



PANNON EGYETEM

VEGYÉSZMÉRNÖKI- ÉS ANYAGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

***ASPERGILLUS TERREUS* TÖRZS ALKALMAZÁSA
ITAKONSAV ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

Készítette:

**Hülberné Beyer Éva Anna
Okleveles biomérnök**

DOI:10.18136/PE.2025.922

Témavezetők:

**Bélafiné Dr. Bakó Katalin
Egyetemi tanár**

és

**Dr. Nemestóthy Nándor
Egyetemi tanár**

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

**Veszprém
2024**

***Aspergillus terreus* törzs alkalmazása itakonsav előállítására**

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

Bio-, Környezet- és Vegyésszmérnöki Tudományok tudományágban

Írta:

Hülberné Beyer Éva Anna

Témavezetők:

Bélafiné Dr. Bakó Katalin és Dr. Nemestóthy Nándor

Elfogadásra javaslom:

igen / nem

.....
Bélafiné Dr. Bakó Katalin

igen / nem

.....
Dr. Nemestóthy Nándor

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve:

igen /nem

.....
(aláírás)

Bíráló neve:

igen /nem

.....
(aláírás)

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

Veszprém,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése:

Veszprém,

.....
az EDHT elnöke

EREDETISÉGI NYILATKOZAT

Alulírott Hülberné Beyer Éva Anna doktorjelölt büntetőjogi felelősségem tudatában nyilatkozom és aláírással igazolom, hogy a jelen nyilatkozat keletkezését megelőző két éven belül sikertelenül lezárt doktori eljárásom nem volt.

A doktori dolgozatom, melynek címe „*Aspergillus terreus* törzs alkalmazása itakonsav előállítására”, saját önálló munkám. A benne hivatkozott szakirodalom felhasználása a forráskezelés szabályai szerint történt. Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül, tartalmi idézet közlése hivatkozás megjelölése nélkül, más kiadott gondolatainak saját szellemi terméként való feltüntetése. Alulírott kijelentem, hogy a plágium fogalmát megismertem, és tudomásul veszem, hogy plágium esetén doktori dolgozatom visszautasításra kerül.

Kijelentem továbbá, hogy a doktori dolgozatom nyomtatott és elektronikus példányai tartalmukban, szövegükben megegyeznek.

Veszprém, 2024. július 5.

.....

Hülberné Beyer Éva Anna

TARTALOM

Kivonat	8
Abstract.....	9
Zusammenfassung	10
Bevezetés	11
1 Irodalmi áttekintés	13
1.1 Karbonsav-túltermelő metabolizmus gombákban	13
1.1.1 Savtúltermelés	13
1.1.2 A fonalas gombákkal kivitelezett fermentációs eljárások típusai	14
1.1.3 Az itakonsavban rejlő vegyipari lehetőségek	16
1.1.3.1 Itakonsav helye a gazdaságban	16
1.1.3.2 Itakonsavból kiinduló szintézis	18
1.1.4 A leghatékonyabb itakonsav termelő – az <i>Aspergillus terreus</i> mikrogomba	20
1.2 Az itakonsav fermentációs technológiát befolyásoló paraméterek.....	23
1.2.1 Az oltóanyag hatása a folyamat alakulására.....	25
1.2.2 Végtermékgátlás – van vagy nincs?	29
1.2.3 A fény, mint környezeti paraméter	31
1.2.3.1 A gomba eredetű fotoreceptorok szignál-mechanizmusa	32
1.2.3.2 Fényre adott válaszreakciók az <i>Aspergillus</i> törzsekben.....	34
1.2.3.3 Cirkadián ritmus, mint a fényérzékelés egyik következménye.....	35
1.2.4 Folyamatos rendszerű itakonsav fermentációk a szakirodalomban	36
1.2.5 Bipoláris elektrodiálízis – a „fermentációbarát” kinyerési technika	41
2 Kísérleti anyagok és módszerek	45
2.1 Alkalmazott mikroorganizmusok	45
2.2 Felhasznált vegyszerek	45

2.3	Fermentációs eljárások	49
2.3.1	Szilárd fázisú fermentáció – oltóanyag előállítása, spóráképzési tesztek	49
2.3.2	Félfolyamatos fermentációs eljárás	50
2.3.3	Folyamatos fermentációs eljárás	51
2.3.4	Rázott lombikos fermentációk.....	54
2.4	Mérési módszerek	56
2.4.1	Itakonsav mennyiségi meghatározása	56
2.4.2	Glükóz mennyiségi meghatározása	57
2.4.3	Száraz sejttömeg mérése.....	58
2.4.4	Oxigén fogyasztás sebességének meghatározása folyamatos üzemű fermentációnál	59
2.4.5	Mintavétel a készülékből a folyamatos fermentációs kísérlet során	59
2.4.6	Mikroszkópos vizsgálatok	60
3	Eredmények.....	61
3.1	Oltóanyag előállítása.....	63
3.1.1	Spóraszám reprodukálhatósága ferde agaros tenyészetben	63
3.1.2	Közvetett spóraszám meghatározása optikai denzitásméréssel.....	65
3.1.3	Az inokulálási spóraszám hatása a DSM826 törzs itakonsav termelésére	66
3.1.4	Két altörzs viselkedésének összehasonlítása itakonsav termeltető fermentációs körülmények között	68
3.2	Félfolyamatos fermentációs kísérletek	73
3.2.1	A félfolyamatos fermentációk indítása.....	74
3.2.2	A félfolyamatos működtetés nyomon követése.....	76
3.2.3	A hozam és a produktivitás alakulásának összehasonlítása beavatkozási ciklusonként.....	78
3.3	Folyamatos fermentációs kísérlet	82

3.3.1	A fermentáció első szakasza – habzás, spórázás és nincs itakonsav!.....	82
3.3.2	A fermentáció második szakasza – képződik az itakonsav	86
3.3.3	Bipoláris elektrodiálízissel összekapcsolt rendszer.....	89
3.4	A fehér fényel történő megvilágítás hatása az itakonsav túltermelő Aspergillus terreus-gombára	93
3.4.1	A fehér fény hatása a spóráképződésre.....	93
3.4.2	A különböző fényviszonyoknál nyert inokulumok itakonsav termelésének összevetése.....	97
3.4.3	Redukált kísérleti terv a fény és az itakonsav hatásának vizsgálatára.....	98
3.4.4	Végponti vizsgálat emelt ismétlésszámban – megvilágítás hatása.....	106
4	Összefoglalás	111
	Tézispontok	113
	Irodalomjegyzék	118
	Publikációs jegyzék	129
	Köszönetnyilvánítás	130

KIVONAT

Doktori munkám során az itakonsav biotechnológiai előállításának alig kutatott területeivel foglalkoztam. Ezek a kutatási irányvonalak szükségesek ahhoz, hogy olyan technológiai újításokat – membrántechnológiai megoldásokat – alkalmazhassunk, amelyek révén a termelési folyamat energia- és anyagfelhasználási hatékonysága növelhető. Kísérleteim az *Aspergillus terreus* gombával történő itakonsav előállításra irányultak, amellyel a legnagyobb termékkoncentráció érhető el az eddig azonosított itakonsav termelő organizmusok között.

A fermentációs folyamat három fő területét céloztam meg: az oltóanyag befolyását a folyamat lefutására; a folyamatos fermentáció megvalósításának lehetőségeit; illetve a fénynek mint környezeti paraméternek a hatását az *Aspergillus terreus* fejlődésére és a fermentáció folyamatára.

Két itakonsav termelő *Aspergillus terreus* altörzs esetén összehasonlító rázott lombikos fermentációkban megvizsgáltam, hogy milyen módon befolyásolja a folyamatot az oltóanyag csíraszám.

A folyamatos fermentáció megalapozására félfolyamatos fermentációs kísérleteket végeztem, ahol a szénforrásként alkalmazott glükóz betáplálási stratégiáit elemeztem. Ezt követően kis hígítási sebességű folyamatos fermentációban vizsgáltam az elérhető itakonsav koncentrációt. Az elfolyó anyagáramot – az itakonsav elektrodialízissel történő kinyerése után – visszavezettem a folyamatos fermentációba, ezáltal megvalósult a visszamaradt glükóz recirkulációja. Ezzel elsők között vizsgáltam, hogy az integrált fermentáció-elektrodialízis rendszer megvalósítható-e itakonsav termelés esetén.

Szilárd fázisú, valamint rázott lombikos fermentációkat végeztem azzal a céllal, hogy a megvilágításnak az ipari jelentőségű itakonsav termelő gombára gyakorolt hatását jellemezzem. A kísérleteim során az itakonsav okozta termék inhibíció kérdésével is foglalkoztam, amely a folyamatos fermentáció egyik limitációját jelentheti.

ABSTRACT

The subject of the doctoral work was to study some barely explored areas of biotechnological manufacture of itaconic acid. These researches are necessary to apply special technological innovations – membrane solutions – where the energy and material efficiency of the process can be enhanced. In the experiments itaconic acid was produced by *Aspergillus terreus* fungus, which provides the highest product concentration among the microorganisms secreting itaconic acid.

Three main areas of the fermentation process were in the focus: influence of the inoculum on the kinetics of the process; possibilities for continuous fermentation; and the effect of light, as an environmental parameter on the development of *Aspergillus terreus* and the progress of the fermentation.

Shaken flask comparative fermentations experiments were carried out with two *Aspergillus terreus* strains producing itaconic acid to study the effect of the amount of germs in the inoculum on the process.

Semi-continuous fermentations were conducted to establish the continuous process, where the feed strategy of glucose, as a carbon source was evaluated. Then in the continuous fermentations the maximal itaconic acid concentration was tested applying low dilution rate. The itaconic acid formed was recovered by electrodialysis and then the effluent mass flow was lead back into the fermentation, thus recirculation of the glucose remained was achieved. These experiments are considered as one of the first measurements in this research area which studied whether the integrated fermentation-electrodialysis system could be established.

Finally, solid phase and shaken flasks fermentation were carried out to study the effect of light on the fungus producing itaconic acid. In the measurements the problem of the product (itaconic acid) inhibition was studied, as well, since it might be considered as one of the limitations of the continuous fermentation.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Thema der Doktorarbeit war die Untersuchung einiger wenig erforschter Bereiche der biotechnologischen Produktion von Itaconsäure. Diese Untersuchungen sind notwendig, um spezielle technologische Innovationen - membrantechnische Lösungen - anzuwenden, die die Energie- und Materialeffizienz des Prozesses verbessern können. In den Versuchen wurde Itaconsäure mit dem Pilz *Aspergillus terreus* hergestellt, der unter den Itaconsäure produzierenden Mikroorganismen die höchste Produktkonzentration aufweist.

Drei Hauptbereiche des Fermentationsprozesses wurden untersucht: der Einfluss des Inokulums auf die Kinetik des Prozesses, die Möglichkeiten einer kontinuierlichen Fermentation und der Einfluss von Licht als Umweltparameter auf die Entwicklung von *Aspergillus terreus* und den Verlauf der Fermentation.

Vergleichende Fermentationsversuche im Schüttelkolben wurden mit zwei Itaconsäure produzierenden *Aspergillus terreus*-Stämmen durchgeführt, um den Einfluss der Keimmenge im Inokulum auf den Prozess zu untersuchen.

Zur Ermittlung des kontinuierlichen Prozesses wurden halbkontinuierliche Fermentationen durchgeführt, bei denen die Fütterungsstrategie mit Glucose als Kohlenstoffquelle bewertet wurde. Dann wurde in den kontinuierlichen Fermentationen die maximale Itaconsäurekonzentration bei niedriger Verdünnungsrate getestet. Die gebildete Itaconsäure wurde durch Elektrodialyse zurückgewonnen und der abfließende Massenstrom wurde in die Fermentation zurückgeführt, wodurch eine Rezirkulation der verbliebenen Glucose erreicht wurde. Diese Versuche gelten als eine der ersten Messungen in diesem Forschungsbereich, bei denen untersucht wurde, ob ein integriertes Fermentations-Elektrodialyse-System eingerichtet werden kann.

Schließlich wurden Festphasen- und Schüttelkolbenfermentationen durchgeführt, um die Wirkung von Licht auf den Itaconsäure produzierenden Pilz zu untersuchen. Bei den Messungen wurde auch das Problem der Hemmung des Produkts (Itaconsäure) untersucht, da es als eine der Einschränkungen der kontinuierlichen Fermentation angesehen werden könnte.

BEVEZETÉS

A vegyipar a környezetszennyezéshez nagymértékben hozzájáruló iparág, azonban minden más technológia számára nélkülözhetetlen alapanyagokat szolgáltat. A technológia vívmányairól pedig a legtöbb ember nem hajlandó lemondani az erőforrások kimerülésének veszélye ellenére sem. Azon kevés ember egyéni törekvése, akik a javak és az energia pazarlását mérsékelni igyekeznek, nem elegendő a pozitív változáshoz, amelyhez az ipar megreformálására van szükség, a tudomány és az innováció segítségével.

A fermentációs biotechnológiai szintézis vagy transzformáció lehetőségét a sokféle élőlény, elsősorban mikroorganizmus által előállított enzimek teremtik meg, melyek specifikus folyamatokat katalizálnak. A jövőre nézve fontos kihívás, hogy a feltétlenül szükséges vegyipari folyamatok és alapanyagok „zöldebb” változatát megtaláljuk, amely működtethető/előállítható megújuló energiaforrások felhasználásával, és kiindulási anyagait is javarészt a megújuló biomassa szolgáltatja.

A nagyléptékű vegyipari folyamatok jelenlegi biotechnológiai alternatívái nem versenyképesek, amíg él a lehetőség a kőolaj alapú gazdaságra. A jövő biotechnológiájának kulcsa lehet, ha sikerül olyan folyamatos üzemű fermentációkat kidolgozni, melyekben minimalizált a vízvesztés, az energia- és az alapanyag-felhasználás. További fontos kritérium az alkalmazott alapanyagok minőségének kérdése, amelyek célszerűen nem versenyezhetnek az élelmiszeriparral.

A fermentációs úton előállított molekulák dúsítása és kinyerése a komplex termelő közegből erőforrás- és energiaigényes folyamatok. A membrános szeparációs eljárások ígéretes fejlesztési utat kínálnak a csapadékképzéses vagy extrakciós módszerekkel szemben. A technológiában alkalmazott membránok szelektív permeációjú rétegek két fázis között, amelyeken keresztül a molekulák más-más sebességgel jutnak át. Az elválasztás hajtóereje lehet nyomás, koncentrációkülönbség, vagy ionos vegyületek esetén elektromos feszültségkülönbség.

A szerves savak előállításában az elektromembrános műveletek közül kiemelt jelentősége lesz a jövőben a bipoláris elektrodialízisnek. Ennek az eljárásnak nagyszerűségét a bipoláris membrán adja, amelyben megfelelő feszültségkülönbség fennállása esetén végbemeget a víz facilitált disszociációja. A berendezés legkorszerűbb kialakításában anion-

és kationcserélő membránokkal kombinálják a bipoláris membránt. Ebben három folyadékter van, rendre – ionszegényedő fermentációs közeg (ún. diluátum), savformájú termék és tiszta lúgoldat. Ezek közül pedig nem csak a termék – a savoldat értékes, hanem mindhárom. A visszamaradó komponenseket tartalmazó rész kiegészítéssel egy folyamatos rendszer betáplált oldatába visszavezethető, a lúgoldat pedig a fermentáció pH-szabályozásában hasznosítható újra. Ezzel a vízfelhasználás és az alapanyag-igény minimalizálható.

Az integrált fermentáció-bipoláris elektrodialízis koncepció kidolgozásában sok kérdés merül fel. Például a sejtömeg szeparációjának szükségessége, mivel az a lapmembrán-modul szűk áramlási csatornáit eltömheti; némely melléktermékek a membrán élettartamát csökkenthetik. A sejtmentes lé pH-ja nem feltétlenül azonos az elválasztási művelet optimális pH-jával, ilyen esetben elválasztás előtt be kell állítani a megfelelő tartományba. Továbbá az ionszegény fermentlében adott esetben előfordulhatnak gátló hatású anyagok, amelyek miatt a folyadékág visszavezetése korlátozott mértékben lehetséges, vagy további kezelést igényel.

A fermentációs úton előállítható szerves savak közül az itakonsav előállítását vizsgáltam, amelyet egyszerű cukrokból állít elő a termelő *Aspergillus terreus* gomba. Az itakonsav kisméretű molekula, mégis igen összetett kémiai szintézisek prekurzora lehet, és értékes alapanyag, amire az irodalmi áttekintésben külön kitérek. Az itakonsav szakaszos fermentációs előállítása visszanyúlik az 1940-es évekre, ám folyamatos fermentációjáról kevés beszámoló található. Modell oldatokkal végzett kísérletek alátámasztották, hogy az itakonsav bipoláris elektrodialízissel szelektíven kinyerhető oldatából.

Munkám során céлом volt megalapozni az itakonsav folyamatos fermentációval történő előállítását, mely bipoláris elektrodialízissel kombinálva hatékony, minimalizált vízfelhasználású és kis hulladékképzéssel járó folyamatként a jövőben ipari léptékű felhasználásra is alkalmas lesz.

1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Karbonsav-túltermelő metabolizmus gombákban

1.1.1 Savtúltermelés

A biotechnológia egyik sikertörténete a citromsav fermentációs előállításának intenzifikálási folyamata. A speciálisan citromsav termelés céljából kifejlesztett termelő organizmusok, *Aspergillus niger* szubszpecieszek már olyan mennyiségben képesek kiválasztani a környezetükbe a citromsavat (15-18 tömeg% (Anastassiadis et al., 2008)), hogy a kémiai szintézissel összevetve gazdaságilag jobb választás a bioszintézis, a fermentáció után szükséges számos további feldolgozási művelet dacára (Berovic & Legisa, 2007). A citromsav biotechnológiai alapú előállításával kapcsolatban azonban érdemes tisztában lenni azzal, hogy ipari méretekig csak a fermentációs és a növényi extrakciós eljárások jutottak el, soha nem létezett kőolaj alapú ipari citromsav előállítás (Wiegand, 1971).

A fonalas gombák a citromsavtól eltérő szerves savak túltermelésére is képesek. Ennek a sajátságának az evolúció során többféle előnye lehetett. Jellemzően akkor lép fel túltermelés – 'overflow' anyagcsere, ha igen nagy mennyiségben áll rendelkezésre egyszerűen metabolizálható szénforrás (pl. glükóz), miközben más tápanyagok – a nitrogénvegyületek vagy a foszfát korlátozottan állnak rendelkezésre (Vrabl et al., 2012). A micélium lesavanyítja a környezetét, főként az ammónium-formában jelenlevő nitrogén felhasználásával képződő protontöbblet környezetbe pumpálásával – akár pH = 2 alatti értékre is (Roos & Luckner, 1984). Egyik hipotézis szerint a savak kiválasztásával a sejtmembrán két oldalán fellépő káros töltéspolarizáció mérséklése a cél (Gradmann et al., 1978). A kompetíció során is előnyös a gombának a savtermelés, hiszen az eubaktériumok jelentős része érzékeny a szerves savak nagy koncentrációjára, és pH=3 alatt sok gomba növekedése is gátolt (Magnuson & Lasure, 2004). A baktériumok sejtmembránján keresztül a protonált savmolekulák spontán diffúzióval a citoplazmába jutnak, majd az ott fennálló homeosztatis, magasabb pH-n disszociálódnak. A baktériumoknak ezáltal improduktív, gradienssel szembeni energiaigényes proton transzportot kell fenntartani, ami egy idő után

a sejtek pusztulásához vezet (Guan & Liu, 2020). Ezzel szemben a termelő gombából, amelyben a termelt savak millimólos nagyságrendben vannak jelen (Gradišnik-Grapulin & Legiša, 1996), akár 1 mólos külső savkoncentráció ellenében is passzív transzporttal juthat ki a képződő felesleg (Burgstaller, 2006). A gombák sejten belüli – jellemzően 7,4-7,6 közötti – pH-ja drasztikus külső változás esetén 1,3 pH egységet is csökkenhet, ám a kifinomult pH homeosztázis fenntartás által 20 perc alatt normalizálódik (Bagar et al., 2009).

Belátható, hogy a természetben ritkán adottak a körülmények a savtúltermelésre, és egyes kutatások rávilágítottak, hogy a kiválasztott szerves savak alapvetően éppen szolgálják a talaj mikrobiom diverzitását (Worrich et al., 2017). Egyes termelő gombafajok a szerves savakat fel is tudják venni, és szénforrásként hasznosítani (Kreyenschulte et al., 2018; Laothanachareon et al., 2021). Tehát a szerves sav tápanyag depozitként is funkcionálhat. Bizonyított, hogy egyes gombák még glükóz jelenlétében is képesek a termelt szerves savak felvételére, fermentációs körülmények között, ennél fogva az extracelluláris térben mérhető savkoncentráció a kiválasztás és a felvétel eredőjeként áll fenn (Roos & Luckner, 1984).

1.1.2 A fonalas gombákkal kivitelezett fermentációs eljárások típusai

A fotoszintetikus szervezetek által szerves anyagokban felhalmozott szén fosszilizálódása nagyjából a fehérrothasztó gombák megjelenésével egyidejűleg lassult le jelentősen, amelyben azok igen hatékony komplex szervesanyag bontása akár jelentékeny szerepet is kaphatott (Bunyard, 2022). A feldúsult légköri oxigén által lehetővé váló aerob anyagcsere és a sejten kívüli térbe kiválasztott, környezeti impulzusokra válaszként kikevert hidrolitikus enzimektől révén a gombák elterjedése rendkívül sikeres volt.

A fonalas gombákkal kivitelezett bioszintézis szén alapanyaga tehát megújuló, azonban a további szükséges tápanyagok, a foszfát és nitrogén szükséglet gyakran bányászott, vagy környezetterhelő kémiai üzemek termékeiből biztosított, ami nem hagyható figyelmen kívül egy fenntarthatósági elemzésnél, főként, hogy ezek a termelő organizmus élettevékenységéhez nélkülözhetetlenek, a kémiai szintézis során viszont nincs igény rájuk. A fermentációt megelőző up-stream műveleti lépések, mint a sterilizálás, vagy szükség esetén a makromolekula formában elérhető szénforrás megfelelő hidrolízise energiaigényes folyamat. Maga a fermentáció, tekintve, hogy az életet támogató környezet biztosítására van szükség, jellemzően enyhe körülményeket igényel, nincs szükség magas

hőmérséklet vagy nagy nyomás alkalmazására, azonban hosszabb az előállítási idő a kémiai szintézishez viszonyítva (hangsúlyozottan a kis szénatomszámú szerves savakra vonatkozóan). Veszélyes anyagok használatára sincs szükség általában. Ez alól talán csak a pH szabályozására alkalmazott szerves lúg- és savoldatok jelentenek kivételt, melyek körültekintő kezelést igényelnek környezeti és munkavédelmi szempontok szerint egyaránt.

A fermentáció lehet szilárd fázisú vagy szubmerz – ahol is vizes szuszpenzió a reakcióközeg. A szilárd fázisú fermentációs technikával, mint termelő folyamattal, munkám során nem foglalkoztam behatóan, mivel léptéknövelési nehézségei és megvalósítási körülményei miatt jelentős vegyipari alapanyag előállításra egyelőre nem alkalmas. A jövőben azonban ugrásszerű előrelépés várható e téren, az élelmiszerhulladékok felhasználására fókuszáló kutatások eredményeinek gyakorlati alkalmazásával (Amato et al., 2020). Megjegyzendő, hogy napjainkban is előnyösen alkalmazható technika enzimek, szekunder metabolitok, gyógyszer alapanyagok előállítására (Kumar et al., 2021). A fonalas gombák sok képviselője jól tolerálja az eljárás körülményeit, és a relatíve kis mennyiségben termelődő, ám jelentős gazdasági értéket képviselő termékek elsődleges kinyerése ezzel a technikával koncentráltabb formában megvalósítható (Krishania et al., 2018).

A felismerés, hogy a szilárd tenyészetekként megismert mikrobák a jóval korlátozottabb oxigénfelvételi lehetőséget biztosító vizes szuszpenzióban is életképesek, jelentősen felgyorsította a biotechnológiai ipar fejlődését. A fonalas gombák esetén azonban ez a limitáció jelentős technikai kihívások elé állít bennünket, mivel az oxigén számos savtermelő fermentációnál kulcsfontosságú szubsztrátum. A buborékoltatásos levegőztetés igen energiaigényes, emellett jelentős habzást okoz, éppen a gombák által konstitutívan kiválasztott fehérjemolekulák révén. A habzás visszaszorítható korszerű, szelektív membránon keresztül megvalósított oxigén-bevezetéssel, amellyel az energiahatékonyság akár négyszeresére növelhető [5].

A szubmerz fermentációt követő down-stream műveletek során a sejttömeget és a vizes fázist szeparálják. Erre a leggyakrabban centrifugálást, szűrést vagy a két eljárás kombinációját alkalmazzák. A szerves savakat a termelő organizmus a sejtközötti térbe szekretálja, a terméknyerés így ebből történik. Ezeket a jelenlegi ipari technológiai eljárásokban sóképzéssel – jellemzően Ca-sóként – csapadékba viszik, majd a csapadék leválasztása és mosása után erős savval – többnyire kénsavval – kiszorítják sójából. Ennek következtében a termékkel összemérhető mennyiségű gipsz melléktermék is képződik [3].

A technológia előnye, hogy egyszerű, és nem-speciális az eszközigénye. Azonban hátránya, hogy az anyalúg a sóképzés miatt jelentősen szennyezett, így nem használható fel ismét a fermentációban, szennyvízként kerül kezelésre (Colleran et al., 1998; Svoldal et al., 1993). Ez egyúttal jelzi számunkra, hogy amennyiben folyamatos fermentációt szeretnénk megvalósítani, ahhoz nem alkalmazható. Folyamatos fermentációban az elfolyóban a szénforrás koncentrációja megegyezik a kevert bioreaktorban fenntartott koncentrációjával. A rendszer előnye a nagy produktivitás, nem a szubsztrátum teljes átalakítása (Stoyanov & Simeonov, 1996). Ez a sajátság pedig olyan feldolgozási műveletet kíván, amellyel az elfolyóban található értékes anyagok visszavezethetők lesznek a folyamatba. Ilyen lehetőség a konvencionális és a bipoláris membrán elektrodialízis (Huang et al., 2007)[3,6,7,9].

A gombafermentációkkal kapcsolatban érdemes kitérni a képződő micélium tömegre, amely biológiai hulladék kategóriába tartozik, esetleg biogáz üzemben hasznosítják jelenleg (Sawant et al., 2018). A gomba micélium azonban erőforrásokból megtermelt – és a technológiából adódóan – jellemzően egyenletes minőségű biomassa, mely komplex szerkezetű makromolekulákat tartalmaz. A gomba sejtfala nagyon jó bioszorpciós sajátságokkal bír (Kapoor et al., 1999), amely jó megkötő-képességet mutat a réz, nikkel, ólom, higany és kadmium ionokra nézve [10]. Sikeres ólommegkötési kísérleteket végeztek citromsav fermentációból származó *Aspergillus niger* gomba biomasszával, amelyet regenerálva több ciklusban is felhasználtak (Jianlong et al., 2001). Sun és munkatársai (2010) tanulmánya alapján az *Aspergillus terreus* gomba biomasszája a stationer fejlődési stádiumban mutat maximális bioszorpciós hatékonyságot, és alkalmas az ólom, a higany és a kadmium kinyerésére. Laboratóriumi kísérletek bizonyítják, hogy bioremediációra az *Aspergillus* fajok élő biomasszája is alkalmas lehet (Boczonádi, 2020; Dias et al., 2002).

