magas laktózkoncentrációt biztosítottak még a gomba növekedésének idiofázisában is, míg az élesztőkivonatból, amely nitrogénforrásként szolgált, csak kis mennyiség volt elérhető a mikroba számára. Ekkor azt figyelték meg, hogy az *Aspergillus* szokványos módon termelte a lovasztatint, de emellett jelentős mennyiségű geodin is képződött [14].

A **geodin** ($C_{17}H_{12}Cl_2O_7$) fizikai, kémiai tulajdonságaiban különbözik a lovasztatintól; természetes klórozott szénvegyület, sárga kristályos anyag, mely antimikrobiális és antivirális hatással bír. Struktúráját tekintve: a kristályszerkezete két független, de hasonló molekulából áll, melyek aszimmetrikusan helyezkednek el. A két molekula egy $O \cdots Cl$ halogénkötésen keresztül kapcsolódik egymáshoz [15], [16].

A **terrein** ($C_8H_{10}O_3$) szilárd halmazállapotú, gyűrűs szerkezetű anyag. Vízen oldódik, az oldat tiszta, színtelen. Ezenkívül jól oldódik dimetil-szulfoxidban is. Fontos tulajdonságai közé tartozik, hogy növényi növekedésgátló és antibakteriális hatással is rendelkezik. A terrein gátolja a melaninszintézist azáltal, hogy a tirozináz nevű enzimfehérje termelését csökkenti. Ez az enzim felelős az emlőseknél a tirozin melaninná történő átalakításában, ami pedig döntő szerepet játszik például az emberi bőrszín kialakulásában, valamint a bőr fényérzékenységet is meghatározza [17], [18].

A **monakolin L** ($C_{19}H_{28}O_3$) egy gyűrűs szerkezetű poliketid, a másodlagos alkoholok egyik képviselője. Képes gátolni a hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktáz enzim működését és így fontos összetevője a különböző koleszterinszint csökkentő gyógyszereknek is. Bár az ismert monakolin vegyületek közül a **monakolin K**-t tartják a leghatékonyabbnak a koleszterinszint csökkentésében – mivel a szerkezete rendkívül hasonlít a HMG-CoA-hoz, ezért képes a HMG-CoA reduktáz, vagyis a koleszterinszintézis sebességkorlátozó enzimének gátlására, kompetitív módon – a csoport többi képviselője is képes kiváltani ezt a hatást, amely egyébként szinte teljesen azonos a lovasztatin hatásmechanizmusával. T.-M. Pan és munkatársa további

érdekességeket figyeltek meg és jegyezték le a monakolin vegyületek kapcsán: egy stabilitási kísérlet eredményeképp megállapították, hogy a monakolin K, L és J magas relatív páratartalom, magas hőmérséklet és napfény mellett a megfelelő hidroxilsavvá alakulnak át, vagyis a monakolinok érzékenyek a hőmérsékletre és a fényre egyaránt [19], [20].

Az **aspulvinon E** antivirális hatással rendelkező, sárga színű vegyület, amely 400 nm-en erős abszorbanciát mutat. Ez jól egyezik a szakirodalmi adatokkal, mivel a sárga anyagok az említett hullámhosszon nyelik el a fényt. Az aspulvinonok bioszintetikus útjának egyik korai terméke [21], [22].

1. táblázat

Aspergillus terreus szekunder metabolitjai

<i>szekunder metabolit</i>	<i>molekulatömeg</i>	<i>olvadáspont</i>	<i>lobbanáspont</i>	<i>gőznyomás (25 °C-on)</i>
lovasztatin	404,54 g/mol	174,5 °C		$2,22 \times 10^{-12}$ Hgmm
geodin	399,2 g/mol	235 °C	$348,2 \pm 31,5$ °C	$0,0 \pm 2,2$ Hgmm
terrein	154,16 g/mol	125-127 °C		
monakolin L	304,4 g/mol			
aspulvinon E	294,27 g/mol			

3. Anyagok és módszerek

Az alábbiakban a kutatásom során felhasznált anyagok, vegyszerek, valamint az alkalmazott módszerek ismertetése következik.

3.1. Felhasznált anyagok és vegyszerek

2. táblázat

Felhasznált anyagok és gyártói

Név	Gyártó	Tisztaság
Nutrient broth	Biolab Zrt.	mikrobiológiai célra
Agar		bakterológiai
Tween 80	Reanal	analitikai reagens
Nátrium-klorid	Spektrum 3D	analitikai reagens
Kalcium-klorid-dihidrát	Scharlab Magyarország Kft.	puriss.
Magnézium-szulfát-heptahidrát	Merck	puriss.
Ammónium-nitrát	Reanal	puriss.
Kálium-dihidrogén-foszfát	Biolab Zrt.	purum
D-glükóz-monohidrát	VWR	technikai m.
Vas (III)-klorid-hexahidrát	Reanal	h.a.: 0,169 g/20 ml, analitikai reagens
Réz-szulfát-heptahidrát	Reanal	h.a.: 33,5 mg/ml, analitikai reagens
Cink-szulfát-heptahidrát	Reanal	h.a.: 32 mg/ml, analitikai reagens
desztillált víz	-	41 μ S/cm
bidesztillált víz	-	1,4 μ S/cm, sterilre szűrt (0,2 μ m szűrőn) HPLC-hez
95%-os kénsav	VWR	analitikai reagens
metanol (eluens)	VWR	HPLC gradient grade
DNS reagens	Acros Organics	98%
Nátrium-kálium-tartarát	Molar Chemicals Kft.	analitikai reagens
metanol	Molar Chemicals Kft.	laboratóriumi célra (99,96%)
etil-acetát	Scharlau	99,7%
trifluor-ecetsav	Sigma-Aldrich	szintézis célra

3.2. Vizsgálati módszerek

Az alábbiakban az általam alkalmazott módszerek kerülnek részletes bemutatásra.

3.2.1. Agarkorongos kompatibilitási kísérlet

Az egyes *Aspergillus terreus* törzsek és a különböző *Bacillus* fajok egymásra gyakorolt hatásának vizsgálatához úgynevezett agarkorongos kompatibilitási kísérletet végeztem. A kísérlethez rendelkezésemre állt kétféle *Aspergillus terreus* törzs: a DSM 23081 és a DSM 826 ferde agaros tenyésztete, valamint két *Bacillus* faj: *Bacillus megaterium* (DSM 3228), *Bacillus ssp. spizizeni* (DSM 347) szintén ferde agaros tenyésztete. A kompatibilitási teszt első lépéseként elkészítettem a Nutrient Agart, amely komplex összetételű, általános baktériumnevelő közeg, valamint a Potato Dextróz Agart, amely pedig egy közismert gombanevelő közeg. A kísérlet elvégzéséhez a gomba- és baktériumtenyészetekből spóraszuszpenziókat kell készíteni, melyekhez fiziológiás sóoldat szükséges, melyhez hozzáadtam még 0,100 gramm Tween 80 felületaktív anyagot, mely a spórák hidratációját segíti elő, lehetővé téve homogén szuszpenzió készítését.

Az így elkészített kétféle tápoldatot és a fiziológiás sóoldatot az **A&E Lab által gyártott AE- PB24 típusú autoklávban** 121 °C-on, 20 percig sterilizáltam. A csíramentesítés, valamint a steril körülmények fenntartása kulcsfontosságú szerepet játszik egészen a kísérlet végéig. Mivel ezen mikroorganizmusok is élőlények, szaporodásukat, viselkedésüket rengeteg tényező befolyásolja, ezért rendkívül fontos, hogy például az adott Petri csészében ténylegesen csak azon mikrobák legyenek jelen, amelyekkel dolgozni szeretnénk, illetve az ezek számára elengedhetetlen tápanyagok. Annak érdekében tehát hogy a kísérlet kezdetekor semmilyen fertőzés ne legyen az adott tápoldatban sterilizálást végeztem, majd ezt követően minden műveletet lamináris box alatt hajtottam végre. A lamináris box működésének lényege, hogy a megfelelő szűrőn megtisztított, steril levegő turbulencia nélkül, vízszintes irányban áramlik, ezáltal védi a fülkében lévő oldatokat, táptalajokat a különböző szennyeződésektől. A steril körülmények fenntartását egyéb intézkedésekkel is elő tudjuk segíteni, például a fülkét mindenhasználat előtt és után alkoholos fertőtlenítőszerrel áttöröltem és néhány percre bekapcsoltam a germicid lámpát, ezáltal a munkafelületre kerülő esetleges szennyeződéseket is eltávolítottam. Továbbá a szuszpenziók készítésekor, az áttöltáskor és a szélesztéskor a kémcsövek száját és a szélesztőbotot leégtettem borszeszégő segítségével, ezáltal az esetleges szennyeződések bekerülésének esélyét tovább

csökkentettem, illetve a Petri csészéket is mindig úgy nyitottam ki, hogy csak a HEPA szűrőre, steril levegő érje őket. A 20 perc nedves hővel történő sterilizálástkövetően tehát az immáron steril oldatokat lamináris box alá tesszük. Miután a teljesen homogén Nutrient táptalaj egy kicsit lehűlt, hét darab steril műanyag Petri csészébe öntöttem ki és megvártam míg megszilárdul, majd hasonlóképpen jártam el a PDA táptalajjal is. Közben a ferde agaron található gomba- és baktériumtenyészetek és a fiziológiás sóoldat segítségével elkészítettem a spóraszuszpenziókat. A kémcsövekbe, melyekben a tenyészetek találhatóak, 4,5 ml fiziológiás sóoldatot pipettáztam, majd óvatosan, úgy, hogy a táptalaj ne roncsolódjon, vortexeltem, hogy a spórák leváljanak és a sóoldattal szuszpenziót képezzenek. A baktérium spórái kevésbé „ragaszkodnak”, ezért könnyebben szuszpenzióba vihetők, míg a gombákat tartalmazó kémcsöveket hosszabb ideig kellett vortexelni.

Az így elkészített gomba- és baktérium-spóraszuszpenziókat a megfelelő táptalajokra oltottam: a két *Aspergillus* tartalmazó kémcsőből 100-100 µl-t a PDA agar közepére pipettáztam, majd szélesztőbot segítségével a táptalaj teljes felületén szétoszlattam a szuszpenziót. Hasonlóképpen jártam el a két *Bacillus*sal is: 100-100-100 µl-t a Nutrient Agart tartalmazó Petri csészék közepére pipettáztam és eloszlattam a táptalajon. Ezt követően a kétféle gombával oltott PDA agarokból fertőtlenített, majd gondosan leégetett, 20 mm-es dugófűrő segítségével kis köröket vágtam ki és szintén leégetett csipesz segítségével a különböző *Bacillus*okat tartalmazó Nutrient Agar közepére helyeztem át őket. Ezáltal négy vizsgálandó rendszert hoztam létre:

- *Aspergillus terreus* DSM 23081 + *Bacillus megaterium*
- *Aspergillus terreus* DSM 23081 + *Bacillus subtilis*
- *Aspergillus terreus* DSM 826 + *Bacillus megaterium*
- *Aspergillus terreus* DSM 826 + *Bacillus subtilis*

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassam, hogy a gomba önmagában is kinő a Nutrient táptalajon, egy-egy *Aspergillus* tartalmazó agarkorongot áthelyeztem egy-egy olyan Nutrient Agart tartalmazó Petri csészébe, amelyre egyik baktériumtörzset sem oltottam rá.

3.2.2. Kofermentáció rázatott lombikos módszerrel

A kompatibilitási kísérlet eredményét alapul véve az *Aspergillus terreus* DSM 23081-et és a *Bacillus megaterium* DSM 3228-t használtam fel a rázatott lombikos

kísérlethez a későbbiekben ismertetett megfontolások alapján. A rázatott lombikos méréshez szükséges tápoldatot, amely a gomba számára kedvező, és az itakonsav termelésre van optimalizálva, a szakirodalom [23] alapján állítottam össze; a 750 ml tápoldathoz szükséges mennyiségeket az alábbi **(3. táblázat)** tartalmazza:

3. táblázat

Tápoldat összetevők és mennyiségük

KH ₂ PO ₄	0,075 g
NH ₄ NO ₃	2,25 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,75 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	3,75 g
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	~130 µl
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	~180 µl
CuSO ₄ × 7 H ₂ O	~180 µl
D-glükóz-monohidrát	90 g
desztillált víz	750 ml

Miután a szükséges hozzávalókat kimértem és homogenizáltam a tápoldatot, 10 %-os kénsav cseppenkénti adagolásával a pH-t 3,0-3,2 közé állítottam, miközben az oldatot folyamatosan kevertetem mágneses keverő segítségével. Az elkészült oldatból hét darab Erlenmeyer lombikba 100-100 cm³-t mértem be mérőhengerrel, majd vattadugóval és nátronpapírral lezártam, és 121 °C-on, 20 percig sterilizáltam. Ezt követően lamináris box alá helyeztem a lombikokat és megvártam míg kézmelegre hűltek. Eközben a fentebb említett gomba és baktérium törzsek (új) ferde agaros tenyészetére 9-9 ml fiziológiás sóoldatot pipettáztam, majd vortexeltem; az így elkészített spóraszuszpenziókat használtam fel a tápoldatok beoltására a következőképpen: hat lombikba 1-1 ml gomba- spóraszuszpenziót pipettáztam, majd ezek közül háromba még 100-100 µl baktérium- spóraszuszpenziót is juttattam. A bejuttatott baktérium-spóraszuszpenzió mennyisége tehát egy nagyságrenddel kisebb, melynek oka az, hogy mikroszkóp segítségével becsültem, hogy körülbelül egy nagyságrenddel több spóra kerül szuszpenzióba mint a gombaesetében, ezért elegendő

kevesebb mennyiséggel inokulálni. A maradék egy lombikot pedig 1 ml *Bacillus*-spóraszuszpenzióval oltottam. Ezáltal azt vizsgáltam 3-3 párhuzamossal, hogy az *Aspergillus terreus* önmagában, illetve a *Bacillus megaterium*mal való közös tenyészetben miként viselkedik adott tápoldat összetétel és körülmények mellett. A hetedik, csak baktériummal oltott rendszer pedig tulajdonképpen kontrollként szolgál, hogy lássam, hogy a többi lombikban keletkező termékeket ténylegesen a gomba termeli-e, illetve, hogy a baktérium hogyan fejlődik ezen a tápoldaton. Az így összeállított lombikokat **New Brunswick Scientific G24 Environmental Incubator Shaker típusú rázógé**pbe helyeztem és 200 rpm-es fordulatszámra ráztam, miközben 33 °C-on termosztáltam őket. 48 óra elteltével azt tapasztaltam, hogy a gomba kinőtt a tápoldatban, ami így rózsaszínes árnyalatot vett fel, viszont a baktériumot tartalmazó lombik nem zavarosodott be, melynek oka az alkalmazott körülményekben keresendő. Lehet például a túl tömény cukorkoncentráció, és/vagy a 3-as pH, ami miatt a *Bacillus* spórák átalakulása vegetatív sejtekké gátolt volt. Annak ellenőrzésére, hogy a lombikokban ténylegesen csak azok a tenyészetek vannak jelen, amelyeket bejuttattam, illetve annak érdekében, hogy megbizonyosodjak, hogy a gomba és a baktérium együtt életképes-e adott körülmények között, **felületi szélesztést** hajtottam végre, valamint mikroszkóp alatt is megvizsgáltam az egyes rendszereket. Lamináris box alatt, egyszerűhasználatos oltókacs segítségével a lombikokból 10-10 µl-t Nutrient Agar tartalmazó Petri csészére juttattam és szétoszlattam.

A kofermentációs kísérlet közben 48, 96 és 168 óra elteltével minden lombikból mintát vettem, amelyeket fagyasztóba helyeztem és később dolgoztam fel. 240 óra elteltével szintén mintát vettem és leállítottam a fermentációt. A mintákat a megfelelő módon előkészítettem a különböző analitikai vizsgálatokhoz. Az itakonsav mennyiségének meghatározásához a 48 órás mintákat 500x-osra, a többi mintát pedig 1000x-esre hígítottam az eluensként is használt kénsav oldattal. A szekunder metabolitok mennyiségét csak a fermentáció vágását követően mértem meg; 7 ml teljes fermentlevet centrifugacsőbe tettem, majd 7 ml HPLC metanolt adtam hozzá és egy éjszakára alacsony fordulatszámra működő rázógépbe helyeztem őket az intenzív fázisérzékenyítés érdekében [24]. Ezt követően a metanolos extraktumokat 0,2 µm-es szűrőn átszűrtem és a szűrleteket 5x-re hígítottam (a hígítás mértéke így összesen 10x lett az extrakciót is figyelembe véve) HPLC metanollal. Az így elkészült mintákat HPLC mintatartó üvegbe pipettáztam és elvégeztem a megfelelő méréseket.

A mintákban lévő cukortartalom meghatározásához – mivel a kísérlet elején feltehetőleg még sok cukor van jelen a rendszerben – a 48 és a 96 óra elteltével vett minták esetében 150x-es hígítást alkalmaztam. A kísérlet végére feltehetőleg csökken a cukorkoncentráció, ezért a 168 és a 240 óra elteltével vett minták esetében 50x-es hígítást alkalmaztam.

3.3. Analitikai módszerek

Az alábbiakban az általam alkalmazott analitikai módszereket mutatom be részletesen.

3.3.1. Glükózkoncentráció meghatározása

A glükóztartalom meghatározáshoz dinitro-szalicilsav módszert alkalmaztam. A DNS módszer azon alapszik, hogy a 3,5-dinitro-szalicilsav lúgos közegben, redukáló cukor jelenlétében 3-amino-5-nitro-szalicilsavvá alakul, amely az 540-590 nm-es tartományban fotometrálnak. A redukáló cukor olyan mono- vagy diszacharid cukor, amely képes elektronokat adni más molekuláknak és ezáltal redukáló ágensként fejti ki hatását. Ezt szabad keton- vagy aldehid csoport jelenléte teszi lehetővé. A módszer hátránya, hogy 0-1 g/l-es tartományba eső redukáló cukor koncentráció esetén megbízható, ezért a megfelelő hígításokkal kell dolgozni. Először a kalibráló egyenes felvételéhez kémcsövekbe hígítási sort készítettem standard, 1,00 g/l-es glükózoldat és desztillált víz felhasználásával az alábbi (4. táblázat) szerint.

4. táblázat

Kalibráló sor a glükózkoncentráció meghatározásához

	<i>glükózoldat</i>	<i>desztillált víz</i>
<i>vak</i>	0 ml	3 ml
<i>1/3 g/l</i>	1 ml	2 ml
<i>2/3 g/l</i>	2 ml	1 ml
<i>1 g/l</i>	3 ml	0 ml

Az így elkészült oldatokhoz, és később, a meghatározandó mintákhoz is 1-1 ml 40 %-os Na-K-tartarát oldatot adtam hozzá, amely azért szükséges, hogy a reakció során kialakuló színt fixáljuk; így az oldat megőrzi színét és a fotometriás meghatározás során megfelelő, valós eredményeket kapunk. Továbbá 3-3 ml DNS reagenst is adagoltam minden kémcsőbe. Ezután a kémcsöveket 90 °C-os vízfürdőbe helyeztem 10 percre, majd folyó hidegvízzel, körülbelül 20 °C-osra hűtöttem őket és spektrofotométer segítségével megmértem az abszorbanciájukat 575 nm-en.

3.3.2. Itakonsav koncentrációjának meghatározása

Az itakonsav meghatározásra használt HPLC rendszer az YL9100 HPLC System volt. A készülékben a Hamilton által gyártott, PRP-X300 típusú kolonna található, melynek részecskemérete 7 μm , dimenzióját illetően pedig 150x4,1 mm-es méretekkel jellemezhető. A mérés során a következő kromatográfiás beállításokat alkalmaztam: 100 μl -es injektálási térfogat, 2 ml/perc-es áramlási sebesség, 210 nm-es detektálási hullámhossz. Mozgófázisként 1 mM-os kénsavat (1000 ml-es mérőlombikba 54 μl 95 %-os kénsav + kétszer desztillált víz) és HPLC minőségű metanolt használtam. A HPLC rendszer gradiens pumpával rendelkezik, ami tudja program szerint keverni a különböző eluenseket, és az általam használt metódus egy gradiens-módszer volt, amely során az (5. táblázat)-ban leírtak szerint változik az eluens összetétele.