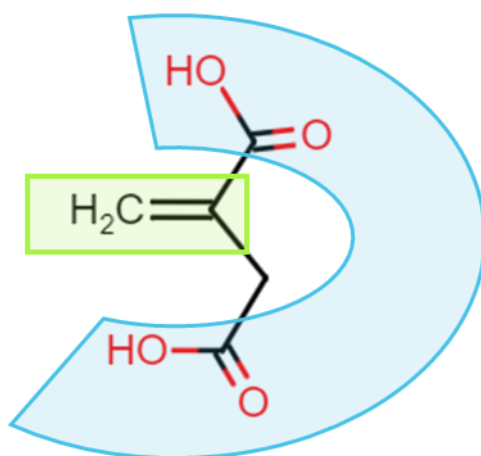
1.1.3 Az itakonsavban rejlő vegyipari lehetőségek

1.1.3.1 Itakonsav helye a gazdaságban

Az itakonsav öt szénatomos, elágazó láncú, telítetlen dikarbonsav (1.1.1 ábra). A Transparency Market Research által 2015-ben készített piaci elemzés szerint az itakonsav legfontosabb ipari felhasználása a szintetikus latex, telítetlen poliészter gyanták,

detergensek, illetve szuperabszorbens polimerek előállítását célozta. 2014-ben a szintetikus latex előállításnak részesedése 55,6% volt, a legnagyobb az itakonsav globális piacán. A sztírol-butadién latex kopolimerizációja során az itakonsav a keresztkötő ágens. Emellett az itakonsavat alkalmazzák kenőolajok, ragasztók, festékek és impregnálószerke, gyógyszereke, gyomirtóke és akrilszálak gyártására is. A tanulmányban a 2015-2023-as időszakra a ragasztóke és impregnálószerke piacán prognosztizálták a legnagyobb növekedést.

Az itakonsavnak nincs közvetlen élelmiszeripari felhasználása. Kopolimerjeit viszont 2000 óta több élelmiszerrel érintkező csomagolóanyagban, illetve bevonatban is engedélyezte az Egyesült Államokban működő FDA (Food and Drug Administration – Food Contact Substance). Bizonyított antibakteriális hatása van (Luan & Medzhitov, 2016), és az ún. aktív csomagolásokban felhasználható ez a hatása (Chiloeches et al., 2022). Az aktív csomagolóanyagok kölcsönhatásba lépnek az élelmiszerrel és annak környezetével, és dinamikus szerepet játszanak az élelmiszereke eltarthatósági idejének meghosszabbításában. Teljes mértékben biodegradálható aktív csomagolások fejlesztésében is szerepet kapott az itakonsav: polivinilalkohollal és pektinnel kombinálva Teleky és munkatársai (2022) ígéretes kísérleti csomagolóanyagokat állítottak elő.



1.1.1 ábra: Az itakonsav szerkezeti képlete

Az itakonsav a glikolízis elkötelező lépését katalizáló foszfofruktokináz enzim inhibitora, befolyásolja a glikolízist, ezáltal hatással van a magasabb rendű állatokban a zsírsav-szintézisre (Sakai et al., 2004). Patkányokon végzett kísérletek arra utaltak, hogy elhízás ellenes, diabétesz ellenes és antilipémiás hatása lehet. Született is egy szabadalom italokban és élelmiszerekeben való alkalmazásra (Yoshinobu et al., 1999), azonban a gyakorlatban nem használják ilyen célokra (da Cruz et al., 2017). Az itakonsav

anyagbiztonsági adatlapja szerint veszélyes anyag, akut toxicitása, bőr- és szemirritáló hatása van.

1.1.3.2 Itakonsavból kiinduló szintézis

Az itakonsav önmagában felhasználható addíciós polimerizáció monomereként, melyek jellemzően vinil ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), vagy mint az itakonsav, vinilidén ($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$) vegyületek. Az 1.1.1 ábrán zöld színnel emeltem ki a vinilidén-csoportot. Az itakonsav esetén R_1 egy karboxil-csoport, R_2 pedig $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ szubsztituens. A monomerek reaktivitását (aktív centrum típusa, kialakításának módja) elektronszerkezeti, polaritási és sztérikus tényezők együttesen határozzák meg (Pukánszky & Móczó, 2012). Az akrilsavval összehasonlítva hátránya, hogy gyökös polimerizációval, önmagában kis móltömegű, nem kívánt keresztkötéseket tartalmazó termék nyerhető (Himmelsbach et al., 2019).

Növelhető az itakonsav iniciátor nélküli gyökös polimerizációjával kapható polimer molekulásúlya, ha kolin-kloridot kevernek az itakonsavhoz (Mielczarek et al., 2020). A reakciót a közeli UV sugárzás katalizálja, amellyel az itakonsav kölcsönhatásba lép. Az így képződő hidrogél molekulásúlya szokatlanul magas – 800 000 Da, és összetételében 12:1 az itakonsav:kolin aránya. A hidrogélek fontos kutatási tárgyai az anyagtudománynak, speciális, hangolható tulajdonságaik miatt (Ahmed, 2015; Ullah et al., 2015). A hidrogél-agyagásvány nanokompozitok szabályozott hatóanyag-leadású termékek, gyógyszerek hordozóanyagai lehetnek (Ianchis et al., 2018; Z. Zhang et al., 2021). Az itakonsavat tartalmazó hidrogélek a festék- és fémszennyezés hatékony eltávolítására alkalmazhatók szennyvízkezelési területen (Bharathiraja et al., 2019).

A két egymástól távoli karboxil-csoport (az 1.1.1 ábrán kék színnel kiemelve) miatt kopolimerizálható diolokkal és diaminokkal, amelyeket akár magából az itakonsavból is szintetizálhatnak (Trotta et al., 2019). A konjugált kettős kötés miatt a két karboxil-csoport reakciókészsége eltérő, amely speciális kopolimerek előállítását is lehetővé teszi.

Az itakonsavból előállítható a plexit felépítő észtermonomernek a sav része, a metakrilsav, amelynek nagy volumenű előállítása fosszilis eredetű acetontól indul ki jelenleg (Darabi Mahboub et al., 2018). Azonban az itakonsav \rightarrow metakrilsav szintézis igen drága katalizátort (pl. Pt/ Al_2O_3 vagy Ru-alapú komplexek), 200 °C feletti hőmérsékletet és nagy nyomást igényel, ráadásul a konverzió 84-90% (Lansing et al., 2017; Le Nôtre et al.,

2014), tehát 10% veszteség már itt előáll. A melléktermékek szennyezik a terméket, valamint a reakcióközeg vizes oldat, ezért további tisztítási lépésekre van szükség a tiszta metakrilsav előállításához. Ebből következik, hogy ha az itakonsavat fő részben megújuló anyagokból állítjuk is elő, a belőle kiinduló ipari léptékű metakrilsav szintézis tipikusan a szennyező vegyipar termékének tekinthető, bármennyire újszerű és zseniális emberi lelemény az eljárás kidolgozása.

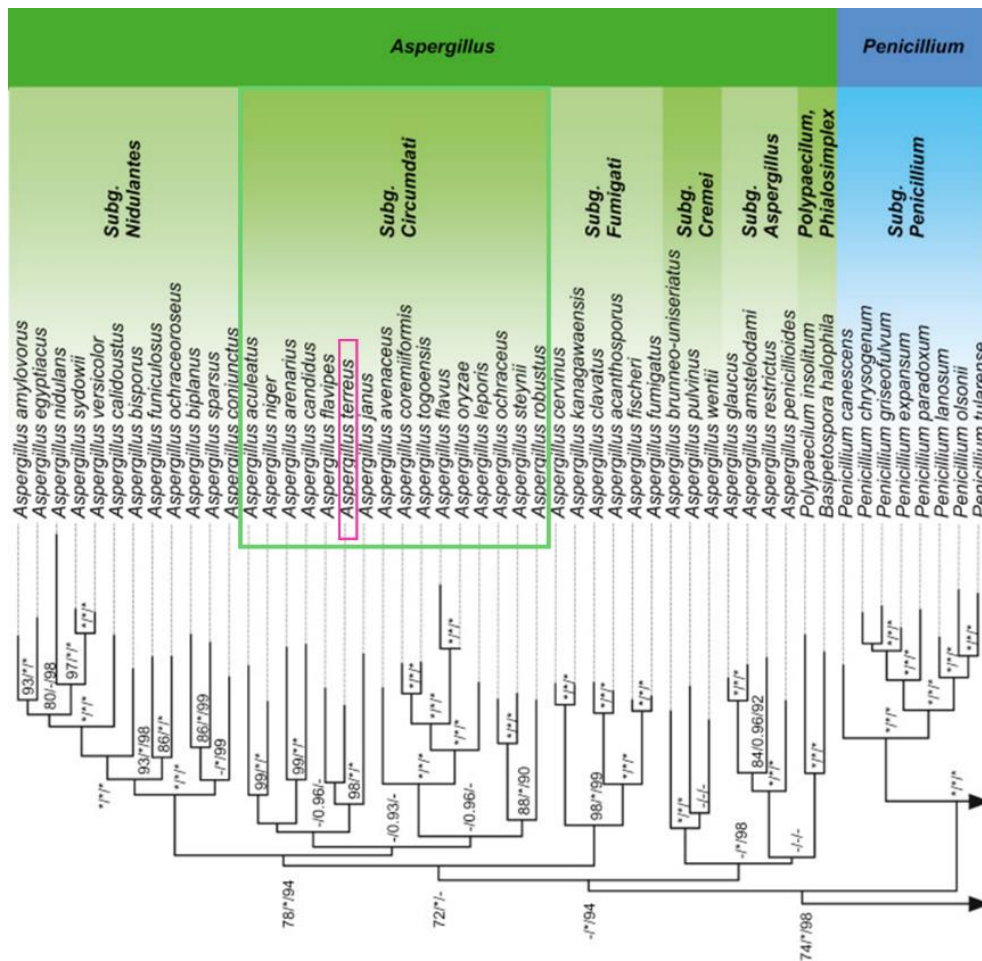
Természetes mikrobiális metabolitként sikerült itakonsav-származékokat izolálni, amelyek a vinilidén- és a karboxil-csoportok helyzetéből adódóan rokon molekulák. Ezen belül megkülönböztethetők az alkil-itakonsav származékok és az α -metilén- γ -butirolaktonok, amelyek mono- vagy biciklusos vegyületek. Adott mikroorganizmusok jellemzően vagy az alkil- vagy a laktongyűrűs származékok szintézisére specializálódtak, de előfordulnak olyan gombák, amelyek alkil- és butirolakton származékok szintézisére is képesek (Sano et al., 2020). *Aspergillus* törzsekből az itakonsav alkil-származékait izolálták (Ding et al., 2018). Ezek antimikrobiális, antivirális, citotoxikus, rákellenes és növényi növekedés-regulátor szerepet tölthetnek be (Perković et al., 2022; Sano et al., 2020; Sethy et al., 2019).

Az O-szubsztituált alkil-itakonsav származékok, egyelőre csak kutatási fázisban, de fontos szerepet kaptak az antimikrobiális polimerek kutatásában, amely iránt ismét egyre nagyobb az érdeklődés. A polimer-bázisú szintetikus „antimikrobiális peptid hasonmások” (polymer-based synthetic mimics of antimicrobial peptide = SMAMP) jellemzője, hogy antimikrobiális hatásuk és sejt-kompatibilitásuk hangolható. A hidrofób illetve kationos szubsztituensek arányának helyes megválasztásával <inaktív / sejt kompatibilis>, <aktív / sejtspecifikus> illetve <aktív / citotoxikus> hatású anyagokhoz juthatunk. Az itakonsav felhasználásának előnye ezen új molekulák kialakításában, hogy a polimer felületén a ligandumok eloszlása jól beállítható, köszönhetően az itakonsav két, különböző reakcióképeségű karboxil-csoportjának (López-Carrasquero et al., 2003, 2013). Az eredmények ígéretesek olyan multirezisztens patogén baktériumok ellen, mint pl. a *Staphylococcus aureus* (Himmelsbach et al., 2019).

Bármelyik fontos felhasználás mellett is foglalnánk állást, elmondható, hogy a környezetkímélő és költséghatékony itakonsav-előállítás minden esetben alapvető kiindulási feltétel.

1.1.4 A leghatékonyabb itakonsav termelő – az *Aspergillus terreus* mikrogomba

Az *Aspergillus*ok gazdasági szempontból az egyik legfontosabb monofiletikus gombanemzetség (Kocsubé et al., 2016). Az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* alnemzetségébe tartozik többek között a hatékony citromsav és glükonsav termelő *Aspergillus niger*, a hatékony hidrolitikus enzim termelő *Aspergillus oryzae*, valamint az *Aspergillus terreus* (1.1.2 ábra), amelynek altörzsei közül került ki ezidáig a legproduktívabb itakonsav termelő mikroorganizmus. Ez a Németországban működő Leibniz Institute DSMZ GmbH-nál DSM23081 letéti számon nyilvántartott *Aspergillus terreus* törzs rátáplásos fermentációs technikával 160 g/l itakonsav végtitert termelt 15 literes bioreaktorban, kevesebb, mint 12 napos fermentáció során (Krull, Hevekerl, et al., 2017). Ez a magas érték egyelőre csak úgy érhető el, hogy kizárólag nagy tisztaságú, jól definiált összetételű vegyszereket alkalmaznak a tápoldatban.

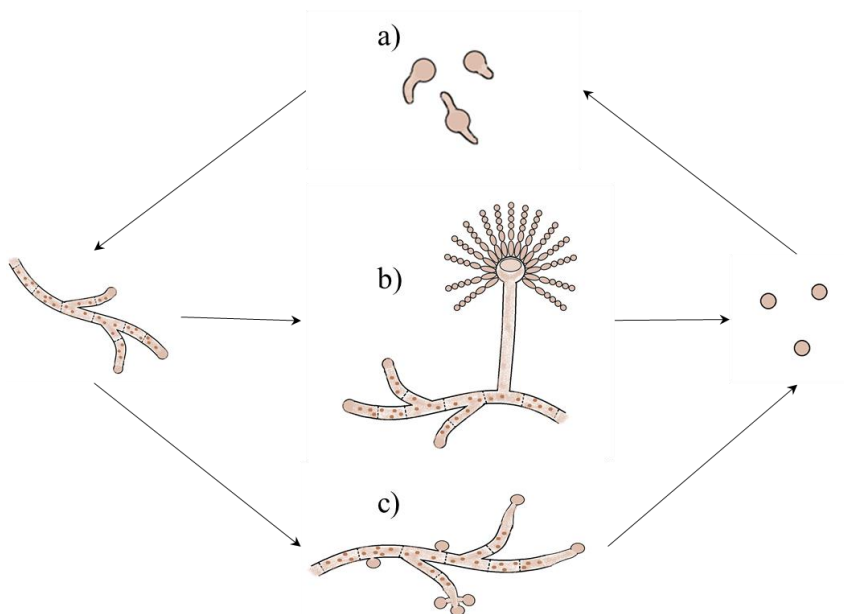


1.1.2 ábra: Az *Aspergillus* nemzetség filogenetikai törzsfája (Kocsubé et al., 2016)

Az *Aspergillus terreus* gomba kozmopolita, képviselőit minden földrészen izolálták már, beleértve az Antarktiszt is (Feng et al., 2019), nagyon változatos élőhelyekről, mint például sivatagos és szántóföldi talajok, komposzt (Varga et al., 2005), sőt, mélytengeri mintákból is (Wang et al., 2020). A sótolerancia, szárazságtűrés és tág hőmérséklet-tartományban való növekedési képesség fontos jellemzője ennek a gombának. A környezeti viszonyokkal szemben mutatott széles tűréshatárok előnyösek, amikor ipari alkalmazásra szánunk egy mikroorganizmust.

Ami az *Aspergillus terreus* életciklusát – fejlődési formáit illeti, a gombát hosszú ideig szigorúan anamorfának (ivartalan szaporodású) tekintették, mostanra azonban bebizonyosodott, hogy képes ivaros szaporodásra is (Arabatzis & Velegraki, 2017). A mikológia területén ugyanazon gombák anamorf és teleomorf alakjainak különböző elnevezései helyett már egy konszenzusos név használatát támogatják (Hawksworth et al., 2011), ezért a teleomorf alak neve egyelőre változatlanul *Aspergillus terreus*.

A gomba ipari szempontból fontos életciklusa az anamorf alakban valósul meg, amelynek formáit a 1.1.3 ábra szemlélteti.



1.1.3 ábra: Az *Aspergillus terreus* aszexuális fejlődési formái: a) spórák duzzadása, csiratubulusok képződése; b) vegetatív hifából kifejlődő konídium tartó a konidiospórákkal – jellemzően szilárd tápközeg felületén; c) szubmerz hifákon fejlődő járulékos spórák (accessory conidium)

A gomba konidiospórái, melyek elsősorban a szaporodás célját szolgálják, megfelelő közegbe kerülve megduzzadnak, főként vizet és cukrot vesznek fel, majd megjelennek rajtuk

a csíratubulusok, amelyek hosszirányú növekedése és elágazódása révén fejlődik ki a hifa, azaz fonalas szerkezetű gomba biomassza. A hifák szövénye a micélium, amelynek mennyisége nem definiálható egyszerűen sejtszámmal, vagy egyéb kvantált egységsszámmal. Ebben a formájában a gomba mennyiségének kifejezése száraz tömeg koncentrációként, vagy valamilyen állandó koncentrációban jelenlevő sejtalkotó (pl ergoszterol) mennyiségének meghatározásával lehetséges (Mansoldo et al., 2020). A gomba növekedése a hifacsúcsokon történik. A csúcsnövekedés mellett újabb elágazások is képződnek. A gombafonalban a sejtmagok osztódása nincs direkt kapcsolatban a csúcsirányú növekedéssel, a csúcsok száma határozza meg, hogy milyen ütemben növekedik a gomba. Az új csúcsok képződése jellemzően a gazdag, sok tápanyagot tartalmazó közegben dominál, mivel a csúcsszám növekedésével tudja a gomba maximalizálni a tápanyagfelvételét. A csúcsok érzékelik egymás közelségét, extracelluláris kémiai szignálok révén, és a külső körülmények mellett ez is befolyásolja a fejlődés mikéntjét (Moore et al., 2005).

1.2 Az itakonsav fermentációs technológiát befolyásoló paraméterek

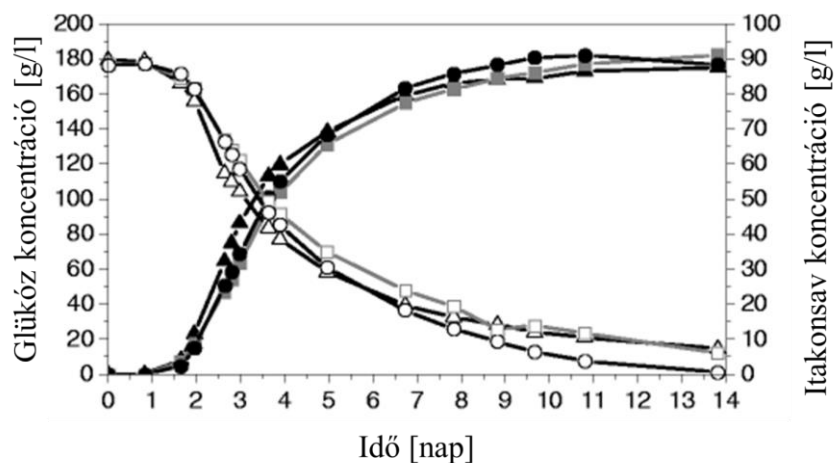
Az itakonsav fermentációs előállítása nagy múltra tekint vissza. Az első ipari szabadalom a Pfizer céghez köthető (Kane et al., 1945), amelyben már *Aspergillus terreus* gomba szubmerz szakaszos fermentációjáról adnak számot. A folyamatot az évtizedek alatt igen sok technikával és különböző léptékben vizsgálták. Az itakonsav termeltetéshez szükséges feltételekről, a különböző technológiai paraméterek optimális tartományáról sok kutatási beszámoló született, amelyekről számos összefoglaló áttekintés készült (Gyamerah, 1995; Hajian & Yusoff, 2015; Kuenz & Krull, 2018; Okabe et al., 2009; Zhao et al., 2018).

Az itakonsavat jelenleg a citromsavhoz hasonlóan csak biotechnológiai úton állítják elő. A világ itakonsav termelésének zömét öt nagyvállalat adja, amelyekből négy Kínában, egy pedig az Amerikai Egyesült Államokban van (De Carvalho et al., 2018). Az itakonsav termelés olyan nagy kapacitású fermentorokkal rendelkező üzemekben történik, szakaszos fermentációval, ahol nem ez a kizárólagos termék. Ez a rugalmasság-igény pedig az ipari innováció gátja, amennyiben túl specifikus, és nem univerzálisan alkalmazható az új eljárás. Az ipari folyamatban 80 g/l körüli itakonsav tartalmú levet dolgoznak fel (Kuenz & Krull, 2018).

Az itakonsav biotechnológiai előállításában foszfát limitációra van szükség a sejttömeg túlzott növekedésének visszaszorítására (Kuenz et al., 2012; Riscaldati et al., 2000).

Felismerték az alkalmazott szénhidrát kiindulási koncentrációjának szignifikáns hatását a hozamra (Karaffa et al., 2015), mely alapján a mikroorganizmus jól tolerálja a 200 g/l glükózkoncentrációt is, és 120 g/l-ig szignifikánsan növekszik az elérhető hozam, melynek elméleti maximuma 1 mol itakonsav/mol glükóz (vagy 0,72 g/g). A tanulmányban a nyomelemek közül a mangán hatását is vizsgálták, mivel a szerzők szoros párhuzamot vonnak az *A. terreus* itakonsav termelése és az *A. niger* citromsav termelése között. A citromsav előállításnál a mangán már 5,6 µg/l koncentrációban jelentősen rontja a citromsav termelés hatékonyságát. A mangán az itakonsav termelés hozamára is hatással van. A forrás 3 µg/l koncentráció alatti értéket javasol (Karaffa et al., 2015), egy másik 10 µg/l alatti tartományt (Welter, 2000). A mangánon kívül más mikroelemek hatását is vizsgálták (Gyamerah, 1995; Hevekerl et al., 2014a; Welter, 2000). Az eredmények alapján az egyes komponenseket külön-külön vizsgálva nem optimalizálható a tápoldat, mivel kereszthatások

lépnek fel. A mangán hatása például a réz ionok koncentrációjával részben ellensúlyozható (Karaffa et al., 2015), illetve a foszfát-tartalom is befolyásolja a hatását (Saha & Kennedy, 2019). Az általam alkalmazott tápoldat egy olyan optimalizált *Aspergillus terreus* fermentációs eljárásban használt, amely három különböző szubszpeciesz esetén bevált, nagyon hasonló lefutást és eredményeket szolgáltatva (1.2.1 ábra) (Kuenz et al., 2012). A kísérletet pH-szabályozás nélkül végezték, 33 °C-on, 1,5 literes kevert tartály bioreaktorban.



1.2.1 ábra: Az *A. terreus* DSM23081 (háromszög), *A. terreus* NRRL 1960 (négyzet), *A. terreus* NRRL 1963 (kör)-fermentációjának összehasonlítása; itakonsav (fekete), glükóz (fehér) (Kuenz et al., 2012)

Az itakonsav fermentációban intenzív oxigénellátást kell biztosítani, amely lehetővé teszi a mikroorganizmusnak a koenzimek regenerálását az alternatív légzési láncon keresztül ATP képzés nélkül, azaz az életfolyamatok működtethetők a mikroorganizmus számára savtúltermelés mellett is (Molnár et al., 2018).

A pH hatásával kapcsolatban több kutatást is végeztek (Hevekerl et al., 2014b; Komáromy et al., 2019; Larsen & Eimhjellen, 1955; Riscaldati et al., 2000; Rychtera & Wase, 1981). Az eredmények alapján a fermentációnál célszerű megvárni a nem szabályozott pH-jú folyamatra jellemző drasztikus pH csökkenést, amikor 2 alá süllyed az érték (Kuenz & Krull, 2018; Larsen & Eimhjellen, 1955). Ezután célszerű elkezdni a pH-szabályozást. Az alkalmazandó lúg minőségének hatását is vizsgálták (Hevekerl et al., 2014b), amely alapján az ammónia oldatot nevezték meg a legmegfelelőbbnek, azonban az eredmények alapján elmondható, hogy a nátrium-hidroxid és a kálium-hidroxid oldat is alkalmas a pH szabályozására, amennyiben nem ugrásszerű beavatkozással valósítjuk meg.

A pH 2 alá csökkenése után alkalmazott szabályozás bármelyik lúg alkalmazása mellett nagyobb végtitert (jobb hozamot) eredményezett a szabályozás nélküli folyamatnál. Az alkáli lúgok esetén pedig a melléktermékek, az almasav és az α -keto-glutársav mennyisége is visszaszorult (1-1,5 g/l koncentrációban fordultak elő). Az ammónium-hidroxid visszanyerésének lehetősége bipoláris elektrodialízissel kérdéses, mivel az ammónium egyrészt szubsztrátja a fermentációnak, másrészt a bipoláris elektrodialízis során folyamatosan termelődő hidroxid-ionok miatt erősen lúgos oldatból már kilép a mérgező ammónia, gáz formájában. Ezt elkerülendő, munkám során a nátrium-hidroxid használata mellett döntöttem, amikor pH-szabályozást alkalmaztam, a kezdetektől figyelembe véve az integrált rendszer kialakításának szükséges feltételeit.

A fermentáció optimális hőmérsékletét tekintve több javaslat is született, melyek a 30-40 °C tartományba esnek. Egy régi vágású 1952-es tanulmányban, amely számos paraméter optimalizálását tartalmazza az *A. terreus* NRRL 1960 szubszpeciesz fermentációjában, az található, hogy 40 °C-on (103 °F pontosabban) nagyon lassú a folyamat. A produktivitás szempontjából 35 °C (95 °F) az optimális, míg a hozam 37 °C-on (98 °F) érte el maximális értékét (Nelson et al., 1952). A németországi Thünen Institute Mezőgazdasági Technológia Intézetében végezték az eddigi legmagasabb végtitert eredményező itakonsav fermentációkat, amelyek hőmérséklete 33 °C volt (Hevekerl et al., 2014a, 2014b; Krull, Hevekerl, et al., 2017; Kuenz et al., 2012; Kuenz & Krull, 2018). Erre alapozva kísérleteimben én is 33 °C-ra termosztáltam.

1.2.1 Az oltóanyag hatása a folyamat alakulására

A fonalas gombák életciklusa jóval összetettebb, mint a baktériumoké. Ez az összetettség jórészt abból fakad, hogy a gombák eukarióta mikroorganizmusok, és jelentős génállományuk révén komplex metabolizmussal rendelkeznek (Gibbons & Rokas, 2013; Mohanta & Bae, 2015).

A tenyésztési körülmények hatással vannak a kifejlődő hifák metabolizmusára, ezt szem előtt kell tartani már az oltóanyag készítésnél is, spóra alapú vagy előtenyésztett oltóanyag esetén egyaránt. A hifák szövevénye, a micélium egységnyi száraz tömege nem szolgáltat információt a metabolikus aktivitásra nézve. Sőt, Zdeněk Fencl (1970) kutatásában rávilágított, hogy a szubmerz fermentációban a tömör pelletes illetve a laza

micéliumos növekedés merőben eltérő fiziológiai állapotnak felel meg. *Aspergillus niger* laza szövevényes hifáiban vizsgálta a 2-es helyen tríciummal szubsztituált uridinnal, hogy a micélium mentén milyen aktív az RNS szintézis. (A radioaktív jel mutatta a jelölt molekula beépülését.) Azt találta, hogy a maximális növekedés fázisában az egész fonal mentén aktív RNS szintézis zajlik, és a hifacsúcsokon és az elágazási lábsejteken a legnagyobb az intenzitása. Ezzel szemben a stacioner fázisban már lényegesen kisebb az intenzitás, és a micélium különböző pontjain összpontosul. Az aktivitás nem a növekedés során később képződött sejtekben magas ilyenkor, hanem random a gombafonal egyes szakaszaiban, amiből következik, hogy itt nem lehet „öreg nyugvó” és „fiatal aktív” felosztást alkalmazni (Fencl, 1970; Papagianni, 2004).

Mivel az oltóanyag minősége és mennyisége fontos paramétere egy fermentációnak, a reprodukálhatóság biztosítását legegyszerűbben úgy lehet megoldani, hogy a gomba egysejtes állapotát, a spórákat használjuk fel erre a célra, ezzel az eljárással optimalizálunk.