A HPLC-s elválasztás azon alapul, hogy a gyenge savak a pH függvényében protonált, illetve deprotonált formában vannak jelen az oldatban, töltésük határozza meg, hogy az állófázis porózus szemcséibe be tudnak-e hatolni; minőségük és protonáltságuk függvényében különböző sebességgel haladnak az oszlopon. A pH-t az alkalmazott mozgófázis határozza meg. Az eljárás során ioncsere kromatográfiás oszlopot használtam. A kromatográfiás csúcsok minőségi azonosítására a retenciós időt, míg a mennyiségi meghatározásra az ismert koncentrációjú hígítási sorral elkészített kalibrációt használjuk. A méréshez szükséges hígítási sort 10 mM koncentrációjú itakonsav törzsoldatból készítettem el. A törzsoldathoz 130,1 mg itakonsav standardot oldunk 100 ml 1 mM-os kénsavban, majd ebből 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM és 0,5 mM oldatot készítettem hígítással: rendre 100, 200, 300, 400 és 500 μl törzsoldatot 10 ml-es mérőlombikba pipettáztam, majd 1 mM-os kénsavval jelre töltöttem. Az így elkészített, ismert koncentrációjú oldatokat megmértem a HPLC segítségével.

5. táblázat

Gradiens program itakonsav meghatározáshoz

kezdeti	100% 1 mM-os kénsav	
1 perc	70% 1 mM-os kénsav	30% metanol
6 perc	70% 1 mM-os kénsav	30% metanol
8 perc	100% 1 mM-os kénsav	
8 perc	stop	

3.3.3. Szekunder metabolitok vizsgálata

A keletkező másodlagos anyagcsere termékek kimutatásához többféle kolonnát,

HPLC módszert, beállítást és eluenst is kipróbáltam. Végül a szekunder metabolitok vizsgálatához a COSMOSIL által gyártott 5C18-MS-II 4,6 ID x 250 mm típusú kolonnát alkalmaztam. A mérés során a YL9100 HPLC System-et használtam, a fő termék azonosításához hasonlóan.

A vizsgálat során a következő kromatográfiás beállításokat alkalmaztam: 10 µl-es injektálási térfogat, 1 ml/perc-es áramlási sebesség, 240 nm-es detektálási hullámhossz. Mozgófázisként HPLC minőségű metanolt és 0,1%-os trifluor-ecetsavat használtam. A trifluor-ecetsav a szakirodalom szerint [25] a kromatográfiás csúcsok jobb elválását segíti elő, ezért volt szükség rá. Az analízis során gradiens programot (**6. táblázat**) alkalmaztam, vagyis az eluens összetétele a mérés közben bizonyos időközönként változott. Ennek oka, hogy a különböző polaritással rendelkező anyagokat a lehető legjobban szerettem volna szeparálni egymástól.

6. táblázat

Gradiens program a szekunder metabolitok vizsgálatára

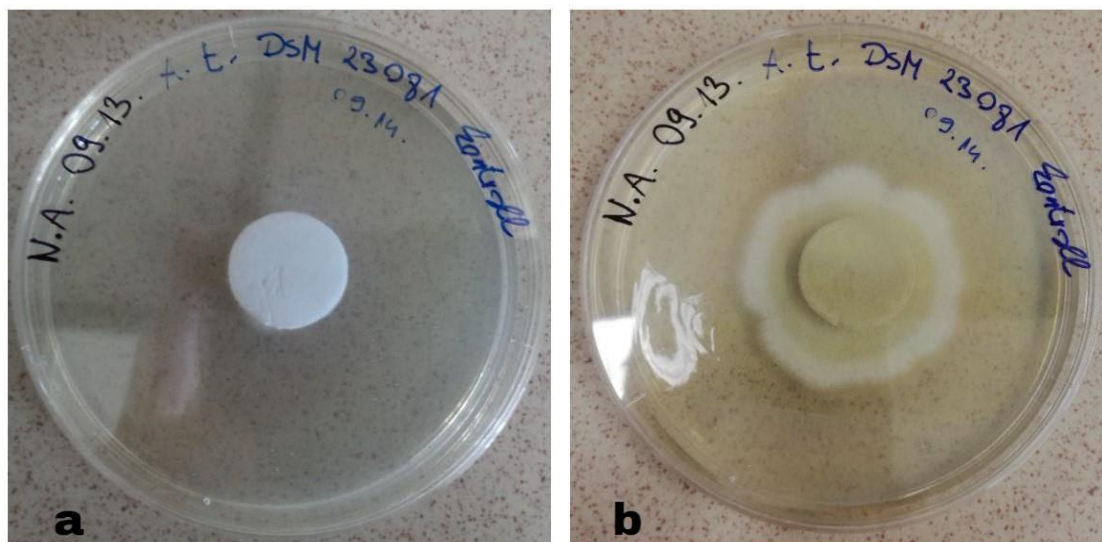
kezdeti	90 % trifluor-ecetsav	10 % metanol
15 perc	20 % trifluor-ecetsav	80 % metanol
20 perc	20 % trifluor-ecetsav	80 % metanol
22 perc	90 % trifluor-ecetsav	10 % metanol
27 perc	90 % trifluor-ecetsav	10 % metanol
45 perc	stop	

4. Eredmények és kiértékelésük

Az alábbiakban az elvégzett mérések eredményeit és az azokból levont következtetéseket szeretném ismertetni.

4.1. Agarkorongos kompatibilitási kísérlet eredménye

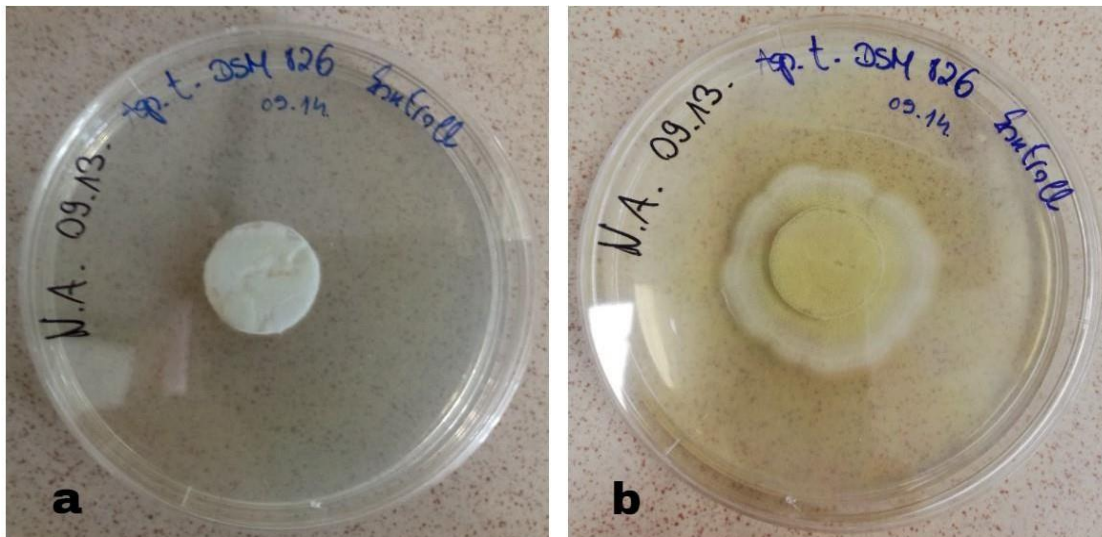
Az elkészített rendszereket 1 nap és 6 nap elteltével is megvizsgáltam és az alábbiakat tapasztaltam: Az *Aspergillus terreus* DSM 23081 már 1 nap elteltével is jól láthatóan kinőtt a PDA agarlemezből kivágott és áthelyezett agarkorongon, tehát a Nutrient Agar komponensei nem gátolják a gomba növekedését. Ezt támasztja alá az is, hogy 6 nap elteltével azt tapasztaltam, hogy a gomba tovább növekedett, már nem csak a PDA korongon, hanem körülötte, a Nutrient Agaron is jól látszik a gombatenyészet (2. ábra).



2. ábra

Aspergillus terreus DSM 23081 (kontroll) **a:** 1 nap, **b:** 6 nap elteltével

Az *Aspergillus terreus* DSM 826 esetében is hasonlóak a tapasztalatok; ez a törzs is már 1 nap elteltével megjelenik a PDA korongon, majd az idő előrehaladtával egyre inkább szaporodik és 6nap elteltével már ez is nagymértékben áttért a Nutrient-re is (3. ábra).

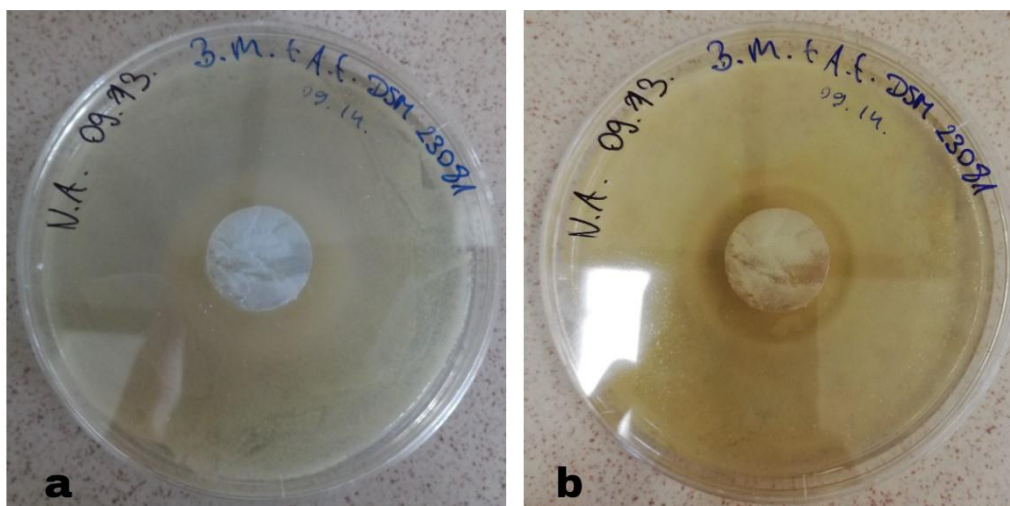


3. ábra

Aspergillus terreus DSM 826 (kontrol) **a**: 1 nap, **b**: 6 nap elteltével

A gombák növekedését folyamatosan nyomon követtem és azt tapasztaltam, hogy a DSM23081 kis mértékben bár, de gyorsabban növekedett és ezáltal a 6 nap alatt jobban elterjedt a táptalajon. Az azonban kijelenthető, hogy mindkét gombatörzs axenikus tenyésztete életképes és néhány nap alatt el tud szaporodni a Nutrient Agaron.