Az *Aspergillus* nemzetség tagjainak többsége képes ivaros és ivartalan spóráképzésre. A biotechnológia szempontjából az ivartalan spóráképzés a relevánsabb, amellyel megőrizhető a termelő törzs genetikai stabilitása. Az *A. terreus* gombáról csak nemrégiben derült ki, hogy ivaros spóráképzésre is képes (Arabatzi & Velegraki, 2017). Alapvetően az ivartalan konídiumok viselkedését vizsgálták a gombatörzs (nem azonos szubszpecieszek!) másik fontos metabolitjának, a lovasztatinnak (koleszterin csökkentő hatású szer) az előállítása (Bizukojc & Ledakowicz, 2010; Boruta & Bizukojc, 2017; Casas López et al., 2005), illetve a törzs oportunistá patogenitása miatt (Deak et al., 2009). Az itakonsav kapcsán kevés tanulmány került kiadásra. Gao és munkatársai (2014) az inokulálási spóraszámot, mint morfológiát befolyásoló paramétert vizsgálták. Az oltóanyagot előtenyésztették, és azt találták, hogy 10^8 db/ml kiindulási spóraszám esetén góccok, illetve pelleték képződtek (a lombik geometriájának függvényében), míg 10^9 db/ml esetén laza micéliumhálózat alakul ki. A 36 órás előtenyésztett inokulumokat 10 % (V/V) mennyiségben alkalmazták fermentoros kísérletben, ahol a gócos növekedés esetén az itakonsav hozam 98,8%-kal több volt a laza micéliumosnál, 10 %-kal a pelletes növekedésünél. El-Imam és munkatársai (2013) klasszikus fermentáció-optimalizálás során az itakonsav fermentációban a kiindulási spóraszám 10^4 – 10^5 db/ml tartományát vizsgálták, amelyben a töményebb oltóanyag jobban teljesített.

Az *Aspergillus*-ok konidiospórái metabolikusan aktívak (Deak et al., 2009; Novodvorska et al., 2016; Osheroov & May, 2001), és kölcsönhatásban vannak a környezetükkel. A gyakorlatban elsősorban a szilárd tápközegen fejlődő konidiospórákat használják oltóanyagként, de az *A. terreus* folyékony tenyészetében is képes ivartalan spóráképzésre. Ezek a szubmerz spórák valamivel nagyobbak a konidiospóráknál, intenzívebb az anyagcseréjük, és nem az összetett konídium struktúrákon fejlődnek, hanem a hifa mentén, ezért járulékos spóráknak is nevezik őket. Feltételezések szerint az immundeficiens betegen kialakuló akut és végzetes szisztémás (a teljes testben elharapódzó) mikózis egyik oka, hogy a testen belül ezekkel a spórákkal terjed szét a gomba (Deak et al., 2009). Technológiai szempontból azt találták, hogy az *A. terreus* DSM23081 törzs szubmerz spórái 0,75 nappal korábban csíráznak, mint a felületi konidiospórák (Hevekerl et al., 2014b). A szubmerz spóra-inokulum előállítása egy járulékos előfermentáció, több centrifugálás-mosás ciklussal az oltóanyag készítmény előállításáig, amely emiatt nem erőforrás-takarékos eljárás, bár kétségtelenül van létjogosultsága, ha egy üzemben nincs lehetőség megfelelő mennyiségű felületi konidiospóra előállítására szilárd fázisú fermentációval, és így biztosítható a reprodukálhatóság.

Az itakonsav fermentációra vonatkozóan a kiindulási spóraszám hatásával kapcsolatban alig van információ. A paraméternek létezhet egy optimális tartománya. Az inokulum spóraszám szignifikáns hatással van a kialakuló makromorfológiára. Citromsav termelő *Aspergillus niger* esetén az alacsony oltási spóraszám (10^4 nagyságrend) mellett a sejttömeg nagyobb hányada van a technológiailag kedvezőnek ítélt pelletes morfológiában (Papagianni & Matthey, 2006). A nagyon alacsony spóraszám azonban jelentősen meghosszabbíthatja a fermentáció adaptációs-lag szakaszát, a túl magas spóraszám esetén viszont gátlás alá kerülhet a csírázás (Barrios-González et al., 1989; Scott & Alderson, 1974). A konidiospórák külső lipidrétegében csírázásgátló anyagok vannak, amelyek az oldatba vitelhez felhasznált felületaktív anyag hatására (pl. Tween-80) gyorsan kioldódnak, és tartósan késleltetik a csíratubulusok megjelenését.

A szakirodalomban gyakori a spóra alapú inokulálás. Az oltás utáni spórakoncentráció egyszerű adat általában, $1 \cdot 10^6$ db/ml (Hevekerl et al., 2014a, 2014b; Kreyenschulte et al., 2018; Krull, Eidt, et al., 2017; Krull, Hevekerl, et al., 2017; Kuenz et al., 2012; Saha & Kennedy, 2019) vagy $5 \cdot 10^6$ db/ml (Karaffa et al., 2015; Molnár et al., 2018), amelyet valamilyen mikroszkópos számlálókamrával határoztak meg. A kiindulási spóraszám

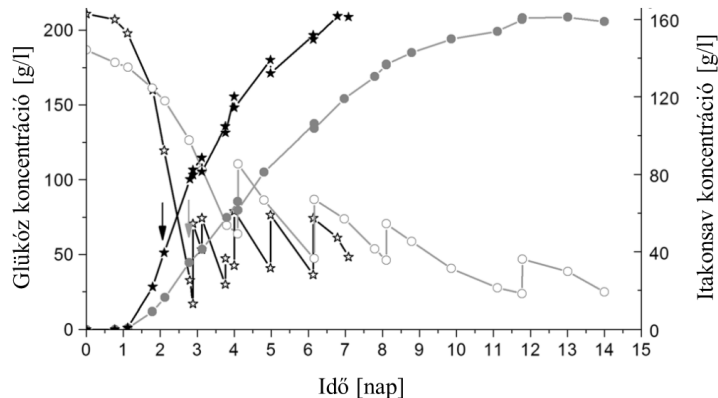
hatását érdemes alaposabban vizsgálni, közvetlenül az itakonsav termelés és hozam szempontjából.

A mikroszkópos sejtszámlálás időigényes feladat, kívánatos lenne egy gyors, fotometriás spóraszám meghatározás, amely megfelelő kalibrációval használható. Ilyen technikát már sikerült kidolgozni *Trichoderma* gomba spórák esetén (Schütz et al., 2020).

1.2.2 Végtermékgátlás – van vagy nincs?

Az itakonsav képződése a fermentáció során részlegesen növekedéshez kötött kinetikát mutat (Krull, Hevekerl, et al., 2017; Riscaldati et al., 2000), sőt, pH szabályozás nélkül a termékképzés nem növekedéshez kötött része lényegében zérus. A mikroorganizmus itakonsav termelésének szerepe még nem tisztázott, azonban a besorolása a primer – szekunder metabolit csoportosításban nehézkes. Tekintve, hogy nem szükséges a túltermelő törzs életfunkcióihoz, és bizonyos fermentációs körülmények között lényegében nem is termelődik itakonsav, inkább a szekunder metabolitok közé sorolandó. Azonban növekedéshez kötött termelődés esetén primer metabolitokról szoktunk beszélni. A felosztás mesterséges, így nem meglepő, hogy vannak esetek a szürke zónában.

Az itakonsav savas karaktere miatt a termelő mikroorganizmus elektromos potenciál hajtotta folyamatait befolyásolhatja. Arra nézve, hogy saját képződésére gátló hatással van, elsőként 1966-ból származnak megállapítások (Kobayashi & Nakamura, 1966). A fermentáció folyamatába integrált, in situ termékeltávolítási stratégiát is fejlesztettek, reaktív extrakcióval, hogy ezt a problémát megoldják (Kreyenschulte et al., 2018). Az ezt követő inhibíciós beszámolók (Okabe et al., 2009; Yahiro et al., 1995) erre az 1966-os forrásra utalnak vissza, amely egy folyamatos fermentáció optimalizálásáról szól. Ennek némileg ellentmond Krull, Hevekerl és munkatársaik (2017) beszámolója olyan rátáplálásos, szakaszos fermentációkról. Az 1.2.2 ábrán látható diagramon két különböző foszfátkoncentráció (0,1 és 0,8 g/l) esetén követhető az *A. terreus* DSM23081 törzsszel kivitelezett rátáplálásos itakonsav fermentáció lefutása, melyben a glükózt por formában adagolták a reaktorba. Az a tény, hogy rátáplálásos technikával elérhető 6 nap alatt 160 g/l itakonsav, és az itakonsav időbeli képződése (a fermentáció produktivitása) 140 g/l itakonsav koncentráció eléréséig jól közelíthető lineáris trendvonalal, azt sugallja, hogy a termékkinhibíció fellépésének feltételeit és mechanizmusát célszerű a jövőben tovább vizsgálni.



1.2.2 ábra: Rátáplálásos itakonsav fermentációk (kör: 0,1 g/l KH₂PO₄, csillag: 0,8 g/l KH₂PO₄, az üres szimbólumok a glükóz, a teli szimbólumok az itakonsav koncentrációt mutatják, a nyilak a pH szabályozás indulását jelzik) (Krull, Hevekerl, et al., 2017)

A glükóz rátáplálása miatt viszonylag kiegyensúlyozott produktivitással igen magas (a szakirodalomban legmagasabb) itakonsav koncentráció érhető el. A nagyobb foszfáttartalom mellett 22 g/l száraz sejtömeg fejlődött ki, ami több, mint kétszerese a foszfát limitált esetben elért 10 g/l-nek. A nagyobb sejtömegképződés miatt a termékhozam 20%-kal alacsonyabb volt, de a fermentáció 5 nappal rövidebb ideig, mindössze 7 napig tartott.

1.2.3 A fény, mint környezeti paraméter

A gombák és a fényhatás interakciója nem olyan triviális, mint például az algák vagy a magasabb rendű növények esetén, ahol a fény nagyon fontos szerepet játszik az életfolyamatokban, mint energiaforrás a széndioxid-fixáláshoz (Lawson et al., 2022). Azonban a gombák fejlett eukarióta organizmusok, melyek igen hatékonyan térképezik fel környezetüket, és amennyiben lehetséges, gyorsan alkalmazkodnak hozzá (Hagiwara et al., 2016). A környezet feltérképezésében a kémiai ingerek érzékelése mellett említendő a hőmérséklet, az ozmotikus viszonyok, a gravitáció, a quorum sensing ('sokaság érzékelése') és a fényviszonyok érzékelése is. Ez utóbbi jelenség nem került el a mikológusok figyelmét, akik évtizedek óta foglalkoznak a gombák fényérzékelési mechanizmusainak tisztázásával, elsősorban alapkutató szintjén.

A fényérzékelés vizsgálata direkt kísérletezéssel sokáig csak a jól mérhető, esetleg szemmel látható változásokról nyújtott információt. A különböző energiájú fotonokra érzékeny receptor molekulák tisztítása, elemzése nehézkes, mivel például a kék fényt nagyon sok fehérje elnyeli, nem csak az erre specializálódott receptor (Fuller et al., 2015).

A fonalas gombák jelentős része reagál a látható fényre (450nm - kék – 700nm - vörös). Ez a képesség evolúciós előnyt jelent, hiszen a fény jelenléte jelzi a földfelszín, ahol UV sugárzásnak, szárazságnak vagy szignifikáns hőmérséklet változásnak lehetnek kitéve. A képesség genetikailag kódolt. A fényérzékelő fehérjék nagyon konzerváltak, azaz nagyon hasonlóak az összes fonalas gombában (Idnurm & Heitman, 2005).

Ilyen fényérzékelő konzervált fehérjék például a fotoliázok, amelyek a DNS javítási mechanizmusait katalizálják a fényre adott válaszként, más fehérjék bonyolultabb szignálkaskádókat aktiválnak, amelyek nagyszámú változáshoz vezetnek a transzkripció szintű génszabályozás révén. A különböző funkciójú fehérjékben közös, hogy van egy kromofór egységük, ami foton abszorpcióval fizikai-kémiai és szerkezeti átalakuláson megy keresztül. A szerkezetváltozás érzékelhető egy másik kölcsönhatásba lépő fehérje által, és folyamatok láncolata indul el a sejtekben (Corrochano, 2011; Fuller et al., 2015).

A fényre valamilyen megfigyelhető módon reagáló gombát mutagén hatásnak kitéve kereshető olyan „vak” mutáns, amelynek fejlődésére nincsen hatással a fény. A „vak” mutánsokban lokalizálva a mutáció helyét pedig lehetővé válik azoknak a géneknek az

azonosítása, amelyek a fotoreceptor fehérjéket kódolják. Az érintett gén szekvenciája ezután kereshető más gombafajok génbankban őrzött genom szekvenciáiban. Így anélkül, hogy minden fajból kénytelenek lennénk mutánsokat létrehozni, feltérképezhető, hogy mely organizmusok képesek ezeknek a fényre adott válaszban részt vevő fehérjéknek a termelésére.

Ezen túlmenően, annak vizsgálata is lehetséges, hogy a fényhatás milyen metabolikus változásokhoz vezet az egyes gombatorzsek esetén. Az mRNS transzkriptóma feltérképezésével azonosíthatók az adott fiziológiai állapotban átírt gének/expresszálandó fehérjék, így a vizsgált környezeti hatás következtében beálló változások is. Ez lehetőséget teremt az olyan metabolikus válaszok azonosítására, amelyek szemmel nem láthatók, ezen belül a fény indukálta válaszreakció molekuláris hátterének tisztázására is.

1.2.3.1 A gomba eredetű fotoreceptorok szignál-mechanizmusa

A legelőször feltárt fényérzékelésért felelős metabolikus út a *Neurospora crassa* gombánál észlelt 'white collar', azaz fehér gallér jelenség mögöttes folyamata volt. Megfigyelték, hogy fényben inkubálás hatására a karotenoid pigmentek termelése indukálódott a hifákban. A jelenségről elnevezett white collar-1 (*wc-1*) gén mutációja esetén viszont nem pigmentálódott a hifa az amúgy konstitutívan pigmentált konídiumok alatt, ami „fehér galléros” megjelenést kölcsönzött a tenyészetnek (Fuller et al., 2015).

A *wc-1* gén által kódolt WC-1 fehérjének van egy ún. PAS doménje. A PAS doménnel rendelkező fehérjék szignál transzdukciós feladatot látnak el, és két fontos részből tevődnek össze (Möglich et al., 2009). A PAS domén a szenzor egység, amely a változatos fizikai-kémiai stimulusok érzékelésére specializálódott. Speciális PAS domének a fény(light)-oxigén-feszültség(voltage)-érzékelő domének (LOV). A WC-1 fehérje LOV doménnel rendelkezik, amely kék fény foton (~465 nm) abszorpciójára képes a kötött FAD molekulája révén. A FAD energiaállapota szabályozza a másik fontos rész, az ún. effektor egység aktivitását, amely lehet valamilyen katalízis vagy a DNS-hez kötődés. A WC-1 fehérjének egy „cink-ujja” van, ami a DNS-hez kapcsolódást biztosítja.

A WC-1 fehérje kölcsönhatásba lép a WC-2 fehérjével, amellyel heterodimert képez, a WC komplexet (WCC). A WC-2 fehérjének nincs a fény közvetlen érzékelésre képes doménje, csak egy „cink-ujja”. Azonban tény, hogy a *wc-2* gén mutációja ugyanúgy „vak”

mutánsokat eredményez, mint a *wc-1* esetén, tehát kulcsszerepet játszik a *N. crassa* fényre adott válaszreakciójában.

A génreguláció úgy történik, hogy a transzkripciós regulátor WCC adott gének promóteréhez kötődik, és ha a kötött FAD molekula gerjesztett állapotba kerül foton abszorpció révén, akkor a szerkezeti változások révén aktiválódik az adott szekvencia átíródása (He et al., 2002).

Az *Aspergillus* nemzetség egyik legalaposabban vizsgált modell organizmusa az *A. nidulans*. A törzs 'white collar' ortológ génjei a *LreA* (WC-1) és a *LreB* (WC-2) fehérjéket kódolják (Purschwitz et al., 2009).

Azonosítottak a fonalas gombákban vörös fény receptort is, a növényekben és baktériumokban található fitokrómok analógiáit (melyek bilin kromofór csoporttal rendelkeznek). Míg a növényekben ezek a molekulák energianyerő mechanizmusok részei, a gombák esetén „csak” regulátor fehérjék. A *N. crassa*-ban két fitokrómot kódoló gént azonosítottak, melyek a *phy-1* és *phy-2* jelölést kapták. Ezek nem kapcsolódnak be a fényre adott válaszreakciókba, mutációjuk ugyanis nem okozott eltérést egyik ismert fényválaszban sem (Purschwitz et al., 2006). Ezzel szemben az *A. nidulans* egyetlen fitokróm génjének, az *fphA*-nak deléciója eltérő fejlődési mintázatot eredményezett a vörös fény alatt (Blumenstein et al., 2005).

A vörös és kék fényreceptorok fényérzékelő fehérjekomplexbe állnak össze az *A. nidulans*-ban. A kék és a fehér fény besugárzása külön-külön nem éri el a fehér fény által kiváltott választ, amely mögött ezeknek a receptoroknak a kölcsönhatása állhat. A fényreceptorok egy trimer komplex részeként továbbítják jelüket számos globális regulátor fehérje által kontrollált mechanizmus irányába, például a VeA fehérjén keresztül (Bayram et al., 2010). A VeA egy velvet (bársony) regulátor fehérje, amely az aszexuális és az ivaros fejlődés közötti egyensúly mellett a másodlagos metabolitok termelését is szabályozza számos fonalas gombában (Purschwitz et al., 2006). A velvet fehérjéről azt találták, hogy komplexekbe rendeződve fontos szabályozási mechanizmusokban vesznek részt, valamint megoszlásuk a citoplazma és sejtmag között (ahol a transzkripciós reguláció történik) a fényviszonyoktól függ (Bayram et al., 2008).

Az *Aspergillus*-ok között az ipari jelentőségű *A. niger* és *A. terreus* is rendelkezik a *wc-1* és *wc-2* gén ortológjaival (Salichos & Rokas, 2010).

1.2.3.2 Fényre adott válaszreakciók az *Aspergillus* törzsekben

A fény a vizsgált esetek jelentős részében a konidiospórák képződésére fejtett ki szignifikáns hatást (Tisch & Schmoll, 2009). Az *Aspergillus* nemzetség sok törzse az *A. nidulans*-hoz hasonló mechanizmusok mentén reagál a fényre, tehát a megvilágítás serkenti az aszexuális spórák képződését (Murthy et al., 2018; J. Zhang et al., 2018).

Az *A. terreus* másik, iparilag fontos, lovasztatin-termelő alfajának - a DSM20543-nak – többféle sporulációs körülményét vizsgálták Porcel és munkatársai (2006). Kimutatták, hogy a gomba fényexpozíciós előzményei hatással voltak a sporulációig eltelt időre a felszíni kultúrákon, azaz a konídiumképződés sötétben lelassult. A másodlagos metabolit, a lovasztatin termelésére viszont az inokulum előállításánál alkalmazott fényexpozíciónak nem volt hatása.

A konídium képződés serkentetősége megvilágítással kiaknázható olyan folyamatokban, ahol a konidiospórák előállítása a cél. Ilyen lehet például a spóra alapú oltóanyag előállítása fermentációhoz, vagy biokontroll termékek fejlesztése. Az ilyen alkalmazásoknál kívánatos, hogy a felhasznált alapanyagok nagyobb százaléka kerüljön a felhasználásra szánt konídiumokba.

Az *A. oryzae* esetében találtak olyan altörzseket, amelyek ellentétes módon reagáltak a fényre a konídium képződés tekintetében (Hatakeyama et al., 2007). Suzuki és Kusumoto (S2020) megvizsgálták a két, eltérő fényreakciójú *A. oryzae* törzs transzkriptómájának különbségeit. A 453 különbözően expresszálódó gén között 67 bizonyult fényre érzékenynek. Több hidrolitikus enzim átíródására is hatással volt a megvilágítás, például egyes alfa-amilázokéra és beta-glükozidázokéra. A tanulmány eredményei alapján tehát, ahogy a szerzők ki is emelik, az *A. oryzae*-vel fermentált élelmiszerek előállítása mellett eredményeik nagy jelentőségre tarthatnak számot az enzimpárban is.

A fehér fény hatással van az *A. niger* biofilm kialakulására is. A megvilágítás kedvezően befolyásolta a melanin termelődést és az extracelluláris poliszacharidok képződését (Sun et al., 2021).

Bár az *Aspergillus*-ok szerves sav termelése és a fényviszonyok esetleges kapcsolatáról nem születtek tanulmányok, van olyan közlemény, amely alapján érdemes ilyen vizsgálatokat végezni. Niu és munkatársai (2016) azt találták, hogy az *A. niger laeA*

globális regulátor fehérjét kódoló génjén elszenvedett pontmutáció 'nem savasító' mutánst eredményez. A LaeA a kék fény érzékelésért felelős 'white-collar' fehérjékkel együttműködő 'velvet' fehérjével, a VeA-val szintén regulációs komplexet alkot (Bayram et al., 2008). A LaeA globális regulátor fehérje az *A. terreus*-ban is megtalálható, és fontos szerepe van a szekunder metabolitok termelésében (Bok & Keller, 2004; Zhgun et al., 2019). A fényre adott metabolikus válaszban és a LaeA-kapcsolt regulációban egyaránt szerepet kapó VeA révén a két szabályozási kaszkád között elméletileg lehet kölcsönhatás.

1.2.3.3 Cirkadián ritmus, mint a fényérzékelés egyik következménye

Vannak olyan ritmikusan változó, sejten belüli molekuláris mechanizmusok, amelyekkel a mikroorganizmus képes az idő múlását érzékelni. Ide tartoznak a cirkadián oszcillátorok, amelyek megfelelnek a következő három kritériumnak: (1) körülbelül 24 óra a periódus idejük, (2) hőmérséklet-kompenzált a periódusuk hossza – azaz viszonylag széles hőmérséklet-tartományban változatlan –, és (3) környezeti hatásokkal újraindítható (mint pl. megvilágítás vagy hőmérséklet-változás) (Liu & Bell-Pedersen, 2006).

Ugyancsak a *N. crassa* gomba esetén tárták fel legrészletesebben egy cirkadián ritmus molekuláris hátterét, amely a törzs konídium képzésében játszik szerepet. A cirkadián ritmus alapja egy negatív visszacsatolású reakciókör. Öt fehérje működött, amelyek között van a kékfény receptor WC-1 és a WC-2 is, valamint egy frekvencia protein (FRQ). Ezen kívül az FRQ fehérjétől független oszcillációs köröket is leírtak ebben a gombában, amelyeknek molekuláris összetevőit még nem sikerült azonosítani. Ilyen például a nitrát reduktáz aktivitás, vagy a diacil-glicerol szint periodikus alakulása a sejtekben (Salichos & Rokas, 2010). Salichos és Rokas átfogó vizsgálatban, 64 fonalas gomba proteómáinak összehasonlításával feltérképezte a cirkadián fehérjék filogenetikai elterjedését. Tanulmányuk alapján az *A. terreus* törzs nem rendelkezik az FRQ fehérje homológjával, azonban a többi négygel igen. Az *A. flavus*-ban, *niger*-ben és *nidulans*-ban ugyanezt találták, az *A. oryzae* pedig a WC-1 fehérje analógját sem tartalmazta. Ismerve, hogy van FRQ független cirkadián ritmus is, ez a hiányosság nem zárja ki a cirkadián szabályozás meglétét az *A. terreus*-ban, bár ezt direkte nem vizsgálták még. Az *A. flavus* esetén viszont már bizonyították a cirkadián ritmus létezését (Greene et al., 2003).

1.2.4 Folyamatos rendszerű itakonsav fermentációk a szakirodalomban

A szakirodalomban igen csekély számú folyamatos fermentációs megoldás lelhető fel az itakonsav előállítására nézve.

A folyamatos fermentáció lényege, hogy folyamatos elvétel történik a fermentléből, amelyet ugyanolyan térfogatárammal érkező friss tápoldattal pótlunk. Fontos úgy megválasztani a hígítási sebességet, hogy a reakciót katalizáló mikrobatömeg kimosódását elkerüljük. Kézenfekvő a kis hígítási sebesség vagy valamilyen sejtviisszatartásos megoldás alkalmazása. Az *Aspergillus terreus* törzs esetén mindkét megoldást vizsgálták már, a sejtek viisszatartásának lehetőségét több, érdekes megoldás alkalmazásával is.

Kobayashi és Nakamura (1966) valósította meg az első publikált folyamatos itakonsav fermentációt. Kísérletükben egy 20 literes Waldhof típusú fermentort alkalmaztak az *Aspergillus terreus* K-26 törzssel kivitelezett fermentációhoz. A készülék egy tartály, melynek szélessége 2:1 arányban áll a magasságával. Belsejében egy tárcsás, forgó levegő sparger a falhoz közel, hat ponton vezeti be a levegőt. A tartály belsejébe, középre a falhoz rudakkal hozzáerősített hengerpalástot helyeztek el, melynek átmérője kb. $\frac{1}{4}$ -e a teljes átmérőnek. A levegővel kevert fermentlé a henger külső felén felemelkedik, majd a belsejében merül alá. Az áramlás oly módon alakul, hogy csillapítja a habzást (Stanbury et al., 2016).

A szerzők megállapították, hogy az itakonsav ennél a törzsnél gátolja saját képződését. Míg a szakaszos fermentációnál 40 g/l itakonsav koncentrációig még nincs hatása a terméknek a további képződésére, addig a folyamatos rendszerénél már 20 g/l itakonsav jelentősen lassította a további képződés sebességét. Érdekes, hogy minél nagyobb az itakonsav koncentráció, annál kisebb a produktivitás, azaz a gátló hatás lineáris összefüggést mutatott a két paraméter között.

A nagyobb micélium koncentráció pozitívan befolyásolta az itakonsav képződését, 16 g/l száraz micélium koncentrációnál találták az optimumot. Ezt a magas értéket úgy sikerült elérniük, hogy egy pulzáló elven működő szűrő egységet építettek be az elvételnél, hogy megakadályozzák a micélium kimosódását.

A gomba hajlamos biofilmet képezni azokon a felületeken, amelyeken nincs erőteljes folyadékmozgás a fermentorban. Ez azt jelenti, hogy például keverős tartályreaktorban a

keverőtengely folyadék fölötti részén, és alulról levegőztetett tartály esetén, ahol aeroszol képződik a légtérben, minden szabad felületen a fejtérben összefüggő gomba biomassza növekszik fel.

Ezt a jelenséget kihasználva Ju és Wang (1986) olyan tárcsás bioreaktort tervezett, amely egy horizontálisan elhelyezett henger test, 3,6 liter térfogattal. A készüléket félig töltötték tápoldattal. Benne rozsdamentes acél hálós tárcsák forogtak oly módon, hogy a tárcsa alsó fele a folyadékba merült, a felső pedig a légtérben volt. A lassú forgatás miatt – kísérletükben optimalizálták a paramétert, 8 rpm – a tárcsákon *Aspergillus terreus* NRRL1960 (\equiv DSM826) biofilm épült fel.

A biofilm kialakulása után folyamatos üzembe kapcsolták a rendszert, ami 60 ml/h áramlás mellett stabilan működött 30 napig, végig termelve az itakonsavat. A steady state-et 6 nap alatt érték el, itt az itakonsav koncentrációja 18,2 g/l volt, a térfogati produktivitás pedig 0,73 g/l/h. Az eljárás érdekessége, hogy az elfolyóban nem volt mérhető micéliumtömeg, dacára annak, hogy a kivezető cső nem volt speciálisan visszatartásra tervezve. Számításaik szerint az elfogyó glükóz alig 1-3%-át fordította a mikroorganizmus növekedésre vagy sejtfenntartásra, a többit itakonsav előállítására használta fel. A tápoldat és a betáp 50 g/l glükózt tartalmazott, a steady state-ben a glükóz koncentráció az elfolyóban (és így a készülékben is) 10 g/l értéken stabilizálódott. Továbbá az extrém aerobnak tekinthető fermentációs folyamathoz megfelelőnek bizonyult a mindössze 100 ml/min sebességű légcsera a bioreaktor gázterében, amelyet nem buborékoltattak át a folyadékon, így habzás sem lépett fel.