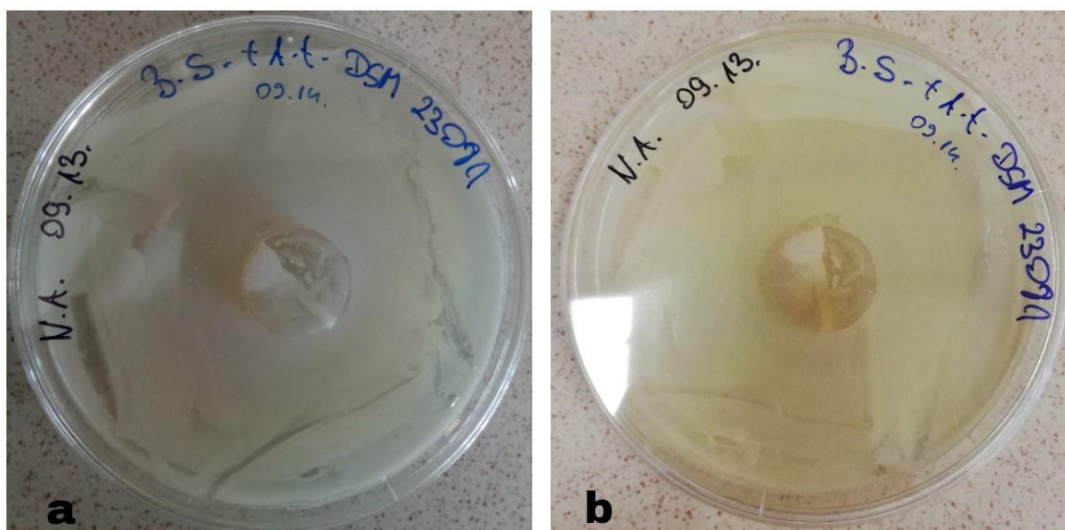
Az *Aspergillus terreus* DSM 23081 és a *Bacillus megaterium* közös tenyésztete esetén 1 nap elteltével azt tapasztaltam, hogy a baktérium kifejlődött és a tenyésztete beborította a teljes agarfelületet, valamint a gomba is kinőtt a PDA korongon. Ha azonban közelebbről megfigyeljük ezt a rendszert, látható, hogy a gombát tartalmazó agarkorong körül egy nagyon keskeny, szabad szemmel alig észrevehető sávban elhalt a baktérium. Az idő előrehaladtával ez a sáv egyre szélesebbé válik és 6 nap elteltével már nagyon jól látható, hogy az agarkorong körül kialakult egy adott szélességű úgynevezett gátlási zóna, ahol sem a *Bacillus* tenyésztet, sem a mikrogomba nincs jelen (4. ábra). Ez azt jelenti, hogy a *Bacillus megaterium* és az *A. terreus* DSM 826 hatással vannak egymás szaporodására, interakcióba lépnek egymással, kölcsönösen gátolják egymást.



4. ábra

A. terreus DSM 23081 és *Bacillus megaterium* tenyészet **a:** 1 nap, **b:** 6 nap elteltével

Ezzel szemben az *Aspergillus terreus* DSM 23081 és a *Bacillus subtilis* együttes tenyésztése során azt tapasztaltam, hogy a baktérium beborította a táptalaj teljes felületét, azonban a gomba alig nőtt ki a PDA korongon. (5. ábra). Ennek oka, hogy az említett baktérium faj teljes mértékben gátolja a gomba szaporodását. Ez a hatás már 1 nap elteltével is jól megfigyelhető, 6 nap elteltével pedig tovább fokozódik.



5. ábra

A. terreus DSM 23081 és *Bacillus subtilis* tenyészet **a:** 1 nap, **b:** 6 nap elteltével

Érdekes továbbá, hogy a *Bacillus subtilis* *Aspergillus terreus* DSM 826-tal való közös tenyésztése esetében is gyakorlatilag ugyanezek a tapasztalatok; a baktérium már 1 nap elteltével a táptalaj egészén megjelenik, viszont a gomba csak kis mértékben képes elszaporodni az agarkorongon, hiszen a baktérium nagy mértékű gátló hatással van a

szaporodására. Ez a 6 nap elteltével egyre inkább megmutatkozik. Megállapítható tehát, hogy a *Bacillus subtilis* az említett gombatörzsek egyikével sem érdemes kofermentálni, hiszen a baktérium szinte teljes mértékben gátolja a gombatörzseket szaporodásukban.

Ezzel ellentétben az *Aspergillus terreus* DSM 826 és a *Bacillus megaterium* kultúrája esetén már az első nap elteltével azt tapasztaltam, hogy a gomba kifejlődött PDA korongon és körülötte jól láthatóan elkezdett kialakulni a gátlási zóna, amely az eltelt 6 nap folyamán egyre inkább kiszélesedett. Elmondható tehát, hogy ezen mikrobák interakcióba léptek egymással, melynek következtében a gomba körül a baktériumtelepek nem voltak életképesek.

A megfigyelések alapján tehát elmondható, hogy a *Bacillus subtilis* DSM 347 tenyészet mindkét rendelkezésemre álló *Aspergillus terreus* törzset szinte teljes mértékben visszaszorította, ezzel tehát nem érdemes kofermentációs kísérletekbe kezdeni, hiszen a távlati célom az *A. terreus* itakonsav termelése mellett fokozni a szekunder metabolitok termelődését. Ezzel szemben a *Bacillus megaterium* DSM 3228 jelenléte bár hatással volt mindkét gombatörzsrre és mindkét esetben megjelent a gátlási zóna, de az *Aspergillus* nem ölte el, az képes volt elszaporodni az agarkorongon, és metabolikusan reagálni. Tehát érdemes kipróbálni, hogy a *Bacillus megaterium*-ot valamely *Aspergillus* törzsszel kofermentáljuk, hiszen a mikroorganizmusok hatást fejtenek ki egymásra, a baktérium jelenléte a 6 napos inkubáció alatt megváltoztathatta a gomba viselkedését, ezáltal befolyásolhatja a termékképzését is. A rázatott lombikos módszerrel végzett kofermentációs kísérletet *Bacillus megaterium* és *Aspergillus terreus* DSM 23081 törzsszel indítottam el, mivel azon túl, hogy kialakult a gátlási zóna, ez a gombatörzs növekedett gyorsabban.

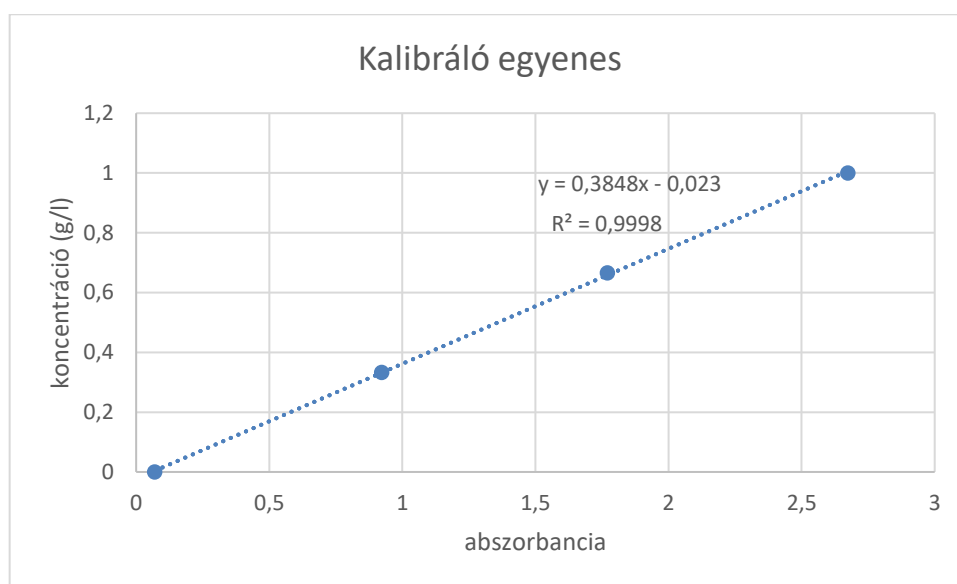
4.2. Felületi szélesztés eredménye

A rázatott lombikokból 48 óra elteltével tehát **felületi szélesztést** hajtottam végre. A gomba jól láthatóan elszaporodott az Nutrient Agaron az axenikus és a kofermentációs rendszerből vett minták esetén egyaránt. A közös tenyészet esetén azt vártam, hogy a baktériumtelepek is megjelenjenek a táptalajon, ez azonban nem következett be. A baktérium önálló tenyészetéből vett minta esetén azonban azt tapasztaltam, hogy bár a vártnál kisebb számban, de a telepek megjelentek az agaron, tehát a csírák egy része életképes maradt. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy – mivel a körülmények azonosak voltak – a gomba jelenléte miatt veszítették el a baktériumspórák teljesen az életképességüket.

A felületi szélesztés eredménye tehát megmutatta, hogy a kofermentációs lombikokban a *Bacillus megaterium* nem képes kifejlődni. A kofermentációs kísérletet azonban érdemes folytatni, hiszen az agarkorongos kompatibilitási kísérlet azt mutatta meg, hogy a két mikroorganizmus hatással van egymásra, tehát feltételezhető, hogy a bejuttatott baktérium spórák már a kezdeti szakaszban kiváltottak valamilyen hatást, melynek következtében befolyásolták a gomba viselkedését, szaporodását, termékképzését.