Azonban más, direkt módon is dolgoztak rögzített gombasejtekkel. Kautola és munkatársai (1985) három különböző sejtrögzítési eljárásban próbálták ki szintén az *Aspergillus terreus* NRRL 1960 törzset. A céljaik között szerepelt a xilóz szénforrás alkalmazhatóságának vizsgálata is, de esetünkben a technológiai megvalósítások és a glükózon elért eredmények relevánsak.

A különböző rögzítési módokat először ismételt szakaszos eljárásban vizsgálták, azaz a mikrobát leválasztották a szakaszos folyamat végén (egy esetben említenek 5 napot, de nem egyértelmű, hogy minden ciklus hossza ennyi volt-e), majd friss tápoldatba helyezték. Az újításként kipróbált, Celite R-626 hordozóra növesztett biokatalizátort próbálták ki végül valódi folyamatos üzemben.

A kipróbált rögzítési módoknál a kiindulási fiziológiai állapota a gombának más és más volt. Az egyik alkalmazott módszerhez 1%-os agarban rögzített nedves micéliumot használtak (a micélium koráról nincs említés), amelyet az eredeti tápoldatból 20 perc centrifugálással választottak le, majd 45 °C-os 1% agar tartalmú folyadékban szuszpendálták. Lehűlés után kis, 3 mm élhosszúságú kockákra darabolták. Az agarkockák produktivitását az ismételt szakaszos eljárásban instabilnak találták.

A második rögzítési módszer a Ca-alginát gyöngybe zárás volt. A gyöngybe ezúttal spórákat zártak, majd megfelelő szilárdítás és mosás után tápoldatban tenyésztették. A gyöngyök felszínének közelében sűrű micélium réteg alakult ki, amely megbízhatóan működött az ismételt szakaszos eljárásban, azonban igen kicsi itakonsav koncentráció, és alacsony produktivitás mellett.

A gélbe zárt és agarba öntött micéliumok produktivitását összevetették a „szabad” micéliuméval, 16 ismétlési cikluson keresztül. Az első két ciklusban a három beállítás nagyon hasonlóan teljesített, majd a harmadiktól az agarkockák és a nedves micélium teljesítménye nagyon lecsökkent. Azt a körülményt, hogy a „szabad” micélium elválasztása centrifugálással 20 percig tartott, mialatt oxigénhiány lépett fel a sejtekben, nem vizsgálták. Ma már ismert tény, hogy a 10 percnél hosszabb ideig fennálló oxigénhiány tartósan károsítja az itakonsav termelés metabolikus útját (Kuenz et al., 2012), ez az információ azonban ekkor még nem állt a kutatók rendelkezésére.

A harmadik Kautola által vizsgált immobilizálás a Celite R-626 hordozóra történő ránövesztés volt, amely egy nagy porozitású szemcsés diatómaföld. A cikk nem közöl adatokat, hogy ismételt szakaszos eljárásban hogyan teljesített ez a készítmény. A szerzők leírása szerint az így kapott rögzített micéliumot igen kisméretű – 16×70 mm-es töltött ágyas oszlopreaktorban használták fel, amelyet folyamatos üzemben vizsgáltak. A levegőztetett reaktorban a folyadék tartózkodási ideje 9-10 óra volt, és két hétig 11 g/l itakonsavat termelt a 60 g/l glükóz tartalmú betápból. Megállapították, hogy ez a stabil működés ammónium-nitrát nitrogénforrás mellett érhető el, ammónium-szulfát mellett nem. A számított produktivitás így 1,2 g/l/h-nak adódott, amely igen magas érték. A folyamatos fermentációk esetén várt alacsony termékkoncentráció és magas produktivitás tehát ebben a kísérletben a vártnak megfelelően alakult.

Folyamatos fermentációs kísérletet végzett Horitsu is munkatársaival (1983). Egy másik *Aspergillus terreus* szubszpeciest (G-026) alkalmaztak, melyet különböző ideig tartó szubmerz tenyésztést követően poli-akrilamid gélbe zártak. Az eljárás leírásából nem derül ki, hogy a nedves micéliumot milyen körülmények között szeparálták a fermentléből, azonban a gélbezárás vegyszerei – pl. az akrilamid monomer, vagy az N,N'-metilén-bisz-akrilamid gyakorolhattak toxikus hatást. Azt találták, hogy hosszútávon a hosszabb ideig – 120, illetve 140 óráig előnevelt micélium teljesített jobban. Az ilyen korú tenyészet már stacioner fejlődési állapotban van, tehát a jobb teljesítőképeség összefüggésben lehet az ebben a fázisban jellemző lelassult anyagcserével, melynek köszönhetően a gélbe zárás folyamatát kevésbé sínylette meg a mikroorganizmus.

A rögzített micélium optimális alkalmazási körülményeit a fentihez hasonló ismételt szakaszos kísérletekkel mérték ki. A vizsgált paraméterek az előtenyésztett micélium kora, a hőmérséklet, az alkalmazott szénforrás (glükóz vagy szacharóz), egyes tápkomponensek koncentrációja a tápoldatban (glükóz, ammónium-nitrát, magnézium-szulfát és ammónium-dihidrogén-foszfát), valamint a tápoldat pH-ja. A paraméterek hatását külön-külön elemezték, így kereszthatások felismerésére, ha lennének, nem volt lehetőség.

A folyamatos reaktor egy 5 cm belső átmérőjű, 20 cm magas üveg cső volt (400 cm³), amelybe 100 ml tápoldatot és 40 g immobilizált micéliumot tettek. Az alkalmazott paraméterek: 35 °C, 1,4 l/min levegőztetés és 4 ml/óra térfogatáram. A maximális produktivitást a 15. napon mérték, amikor 0,6 g/l/h-nak adódott. A termékkoncentrációról vagy hozam jellegű paraméterről nincs említés a publikációban. Az így rögzített micélium nem növekedett a vizsgált 30 napban, és felezési idejét 10 napban határozták meg a szerzők.

Welter 2000-ben benyújtott német nyelvű PhD dolgozatában (2000) itakonsav termelő *Aspergillus terreus* törzssel (NRRL 1963 szubszpeciest) kivitelezett folyamatos fermentáció lehetőségét kutatta. A dolgozatban bemutatta szabad micéliummal végzett folyamatos fermentációs kísérletét, melynek hígítási sebességét az előzetesen meghatározott maximális fajlagos növekedési sebességhez (μ_{\max}) igazította, hogy elkerülje a sejtek kimosódását. A 180. óra után azonban a hígítási sebességet megnövelte, úgy, hogy az több, mint 10 %-kal meghaladta a μ_{\max} -et, mégis a 300. órára, mikor leállította a fermentációt, a fermentorban egy összefüggő, nagyméretű gomba aggregátumot talált. A sejtömeg tehát nem mosódott ki. Következtetésként azt vonta le, hogy a szabad sejtes folyamatos rendszerű fermentáció a nem tervezhető fejlődés miatt komoly nehézségekbe ütközik. A tapasztalt

burjánzás azonban visszaszorítható lehet szerinte a foszfát-tartalom csökkentésével a betáplált oldatban. A dolgozat szakirodalmi áttekintésében a szerző ki is tér arra, hogy kevés szabad sejtes folyamatos fermentációs kísérletről számoltak be előtte, amely alacsony szám mögött szerinte az *A. terreus* nemkívánatos hajlama áll a felületeken való megtapadásra, és azokon a túlburjánzásra.

A Kirsten Welter által ismertetett szabad micéliumos folyamatban 0,6 l/h hígítási sebesség mellett az elfolyó mindössze 0,3 g/l itakonsavat, és 68 g/l reziduális glükózt tartalmazott. Rögzített sejtes kísérletében LentiKats[®] hordozóra növesztett micéliummal dolgozott, amellyel igen kicsi, 0,05 l/h hígítási sebesség mellett 12-13 g/l itakonsav koncentrációt sikerült elérnie az elfolyóban, a glükóztartalom pedig ezzel párhuzamosan 57 g/l volt.

Rychtera és Wase (1981) a pH hatását vizsgálta az *Aspergillus terreus* NRRL 1960 folyamatos, szabad micéliumos fermentációjára. Egy 3 liter hasznos térfogatú laboratóriumi fermentort alkalmaztak a célra, amelynek alja és fedőlemeze rozsdamentes acélból készült, ezek zárták le az üveg henger két végét, megfelelő tömítéssel ellátva. A kialakítás lehetővé tette túlfolyócső alkalmazását, amely a hidrosztatikus erők kihasználásával az állandó térfogatot biztosította a folyamatos eljárás során. A tanulmány elsődleges célja a pH, mint paraméter hatásának teljeskörű feltárása volt, mind a kiindulási beállítás, mind a szabályozás esetén. Felismerték azt a jelenséget, hogy a fermentáció során a kezdeti szakaszban fellépő savasodás kulcsfontosságú a hatékony termelőképeségű sejtömeg kialakulásához, és kiemelték, hogy ez szakaszos és folyamatos üzem esetén egyaránt érvényes.

A pH hatását a folyamatos fermentációra egyetlen kísérlet során határozták meg. A kísérlet érdekessége, hogy adott pH-ra szabályozásnál, miután elérték az állandósult állapotot ('steady state'), a mérések elvégzése után a fermentlevet leeresztették, és a készüléket kitisztították, újra sterilizálták. Erre azért volt szükség, mert a készülék belsejében minden felületen intenzíven nőtt a gomba. A tisztítás után visszatöltötték az aseptikusan kivett fermentlét, és következett a pH-sor következő értéke, amely esetén ismét megvárták az állandósult állapotot. Összesen hét különböző pH-értéken végezték el a mérést (2,0-3,5 tartományt felölelően), ezért az egy láncként lefolytatott kísérlet 900 órán át, azaz több, mint 37 napig tartott. A titer szempontjából legjobbnak a pH=3,1 értékre szabályozást találták, ahol 7,8 g/l itakonsav koncentráció állt be az állandósult állapotban.

1.2.1 táblázat: Folyamatos üzemeltetésű itakonsav fermentációk a szakirodalomban

Technológia	Termelő törzs	V_{ferm} [ml]	D [1/h]	u [ml/h]	Citakonsav [g/l]	Forrás
szabad micélium	A.t. NRRL1960 (DSM826)	3000	0,04	120*	7,8***	(Rychtera & Wase, 1981)
poli-akrilamid gélbe zárt micélium	A.t. G-026	100	0,04	4*	15**	(Horitsu et al., 1983)
Celite R-626-ra növesztett sejtömeg	A.t. NRRL1960 (DSM826)	14	0,111	1,56*	11	(Kautola et al., 1985)
forgó tányéron felnövesztett sejtömeg	A.t. NRRL1960 (DSM826)	3600	0,017	60	18,2	(Ju & Wang, 1986)
szabad micélium	A.t. NRRL1963	1800	0,06	108*	0,3	(Welter, 2000)
szabad micélium	A.t. NRRL1963	1800	0,1	180*	0,15	(Welter, 2000)

*számított értékek a fermentációs létérfogat és a hígítási sebesség ismeretében.

**számított érték maximális produktivitás mellett

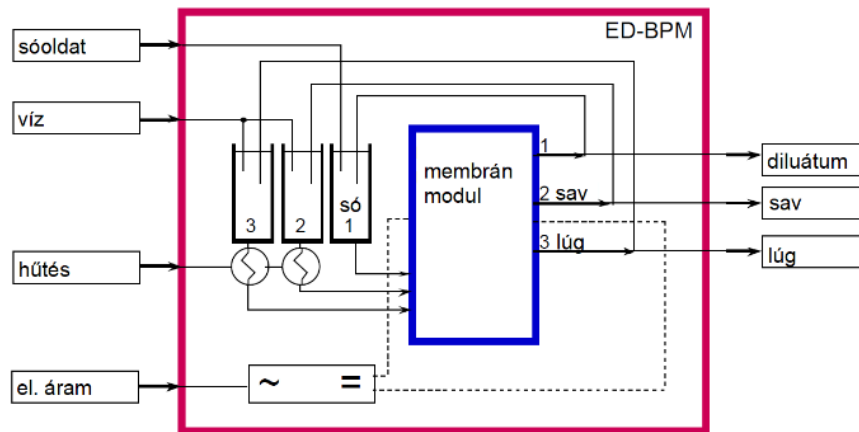
***pH=3,1 szabályozás esetén

A folyamatos fermentációs kísérletek néhány paramétere az 1.2.1 táblázatban található összefoglalva. Az óránként nyerhető elfolyó lé mennyisége a különböző hígítási sebességek mellett elméletileg a fermentációs térfogat (V_{ferm}), tehát a folyamat edényzetének méretezésével egységesíthető. Ebből a léből történik a későbbiekben a termékkinyerés, ezért a legfontosabb paraméternek a termék koncentrációját határoztam meg az elfolyó lében. A feldolgozási műveletek hatékonyságának növelése érdekében ez a paraméter maximalizálandó. Az elfolyóban maradó hasznos tápanyagokat nem kell veszteségnek tekinteni, ha rendelkezésre áll a termékkinyerésre egy megfelelő bipoláris elektrodiálizátor.

1.2.5 Bipoláris elektrodiálízis – a „fermentációbarát” kinyerési technika

A vegyiparban és a fermentációs iparban bipoláris membrán elektrodiálízist (ED-BPM) alkalmaznak savak és lúgok előállítására, a megfelelő sók oldatából. A kémiai eljárásokból származó ipari szennyvizek szervesetlen só tartalmából a sav és lúg előállítása előnyösen elvégezhető egy lépésben a tisztítással. Az eljárás sematikus elrendezését mutatja az 1.2.4 ábra.

Az ED-BPM általában szakaszos művelet, azaz adott mennyiségű sóoldatot addig recirkuláltatnak a membrán modulon, amíg eléri a kívánt eredményt. Ez teszi szükségessé a hűtőberendezés alkalmazását, ugyanis az ionmozgás a modulban hőt fejleszt.



1.2.4 ábra: Bipoláris elektrodiálízis sematikus elrendezése

Technológiai újdonságot a bipoláris membránnal felszerelt membrán modul jelent. Az elrendezés a konvencionális elektrodiálízishez hasonlóan – ahol csak kation- és anion-cserélő membránok váltakoznak egymással – lapmembrános. A sorban elrendezett membránok ismétlődő egységekben követik egymást, egy elektródpár közé 50-100 egység helyezhető (Strathmann et al., 2013). A membránoknak formatartónak és mechanikailag ellenállónak kell lenniük. A sík membránok között olyan távtartókat alkalmaznak, amelyek a cirkuláltatott folyadék útjában akadályokat képeznek, örvénylő mozgásra kényszerítik azt. Ezzel csökkenthető a koncentráció polarizációs és eltömődési folyamatok káros hatása (Probstein et al., 1972). Az elektródok körül jellemzően egy külön elektrolit oldat áramlik, amelyet megfelelő ioncserélő membránok választanak el a műveletre specializált membránsorozattól.

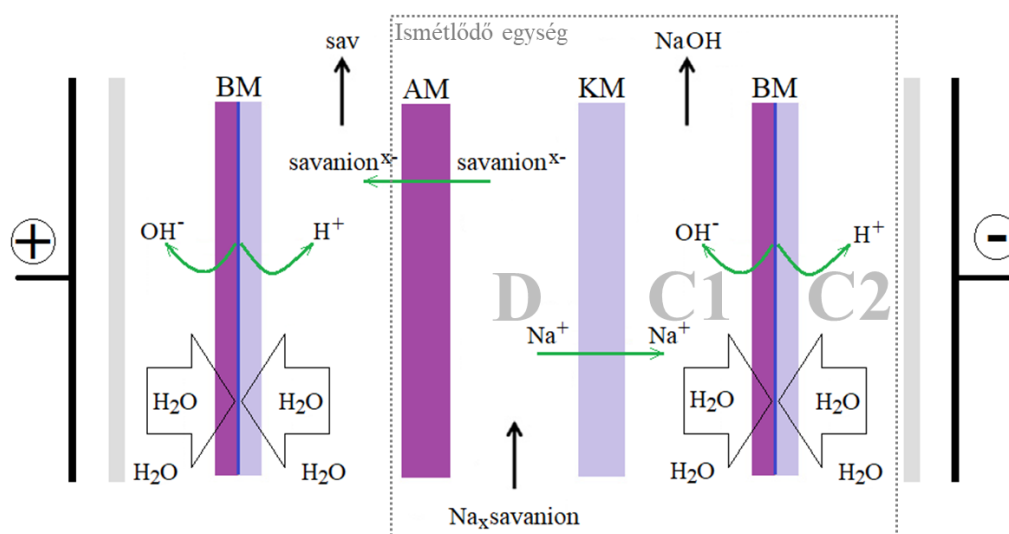
Aszerint, hogy milyen membránok alkotják az ismétlődő egységet, háromféle elrendezést különböztethetünk meg:

1. kation-cserélő és bipoláris membránok (BPM) – két kompartmentes, a kation (jellemzően nátrium) szelektíven átjut a sóoldatból a másik folyadékfázisba, ahol a hidroxid ionokkal „társulva” lúgoldatot nyerünk, míg az eredeti sóoldat savasodik a BPM-ből kiáramló hidrogénionok miatt;
2. anion-cserélő és BPM – szintén két kompartmentes elrendezés, azonban ez esetben az anion jut át a sóoldatból a másik oldatba, amely savasodik a művelet során;

3. anion-cserélő, kation-cserélő és BPM – három kompartmentes elrendezés, a kiindulási sóoldat hígul (diluátum), míg a két szomszédos kompartmentben sav illetve lúg képződik.

Az elrendezések közül a harmadikat szemlélteti az 1.2.5 ábra. A BPM két oldalán az eljárás végén egy erősen savas és egy erősen lúgos oldat lesz, ami kémiai jelentősen igénybe veszi a membránt.

A három kompartmentes elrendezés jól integrálható szerves savak előállítását célzó fermentációs rendszerekbe. A fermentációk fontos paramétere a pH, amelynek szabályozására a savtermeléssel járó folyamatokban valamilyen lúg oldatát használják. Az ED-BPM-ből visszanyerhető, és újra felhasználható a lúg, miközben a terméket is egy tisztított oldatban szeparáljuk. A hagyományos csapadékképzéses kinyerési módszerek nagy mennyiségű szervesen oldható só – általában gipsz – melléktermék képződésével járnak, gyakran a kívánt savhoz hasonló volumenben. Ezzel szemben az ED-BPM-hez nem szükséges segédanyagokat alkalmazni, és így melléktermék sem képződik.



1.2.5 ábra: Három kompartmentes ED-BPM felépítése (szaggatott vonallal bekeretezve az ismétlődő egység)

A bipoláris membrán (BM) funkciója az egyszerű ioncserélő membránokkal szemben nem a szelektív iontranszport, ideális esetben ugyanis ezen a membránon keresztül nem cserélődnek ionok a szomszédos oldatokban. A két ellentétes töltésű laminált réteg között található egy 4-5 μm vastagságú katalitikus átmeneti zóna, ahol a gélszerű kation- illetve anion-cserélő rétegen keresztül diffúzióval bejutó víz van.

A bipoláris membránt „záró irányban” kell elhelyezni az elektromos erőterben, tehát a kation-cserélő réteg, amelyen negatív töltések lokalizáltak, a szintén negatív töltésű katód felé néz, míg a pozitív töltéseket tartalmazó anion-cserélő réteg a pozitív töltésű anód felé. Egyenáram hatására elektrokatalitikus vízdiszociáció lép fel, ami a membránban kialakuló koncentrációprofilokkal magyarázható. A kapcsolt feszültség miatt a két ioncserélő rétegből az ellenionok az elektródok felé, az érintkező folyadék fázisba vándorolnak. A töltéskiegyenlítés kényszere miatt a két réteg közötti határfelületen a víz diszociációs egyensúlya az ionképződés irányába tolódik el, a hidroxid- és oxónium-ionok pedig szintén a megfelelő elektród irányába mozognak. A víz a bipoláris membránt határoló vizes oldatokból diffúzióval pótlódik a katalitikus rétegben. Az energiát a folyamathoz az elektromos erőter szolgáltatja (Wilhelm, 2001).

A membrán rétegek ionszeparációs jellemzőjére azért van szükség, hogy a membránban fixált funkciós csoportokkal azonos töltésű ionok ne ériék el a reaktív bipoláris érintkezési zónát, valamint hogy lehetővé tegyék a termelődő ellenionok kijutását a membránból. A gyakorlatban egy minimális szivárgás mindig fellép, amely folyamatnak termodinamikai okai vannak, ezért teljesen nem szüntethető meg, csak minimalizálható.

A folyamatos üzemű fermentáció és a bipoláris elektrodialízis összekapcsolásával olyan újszerű, integrált rendszer valósítható meg, ahol a kinyerési eljárás in situ megoldható, s amely – várhatóan – jobb anyag- és energiamérleget eredményez az itakonsav előállítás során.

2 KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Alkalmazott mikroorganizmusok

Kutatásom során az *Aspergillus terreus* törzs itakonsav termelésének vizsgálatához a DSM826 (NRRL1960) letéti számú szubszpeciest választottam alanyként. Ennek a törzsnek nagyon sok tanulmányban vizsgálták az itakonsav termelését, és az első olyan izolátum, amely már ipari jelentőségű termelőnek bizonyult. A legnagyobb itakonsav végtiter, amelyet ezzel a törzssel szakaszos rendszerben elértek 110 g/l volt (Karaffa et al., 2015), 12 napos futási idő mellett, pH szabályozás nélkül.

A szakirodalom még egy másik, kutatási célra elérhető hatékony itakonsav-termelő szubszpeciest említ, a DSM23081 altörzset. Ez a törzs 160 g/l itakonsavat termelt 7 nap alatt speciális, glükóz rátáplálásos fermentációs technika alkalmazása mellett, időzített pH-kontroll mellett (Krull, Hevekerl, et al., 2017). Ezt a szubszpeciest összehasonlító vizsgálatokban használtam, itakonsav termelésre szakaszos, rázott lombikos fermentációban, illetve a fehér fény bizonyos hatásainak tanulmányozása során.

A különböző kísérletek értékelésénél minden esetben feltüntettem, hogy melyik altörzsre vonatkoznak a megállapításaim.

2.2 Felhasznált vegyszerek

A mikroorganizmusok fenntartásához, az inokulum és a fermentációs tápoldatok előkészítéséhez, a mintavételekhez, illetve a minták elemzéséhez felhasznált anyagokat az 2.2.1 táblázat tartalmazza.

2.2.1 táblázat: Felhasznált anyagok és vegyszerek

Név	Gyártó	Minőség
agar	N/A	bakteriológiai
bidesztillált víz	a laboratóriumban került előállításra	vezetőképessége 1,2 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$
burgonya-glükóz agar	Fluka Analytical	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Reanal	a.r.
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Hungrana Kft.	élelmiszeripari
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (standard)	Sigma-Aldrich	a.r.
$\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Reanal	a.r.
desztillált víz	a laboratóriumban került előállításra	vezetőképessége <5 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$

Név	Gyártó	Minőség
di-Na-EDTA	Reanal	a.r.
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	Reanal	a.r.
Foamsol (habzásgátló)	AB Vickers	-
H ₂ SO ₄	Merck	95%
ítakonsav (standard)	Sigma-Aldrich	a.r.
KH ₂ PO ₄	Biolab	a.r.
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Merck	a.r.
metanol	VWR	HPLC gradient grade
NaCl	VWR	a.r.
Neomagnol	gyógyszertári	-
NH ₄ NO ₃	Reanal	a.r.
Tween-80	Reanal	a.r.
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	Scharlau	a.r.

A fermentáció során alkalmazott *Aspergillus terreus* törzseket ferde agaros tenyészeteken tartottam fenn. A szilárd tápközeg összetétele az 2.2.2 táblázatban található.

2.2.2 táblázat: Törzsfenntartási burgonya-glükóz táptalaj összetétele

Komponens	Koncentráció [g/l]
Agar	5,0
Glükóz	10
NaCl	20
Burgonya-glükóz agar	40

A ferde agaros tenyészetekről kiindulva készítettem el az inokulumként használt konidiospóra szuszpenziót. A rázott lombikos kísérletekhez közvetlenül a ferde agarról nyert spóraszuszpenziót használtam, a lombikok számától függően 4-6 kémcsöves tenyészet felhasználásával. A lemosott spóraszuszpenziókat felhasználás előtt egyesítettem, intenzíven elkevertem.

A keverős, kezelőpaneles bioreaktorokban végzett kísérletekhez szükséges nagy mennyiségű spóraszuszpenziót 185 cm² felületű, Roux-típusú tenyésztőedényben állítottam elő. A törzsfenntartási, illetve a konidiospóra előállítását célzó tenyészeteket inkubátorban, 33 °C-on, 5-7 napig növesztettem.

A konidiospórákat 0,01 % Tween-80 felületaktív anyagot tartalmazó fiziológiás sóoldattal szuszpendáltam fel az agarfelületről, ezt használtam a szubmerz kísérletek során oltóanyagként. A konidiospóra a gomba egysejtes megjelenési formája, ezért Bürker-

kamrával jól számolható. Szélesztéses technikával az élőcsíraszám is meghatározható a szuszpenzióban, szemben a fonalas megjelenési formával, ahol sejtszám nem definiálható.

A fény, mint technológiai paraméter vizsgálatánál szilárd tápoldaton vizsgáltam a spóráképzésre gyakorolt hatást. A burgonya-glükóz táptalaj mellett, amely komplex összetevőt is tartalmaz, szintetikus, jól definiált összetételű Czapek-Dox tápagart is alkalmaztam (2.2.3 táblázat).

2.2.3 táblázat: Czapek-Dox szintetikus táptalaj összetétele

Komponens	Koncentráció [g/l]
Agar	15,0
Szacharóz	30
NaNO ₃	3
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01

A fermentáció során a mikroba számára az itakonsav megfelelő termeléséhez a fenntartó táptalajtól eltérő összetételű fermentációs tápközegre van szükség. A megfelelő, optimális tápoldat-összetétel a törzsre vonatkozó szakirodalomból származik, összetétele a 2.2.4 táblázatban látható (Kuenz et al., 2012).

2.2.4 táblázat: A fermentációs tápközeg összetétele

Komponens	Koncentráció [g/l]
Glükóz	120,0-150,0
NH ₄ NO ₃	3,0
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5,0
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	1,67 · 10 ⁻³
CuSO ₄ · 7 H ₂ O	0,015
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,008

A félfolyamatos és a folyamatos fermentációk során a rátáplált friss médium összetételét a 2.2.5 táblázatban tüntettem fel.

2.2.5 táblázat: A rátápláló oldat összetétele

Komponens	Koncentráció [g/l]
Glükóz	100,0 – 1. félfolyamatos ferm.
	változó – 2. félfolyamatos ferm.
	206,25 – folyamatos ferm.
NH ₄ NO ₃	2,25
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5,0
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0 – félfolyamatos ferm.
	0,008 – folyamatos ferm.

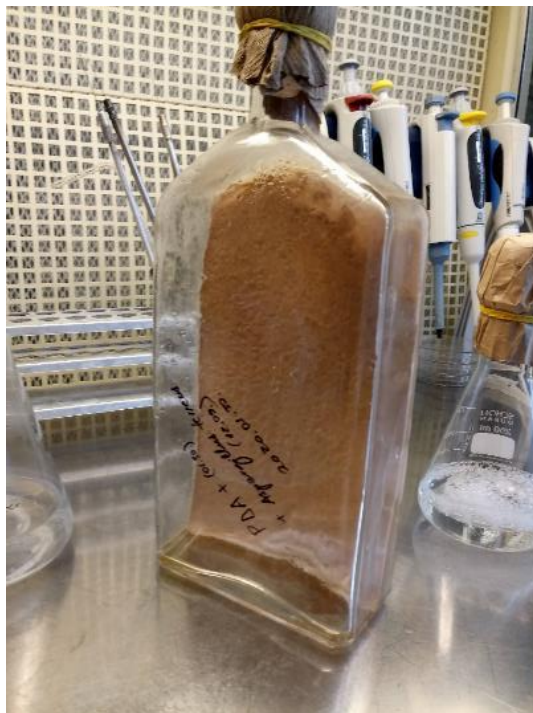
2.3 Fermentációs eljárások

2.3.1 Szilárd fázisú fermentáció – oltóanyag előállítása, spóráképzési tesztek

A szubmerz fermentációk beoltására minden esetben konidiospóra szuszpenziót használtam. Ennek az oltóanyagnak nagy előnye, hogy a gomba egysejtes formában van jelen, ezért minősíthető a spórázó tenyészet kora, valamint a spóra koncentráció [db/ml] adatokkal. A szilárd fázisú tenyésztéshez burgonya-glükóz agart használtam (Fluka gyártmányt), mert a spóráképződés ezen intenzívebb, mint például a Czapek-Dox tápközegen, amely a szénforráson és az agaron kívül kizárólag szervesen sókat tartalmaz.

Az oltóanyag elkészítése során szempont volt, hogy minél nagyobb töménységű szuszpenziót tudjak előállítani, mivel a lemosáshoz használt Tween-80 tartalmú fiziológiás sóoldat hígítja a termeltetési médiumot.

A tenyésztést kémcsöves ferde agaros tenyészetben és Roux edényben végeztem. Utóbbi igen nagy – 185 cm²-es agarfelületet biztosít, miközben a szűk, papírvattával védett nyakon keresztül a steril felszuszpendálás és spóraszuszpenzió átöntés lényegesen biztonságosabb, mint például egy hasonló felületű Petri-csésze esetén (2.3.1 ábra).



2.3.1 ábra: Roux edény benne a spórázás tenyészettel

A fény spóráképzésre gyakorolt hatásának vizsgálata során 6 helyes microplate-eket használtam a konstans tápközeg-felületű párhuzamos mérések elvégzéséhez. Az egyes helyeket homogén spóraszuszpenzió 100-100 µl-ével oltottam le, majd egyhetes tenyésztés után 10-10 ml fiziológiás sóoldattal mostam le a képződött konidiospórákat. Ezekből a spóraszuszpenziókból megfelelő hígítás után Bürker-kamrával meghatároztam a milliliterenkénti spóraszámot, amelyet visszaszámoltam egységnyi felületre eső konidiospóra számra.

2.3.2 Félfolyamatos fermentációs eljárás

A félfolyamatos fermentációs kísérleteket Sartorius Stedim BIOSTAT® Bplus bioreaktor rendszerben végeztem. Az üvegből készült keverős reaktorban maximum 2 liter fermentlé kezelésére van lehetőség, azonban a gombafermentáció jelentős habzással jár – amint azt a későbbiekben bemutatom, így 1,5 liter munkatérfogat mellett működtettem. A fermentor saválló acélból készült fedelén helyezkedik el sterilen működtethető tengelykapcsolással a keverőtengely, amelyre 2 db 6 lapátos Rushton turbinakeverőt szereltem. A levegőbevezetés a keverő alá nyúló ívesen meghajtott saválló acél csövön keresztül megoldott, a buborékok aprítását és a tengelyre merőleges irányú keveredését a Rushton turbinakeverő jellemző keverési profilja biztosította.



2.3.2 ábra: Biostat fermentor

A fermentor termosztáló köpenytérrel, pH-elektróddal, oldott oxigénmérő elektróddal, elmenő levegő hűtővel szerelt, általános célú bioreaktor (2.3.2 ábra).

A félfolyamatos működtetést a tenyészet késő exponenciális fejlődési szakaszában indítottam el. A fermentáció során ebben a szakaszban, jellemzően a 4. – 5. nap körül mérhető a maximális itakonsav produktivitás (Komáromy et al., 2019). A kivétel-rátáplálás ciklusokat 24 óránként ismételttem.

A fermentációk 33 °C-on zajlottak, a pH-szabályozást a 48. órában indítottam el, miután a tenyészet pH-ja 2 alá süllyedt. A szakirodalom alapján előnyös a pH visszaesését megvárni, majd ezután pH-szabályozást alkalmazni. Esetemben a pH-t 3-ra szabályoztam 10 %-os (m/m) NaOH-oldattal.

Kétféle félfolyamatos kísérlet eredményeit ismertetem részletesen, amelyek között jelentős eltérés volt a glükóz rátáplálás stratégiájában. Az első kísérletben állandó glükóz tartalmú tápoldattal töltöttem vissza a megcsapolt fermentlét, míg a másodikban a rátáplálás a glükóz koncentrációját oly módon változtattam, hogy visszaállítsam a teljes fermentlében a 120 g/l-t. A szakirodalom szerint 120 g/l-ig emelve a glükóz koncentrációját szignifikánsan pozitív a termékhozamra gyakorolt hatása, e fölött pedig – 200 g/l-ig – már nem befolyásolja (Karaffa et al., 2015).

A 12 napig tartó első típusú félfolyamatos fermentáció esetén a szakaszos felfutási idő 5. napján indult a félfolyamatos működtetési szakasz. Hét elvétel/rátáplálási ciklust végeztem el, amelyből az első 5 esetben mindössze 100-100 ml (6,7%) tápoldatot cseréltem, majd az utolsó 2 esetben 200 ml-t (13,4%).

A második félfolyamatos fermentáció 10 napig tartott, a 4. napon indult a félfolyamatos üzemmód. Hat elvét/rátáplálási ciklust végeztem, minden esetben 200-200 ml (13,4%) tápoldatsere történt.

2.3.3 Folyamatos fermentációs eljárás

A folyamatos fermentáció kivitelezésére alkalmazott berendezés egy LAMBDA MINIFOR laboratóriumi fermentor volt, amely 1-3 liter hasznos térfogatú üvegedénnyel rendelkezik. A fermentáció nyomon követésére szolgáló tartozékai egy hőmérséklet mérő szondával kombinált pH üvegelektrod, illetve egy oxigén elektród. A fermentor fűthető

infravörös besugárzással, hűtésre nincs lehetőség. A csatlakoztatható csonkokon keresztül megoldható a pH szabályozása, a mintavétel, illetve habzsgátló adagolása. A fermentorban a levegőztetés levegő bevezető- illetve elvezető- csonkkal biztosítható. (2.3.3 ábra)



2.3.3 ábra: LAMBDA MINIFOR laboratóriumi fermentor

A fermentor keverése axiális irányú, a megfelelő kevertetési feltételek eléréséhez a motor a tengelyt egy mágneses áttételen keresztül adott Hz-en föl-le mozgatja. A tengelyen három, egymástól 3 cm-re rögzített szilikon tányér végzi a keverést. A hajlékony szilikon tányérok nem keltenek erős nyíróerőket a környezetükben a „halfarok”-szerű mozgásuk következtében, ezáltal nyírásra érzékeny mikroorganizmusok esetén kiválóan alkalmazható. A függőleges tengely alján, a legalsó szilikon tányértól 3 cm-re található egy állítható buborékelosztó, amellyel szabályozható a bevezetett levegő porlasztása.

Ez a készülék rendkívül sokoldalú, speciális keverési megoldása révén alkalmas akár nagy sűrűségű tenyészetek fermentálására is. Felépítése alkalmas a folyamatos módban való alkalmazásra. Az oxigénátadási viszonyairól kevés információval rendelkezem, ám a speciális keverés, és a bevezetett gáz diszpergálás korlátai miatt kisebb hatékonyságot vártam, mint a Biostat reaktor esetén.

A fermentor 1,8 liter itakonsav termelésre optimalizált tápoldatot tartalmazott az indításnál. Az oltáshoz 100 ml Roux edényről (185 cm² agarfelület) nyert spórasuszpenziót használtam.

A fermentáció során nem alkalmaztam pH szabályozást, Hevekerl munkája (2014b) alapján. Ebben olyan eredményeket közöl, melyek alapján a pH szabályozás nélküli esetben az első hét napban a fermentáció felfutása pH stratégiától független, ha a kiindulási pH értéke 3 vagy afölötti. A fermentációs tenyésztőközeg kiindulási pH-ját sterilizálás előtt pH = 3-ra állítottam, majd nem szabályoztam a folyamat során. Az alacsony pH jelentős előnye, hogy elkerülhető volt általa a befertőződés az egész fermentációs folyamat során, annak ellenére is, hogy a felmerülő problémák miatt kihívást jelentett a beavatkozások teljeskörű sterilitásának biztosítása. Ilyen nehézség például a habzás, a betáplavezeték eltömődése, a steril levegőszűrő eltömődés miatti cseréjének szükségessége.

A folyamatos működtetés során 12 ml/óra sebességgel történt a fermentlé kivétele egy csővezetéken keresztül, mely az edényzet legalsó pontjára nyúlt le. Ugyanilyen sebességgel tápláltam be a steril rátáp oldatot, egy felülről bevezetett csonkon, amely 5 cm-re helyezkedett el a kevertetett-levegőztetett folyadék felszínétől. Az alkalmazott hígítási sebességet a félfolyamatos kísérletek alapján választottam meg. A rátáplált oldat glükóztartalma végig állandó volt, mivel folyamatosan nem igazíthattam egyszerűen a készülékben fennálló cukor-koncentrációhoz. A betáplált oldat olyan tömény cukortartalommal bírt (200 g/l feletti), amely alapvetően bakteriális fertőzésre nem érzékeny a nagy ozmózisnyomás miatt. Ez a magas cukortartalom elegendőnek bizonyult, hogy a készülékben is magas cukorkoncentrációt tartsak fenn.

A fermentorhoz Masterflex L/S Easy-Load II. típusú precíziós pumpát kapcsoltam a pontos adagolás biztosításához, ami fontos feltétel a folytonos fermentációk kivitelezése során. Általános laboratóriumi perisztaltikus pumpával nem kivitelezhető a nagyon lassú adagolás olyan mértékű pontossággal, amely a kísérlet során elvárt volt. A kétutas pumpa egyidejűleg végezte az elvételt és a rátáplálást. Mintákat a 24 óra alatt összegyűlő elvételből, és a készülékből közvetlenül vettem.

Az indulásnál az oxigénellátást sterilre szűrt sűrített levegő bevezetésével biztosítottam – 1,5 VVM mennyiségben. Ezt egy hét futás után tiszta oxigén gázra cseréltem - 0,3 VVM adagolással, mivel a készülékben az oxigén beoldódásának sebessége nem volt elegendő az itakonsav termelés beindulásához. Megállapítottam, hogy oxigénlimitált körülmények között az itakonsav képződése teljesen gátolt volt, miközben a pH lecsökkent 1,9 értékre és stagnált ez idő alatt is. Egyúttal megjegyezném azt is, hogy annak feltételezése egyes tankönyvekben, hogy az itakonsav révén savanyítja az *Aspergillus terreus* a

környezetét, nem helytálló. A környezet savasodása inkább a biomasszába beépülő ammónium-ionokról leválasztott, majd szekretált protonoknak tulajdonítható (Kuenz & Krull, 2018).

A tiszta oxigén nem bizonyult toxikusnak, a mikroba jól fejlődött, és az itakonsav képződése is beindult a változtatás hatására.

A kevertetés 3 Hz sebességgel történt, és a hőmérsékletet 33 °C-on tartottam, amely a 22 °C-os laboratóriumi szobahőmérséklet mellett stabilan tarthatónak bizonyult.

2.3.4 Rázott lombikos fermentációk

A rázott lombikos fermentációkat tiszta papírvattából készült dugóval ellátott Erlenmeyer lombikokban végeztem. Ezeket a mikroorganizmus nagy oxigénigénye miatt csak a névleges térfogat 1/5-éig töltöttem tápoldattal. A kis folyadék rétegvastagság és a keverés közben kialakuló nagy gáz/folyadék határfelület biztosította a megfelelő oxigénellátást.

A tápoldat elkészítésénél az ásványi sókat a végtérfogat 80%-ában oldottam fel. Mérőlombikban készítettem el a sóoldatot. A sók oldási sorrendjének helyes megválasztásával elkerülhető a csapadékképződés. A lombikot desztillált vízzel feltöltöttem $\frac{3}{4}$ -ig, majd a sókat a következő sorrendben oldottam bele: ammónium-nitrát, kalcium-klorid, magnézium-szulfát, nyomelemek törzsoldatból, majd az utolsó lépésben a kálium-dihidrogén-foszfát, ezt követően jelig töltöttem, és homogenizáltam. A sóoldat pH-ját 10%-os (m/m) kénsavval 3,0-ra állítottam. A glükózoldatból a végtérfogat 20%-a tartalmazta az adott lombikhoz szükséges adagot.

Azokban a kísérletekben, amelyeknél a tápoldatnak eleve tartalmaznia kellett itakonsavat, a tápoldat térfogatot három részre bontottam. Ebben az esetben a sóoldatot olyan töménységben készítettem el, hogy végtérfogat 60%-a tartalmazza a szükséges mennyiségeket, és ebben az esetben is jelre töltés előtt kénsavval 3,0-ra állítottam a pH-értéket. A glükóz törzsoldatból a végtérfogat 20%-ának megfelelő mennyiségre volt szükség ezekben az esetekben is. Az itakonsavat nagy töménységű oldatból mértem ki, olyan módon, hogy a legtöményebbnek szánt 30 g/l beállítás esetén is legyen még annyi mozgástér, hogy a pH-t ammónium-hidroxid oldattal 3,0-ra állítsam, jelre töltés előtt. Ebben az esetben az

ammónium-hidroxid alkalmazásával a különböző itakonsav tartalmú lombikokba nem vittem be új kémiai anyagot (ahogyan az nátrium-hidroxid alkalmazásával megtörtént volna), hanem csak az ammónium tartalom változott valamelyest bennünk. Az ammónium az alkalmazott (foszfát-limitre) optimalizált tápoldatban nem limitáló szubsztrát. A sóoldatból és az itakonsav oldatból elkészítettem azokat az tápoldatokat, melyek minden komponenst (tehát már az itakonsavat is, ha szükséges volt) a kívánt mennyiségben tartalmazta, és a végtérfogat 80%-ának megfelelő mennyiségben a 100%-hoz szükséges mennyiségeket oldottam fel. Minden esetben mérőlombikokban dolgoztam, a koncentrációadatok alapján számítva az adott mérőlombik térfogatába szükséges mennyiségeket.

A fermentációhoz használt lombikokba sterilizálás után, lamináris fülke alatt mértem össze a végleges tápoldatot.

Oltáshoz minden méréssorozatnál spóraszuszpenziót készítettem, az igényelt mennyiség szerint ferde agaros tenyészetekről vagy Roux-edényről lemosva a spórákat. Az agarról steril, zárható edénybe öntöttem a spóraszuszpenziót, amelyet intenzív rázással homogenizáltam, majd steril pipettával azonos mennyiségeket mértem a méréssor lombikjaiba. A spóraszuszpenzió spóraszámát Bürker-kamrás vagy tenyésztéses telepszámlálással határoztam meg.

A fermentációs lombikokat 33 °C-on, 200 rpm rázási fordulatszám mellett inkubáltam egy B.Braun gyártmányú plexi házas inkubált rázógépen. A fermentációs idő 7-9 nap volt.

A lombikokból menetközben nem vettem mintát, csak a leállításkor. Az összehasonlító kísérlet sorozatban több párhuzamos lombikot indítottam, hogy az egyes mérési pontokon levehető legyen 3-3 minta.

A kiindulási spóraszám hatását 3x5 rázott lombikos kísérlettel vizsgáltam, 5 különböző spórakoncentráció beállításával, beállításonként három párhuzamos lombikkal. A spóraszuszpenziót ennél a kísérletnél magával a tápoldattal készítettem, hígítottam, hogy az egyes beállítások között valóban csak a kívánt paraméterben legyen eltérés. A lombikokat steril mintáztam a 144. és a 216. órában.

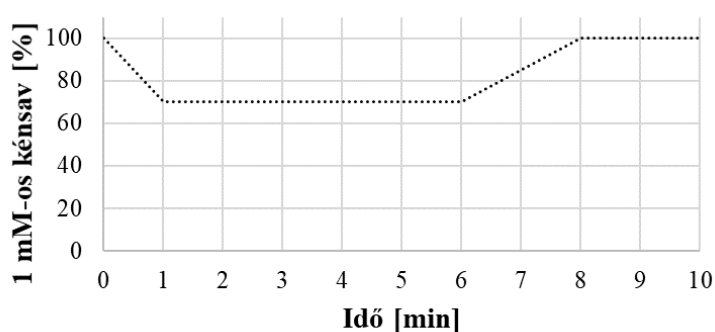
2.4 Mérés módszerek

2.4.1 Itakonsav mennyiségi meghatározása

Az itakonsav koncentrációját nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával mértem. Az eljáráshoz Hamilton PRP-X300 (ID: 4,1 mm, L: 150 mm, részecskeméret: 7 μm) típusú ioncsere kromatográfias oszlopot alkalmaztam YL9100 HPLC rendszerrel kapcsolatban. A kromatográfias csúcs minőségi azonosítására a standarddal mért retenciós időt, mennyiségi meghatározásra az ismert koncentrációjú standard oldat sorozattal felvett csúcs alatti területekre vonatkoztatott kalibrációt használtam. A jel-koncentráció összefüggés 0-0,5 mM koncentráció tartományban lineáris.

A fermentlé mintákat 0,20 μm pórusátmérőjű nylon fecskendőszűrőn sejtmentesre szűrtem, majd 1 mM-os kénsavval 500-szoros vagy 1000-szeres hígítást készítettem. A nagy hígítás egyrészt szolgálta a lineáris tartományban való munkát, másrészt az oszlop védelmét a kétszeresen pozitív kationoktól (Ca^{2+} és Mg^{2+}), melyek az itakonsav termelésre optimalizált tápoldatban nagy koncentrációban vannak jelen. Az injektálási térfogat 100 μl volt.

A meghatározáshoz gradiens módszert alkalmaztam (2.4.1 ábra), melyben az eluens 1 mM-os kénsavból és HPLC gradiens minőségű metanolból állt össze. A metanol adagolása biztosította, hogy a fermentlében esetleg jelen levő apolárisabb komponensek is biztosan elhagyják az oszlopot.



2.4.1 ábra: HPLC gradiens program itakonsav meghatározásához

Az itakonsav retenciós ideje 3,5 perc, és a detektálást UV 210 nm-en végeztem.

2.4.2 Glükóz mennyiségi meghatározása

A fermentléből vett minták glükóz tartalmát DNS-módszerrel (di-nitro-szalicilsav reagens), illetve HPLC-vel határoztam meg.

A DNS-módszer egy egyszerű, fotometriás meghatározás, amely a redukáló cukrok mérésére alkalmas. A kísérleteim során kizárólag glükóz szénforrást alkalmaztam, így a kalibrációhoz is glükóz törzsoldatot készítettem. A kalibrációs egyenes egyenletét 4 pont felvételével határoztam meg (2.4.1 táblázat).

2.4.1 táblázat: Mérési sor készítése

Komponensek	Kalibráló oldatok				Minta
	Vak	0,33 g/l	0,66 g/l	1 g/l	? g/l
Desztillált víz [ml]	3	2	1	0	0
DNS törzsoldat [ml]	3	3	3	3	3
Glükóz törzsoldat [ml]	0	1	2	3	0
Hígított minta [ml]	0	0	0	0	3
Kálium-nátrium-tartarát oldat [ml]	1	1	1	1	1

A meghatározandó mintákból olyan hígítást kell készíteni, amely várhatóan a kalibráció tartományába eső koncentrációban tartalmazza a glükózt. A reakció 90 °C-on megy végbe, 10 perc reakcióidővel. Mivel az alkalmazott hőmérséklet és reakcióidő jelentősen befolyásolhatja az eredményt, minden mintasor mellett kalibrációt is végeztem.

A mintákat folyó víz alatt gyorsan lehűtöttem, majd megmértem a reakcióelegyek abszorbanciáját 575 nm-en. A standard oldatok koncentrációinak és abszorbancia értékeinek ismeretében meghatároztam a lineáris kalibrációs egyenes egyenletét, mely alapján a minták glükóztartalma számítható.

A DNS-módszer nagy hátránya, hogy 1 g/l-es glükózkoncentráció felett az eredmény teljesen értékelhetetlen, és az ismételt mérés igen időigényes. Ezért kutatásom második szakaszában HPLC módszert adaptáltam, amely az egészen alacsony, 0,01 g/l glükózkoncentrációtól 10 g/l-ig lineáris koncentráció-jel függvényt ad.

A glükóz meghatározására BioRad Aminex HPX-87H (ID: 7,8 mm, L: 300 mm, részecskeméret: 9 µm) kromatográfiás oszlopot használtam YL9100 HPLC rendszerrel kapcsolva. A módszer izokratikus, eluensként 5 mM-os kénsav oldatot alkalmaztam. A

kolonnát 50 °C-on termosztáltam, az eluens áramlási sebessége 0,6 ml/perc volt. Az injektálási térfogat 20 µl volt. A glükóz meghatározásához a jelet refrakciós index detektor szolgáltatotta ($t_{R, \text{glükóz}} = 8,40$ perc), amely előtt UV-Vis detektoron is átmegy az eluátum. Ennek jelentősége, hogy egy biológiai eljárásból származó mintából, amelynek a fermentlevek is, mérhetőek a cukrokon kívül, például az alkoholok, szerves savak és más metabolitok is, amelyek ezen az oszlopon elválnak. Az itakonsav is mérhető lenne, azonban a glükóz méréséhez alkalmazott kisebb hígítási fok miatt az itakonsav UV_{210nm} jele már a lineáris tartományon kívül esik, ezért ezt az adatot végig a kutatásom során az előzőekben már ismertetett HPLC módszerrel, illetve berendezéssel határoztam meg.

2.4.3 Száraz sejttömeg mérése

A száraz micélium koncentráció (DMW = dry mycelial weight) meghatározása lehetséges a minta ismert térfogatának centrifugálásával, a leülepedő sejtek mosását és ismételt centrifugálását követő szárítással. A felhasznált térfogatból és a kinyert száraz biomassa tömegéből kiszámítható a száraz biomassa koncentráció. Azonban az eljárás alkalmazhatóságának feltétele, hogy az egész rendszerre jellemző mintából dolgozzunk.

A gomba fermentációk során kialakulhatnak makroszkópikus struktúrák, pl. pelletek. Emiatt a fermentlé inhomogén, és a DMW pontos meghatározásához igen nagy mennyiségű mintára van szükség. A lombikos mérések esetén kiküszöbölhető a probléma, ha a teljes reakciótérfogatot feldolgozzuk, és ebből számolunk.

A laboratóriumi bioreaktorokban végzett hosszú, esetenként több száz órás kísérletek folyamán nagyon korlátozott, hogy mennyi minta kivételére van lehetőség. A mintázás nem szabad, hogy befolyásolja a folyamatot magát. Az inhomogén bulk és a mintázás minimalizálásának összeegyeztethetlensége miatt bizonyos esetekben eltekinttem a szuszpendált száraz sejttömeg koncentráció meghatározásától.

2.4.4 Oxigén fogyasztás sebességének meghatározása folyamatos üzemi fermentációnál

Az oxigén fogyasztási sebességének meghatározásához leállítottam a bemenő levegőáramot és nyomon követtem, hogyan süllyed az oldott oxigén szintje, másodpercenkénti adatrögzítés mellett. Majd újra megindítottam a levegőáramot, egészen addig, amíg ismét beállt az egyensúly, azaz amikor az oxigén felhasználás mértéke megegyezik a beoldódott oxigén mennyiségével, majd ismét megszüntettem a levegőbetáplálást. Mérési időpontonként három párhuzamos eredményt kaptam így, amelyek átlagát vettem. Az adatokat $\mu\text{g O}_2/\text{L}\cdot\text{s}$ mértékegységben adtam meg. Mivel a biomassza koncentrációja egy ponton túl már nem volt követhető a készülékben, ezért egységnyi mikrotömegre fajlagosított adatokat nem sikerült meghatározni.

Aerob mikroorganizmusok tenyésztése esetén a mikroba a tápközegben oldott oxigént veszi fel és hasznosítja. Az oxigén is szubsztrátja a növekedésnek, ezért a tápoldatban az oldott oxigén koncentrációjának ugyanolyan hatása van a fajlagos növekedési sebességre, mint az egyéb tápanyagoknak. Az itakonsav termelés egyik fontos befolyásoló tényezője az oldott oxigén szintjének alakulása a fermentációban. Az optimális tartomány meghatározásához a sejttömeg fogyasztási sebességének ismerete, de még a mérésének kidolgozása is közelebb visz.

2.4.5 Mintavétel a készülékből a folyamatos fermentációs kísérlet során

Míg a félfolyamatos fermentáció esetén a napi kivétel összetétele megegyezik a készülékben aktuálisan fennállóval, figyelembe véve, hogy a keverés miatt a készülékben makroszkópikus szinten homogén körülmények vannak. Ezzel szemben a folyamatos fermentációnál a 24 óra alatt összegyűlt elvétel összetétele nem azonos a készülékben adott pillanatban mérhetővel.

A folyamatos kísérlet során a fermentálóból időnként mintát vettem steril fecskendővel egy vastag szilikon szeptumon keresztül. A minta 2 ml-t tett ki, ha az itakonsav és a glükóz koncentrációjának meghatározása volt a cél. A kísérlet első hetében, amelyben az oxigén limitálta a folyamatot, még nem alakultak ki nagyméretű aggregátumok a gombából. Ekkor

5 ml mintát vettem, amelyből a DMW koncentráció változásának trendjét is lehetőségem volt követni.

2.4.6 Mikroszkópos vizsgálatok

A kísérleteim során a mikroorganizmus fejlődését, a tenyészeim tisztaságát mikroszkóppal is vizsgáltam. A Zeiss Primo Star típusú áteső fényben vizsgáló mikroszkópot fázis kontraszt feltétellel látták el, így festési eljárás nélkül is szépen kirajzolódott a micélium hálózat. Ezerszeres nagyítás alatt képet kaptam a fonalak integritásáról, vakuólumok, spórák jelenlétéről, illetve ez alatt a nagyítás alatt már a baktériumsejtek is láthatóak, ha véletlenül befertőződött volna a tenyészet. Négy százszoros nagyítás alatt a góccok sűrűségét, tömörségét tudtam vizsgálni.

3 EREDMÉNYEK

Az itakonsav fermentációs előállításának folyamatos pályára állításához több részfolyamat beható vizsgálatára is szükség van, melyek közül az alábbiakban felsorolt problémakörökkel foglalkoztam munkám során.

Az oltóanyag minősége hatással lehet a kialakuló morfológiára, amely a szakirodalom szerint szoros kapcsolatban áll a termelékenységgel. A kezdeti körülmények emiatt nem egyszerűen egy hosszabb lag szakaszt eredményeznek, (amely a beoltás utáni adaptáció ideje, ezt követi az exponenciális növekedés fázisa), mint egy lényegesen egyszerűbb genommal és életciklussal rendelkező egysejtű baktérium alkalmazásánál. Gombák esetén a makrostruktúrák kialakulása eleve determinálhatja az egész termelési folyamatot, például a szubsztrát sejtmembránhoz történő diffúziós limitációja által. Folyamatos fermentáció esetén, amelyben a sejttömeg lassú újratermelődése várható, a felfutási szakasz szintén hosszú időre meghatározó hatással lehet. A szakirodalomban nem elérhetőek az itakonsav termelő *Aspergillus terreus*-t illetően az oltóanyag hatását illetve minősítését célzó kutatások. Vizsgáltam ezért a konidiospóra alapú oltóanyag gyors minősítésének lehetőségét, és az oltási csíraszám hatását a folyamat hozamára.

Két itakonsav túltermelő szubszpeciesz állt rendelkezésemre, amelyeket összehasonlító vizsgálatnak vettem alá rázott lombikos kísérletsorozatban. Összevettem viselkedésüket szakirodalomból adaptált optimalizált körülmények alkalmazása mellett.

A folyamatos fermentáció közelíthető félfolyamatos rendszerrel, amelyben egységugrásszerűen, rendszeres időközönként történik kivétel és visszatöltés a bioreaktorba. Itt is definiálható egy látszólagos hígítási sebesség, illetve a beavatkozási ciklusok közötti változások számszerű kiértékelése lényegesen egyszerűbb, mint a folyamatosan változó összetételű folyamatos üzem esetén (mielőtt a 'steady-state' beállna, ha elérhető egyáltalán ilyen). Elméletileg a beavatkozások gyakoriságának növelése és a térfogatcsere csökkentése végül a folyamatoshoz egyre jobban közelítő eljárást eredményez. Kétféle félfolyamatos eljárást alkalmaztam, melyek a betáplált oldat minőségében tértek el. A kísérleteimet 2 liter hasznos térfogatú, Biostat típusú laboratóriumi fermentorban végeztem.