4.3. A glükóz- és az itakonsav-tartalom alakulása

A különböző rendszerek glükóz tartalmának időbeli alakulását DNS módszer segítségével követtem nyomon. A lombikokban lévő cukorkoncentráció meghatározásához kalibráló egyenest (6. ábra) készítettem, majd az egyenes egyenlete alapján kiszámoltam az abszorbancia értékekhez tartozó koncentráció értékeket és a megfelelő hígítást figyelembe véve meghatároztam a lombikokban lévő cukor koncentrációját.

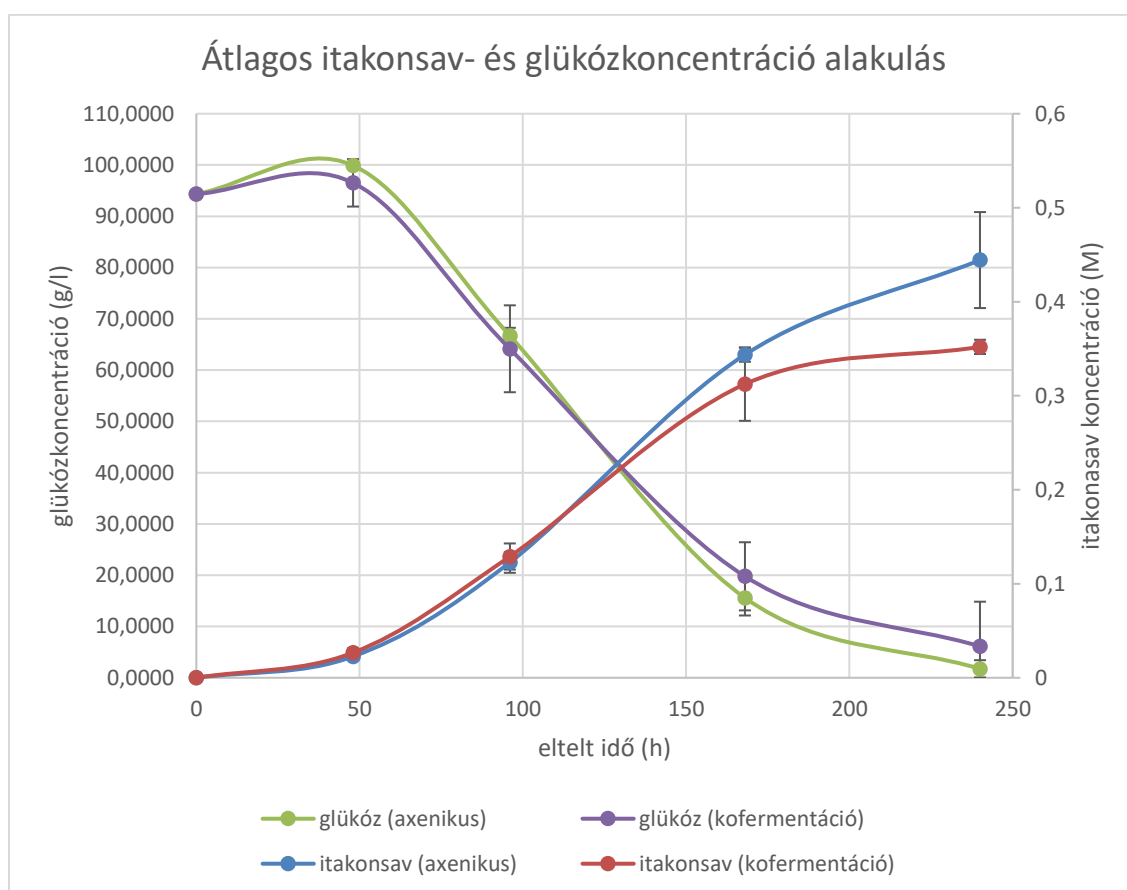


6. ábra

Kalibráló egyenes a glükózkoncentráció meghatározásához

Az adott időpillanatokhoz tartozó itakonsav-koncentrációt HPLC módszer segítségével határoztam meg. A HPLC berendezéshez tartozó számítógépes szoftver a mérést követően megjeleníti a kromatogramokat, amelyeket rögtön ki is tudunk értékelni. A megjelenő csúcsoknak kijelöltem a kezdő és a végpontját, vagyis azokat a pontokat, ahol a felfutás elkezdődik, illetve ahol a görbe az alapvonalhoz „simul”. Ezután a rendszer integrálást végez és kiszámolja a csúcs alatti terület nagyságát. A kiértékelést követően az ábra alatt található táblázat mutatja a kromatográfiás csúcs(ok) adatait; a retenciós időt és a csúcs alatti

területet. Az ismert koncentrációjú standard-ek felhasználásával a cukorméréshez hasonlóan itt is kalibráló egyenest vettem fel, mely segítségével a koncentráció értékek meghatározhatóak, amelyekből pedig a megfelelő hígításokat figyelembe véve az eredeti koncentráció visszaszámolható. Az R^2 értéke azt mutatja meg, hogy a mért pontok mennyire illeszkednek az adott egyenesre, mivel ez jelen esetben 0,9998 és 0,9996, a kalibráló egyeneseket elfogadhatónak tekintjük és ez alapján pontosan meghatározhatók a koncentráció értékek. Az axenikus gombatenyészetet tartalmazó lombikok, valamint a kofermentációs rendszerek glükóz- és itakonsav-tartalmának értékét az egyes mintavételi pontokban átlagoltam, majd kiszámoltam a szórásokat is és ezt egy közös diagramon ábrázoltam (7. ábra).



7. ábra

Itakonsav- és glükózkoncentráció átlagos alakulása a két különböző rendszerben

Ez alapján elmondható, hogy ha az átlagokat nézzük, akkor a glükóz lefutásában tulajdonképpen nincs különbség az axenikus gombatenyészet és a kofermentációs rendszerek között, mivel minden mérési pontban átfednek a szórások. Ezzel szemben az itakonsav koncentráció időbeli lefutásában tapasztalunk eltérést, az utolsó pontban (240 óra)

a szórások egyáltalán nem fednek át, de a görbék már a 168 órás mintavételi pontnál kezdenek szétágazni. Fontos megemlíteni, hogy bár a sejttömeg alakulását nem követtem nyomon a mintázási térfogat korlátozott mennyisége miatt, de valószínűsíthető, hogy 168 óra elteltével a mikroba, növekedését illetően, már a hanyatló fázisban van és a szekunder anyagcseretermékek ekkor kezdenek megjelenni.

Az itakonsav átlagos végső koncentrációja axenikus tenyészet esetén 0,444 mólos, míg a kofermentációs rendszerben ez az érték csak 0,352, így a visszaesés közel 21%. Tehát, ha csak a fő termék keletkezését tekintjük, akkor gazdaságilag nem kifizetődő kofermentációt végrehajtani, hiszen a baktérium jelenléte negatívan hat az itakonsav termelődésére.

4.4. Szekunder metabolitok vizsgálatának eredménye

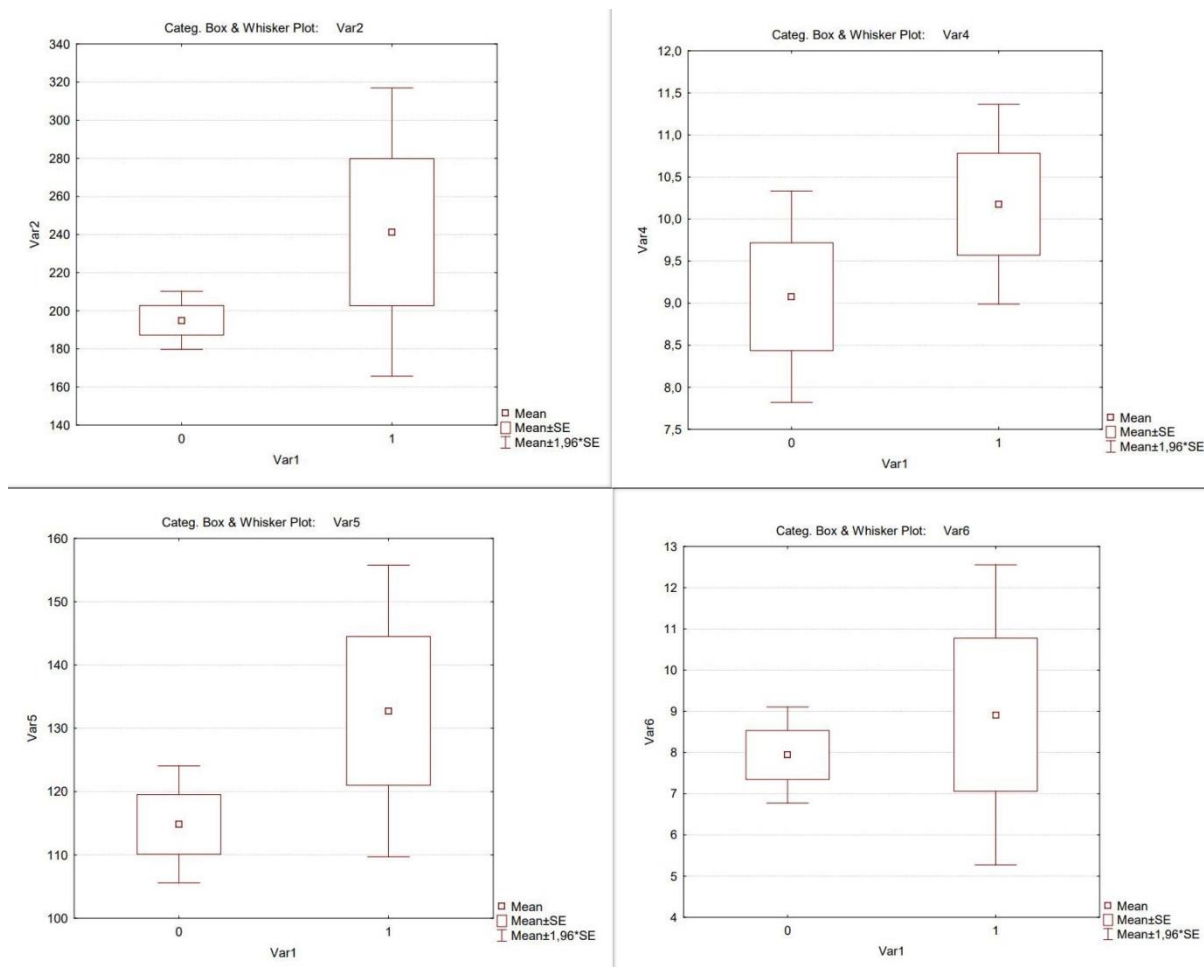
A fermentáció végén tehát megvizsgáltam, hogy az axenikus gombatenyészetekben, valamint a kofermentációs rendszerekben milyen szekunder metabolitok keletkeztek és az eredményeket összehasonlítottam. A kapott kromatogramokon kiintegráltam minden lehetséges csúcsot, majd egy táblázatba kigyűjtöttem ezeket, valamint a retenciós időket és a csúcs alatti terület értékeit is.