A szakirodalomban szabad micéliumos félfolyamatos itakonsav fermentációról nincsenek feljegyzések, csak az ahhoz valamelyest hasonló teljes tápoldatcserés eljárásra. A

teljes tápoldatcsere esetén a leválasztott micéliumot áthelyezték friss tápoldatba, és ismételten inkubálták a glükóz elfogyásáig. Az ilyen jellegű kísérletek is kizárólag rázott lombikos léptékben valósultak meg. Ez az eljárás nem alkalmas a folyamatos fermentáció megalapozására, mivel olyan drasztikus a változás a mikroorganizmus környezetében, amely a folyamatos üzemű fermentáció esetén nem várható.

Megvalósítottam egy szabad micéliumos folyamatos itakonsav fermentációt, amelynek elfolyójából sor került bipoláris elektrodialízises termékkinyerésre. A kísérletben a szakirodalomban fellelhető hígítási sebességekhez képest egy nagyságrenddel kisebbet alkalmaztam, amellyel a termékkoncentráció növelhetőnek bizonyult az elfolyó oldatban. A folyamatos fermentáció fontos megfigyeléseit, és a további kutatásokat megalapozó tapasztalatait is összefoglaltam.

Az oltóanyag előállítás során nyilvánvalóvá vált, hogy az inkubáció fényviszonyai hatással vannak az *Aspergillus terreus* DSM826 telepeinek megjelenésére, és az agarba diffundáló színanyagok képződésére. Továbbá a folyamatos fermentáció során a micélium jelentős itakonsav-tartalom mellett újul meg, amelynek egyes szakirodalmi források gátló hatást tulajdonítanak. Redukált kísérleti tervet készítettem, amelyben az egyik független változó volt a kiindulási itakonsav tartalom volt, a másik pedig a fényhatás. Rázott lombikos fermentációkban vizsgáltam a beállított körülmények között kialakuló micéliumtömeg növekedési és termelési sajátosságait. A kísérleti elrendezés az itakonsav és a fehér fényvel történő megvilágítás kereszthatásának megállapítására is alkalmas volt.

A fonalas gombák reagálnak a fehér fényre, amely tény alapkutatási szinten széles körben vizsgált és igazolt. Amellett, hogy olyan folyamatokra hat a megvilágítás, mint például a konidiospórák képződése, a válaszreakció géntranszkripció, ezáltal metabolikus jellegű is lehet. Az itakonsav túltermelő *Aspergillus terreus* gomba esetén ez a környezeti paraméter nem kutatott, különösen itakonsav termelő körülmények között. Megvizsgáltam, hogy a fehér fény milyen hatást gyakorol a spóráképzésre és itakonsav termelésre.

3.1 Oltóanyag előállítása

3.1.1 Spóraszám reprodukálhatósága ferde agaros tenyészetben

A kísérletekhez vegetatív módon tartottam fenn az *Aspergillus terreus* DSM826 törzset. A kémcsőbe dermesztett PGA (burgonya-glükóz agar) tápközeget fémkacsal átvitt konidiospórával oltottam, majd egy hétig 33°C-on inkubáltam. Ez alatt az idő alatt kinőtt a fonalas forma, és a tenyészet felületén ismét konídiumok képződtek, amelyek miatt bársonyosan barna felületet nyert a kinőtt gomba (3.1.1 ábra). Az így elkészült tenyészeteket hűtőszekrényben 4 °C-on felhasználásig vagy a következő – általában 3 havonkénti – átoltásig tároltam.

A ferde agar elkészítése során minden steril 16 mm-es átmérőjű kémcsőbe 5 ml forró, még folyékony PGA tápagart pipettáztam, majd azonos dőlési szögbe állítva hagytam megszilárdulni. Az így kialakuló tápközeg felülete közel egyforma. A felületen közvetlenül elkenhető egy oltókacsnyi konidiospóra. Az oltókacsok standardizált méretű hurokkal rendelkeznek.

A rázott lombikos kísérletek oltóanyag igénye kicsi a literes és afölötti bioreaktorokéhoz képest, ezért ezekhez elegendő konidiospóra mosható le néhány kémcsőről. Igazolni akartam, hogy a képződő konidiospóra mennyisége arányos a tápközeg-levegő határfelülettel, azaz a kémcsöves tenyészeteken hasonló mennyiségben képződik spóra, amennyiben minden nevelési körülmény azonos.



3.1.1 ábra: Ferde agaros tenyészetek megjelenése PGA agaron

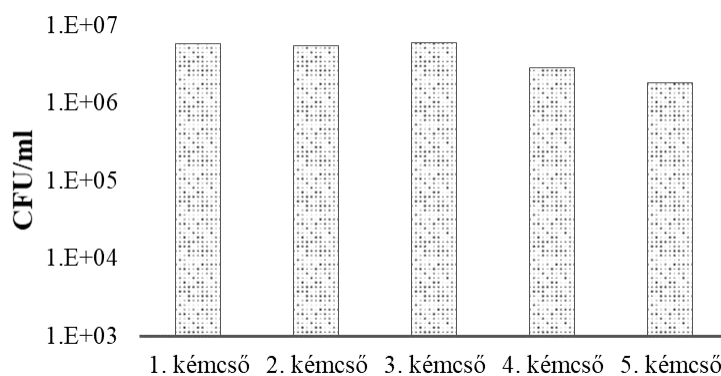
A kísérletben az *Aspergillus terreus* DSM826 (NRRL1960) mikroorganizmust vizsgáltam.

A kémcsöves tenyészetek leoltását egy törzsfenntartási kémcsőről végeztem, fém oltókaccsal vittem át a hűtőben tárolt tenyészetéről vett konidiospórákat a friss tápközegre. A szilárd tápagar felületén sűrűn cikkcakkozott vonal húzásával egyenletesen felvittem a spórákat a felületre. Az inkubálás paraméterei: 33°C, természetes fényviszonyok (áttetsző falú inkubátorszekrényt használtam), 1 hét időtartam. Az inkubációs idő végén egyenletes fahéjszínű felület alakult ki a tápagon, amelyre 8-8 ml Tween-80 tartalmú fiziológiás sóoldatot pipettáztam. A spórákat felszuszpendáltam steril kaccsal, és a folyadékot homogenizáltam kémcsőrázón 1 percig. Ezekből a törzs szuszpenziókból végeztem a spóraszám-meghatározásokat.

3.1.1 táblázat: Telepformáló egység (CFU) meghatározással kapott telepszámok

Hígítási lépcső	Telepszámok				
	1. kémcső	2. kémcső	3. kémcső	4. kémcső	5. kémcső
$10^5/1$	45	70	58	47	13
$10^5/2$	60	56	51	26	9
$10^6/1$	6	4	6	2	1
$10^6/2$	7	5	7	2	4
CFU/ml	$5,9 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$

Az öt párhuzamos tenyészet esetén meghatározott telepkepző egység-koncentrációkat a 3.1.1 táblázatban összegeztem. A kiértékeléshez a 10^5 és 10^6 hígítási lépcsőket használtam fel.



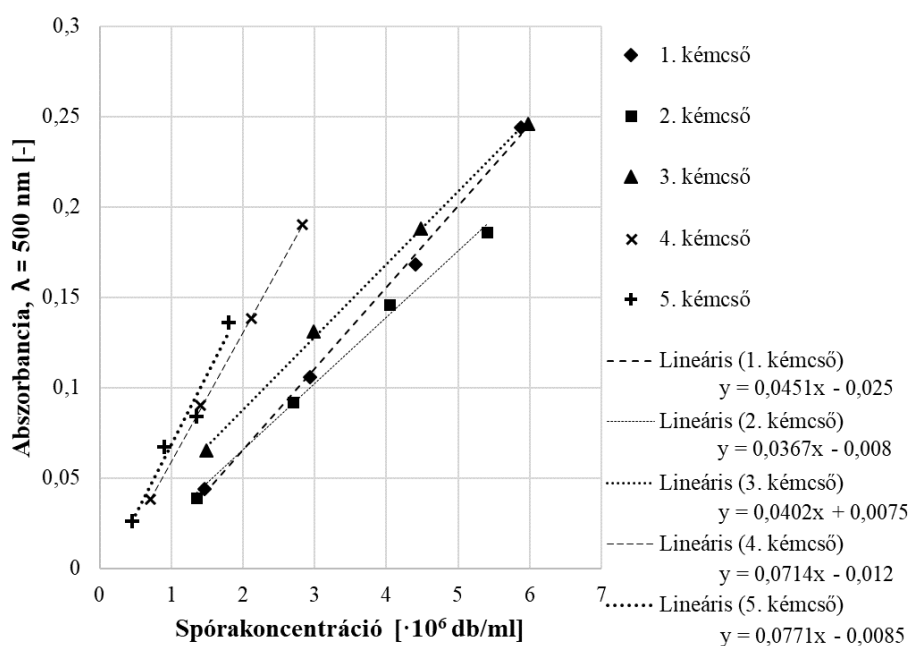
3.1.2 ábra: Spórakoncentrációk (colony forming unit/ml) a ferde agaros tenyészetekről nyert szuszpenziókban

A mérések azt mutatják, hogy a spóraszám nagyságrendileg nem változik (3.1.2 ábra), de a legnagyobb érték több, mint háromszorosa a legkisebbnek, aminek már lehet hatása a fermentációs folyamatra, tehát a spóraszám meghatározása oltás előtt standardizált eljárás mellett is fontos lépés.

3.1.2 Közvetett spóraszám meghatározása optikai denzitásméréssel

Megvizsgáltam, hogy a telepszámlálás adatait felhasználva készíthető-e megbízható optikai-denzitás kalibráció az egysejtes, kis méreteloszlású spórák koncentrációjának meghatározásához.

Az alkalmazott hullámhosszt a szakirodalom alapján határoztam meg, 500-550 nm tartományban várható elnyelési maximum. Az egyes kémcsövekről nyert szuszpenziókból hígítási sort készítettem, abszorbancia értéküket a hígítás és a telepszámlálás alapján számolt élőcsíraszám függvényében ábrázoltam. (3.1.3 ábra).



3.1.3 ábra: Spóraszám fotometriás mérésének eredményei

Az abszorbancia értékek a hígítás függvényében lineárisan változtak, azonban az egyes mintákra meghatározott egyenesek nem esnek egybe, és meredekségük is eltérő, így a módszer nem alkalmazható megbízható, gyors csíraszám meghatározásra. A

telepszámlálás mellett tehát maradnak a számlálókamrás eljárások (Bürker-kamra), amelyek viszonylag gyors eredményt szolgáltatnak.

3.1.3 Az inokulálási spóraszám hatása a DSM826 törzs itakonsav termelésére

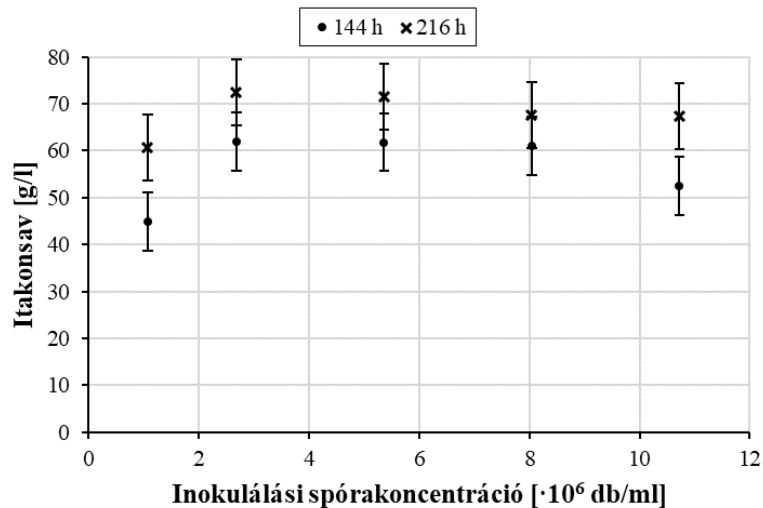
Az *Aspergillus terreus* DSM826 törzssel végzett fermentáció egyik paramétere az alkalmazott oltási csíraszám. A szakirodalomban fellelhető fermentációs kísérletek zömében az ivartalan konidiospórákkal történő oltást alkalmazták, mivel a gomba ezen formája egysejtű, így jól jellemezhető a spóraszámmal, és az oltóanyag előállítása jól reprodukálható.

Az itakonsav előállítással kapcsolatban kevésbé vizsgált az oltási spóraszám hatása a teljes folyamat lefutására. Feltételeztem, hogy van optimális tartománya az oltásnál alkalmazott spóra-koncentrációnak, amelynél a fermentáció optimális lefutású. Ez azt jelenti, hogy a lehető legrövidebb idő alatt éri el a maximális itakonsav végtitert.

A tartomány alsó határának elméleti alapja, hogy kis spóraszám esetén a lag-szakasz elhúzódik, a felső határt pedig az a fiziológiai mechanizmus szabja meg, amely a nagy sűrűségű gombaspóra szuszpenziókban a csírázás késleltetéséért felelős. A hifák kifejlődésére, a micélium makromorfológiájára hatással van a kiindulásnál alkalmazott spórakoncentráció, amely a különböző kezdeti feltételekkel indított fermentációknál azonos micélium tömegkoncentráció esetén is okozhat eltérést a hozamban és a produktivitásban.

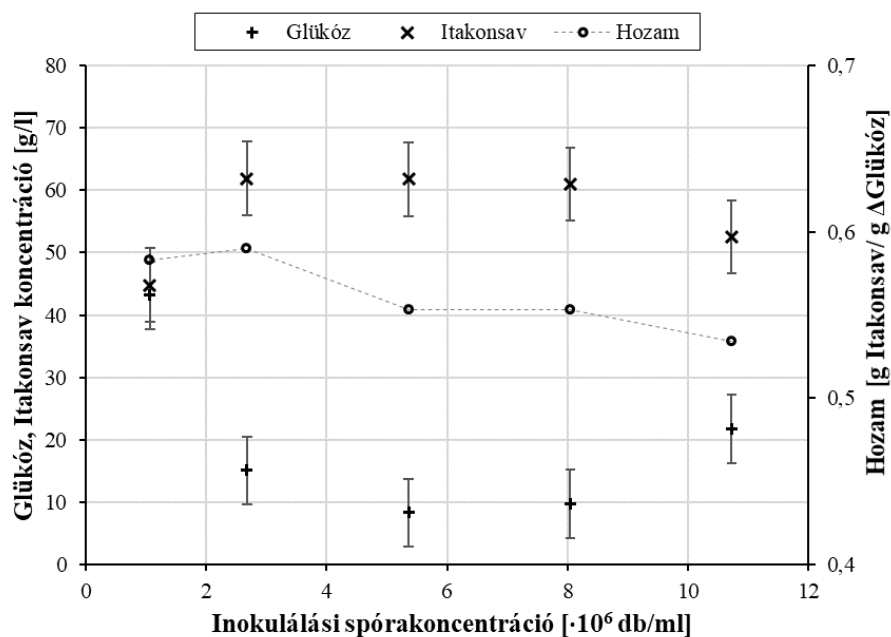
Az általam vizsgált oltás utáni spóraszám koncentráció tartomány a 10^6 és 10^7 db spóra/ml-t ölelte fel. A szakirodalomban általánosan alkalmazott koncentráció 5×10^6 db konidiospóra/ml, mely a vizsgált tartományba esik.

Az eredmények a 3.1.4 ábrán láthatóak. A 144. órában a legkisebb oltási spóraszámmal indult lombikok itakonsav tartalma elmarad az egy nagyságrenddel nagyobb spóraszámúakhoz viszonyítva, amely nagyrészt a hosszú lag-szakasz következménye. Az $1,07 \times 10^7$ spóra/ml-es – legtöményebb – beállítás esetén a 144. órában még észlelhető lemaradás, bár nem szignifikáns az eltérés, a végső, 216 órás mintákban azonban nem mérhető szignifikáns eltérés egyik beállítás esetén sem. A jövőben, egy külön kísérletterv keretein belül érdemes meghatározni a maximális itakonsav-tartalom elérésének időpontját az oltás utáni csíraszám függvényében.



3.1.4 ábra: A különböző kiindulási spóraszámú fermentációk itakonsav tartalma a 144. és a 216. órában (minden pont 3-3 párhuzamos fermentáció átlaga)

A kísérlet 144. órájában, a hatodik napon mért glükóz és itakonsav koncentrációk, valamint a számított termékhozamok a 3.1.5 ábrán láthatók.



3.1.5 ábra: A glükóz-, az itakonsav-koncentráció és a termékhozam alakulása különböző oltási spóraszámok mellett, a 144. órában

A 144. órában még minden beállítás tartalmazott maradék glükózt. A vizsgált kiindulási spórákoncentráció tartomány alsó határán a legtöbb a maradék glükóz, amely magyarázható azzal, hogy a sejttömeg exponenciális gyarapodása később indult be a többi beállításhoz képest. A tartomány legnagyobb értékénél is viszonylag magas a maradék glükóz koncentrációja, ebben az esetben feltételezésem szerint a spórák csírázása gátlás alá került. Vagy egy molekuláris mechanizmus van a háttérben, amelyek révén az aktiválódó,

duzzadó spórák képesek érzékelni koncentrációjukat, és gátló hatást gyakorolnak a további spórák kicsírázására, vagy pedig valamelyik komponensből – feltehetően a limitáló foszfátból – a gyors kimerülés miatt nem jut a spórákba olyan mennyiség, hogy az anabolikus folyamatok maximális sebességgel működjenek.

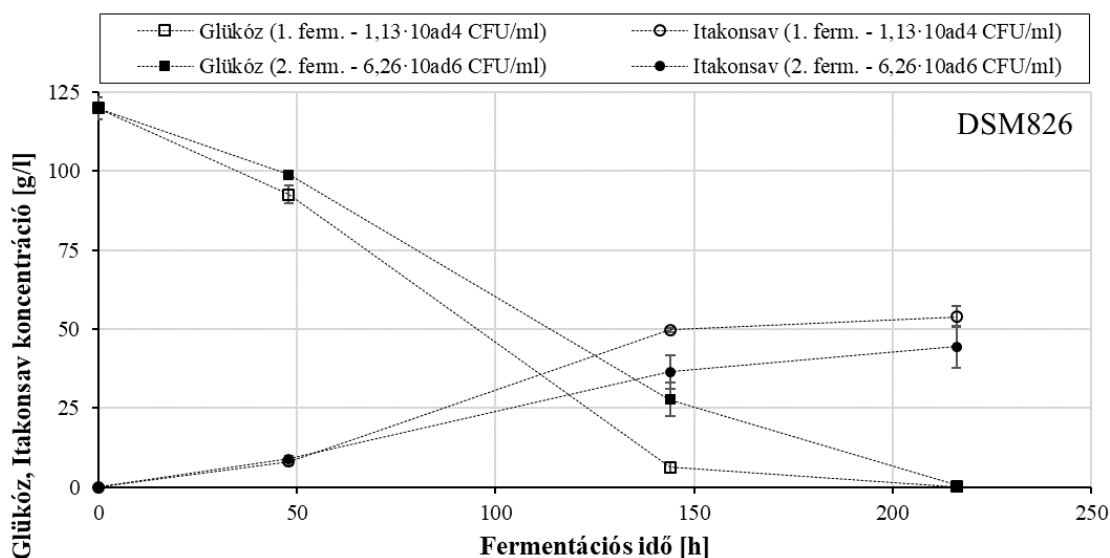
A 3.1.5 ábrán feltüntettem a fermentációs hozamot is, amely a keletkezett itakonsav és az elfogyott glükóz hányadosa. Elméleti maximuma 0,72 g/g, tehát ha az elfogyó glükóz teljes egészében az itakonsav termelés metabolikus útján alakul át, akkor 1 g glükózból 0,72 g itakonsav keletkezik. A kísérlet során azt tapasztaltam, hogy kisebb spórakoncentrációk esetén a hozam 0,59 g/g illetve 0,58 g/g, amely ~10 %-kal meghaladta a legnagyobb spórakoncentráció esetén kapott 0,53 g/g értéket. A szakirodalomban leggyakrabban előforduló $5 \cdot 10^6$ db/ml beállításnál számolt hozam a két végpont között helyezkedett el, 0,55 g/g-nak adódott. Az elméleti hozam értelemszerűen nem érhető el, hiszen a tápoldatban szerves szén csak a glükózból volt elérhető a mikroba felépítő folyamataihoz.

Érdekes kérdés, hogy vajon a híg spórakoncentrációból kinevelt micélium egységnyi mennyisége valóban több itakonsavat termel-e, mint a sok spórából növekedő micéliumtömeg? Elképzelhető, hogy a fizikailag összefüggő micéliumhálózat olyan optimális tápanyag-felhasználást valósít meg a teljes hossza mentén, hogy ezáltal az itakonsav termelődést maximalizálni tudja az organizmus. Ha ez így van, az újabb érdekes kérdéseket vet fel. Az egy spórából kialakuló gombát biológiailag tekinthetjük önálló egyednek is, mivel a sejtjei között megvalósul olyan interakció, amely jelentősen eltér a mikroorganizmus–környezet kémiai kölcsönhatásoktól? Ezek a genetikailag egyforma „egyének” pedig valamilyen módon együttműködhetnek vagy épp ellenkezőleg, versenghetnek egymással.

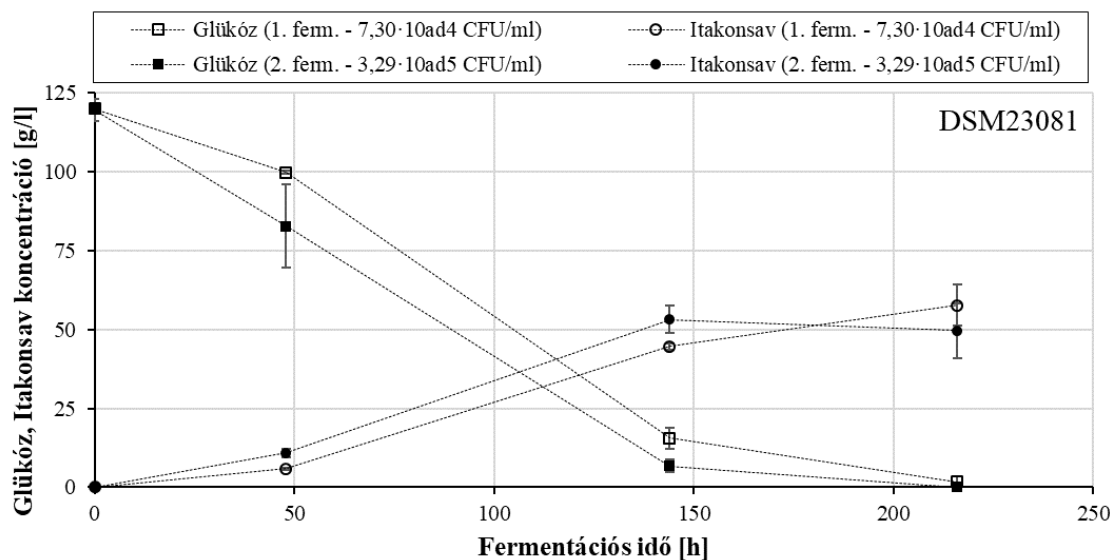
3.1.4 Két altörzs viselkedésének összehasonlítása itakonsav termeltető fermentációs körülmények között

A szakirodalomban szakaszos eljárásban két *Aspergillus terreus* altörzs teljesített a legjobban, melyeket a DSMZ törzsbankban DSM826 és DSM23081 letéti számon tartanak fenn. Ezeket rázott lombikos fermentációs kísérlettel hasonlítottam össze. Mindkét törzs

esetén két, különböző spóraszámú oltott fermentációt végeztem, mely egyenként 9 párhuzamos lombikból állt. Az azonos körülmények között rázott lombikokból hármat meghatározott időnként levettem, az itakonsav- és a glükóztartalmat meghatároztam (3.1.6 és 3.1.7 ábra). Egy fermentációs sorozat kivételével a száraz sejtömeg adatokat is megmértem (3.1.8 ábra).



3.1.6 ábra: *Aspergillus terreus* DSM826 törzssel végzett rázott lombikos kísérletek lefutása



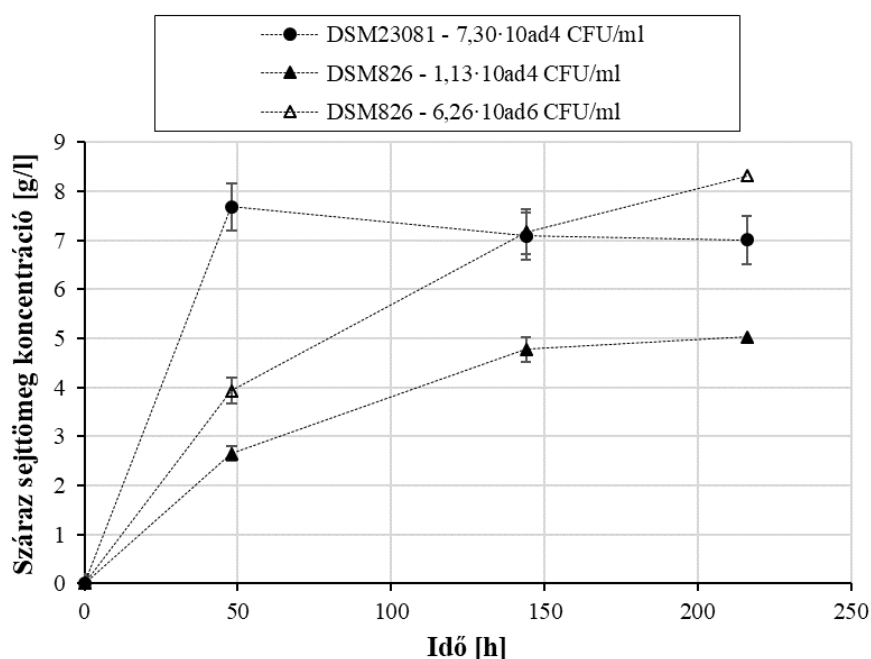
3.1.7 ábra: *Aspergillus terreus* DSM23081 törzssel végzett rázott lombikos kísérletek lefutása

A két törzs esetén a végső itakonsav titer nem különbözik szignifikánsan, a fermentáció lefutásában azonban jelentős különbségek adódtak. A DSM826 törzs esetén gátló hatású volt a nagy spóraszámú oltás, a cukor elfogyasztása lassabb ütemben történt,

a sejtömeg pedig szignifikánsan nagyobb volt, mint a kisebb spóraszámú oltásnál. Tehát az alacsonyabb spóraszámú induló fermentáció előbb, a 144. órára elérte a maximális itakonsav koncentrációt, míg a nagyobb spóraszámú oltott kísérlet során a 144. órában még jelentős (~27 g/l) maradék glükóztartalom volt mérhető, amely a 216. órára elfogyott ugyan, de nem növelte szignifikánsan az itakonsav végtitert.

A DSM23081 esetén azonban a nagyobb spóraszámú fermentáció során gyorsabban elfogyott a glükóz és az itakonsav koncentráció is stabilizálódott a 144. órára.

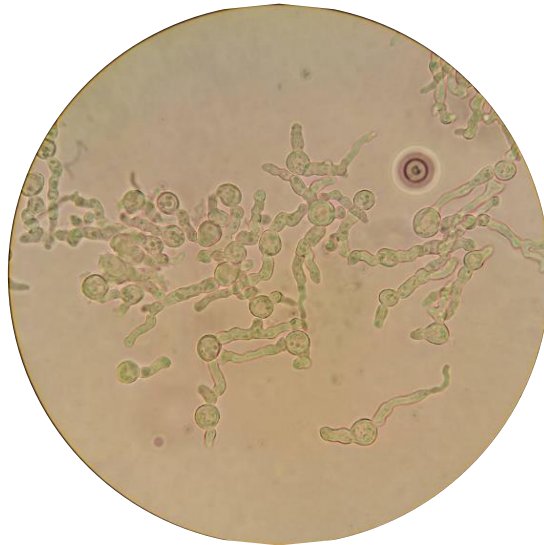
Meg kell azonban jegyezni, hogy a DSM23081 2. fermentációjának spóraszámát egy nagyságrenddel elmarad a DSM826 2. fermentációjának spóraszámától. Amennyiben van egy maximális spórakoncentráció, amely mellett már gátolt a micéliumképződés, és ezt a DSM826 törzs 2. fermentációjával elértük, ez magyarázatot adhat a megfigyelt lassabb glükóz-felhasználásra.