A kontroll rendszerek esetében rendre 12, 14 és 16 db csúcsot találtam, míg a kofermentációs mintákban 18, 18 és 19 csúcs volt kiintegrálható. Ezt követően a retenciós időt figyelembe véve megnéztem, hogy melyek azok a csúcsok, amelyek az axenikus (kontroll) tenyészetekben és a kofermentációs rendszerben is megjelennek, majd STATISTICA program segítségével megvizsgáltam, hogy van-e szignifikáns különbség az egyes csúcsok területeiben a két különböző rendszer esetében.

11 olyan csúcsot találtam, amely mind a hat lombikból vett minta esetén megjelenik. Ezen csúcsok adatait (retenciós idő, csúcs alatti terület) vittem be a STATISTICA-ba, amely 2-től 12-ig számozta ezeket a csúcsokat. Az itakonsav csúcsot standard segítségével azonosítottam a HPLC-n, azonban itt ezt nem értékeltem, hiszen a kis mértékű hígítás miatt a minta – itakonsavra nézve – nagyon koncentrált, ennek következtében az értéke a nem lineáris tartományba esett. Ennek megfelelően a 3-as számú csúcsot kivettem az elemzésből. A HPLC-re ezen kívül lovasztatin standard-et is injektáltam, azonban a mintákban nem jelent meg csúcs a lovasztatin retenciós idejének megfelelő időpillanatban, tehát megállapítható, hogy ezt az anyagot nem termelte a törzs. A szakirodalom egyébiránt eddig még nem vizsgálta az itakonsav túltermelő törzsek lovasztatin termelését, ezért nagy előrelépés lett volna, ha valamelyik fermentációs rendszerben ez az anyag is megjelenik.

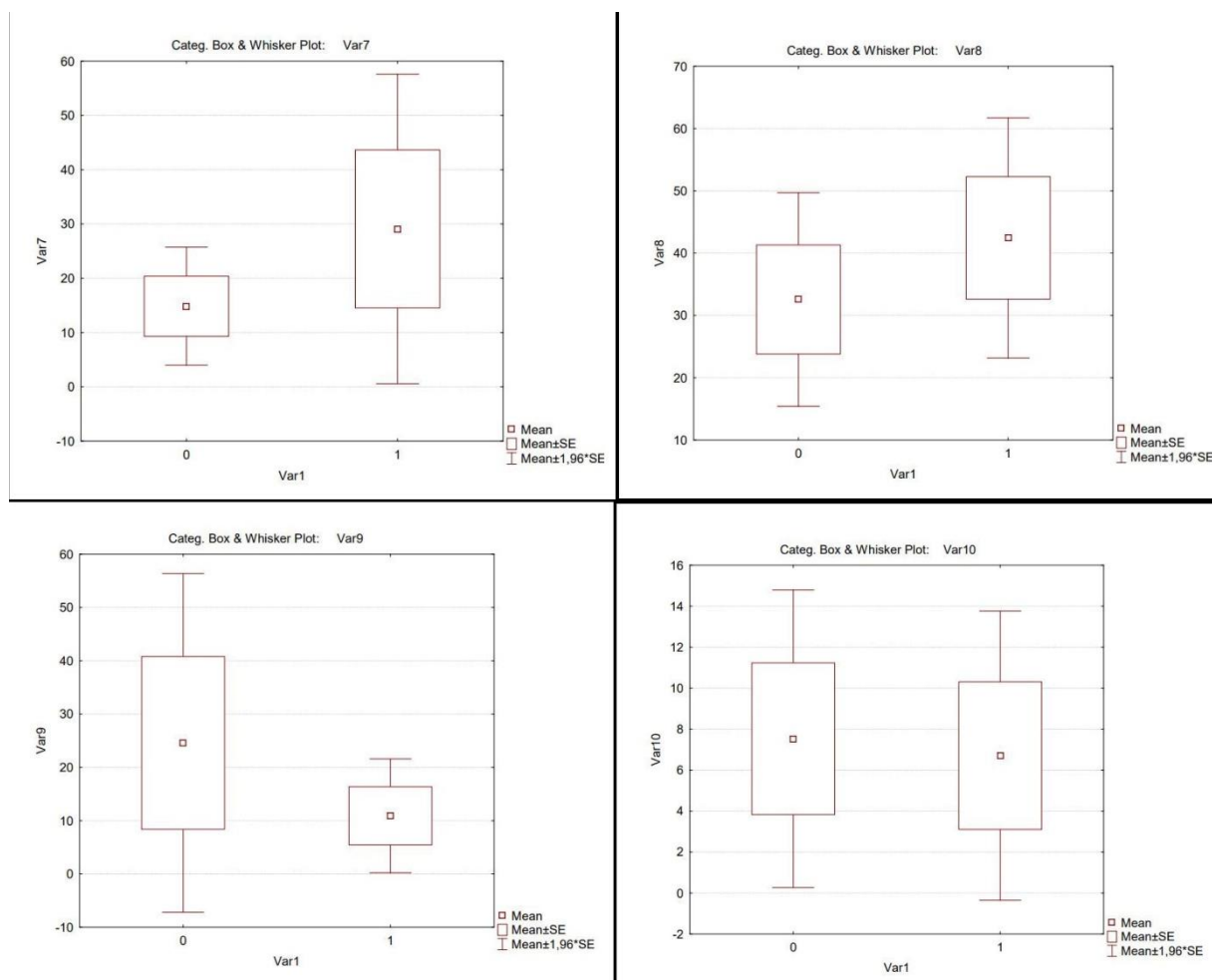
A program az adatokból átlagot és szórást számolt, majd „boxplot” ábrán meg is

jelenítette ezeket (8. ábra), (9. ábra), (10. ábra).



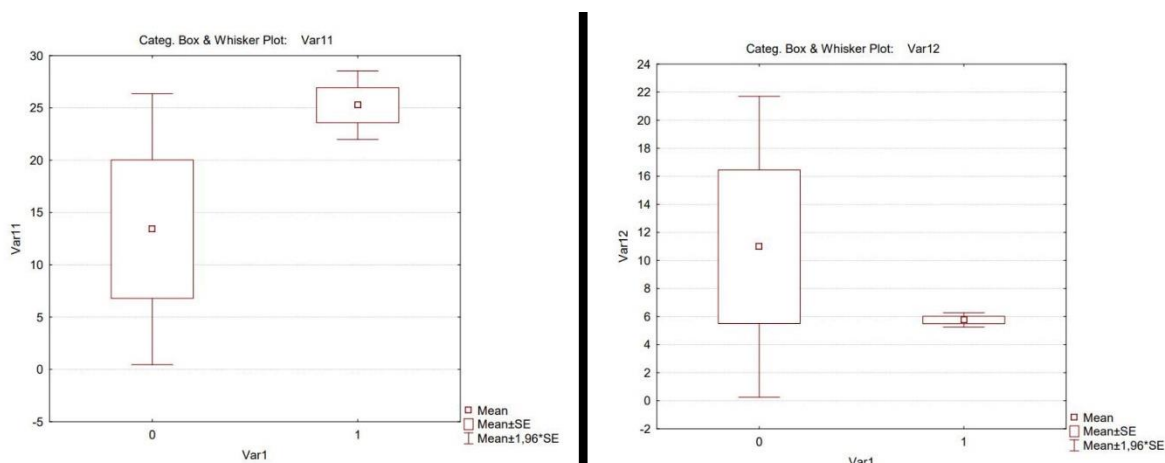
8. ábra

2, 4, 5, 6 csúcsok dobozdiagramjai
0 = kontroll, 1 = kofermentáció



9. ábra

7 – 10 csúcsok dobozdiagramjai
0 = kontroll, 1 = kofermentáció



10. ábra

11, 12 csúcsok dobozdiagramjai
0 = kontroll, 1 = kofermentáció

A dobozdiagramokon a középső kis négyzet az átlag értékét, a nagyobb „doboz” az átlag és a

szórás összegét, a kis vonal pedig a kiugró értékeket jelölik. Ez alapján elmondható, hogy azon szekunder metabolitokat vizsgálva, amelyek mindkét fermentációs rendszerben megjelentek, nincs szignifikáns különbség a kontroll és a kofermentációs tenyészetek között, hiszen minden csúcs esetében átfedést tapasztaltam. Azt azonban fontos megjegyezni, hogy mindkét mátrixból csak 3-3 minta állt rendelkezésemre – hiszen 3-3 lombikkal dolgoztam – a statisztikai elemzés pontosabb lenne, ha legalább 5 adatpontot használtam volna.