3.1.8 ábra: *Aspergillus terreus* DSM826 és DSM23081 törzsekkel végzett rázott lombikos kísérletek során a sejtömeg koncentrációjának alakulása

A két törzs között a legnagyobb eltérés a sejtömegek alakulásában volt megfigyelhető (3.1.8 ábra). A DSM826 törzs mindkét fermentációja során a sejtömeg monoton növekedett a vizsgált 216 órás intervallumban, míg a DSM23081 esetében a maximális koncentrációt már a 48. órára elértük, és ezután nem változott szignifikánsan.

A spórából induló fermentációk esetén a lag szakaszban először a spórák duzzadása történik meg, mely során vizet, tápanyagokat és glükózt vesznek fel. Az intenzív anyagcsere beindulása után hifanyúlványok jelennek meg a spórákon.



3.1.9 ábra: *Aspergillus terreus* DSM826 spórák csírázása



3.1.10 ábra: *Aspergillus terreus* DSM23081 csírázása

A DSM23081 törzs spórái nagyobb méretűre duzzadnak, és intenzívebb hifanyúlványképződés megindulása tapasztalható, mint a DSM826 esetén, melynél jellemzően két hifanyúlvány indul ki egy spórából, majd csak bizonyos, a körülményektől függő hosszúság elérése után indul meg az elágazások képződése. A gombafonalak növekedése a fonalak végén történik (apikális elongáció – csúcsirányú hosszabbodás), ezért a nagyobb számú hifacsúcs gyorsabb növekedést tesz lehetővé (3.1.9 és 3.1.10 ábrák). Érdeemes lenne megvizsgálni, hogy egységnyi tömegű nyugvó gombaspóra mennyi glükóz, illetve tápanyag

felvételére képes a hifanövekedés megkezdéséig, ha a fermentáció során alkalmazott körülmények közé kerül.

Az itakonsav termelés szempontjából kiemelendő, hogy a vizsgált időintervallumban ugyanolyan mennyiségben termeltethető itakonsav a DSM826 törzs szignifikánsan – közel 30%-kal kevesebb biomasszával, mint a DSM23081 törzssel, amely a feldolgozási műveletek, és a hulladék-képződés szempontjából előnyös. Erre alapozva a bioreaktorokban végzett kísérletek során az *Aspergillus terreus* DSM826 altörzssel dolgoztam.

3.2 Félfolyamatos fermentációs kísérletek

A folyamatos fermentációt megelőzően a gyakorlatban egyszerűbben megvalósítható félfolyamatos eljárásban vizsgáltam a gomba viselkedését, amely a folyamatos rendszer paramétereinek megalapozását is szolgálta. A félfolyamatos technika előnye, hogy a készülékből kivett térfogat ugyanannyival pótolható, az állandó reakcióterfogat ezért jól tartható. Nem fenyeget eltömődés vagy meghibásodás az adagolási automatikában. A kivétel-rátáp ciklusokban kicserélt térfogatok csökkentésével és a beavatkozási ciklusok gyakoriságának növelésével közelíthető a folyamatos eljárás, és egy látszólagos hígítási sebességgel jellemezhető.

A kétféle részletesen ismertetésre kerülő félfolyamatos fermentáció során az *Aspergillus terreus* DSM826 szubszpeciesz volt a termelő törzs. A különbséget a rátáp oldat glükóztartalma jelentette két eljárás között. Előzetes, itt nem részletezett kísérletek során kiderült, hogy az elégtelen foszfát-rátáplálás meggátolja az amúgy is foszfát limitáció mellett végzett fermentációban a mikrotömeg megújulását, ha átállunk félfolyamatos működésre. Mivel a foszfát a fermentlén belül a mikrotömegben lokalizált, feltételezve, hogy sejttömegre nézve is homogén a kivett rész, a rátáplált oldatban a kiindulási koncentráció alkalmazása mellett állandó foszfát-tartalom áll fenn a készülékben.

A glükóztartalom az első félfolyamatos fermentáció (I. FélFF) során a rátápban nem változott, állandó 100 g/l volt. A második fermentációban (II. FélFF) azonban minden elvét/rátáplálás alkalmával visszaállítottam 120 g/l-re a készülékben. Ezt a rátáp oldat steril összemérésével oldottam meg, törzsoldatokból és steril desztillált vízből kiindulva. A glükóz törzsoldat koncentrációja 400 g/l-es volt, a többi komponens pedig 100-szoros töménységű. A törzsoldatokból a 200 ml-hez megfelelő mennyiségűt pipettáztam sterilizált laboratóriumi üvegbe, majd jelig töltöttem az edényt. A maximálisan így beadagolható glükóz mennyiség így 192 ml-ben 76,8 g volt, amit nem kellett meghaladni egyszer sem.

A kísérleteket a 2. fejezetben felsorolt analitikai mérésekkel követtem nyomon. Egyes mintákat fáziskontraszt mikroszkóp alatt is vizsgáltam, és sterilitási vizsgálat céljából Petri-csészékre szélesztettem belőlük. Egyik mintából sem volt kimutatható idegen mikroorganizmus.

A kísérletekben nem sikerült jelentősen meghaladni a 30 g/l itakonsav koncentrációt, dacára a kis látszólagos hígítási sebességnek és a rendelkezésre álló glükóznak. A szakaszos kísérletek alapján 40 g/l fölötti értékre is lehetett számítani (Komáromy et al., 2019), más források szerint a törzs 90-120 g/l itakonsav termelésére képes a glükóz kimerüléséig, így a termékgátlás lehetősége ebben az eljárásban felmerül.

3.2.1 A félfolyamatos fermentációk indítása

A fermentációk mindkét esetben a szakaszos itakonsav fermentációkhoz hasonló felfutással indultak. A félfolyamatos működtetést a késői exponenciális növekedési szakaszban kezdtem meg, az I. FélFF esetén az 5., a II. FélFF esetén pedig a 4. napon. Ezen a ponton már 20 g/l vagy e fölötti itakonsav-tartalom volt a fermentlében.

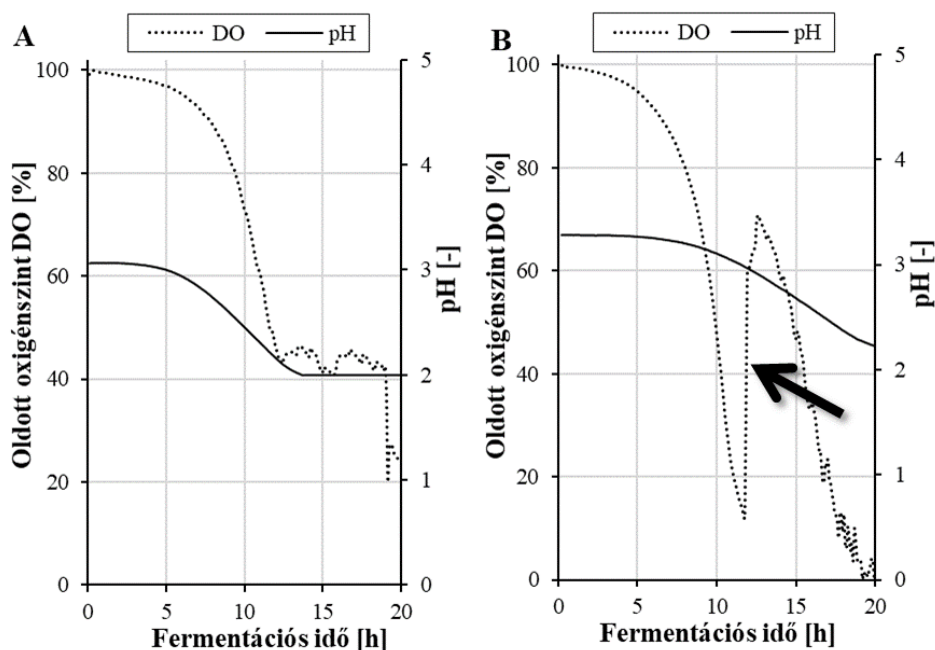
A felfutási szakasz első 20 órájában az oldott oxigénszint és a pH gyors süllyedése volt tapasztalható. Ezalatt az idő alatt kis volumenű mintákat vettem, melyekből az itakonsav- és az extracelluláris glükóztartalom alakulása mérhető volt, és mikroszkóp alatt vizsgálható a spórák csírázása. Emiatt a sejtszárazanyag tartalmat erre az időszakra vonatkozóan nem tudtam követni, mivel ahhoz a vizsgálathoz nagyobb mennyiségre lett volna szükség. A glükóz fogyása nagyon lassú volt (3.2.1 táblázat), amiből következtetni lehet a biomassza lassú növekedésére is az alkalmazott szintetikus fermentációs közegben.

3.2.1 táblázat: A glükózfogyasztás felgyorsulása a II. FélFF felfutási szakaszában

<i>Fermentációs idő</i>	<i>Glükóz koncentráció</i>	<i>Glükózfogyasztás sebessége</i>
0 h	149,3 g/l	
6 h	148,6 g/l	0,12 g/l/h
19 h	146,7 g/l	0,15 g/l/h
24,5 h	144,4 g/l	0,42 g/l/h
35,5 h	138,1 g/l	0,57 g/l/h
48,5 h	129,2 g/l	0,68 g/l/h
71 h	108,4 g/l	0,92 g/l/h

Megállapítható tehát, hogy a növekedésnek ebben a szakaszában, közvetlenül a csírázás után a biomassza specifikus oxigénigénye magasabb, mint az ezt követő fázisokban.

A mért adatok a 3.2.1 ábrán láthatóak. Az 3.2.1/b ábrán fekete nyíllal jelölt habzás miatt az oldott oxigénszint megemelkedett, majd a habzástgátló hozzáadása után ismét erőteljesen csökkent. A korai szakaszban képződő hab nagy biomassza-tartalmú, ami miatt a folyadék fázisban jelentősen lecsökkenhet a gomba mennyisége.



3.2.1 ábra: Az oldott oxigénszint és a pH változása a fél folyamatos fermentációk felfutási szakaszában: A) I. FélFF B) II. FélFF (fekete nyíl - habzás)

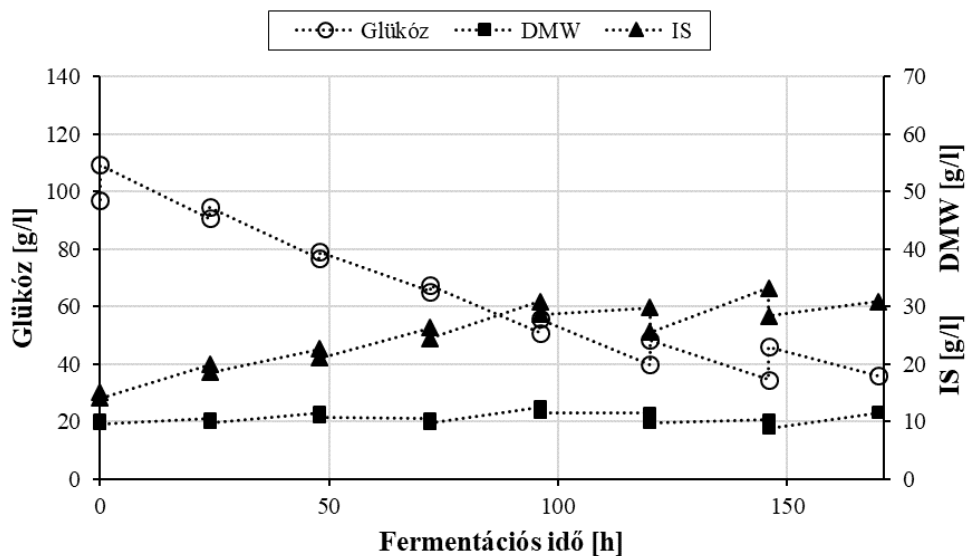
Mivel a szakirodalomban kevés elérhető kísérleti tapasztalat áll rendelkezésre ennek a technikának az alkalmazásáról, azok a paraméterek, melyek nagyban befolyásolják a folyamat lefutását, mint például a fél folyamatos működtetés indításának időzítése a növekedés megfelelő fázisához, a beavatkozási ciklusok gyakorisága, vagy a rátáplált oldat összetétele, ezek megválasztása alapos megfontolások után, de mégis önkényesen történt. Ezek az úttörő kísérletek elsősorban kiindulópontként szolgálhatnak a későbbi optimalizálási munkához.

A pH csökkenését az ammónium-ionok felvételének tulajdonítják (Kuenz & Krull, 2018), ami valóban összecseng Kuenz (2012) ammónium-ion felvétel méréseivel. Ebben a korai fázisban nem volt mérhető itakonsav-tartalom a fermentáléban. A sav termelődése tehát nem oka az alacsony pH kialakulásának, bár feltehetően jelentős szerepet játszik annak fenntartásában, figyelembe véve, hogy a pH-kontrollált szakaszban a lág-adagolás korrelál a képződő sav mennyiségével.

3.2.2 A félfolyamatos működtetés nyomon követése

A két fermentációs eljárás között a félfolyamatos üzem paramétereiben volt különbség. Az első eljárás esetén konstans glükóz koncentrációt alkalmaztam a betáplált friss oldatban, míg a második esetben a glükóz koncentrációját beavatkozásról beavatkozásra változtattam, attól függően, hogy a 24 órás periódusban a fogyás hogyan alakult. Célom itt az állandó magas glükózkoncentráció fenntartása volt.

Az I. FélfFF során mért koncentráció adatok a félfolyamatos működtetés kezdetétől a 3.2.2 ábrán láthatók.



3.2.2 ábra: Az I. FélfFF során mért glükóz-, itakonsav- (IS) és sejtszáranyag (DMW) koncentrációk

A félfolyamatos működtetés során a glükóz koncentrációja csökkenő tendenciát mutatott, míg az itakonsav lassan növekedett, majd miután elérte a 28 g/l-es értéket, erre állt vissza a ciklusok közötti idő alatt. A sejtszáranyag koncentrációjának alakulása változékonynak bizonyult, amelynek oka – nagy valószínűség szerint – a habzás által a készülék belső falára kihordott mikrobátömeg, amellyel nem számoltam. Az értéke 10 g/l körül ingadozott, anélkül hogy egyértelmű növekedő vagy csökkenő tendenciát mutatott volna. Az utolsó két ciklusban a kicserélt térfogatot kétszeresére növeltem. Ez a glükóz koncentráció jelentősebb növekedésében és az itakonsav koncentráció arányosan csökkenő értékében észrevehető. A mikrogomba tömeg megújult a nagyobb hígítási lépés esetén is. A nagyobb térfogat-csere a pH-szabályozáshoz használt lúg fogyasztásában 2-3 órás szünetet

eredményezett, amely a kisebb hígításnál nem volt észlelhető. A szünetet követően azonban a lúgfogyasztás ismét elindult és gyorsan elérte az eredeti meredekségét.

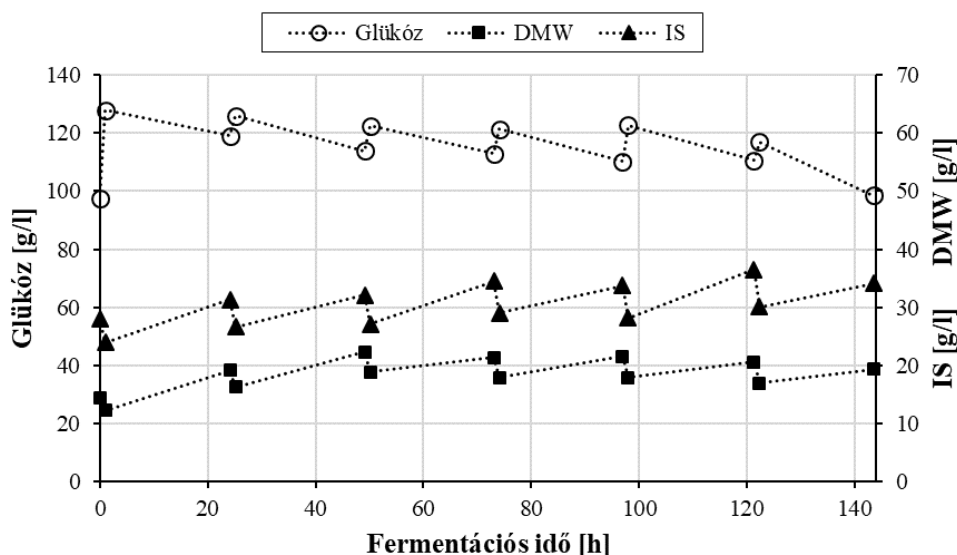
A következő félfolyamatos eljárásban a tapasztalt cukorfogyási trend miatt a rátáplált oldat cukortartalmát annak megfelelően változtattam, hogy a beavatkozás előtt vett mintából mennyinek adódott a cukorkoncentráció. Minden rátáp/elvét ciklusban annyi cukor visszapótlásáról gondoskodtam, hogy a 120 g/l-t elérjem. Kisebb ingadozás tapasztalható volt, mivel a fermentorban a folyadék térfogata a mintázások és az intenzív levegőztetés miatt fellépő párologási veszteség miatt eltért kissé a számításokhoz használt adattól. A 120 g/l glükózkoncentráció olyan irodalmi adat (Karaffa et al., 2015), melyet batch fermentációk esetén – mint kiindulási koncentráció hatását – vizsgáltak az itakonsav hozamra nézve. Ez alatt az érték alatt a hozam alacsony volt, fölötte azonban már nem volt hatása ennek a paraméternek a hozam alakulására. Meg kell jegyezni, hogy a szakaszos fermentációban a legnagyobb produktivitás a 96-120 óra időintervallumban volt mérhető, amikor a glükóz koncentrációja 80 g/l-ről 55 g/l-re csökkent. Arra nézve tehát, hogy a konstans magas értéken tartott cukortartalom milyen hatással van a sejtömeg produktivitására, az itt bemutatott mérések az első kísérleti adatok.

A konstans magas cukortartalom maga után vonja, hogy az elvételben is magas lesz a maradó cukorkoncentráció. Azonban, terv szerint a félfolyamatos, vagy lehetőség szerint a folyamatos fermentáció folyamatát összekapcsolva egy bipoláris elektrodialízis modullal, az itakonsav kémiai modifikátorok használata nélkül szelektíven kinyerhető. A visszamaradó, magas glükózkoncentrációjú oldat pedig alkalmas lehet a folyamatba való visszavezetésre, megfelelő ionos és nem ionos tápanyagkomponensek adagolása után. Az egész folyamat valódi hatékonyságát pedig majd a kapcsolt rendszerre vonatkozó adatok alapján lehet kiszámolni.

A II. FélIFF során mért koncentráció adatok a félfolyamatos működtetés kezdetétől a 3.2.3 ábrán láthatók.

Az itakonsav koncentráció növekedő trend mentén lassan 28 g/l-ről 34 g/l-re változott. Ez az érték még mindig jelentősen elmarad a szakirodalmi 90-120 g/l-től, holott folyamatosan jelentős mennyiségű glükóz állt a mikroba rendelkezésére. A sejtömeg 20 g/l körül ingadozott, kis mértékben emelkedett a folyamat második szakaszára. A kísérlet során még intenzívebb sejtömeg képződést tapasztaltam a készülék gázterének szilárd felületein, mint

az I. FélFF esetén. A szuszpendált száraz sejtömeg, amely az elvétekből meghatározható volt, kiegyensúlyozott képet mutatott. Az I. FélFF-hoz képest kétszeres mennyiségű sejtömeg miatt azonban a fermentlé jóval viszkózusabb volt, ami megnehezítette a sejtmentesítést, akár centrifugálással, akár szűréssel.

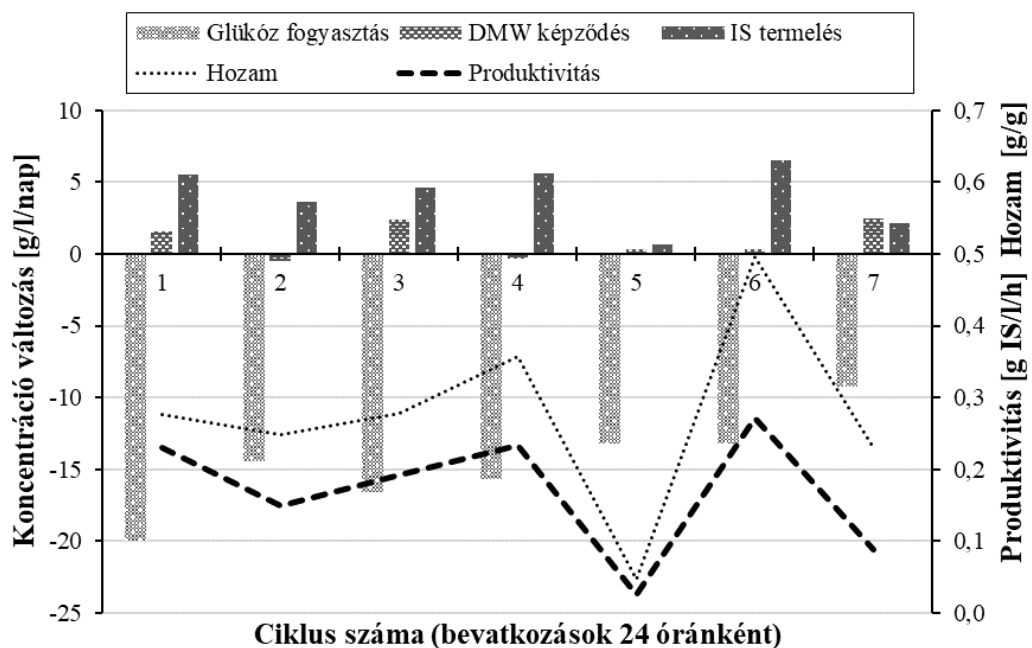


3.2.3 ábra: A II. FélFF során mért glükóz-, itakonsav- (IS) és sejtszáranyag (DMW) koncentrációk

A nagy mennyiségű szilárd sejtömeg ráadásul valós időben, a készülékben a teljes térfogathoz mérten is már számottevő mennyiségű intracelluláris fázist jelent, amelynek összetétele (pl. itakonsav tartalma) nem azonos az extracelluláris térben mérhetővel. Mivel a készülékben a hasznos térfogat meghatározása bizonytalan, a hatékonyság értékeléséhez több adat szükséges.

3.2.3 A hozam és a produktivitás alakulásának összehasonlítása beavatkozási ciklusonként

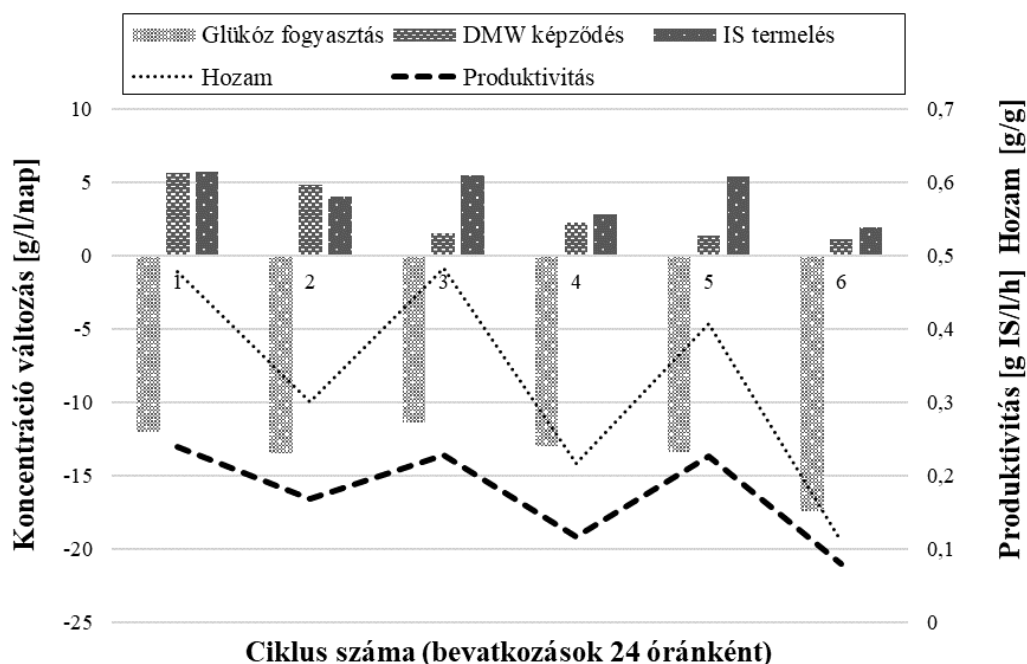
A 3.2.4 ábrán látható a ciklusonként elfogyasztott glükóz, keletkezett itakonsav (IS) és a sejtszáranyag változása. Az ábrán feltüntettem a 24 órás intervallumokra kiszámolt átlag produktivitás és termékhozam értékeket.



3.2.4 ábra: A glükóz-, itakonsav(IS)- és sejt szárazanyag koncentráció, a hozam és a produktivitás alakulása az I. FélFF-ban

A 24 órás periódusokra számolt produktivitás adatok ingadoztak, az első, a negyedik és a hatodik ciklusban maximumot mutatott ez a paraméter, rendre 0,23, 0,23 és 0,27 g IS/L/h. Az itakonsav hozam szintén ezekben a ciklusokban ért el magasabb értéket, amely 0,28, 0,35 és 0,50 g IS/g glükóz volt. Az itakonsav hozam elméleti maximuma 0,72 g IS/g glükóz, amely a metabolikus útvonalból számolható, azzal a feltételezéssel, hogy a mikroorganizmus a glükózt kizárólag itakonsav előállítására hasznosítja. A bemutatott kísérletben azonban nem alkalmaztam sejtvisszatartást, tehát a sejt tömeg megújulása fontos tényező volt a működtetés során. A fermentáció során nem volt cél elérni az elméleti hozamot, csak megközelíteni azt. Innen közelítve, a hatodik ciklusban elért 0,50 g IS/g glükóz részeredmény ígéretes. Azonban a tapasztalt peridiocitás a termelésben nem vitatható, ami további vizsgálatokat kíván, a mikroba viselkedését és egyéb, eddig figyelembe nem vett tényezőket véve górcső alá. A folyamat leállítását megelőző tizenkét órában már nem történt további lúgadágalás.

A II. FélFF-ban ciklusonként mért elfogyott glükóz, képződött itakonsav és száraz sejt tömeg alakulása a 3.2.5 ábrán látható. Szaggatott vonalakkal jelöltem a számolt itakonsav produktivitást és hozamot a 24 órás periódusokra vonatkozóan. A számításhoz a teljes fermentálé térfogatadatot használtam.



3.2.5 ábra: A glükóz-, itakonsav- és sejtészanyag koncentráció, a hozam és a produktivitás alakulása a II. FélFF-ban

Ebben a kísérletben még feltűnőbb a folyamat periodicitása. A produktivitás az első, harmadik és ötödik ciklusban mutatott maximumot, rendre 0,24, 0,23 és 0,23 g IS/L/h. A legalacsonyabb értéket, 0,08 g IS/L/h-t, a hatodik ciklusban tapasztaltam, amely után már nem volt további lúgadagolás, és a folyamatot leállítottam. Az előző folyamathoz hasonlóan alakult a hozam is, ugyanezen ciklusokban sorra 0,48, 0,48 és 0,41 g IS/g glükóz csúcserőteket sikerült elérnem.

A két félfolyamatos fermentáció során a produktivitások igen alacsonyak voltak, holott a rendszer előnye éppen a nagy produktivitással való működtetés lenne. A magasabb cukorkoncentráció alkalmazása nem növelte a produktivitást, bár a hozam kedvezőbben alakult. A hozam, azaz hogy a felhasznált glükóz hányad része alakul itakonsavvá, nagyon fontos paraméter az anyagfelhasználás minimalizálása szempontjából. Emiatt a nagy cukorkoncentrációval megvalósított félfolyamatos fermentációt vettem alapul a folyamatos eljárás paramétereinek – a hígítási sebesség és szubsztrátadagolási stratégia – tervezésénél. A szakirodalmi folyamatos fermentációkkal összevetve elmondható, hogy a kivett fermentlé elérhető itakonsav koncentrációja szignifikánsan nagyobb volt a legmagasabb 18 g/l értéknél (Ju & Wang, 1986).