5. Összefoglalás

A kutatómunkám során agarkorongos kompatibilitási teszt segítségével megvizsgáltam, hogy a rendelkezésemre álló kétféle *Aspergillus terreus* törzs és a két különböző *Bacillus* faj szilárd tápközegekben milyen hatással vannak egymás szaporodására. Azt tapasztaltam, hogy a *Bacillus subtilis* olyannyira antagonista, hogy mindkét mikrogombát megöli, míg a *Bacillus megaterium* nem öli el egyik *Aspergillus terreus* törzset sem, de az adott mikrobák mindkét esetben hatással vannak egymásra és a gombát tartalmazó agarkorong körül megjelenik az úgynevezett gátlási zóna. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy ezen két mikroorganizmussal érdemes lehet kofermentációt végezni, így tehát a gyorsabb növekedést mutató gombával *Aspergillus terreus* DSM 23081-el és a *Bacillus megaterium*mal rázatott lombikos módszerrel kofermentációt indítottam. Ezen kívül három lombikot axenikus gombatenyésztéssel inokuláltam, hogy össze tudjam hasonlítani a két különböző rendszer viselkedését. 48 óra elteltével a lombikokból felületi szélesztést hajtottam végre, amely során azt tapasztaltam, hogy a gomba és a baktérium közös tenyészte esetén a bejuttatott *Bacillus* spórák már nem életképesek, és az itakonsav termeltetésre optimalizált tápoldat alkalmazása önmagában is jelentős életképesség csökkenéshez vezet. Ennek ellenére, a kompatibilitási teszt eredménye alapján feltételezhető, hogy a baktériumspórák jelenléte is kiváltott valamilyen metabolikus választ, és befolyásolhatta a gomba termékképzését, ezért a kofermentációt tovább folytattam. 96 és 168 óra elteltével mintát vettem, majd 240 óra elteltével leállítottam a fermentációt és ekkor is mintát vettem. A glükózkoncentráció időbeli alakulását DNS módszer segítségével, az itakonsav, mint keletkező fő termék koncentrációját pedig HPLC módszerrel követtem nyomon. Az axenikus gombatenyésztet és a kofermentációs rendszerek összehasonlításához a cukortartalom és az itakonsav-koncentráció időbeli lefutását ábrázoltam, ami alapján elmondható, hogy van eltérés a kétféle fermentáció között. Megállapítható, hogy a *Bacillus* jelenlétében a gomba kevesebb itakonsavat termelt.

A végső mintát egy másik HPLC módszerrel is analizáltam, annak érdekében, hogy megvizsgáljam, a szekunder metabolitok termelődését figyelembe véve van-e különbség a két rendszer között. Továbbá a rendelkezésemre álló lovasztatin standardet használva vizsgáltam, hogy valamelyik fermentációs közegben megjelenik-e a lovasztatin. A keletkező szekunder metabolitokat áttekintve azt tapasztaltam, hogy azon

anyagcseretermékekénél, melyek mindkét mátrixban megjelentek, nincs szignifikáns különbség a metabolitok mennyiségét illetően, valamint az is megállapítható, hogy a gombatörzs nem termelt lovasztatint (egyik rendszerben sem). Összességében tehát elmondható, hogy ebben a formában nem érdemes kofermentációt végezni, hiszen a baktérium jelenléte nem indukálta a szekunder metabolitok további termelődését, emellett viszont negatív hatással volt az itakonsav, mint fő termék keletkezésére.

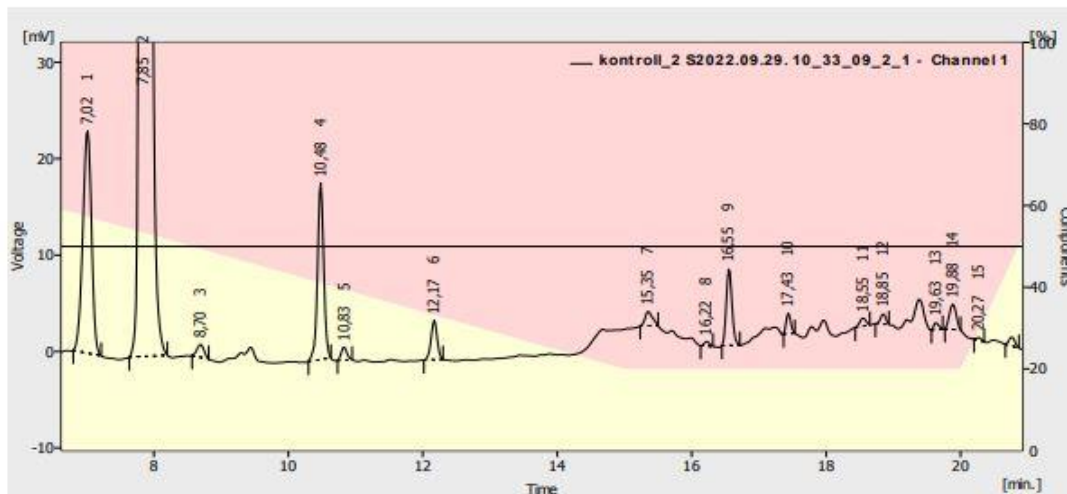
Irodalomjegyzék

- [1] „Aspergillus Species”, *Doctor Fungus*. <https://drfungus.org/knowledge-base/aspergillus-species/> (elérés 2021. július 12.).
- [2] „Élelmiszer-mikrobiológia | Digitális Tankönyvtár”. https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer-mikrobiologia/adatok.html (elérés 2021. július 12.).
- [3] „GOMBAK.pdf”. Elérés: 2021. november 4. [Online]. Elérhető: <http://web.unideb.hu/~szentirmai/GOMBAK.pdf>
- [4] Á. Németh, *Ipari mikrobiológia*.
- [5] Szigeti G., „Az Aspergillus nemzetség átfogó filogenetikai analízise; potenciális mikotoxin-termelő és opportunistá patogén fekete Aspergillus törzsek jellemzése”, PhD, Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Hungary, 2018. doi: 10.14232/phd.9958.
- [6] „Aspergillus terreus taxonómia, morfológia és életciklus / biológia”, *Thpanorama - Tedd magad jobban ma!* <https://hu.thpanorama.com/articles/biologa/aspergillus-terreus-taxonoma-morfologa-y-ciclo-de-vida.html> (elérés 2021. október 8.).
- [7] „Aspergillus terreus”, *Doctor Fungus*. <https://drfungus.org/knowledge-base/aspergillus-terreus/> (elérés 2021. július 12.).
- [8] Y. Sun és mtsai., „Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*”, *Microb Cell Fact*, köt. 20, sz. 1, o. 42, dec. 2021, doi: 10.1186/s12934-021-01527-0.
- [9] H. Chen és mtsai., „Inducing secondary metabolite production by the soil-dwelling fungus *Aspergillus terreus* through bacterial co-culture”, *Phytochemistry Letters*, köt. 12, o. 35–41, jún. 2015, doi: 10.1016/j.phytol.2015.02.009.
- [10] D. Arora, P. Gupta, S. Jaglan, C. Roullier, O. Grovel, és S. Bertrand, „Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: Current status and outlook”, *Biotechnology Advances*, köt. 40, o. 107521, máj. 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107521.
- [11] Y. Sun és mtsai., „Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*”, *Microb Cell Fact*, köt. 20, sz. 1, o. 42, dec. 2021, doi: 10.1186/s12934-021-01527-0.
- [12] „Gyógyszer- és élelmiszer-biotechnológia | Digitális Tankönyvtár”. https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0025_bio_3/ch03.html (elérés 2021. július 21.).
- [13] „Lovastatin”. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/53232> (elérés 2021. július 21.).
- [14] M. Bizukojc és S. Ledakowicz, „Simultaneous biosynthesis of (+)-geodin by a lovastatin-producing fungus *Aspergillus terreus*”, *Journal of Biotechnology*, köt. 132, sz. 4, o. 453–460, dec. 2007, doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.07.493.
- [15] M. H. Rønneest és mtsai., „(+)-Geodin from *Aspergillus terreus*”, *Acta Crystallogr C Cryst Struct Commun*, köt. 67, sz. 3, o. o125–o128, márc. 2011, doi: 10.1107/S0108270111005816.
- [16] „geodin | C17H12Cl2O7 | ChemSpider”. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.187606.html> (elérés 2021. szeptember 16.).
- [17] „Terrein from *Aspergillus terreus*, ≥98% (HPLC) | Sigma-Aldrich”. <http://www.sigmaaldrich.com/> (elérés 2021. szeptember 17.).
- [18] Dr R. É., Dr E. G., Attila B., Dr B. Á., Dr H. J., és Dr H. I., „A melaninpigmentáció patofiziológiája The pathophysiology of the melanin pigmentation”.
- [19] „Monacolins - an overview | ScienceDirect Topics”. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/monacolins> (elérés 2021. szeptember 17.).
- [20] „Monacolin L”. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15294098> (elérés 2021. szeptember 17.).

- [21] T. Boruta és M. Bizukojc, „Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures”, *Appl Microbiol Biotechnol*, köt. 100, sz. 7, o. 3009–3022, ápr. 2016, doi: 10.1007/s00253-015-7157-1.
- [22] H. Gao és mtsai., „Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, köt. 23, sz. 6, o. 1776–1778, márc. 2013, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.01.051.
- [23] A. Kuenz, Y. Gallenmüller, T. Willke, és K.-D. Vorlop, „Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations”, *Appl Microbiol Biotechnol*, köt. 96, sz. 5, o. 1209–1216, dec. 2012, doi: 10.1007/s00253-012-4221-y.
- [24] K. A. Rodrigues és mtsai., „Exploring the Brazilian diversity of *Aspergillus* sp. strains for lovastatin and itaconic acid production”, *Fungal Genetics and Biology*, köt. 138, o. 103367, máj. 2020, doi: 10.1016/j.fgb.2020.103367.
- [25] K. Sakai, H. Kinoshita, és T. Nihira, „Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites”, *Appl Microbiol Biotechnol*, köt. 93, sz. 5, o. 2011–2022, márc. 2012, doi: 10.1007/s00253-011-3657-9.

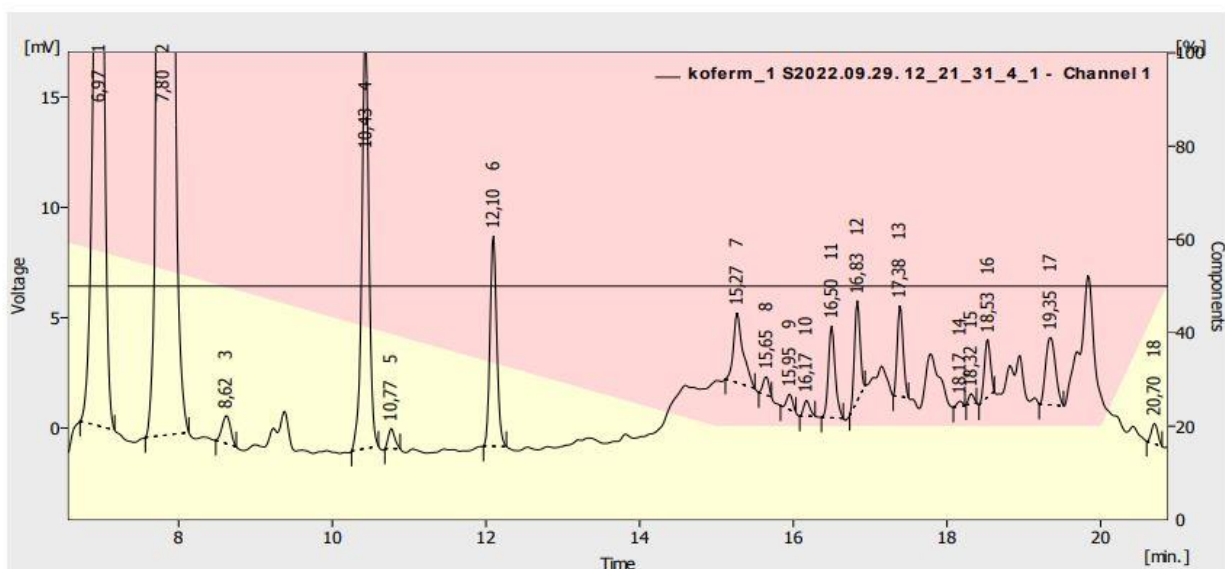
Mellékletek

Az alábbi két ábrán a szekunder metabolitok vizsgálatának kromatográfiás eredményei láthatóak egy kontroll és egy kofermentációs lombik esetében.



Result Table (Uncal - kontroll_2 S2022.09.29.10_33_09_2_1 - Channel 1)							
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	7,017	208,554	23,049	6,1	5,3	0,15	
2	7,850	2942,166	370,387	86,0	84,8	0,15	
3	8,700	9,830	1,335	0,3	0,3	0,13	
4	10,483	116,152	18,278	3,4	4,2	0,10	
5	10,833	7,968	1,352	0,2	0,3	0,12	
6	12,167	25,455	4,047	0,7	0,9	0,12	
7	15,350	11,332	1,481	0,3	0,3	0,13	
8	16,217	2,594	0,461	0,1	0,1	0,12	
9	16,550	46,681	7,915	1,4	1,8	0,12	
10	17,433	10,070	2,118	0,3	0,5	0,08	
11	18,550	5,303	0,847	0,2	0,2	0,12	
12	18,850	5,696	1,050	0,2	0,2	0,10	
13	19,633	3,600	0,722	0,1	0,2	0,10	
14	19,883	18,485	2,603	0,5	0,6	0,13	
15	20,267	1,542	0,286	0,0	0,1	0,10	
16	20,767	5,748	0,927	0,2	0,2	0,12	
Total		3421,175	436,858	100,0	100,0		

M-1. ábra
Kontroll rendszer

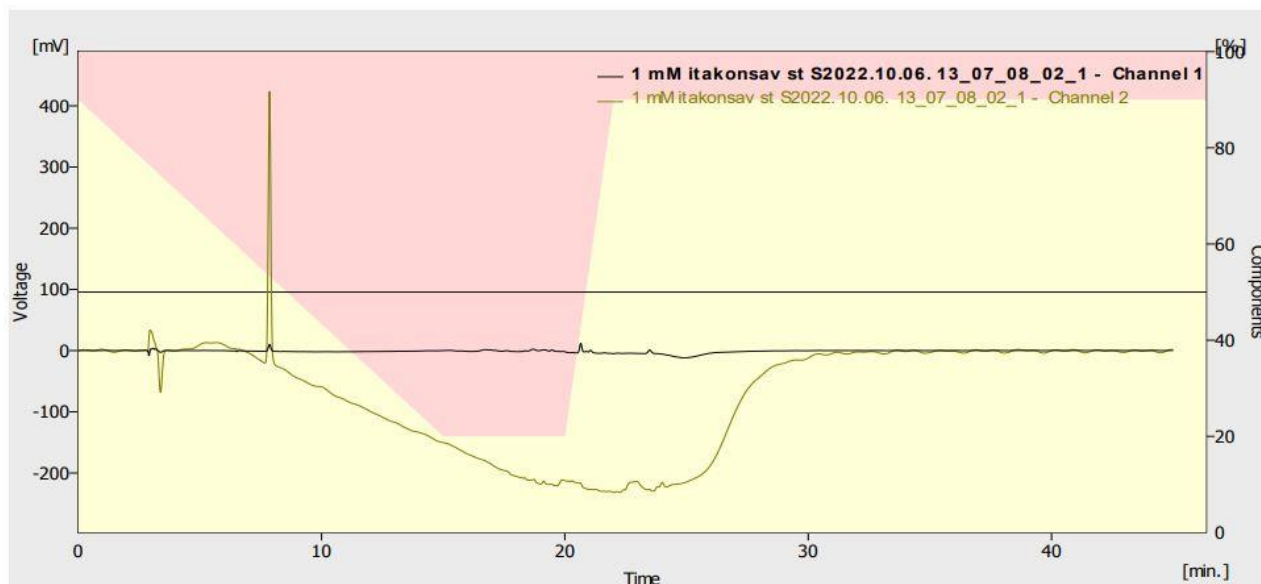


Result Table (Uncal - koferm_1 S2022.09.29. 12_21_31_4_1 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	6,967	315,747	34,500	9,0	7,7	0,15	
2	7,800	2821,628	357,576	80,9	79,8	0,15	
3	8,617	9,866	1,263	0,3	0,3	0,13	
4	10,433	120,577	18,869	3,5	4,2	0,10	
5	10,767	5,373	0,929	0,2	0,2	0,10	
6	12,100	57,780	9,525	1,7	2,1	0,12	
7	15,267	27,469	3,163	0,8	0,7	0,12	
8	15,650	4,491	0,841	0,1	0,2	0,12	
9	15,950	3,836	0,705	0,1	0,2	0,10	
10	16,167	3,903	0,706	0,1	0,2	0,12	
11	16,500	25,346	4,153	0,7	0,9	0,10	
12	16,833	22,197	4,519	0,6	1,0	0,10	
13	17,383	21,808	4,106	0,6	0,9	0,10	
14	18,167	1,061	0,230	0,0	0,1	0,10	
15	18,317	2,024	0,460	0,1	0,1	0,10	
16	18,533	13,900	2,590	0,4	0,6	0,10	
17	19,350	27,124	3,058	0,8	0,7	0,17	

M-2. ábra
Kofermentációs rendszer

A következő két ábrán az itakonsav-, illetve a lovasztatin-standard kromatogramja látható. Ezek alapján az itakonsav csúcs egyértelműen beazonosítható a fermentációs mintákban, míg az is megfigyelhető, hogy lovasztatin nincs egyik rendszerben sem.



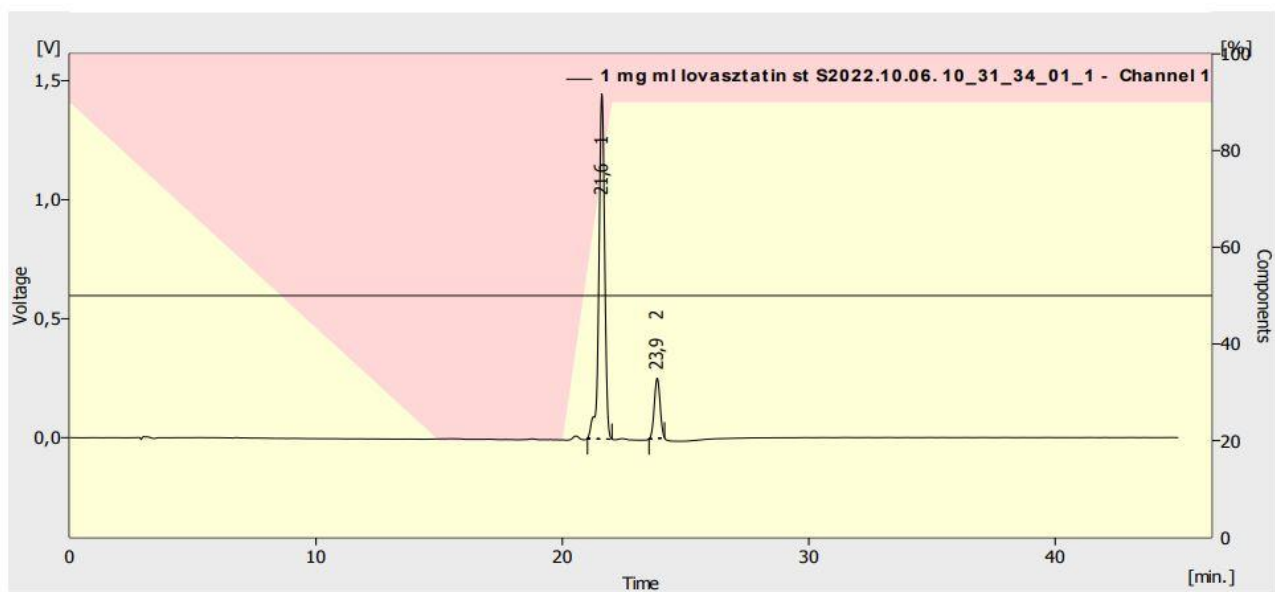
Result Table (Uncal - 1 mM itakonsav st S2022.10.06. 13_07_08_02_1 - Channel 1)

Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
No peak to report						

Result Table (Uncal - 1 mM itakonsav st S2022.10.06. 13_07_08_02_1 - Channel 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	7,867	3134,213	441,086	100,0	100,0	0,13	
	Total	3134,213	441,086	100,0	100,0		

M-3. ábra
1 mM itakonsav standard



Result Table (Uncal - 1 mg ml lovasztatin st S2022.10.06. 10_31_34_01_1 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	21,600	23656,380	1449,109	85,2	85,1	0,25	
2	23,850	4120,274	253,902	14,8	14,9	0,27	
	Total	27776,654	1703,011	100,0	100,0		

M-4. ábra
1 mg/mL lovasztatin standard