A fermentációk során nyert itakonsav tartalmú levet centrifugálással (6000 rpm, 10 perc) elválasztottam a micélium tömegetől, és bipoláris-elektrodialízis kísérletekben kerültek felhasználásra [6,7,9]. Ezáltal értékes információkat nyertünk a pH hatásáról az elválasztás hatékonyságára, a glükóz visszatartásra és az energiafelhasználásra vonatkozóan.

3.3 Folyamatos fermentációs kísérlet

A Lambda Minifor laboratóriumi fermentorban végzett fermentáció 547 órás futását dokumentáltam, amely a szakaszos felfutást, egy egyhetes oxigénlimitált, nem termelő szakaszt, majd egy több, mint 300 órás itakonsav termelő szakaszt ölelt fel. Az itakonsav termelő szakaszban bipoláris elektrodialízissel feldolgozott diluátum visszatáplálásának hatását is vizsgáltam. A bipoláris elektrodialízisnek az a sajátossága, hogy a termékkinyeréshez nincsen szükség segédanyag hozzáadására, így az itakonsavra, illetve ionos komponensekre nézve elszegényedett fermentlében, másnéven diluátumban visszamaradó tápanyagok (elsősorban a glükóz szénforrás) visszaforgathatók a folyamatba. A visszaforgatást limitálhatják olyan gomba eredetű metabolitok, amelyek esetleg gátló hatást gyakorolnak az itakonsav termelés metabolikus útjára. Ilyen valóban integrált alkalmazásra nézve nincsen még adat a szakirodalomban.

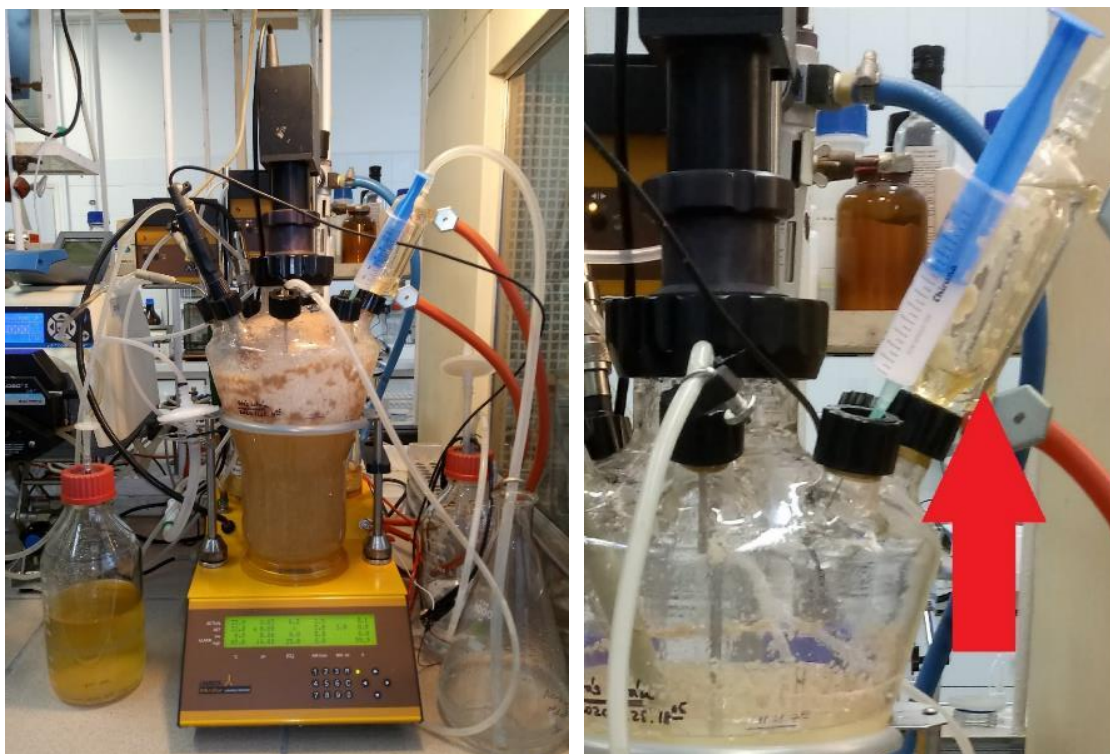
Az előbbieken bemutatott félfolyamatos kísérletek során használt Biostat készüléket technikai okokból kellett lecserélni.

Mivel egyetlen folyamatos kísérletet végeztem a vázolt körülmények között, amely több, mint egy hónapot vett igénybe, a kiértékelés során a statisztikai értékelhetőség hiánya miatt nem tehetek általános megállapításokat. Azonban a folyamat során nyert megfigyeléseket és tanulságokat érdemes kielemezni, rendszerezni, hogy ezeket a további folyamatos fermentációs kísérletek tervezésénél tekintetbe véve egy lépéssel közelebb kerüljünk az ipari megvalósításhoz.

3.3.1 A fermentáció első szakasza – habzás, spórázás és nincs itakonsav!

A kísérlet szakaszos üzemi indítása során a pH érték változása hasonló mintázatot mutatott a Hevekerl kísérletében leírtakhoz (2014b). 72 órán belül a pH lecsökkent 1,9 értékre, majd stagnált. A szakirodalmi adatok alapján a lecsökkent pH valamelyest lassítja a sejttömeg növekedési ütemét, azonban az elérhető DMW koncentrációt nem befolyásolja. Az alacsony pH támogatja a sterilitás fenntartását a készülékben. E két tényező ismeretében nem alkalmaztam pH szabályozást.

A fermentáció első hetében a tápközeg jelentős habzását tapasztaltam. Amellett, hogy a habképződés miatt kirakódott a micéliumtömeg egy jelentős része a készülék fejterének falára, előfordult, hogy a fermentlé kihabzott az elmenő levegőszűrőn keresztül (3.3.1 ábra). Mivel a kihabzás a készülékben levő folyadéktérfogat változásához is vezet, és a levegőztetést is befolyásolja, ezért szabályozása kulcsfontosságú az itakonsav fermentáció során.



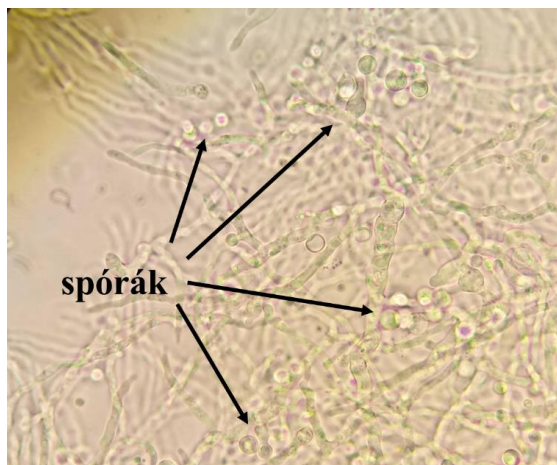
3.3.1 ábra: A habzás következményeként kirakódott sejtömeg a készülék falán (balra), illetve az elmenő levegő hűtőjében (jobbra)

Az intenzív levegőztetés alkalmazásakor a hab szemmel láthatóan nagy biomaszataralmú volt. Ha a sejtömeg kirakódik végig az elmenő levegő hűtőben és csövekben, az nehezíti a sterilitás fenntartását.

A fermentáció során 0,5, illetve 1,0 ml-es mennyiségben 5 %-os steril Foamsol szuszpenziót adagoltam a rendszerhez, a habzás megfékezésére. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, hogy milyen típusú habzásgátlót érdemes az itakonsav fermentáció során alkalmazni. A szilikon alapú Foamsol-t élelmiszeripari etanol fermentációhoz fejlesztették ki, ahol az eszemben előálló extrém alacsony pH-val nem kell számolni. A Foamsol bevált a félfolyamatos kísérleteim során, ahol 48 óra szabad futás után pH = 3 szabályozást alkalmaztam. A legmegfelelőbb, 3 alatti pH-n is stabil és inert habzásgátló kiválasztása

fontos kutatási feladat lesz a jövőben. Ahogyan az is, hogy a fejtérben a biomassza kirakódását megakadályozzuk, például valamilyen nanotechnológiás felületkezeléssel, amely ellenáll a gomba megtapadásának.

Az első hét ötödik napján már folyamatos üzemre kapcsoltam a mikroba szubmerz spórázása miatt (3.3.2 ábra). Ez alatt az idő alatt nem termelődött mérhető mennyiségű itakonsav, dacára a gondos szakirodalmi tájékozódás alkalmazásának. A probléma okaként az alacsony oxigénátadási sebességet határoztam meg.

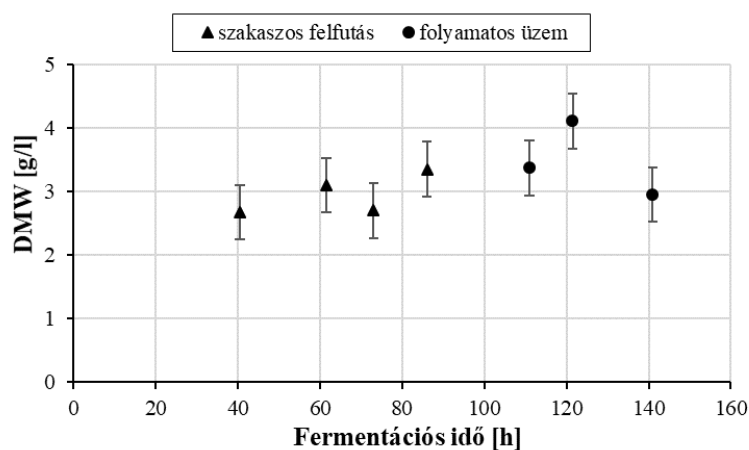


3.3.2 ábra: Intenzív spórázás a fermentáció 87. órájában, 1000x-es nagyításban

A Biostat reaktorban végzett számos szakaszos (jelen dolgozatban nem tárgyalt) és félfolyamatos kísérlet előtt számszerűsítettem tiszta vízben a 33 °C, illetve 37 °C hőmérsékletekhez tartozó oxigénátadási sebességeket az adott készülékben, különböző keverési fordulatszám és levegő térfogatáram paraméterpárok beállításával. Így kiválasztható volt az a paraméter pár, amellyel a lehető legkevesebb levegő bevezetésével (habzás!) és a lehető legkisebb fordulatszám (nyíró erők!) beállításával még elégséges oxigénbevitelt értem el [4].

A Lambda fermentor esetén erre nem került sor, ezért a kevertetés frekvenciáját és a levegő bevezetést a még alkalmazható maximális értékekre állítottam. A levegő bevezetés porlasztása a belépési ponton igen kis hatékonyságú ebben a berendezésben. 3 l/perc esetén – ami kb. 1,6 VVM-nak felelt meg, a nagyméretű buborékok igen gyorsan átszaladtak a folyadékon. 2,7 l/perc és 3 Hz keverési frekvencia esetén mértem a legnagyobb levegő visszatartást (emelkedett folyadékszint alapján), és a legkedvezőbb buborék aprózódást itt figyeltem meg.

A speciális keverés, amely a nyíróerők minimalizálását célozza a halfarok-szerű mozgással, nem alkalmas a buborékok hatékony diszpergálására. A kísérlet első szakaszában bebizonyosodott, hogy az *Aspergillus terreus* gombával végzett fermentációban ez a hiányosság olyan szintű oxigén-limitációt okozott, amely korlátozta a növekedést (3.3.3 ábra), illetve az itakonsav képződés teljes mértékben gátlás alá került. Azonos összetételű tápoldaton a Biostat reaktorban 10-15 g/l DMW is elérhető volt (lásd a kiindulási értékeket a félfolyamatos kísérletek során – 3.2.2 és 3.2.3 ábrák). A limitáció a folyamatosított működtetés során is egészen addig fennállt, amíg a levegőt tiszta oxigénre nem cseréltem (3.3.3 ábrán a zöld jelölők). Látható, hogy a növekedés már nem volt szignifikáns a 40. óra után.



3.3.3 ábra: A mért micéliumtömeg-koncentráció adatok (DMW) a fermentációs idő függvényében

A 167. órában levegőadagolás helyett tiszta oxigén gáz lassú adagolására tértem át. A tiszta oxigén adagolásával a telítési koncentráció megnövekedett (arányosan az oxigén parciális nyomásának változásával, azaz 5-szörösére), így az a készülék kialakítása ellenére sem limitálta a folyamatot a továbbiakban. A tiszta gáz adagolás megkezdése után a következő hét nap során az itakonsav-tartalom fokozatosan megnövekedett, 0-ról 30 g/l körüli értékre.

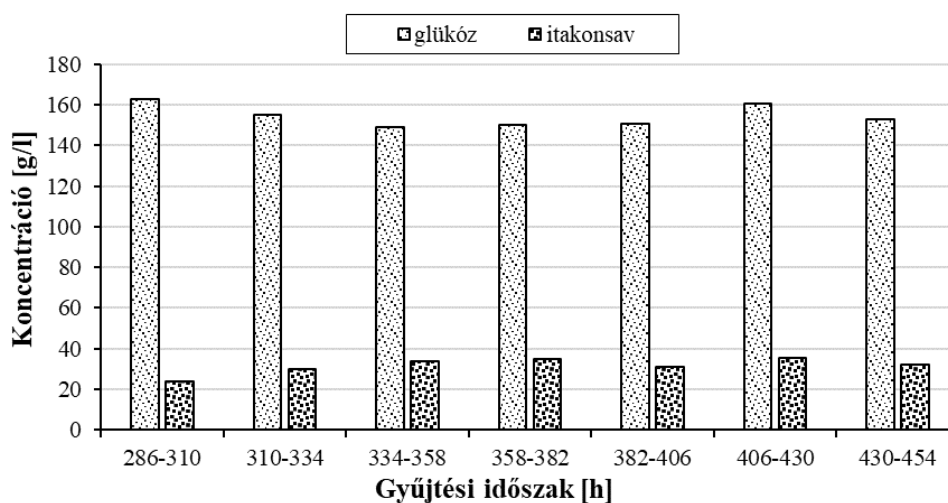


3.3.4 ábra: A fermentáló kultúrának változása a kísérlet során

A gomba növekedése az 5-6. naptól kezdődően morfológiai változáson ment át, és az addig laza szövetként fejlődő micélium golyós pelletékké formálódott (3.3.4 ábra). Ekkor már nem volt lehetőségem a DMW nyomon követésére, mivel a készülékből egy 1 mm átmérőjű, hosszú tűn keresztül tudtam csak mintát venni. A minta a nagy golyók kizáródása miatt már nem volt reprezentatív a teljes fermentlére nézve.

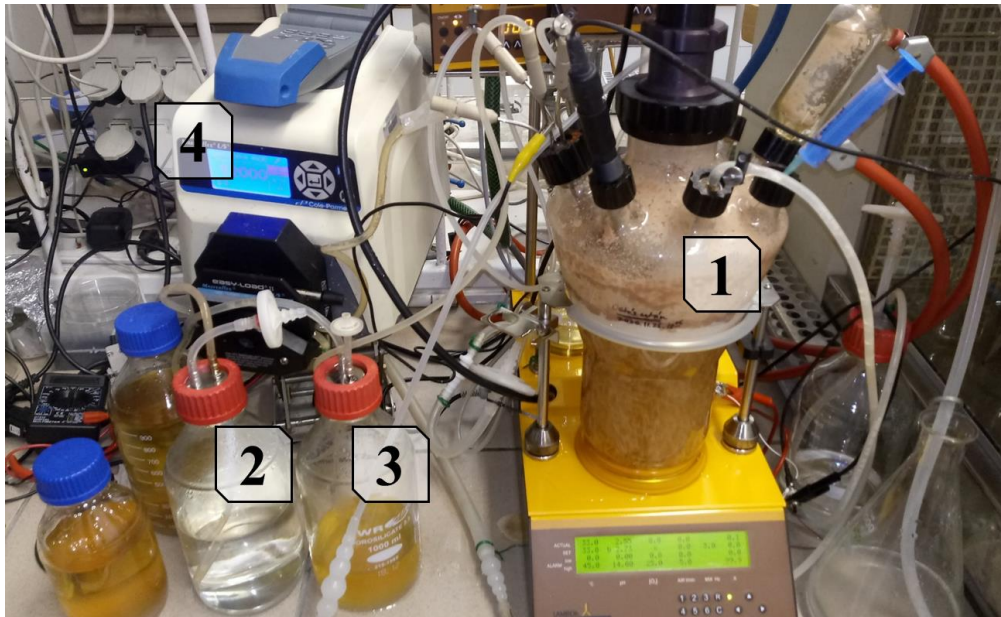
3.3.2 A fermentáció második szakasza – képződik az itakonsav

Az oxigén limitáció megszüntetése utáni öt napos adaptációs intervallumban az itakonsav koncentrációja az extracelluláris térben 20 g/l, azaz 2% fölé emelkedett, a 328. órától nézve 25-35 g/l közötti értéket vett fel. 2-2,5 % itakonsav-tartalom mellett már az elfolyó fermentlét érdemes a bipoláris elektrodialízissel végrehajtott kinyerési kísérletekhez gyűjteni, így tehát az elfolyó gyűjtő edényt 24 óránként cseréltem. A napi gyűjtött mennyiségeket az egyesítés előtt itakonsav- és glükóztartalomra nézve analizáltam (3.3.5 ábra).



3.3.5 ábra: Napi gyűjtött fermentlevek összetétele (az állandó térfogatáram miatt a mért adatok tekinthetők az adott időszak átlagos mintáinak is)

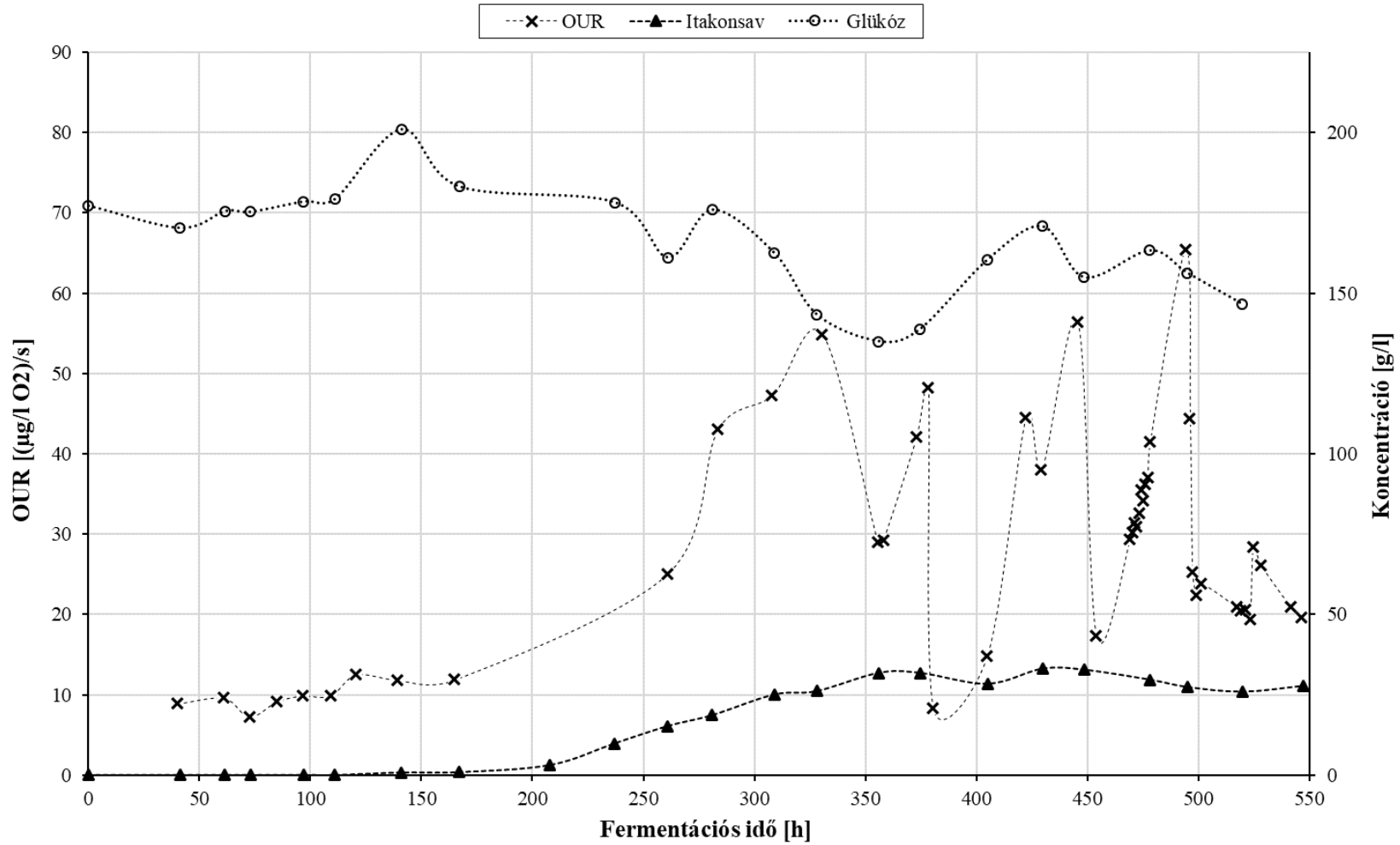
Itt fontos megjegyezni, hogy a készülék alján elhelyezett kivételi csövön keresztül az alkalmazott igen alacsony kifolyási sebesség miatt a sejtömeg nem arányosan hígult az extracelluláris térben mérhető anyagokhoz képest. Ezt jól szemlélteti a 3.3.6 ábra, amelyen a gyűjtőedény és a fermentor egymás mellett látható.



3.3.6. ábra: A folyamatos üzemű fermentáció installációja: 1. Lambda Minifor fermentor; 2. rátáp oldat edényzete; 3. elvétel oldali gyűjtőedény; 4. kétutas, precíziós perisztaltikus pumpa

A fermentáció során mért paraméterek alakulását az idő függvényében a 3.3.7 ábra mutatja. A szürke jelölőkkel feltüntetett glükózkoncentráció az egész folyamat során 120 g/l feletti volt. Az itakonsav termelés szempontjából releváns időszakban nem állt be egy kvázi egyensúlyi értékre, hanem ingadozott 130-170 g/l között. Az itakonsav jóval kiegyensúlyozottabb képet mutatott, a 300. óra körül elérte a 25 g/l értéket, és ezt követően végig efölött maradt. A maximális mért itakonsav koncentráció 33 g/l volt a 430. órai mintavételből. A 309-547 időintervallumban mért itakonsav koncentrációk átlaga a készülékben 29,0 g/l volt, ami a szakaszos méréseknél elérhetőnél jóval alacsonyabb, de a szakirodalomban szabad micéliumos folyamatos itakonsav fermentációkban elért értékeknél szignifikánsan magasabb (v. ö. a 1.2.1 táblázat értékeivel – 32. o.).

A folyamatos fermentáció során dinamikus módszerrel mértem az oxigénfelvételi sebességet. A mérés lényege, hogy a levegő/oxigén betáplálást leállítom, és 1 percig, vagy rövidebb ideig, ha kis oldott oxigén koncentrációról indultam, mértem a fogyasztás sebességét. Ennek értéke az oxigénlimitált szakaszban viszonylag kiegyensúlyozott volt, a készülék abszolút mikroba tartalma 10 µg/l oxigént vett fel másodpercenként.



3.3.7 ábra: Lambda Minifor fermentorban kivitelezett fermentáció közben mért glükóz, illetve itakonsav koncentráció és az oxigén felvételi sebesség időbeli alakulása (A 86. órától folyamatos üzem, $D=0,0075$ 1/h, a 167. órától levegő helyett tiszta oxigéngáz bevezetés.)

A tiszta oxigén bevezetését követően közel négy napig nem követtem ezt a paramétert. Amikor az itakonsav-tartalom növekedésnek indult, és elérte az ígértes 15 g/l-t, ismét végeztem légzési sebesség méréseket. Az oxigénbevezetés szüneteltetését nem tekintettem durva beavatkozásnak a fermentáció során, mivel az oldott oxigénszint nagyon magas volt végig, a 1 perc alatt nem okozhatott tartós károsodást a micéliumokban. Ezért ezeket a méréseket gyakrabban végeztem el, a tapasztaltaktól függően akár óránként.

Azt tapasztaltam, hogy éles, periodikus változások figyelhetők meg a légzési sebességben, amelyeket mérési adatok hiányában nem tudtam ugyan fajlagosítani a micéliumtömegre, de nem magyarázhatta a gomba szaporodása vagy kimosódása. A minimális periódusidő a mért hullámszám átlagából számolva 47 óra, ami 0,02 1/h frekvenciának felel meg. A légzési sebesség mért maximuma 48-65 $\mu\text{g/l}$ oxigén felvétel között mozgott másodpercenként, a minimum érték pedig 8,3-19,5 $\mu\text{g/l}$ oxigén/s tartományban, amely legalább 40%-ra való visszaesést mutat. A mérés automatizálásával lehetne megvalósítani a pontosabb monitorozást. Nem zárható ki, hogy a jelenség háttérben a gombasejtek cirkadián ritmusa és jellemző pulzáló környezetfelderítési mechanizmusai is szerepet játszanak. Az üveg fermentorban a fényviszonyok a nappal-éjszaka változásával nem állandók, és ez adhat a válaszreakciónak egy periodikus mintázatot. További lehetséges ok, hogy a mikroorganizmus állandóan magas glükózkoncentráció mellett oxigéndús környezetben van szubmerz formában. Ez az állapot olyannyira nem természetes, hogy az evolúciós alkalmazkodás során adaptált szabályozó mechanizmusok kaotikus eredménnyel működnek. Az *Aspergillus*-oknál azonosított alternatív oxigénáz rendszer is közrejátszhat a jelenség kialakulásában.

A légzési sebesség mérése dinamikus módszerrel tehát igen érdekes jelenséget tárt fel, amelynek további kutatása fontos és érdekes feladat.

3.3.3 Bipoláris elektrodiálízissel összekapcsolt rendszer

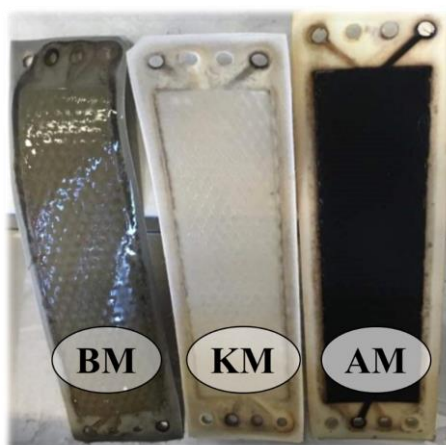
A folyamatos fermentáció 25 g/l illetve e fölötti itakonsav tartalmú napi gyűjtéseit 2 μm pórusméretű üvegszálalás mélységi szűrőlapon sejtmentesre szűrtem, és NaOH-os pH állítás után közvetlenül felhasználtuk egy kereskedelmi forgalomban kapható bipoláris-elektrodiálízis berendezésben [9]. Az egyes frakciók megjelenése a 3.3.8 ábrán látható. A diluátum az itakonsav kinyerése után 128 g/l glükózt és 1,3 g/l itakonsavat tartalmazott. Az

oldatot 10 percig 90 °C-on tartottam, hogy a nemkívánatos mikroorganizmusok számát redukáljam, majd visszahűtés után a 495. órától visszatápláltam a készülékbe. Az eredeti betápláláshoz képest (amelyben 206 g/l glükóz volt) jelentősen kevesebb glükózt tartalmazott, és az ionos tápkomponenseket sem tartalmazott. A mikroszkópos képen a beavatkozás két napja alatt a hifák elnyúltak, a mikromorfológia változásnak indult. Azonban mindez csak olyan mértékben, hogy indukálhatták a tápanyagok koncentráció-változásai is. Ezzel egyidőben az itakonsav koncentráció csökkenni kezdett, 25 g/l-ig esett vissza. Mikor ismét az eredeti rátáp oldatot adagoltam, a változások reverzibilisnek mutatkoztak, és a készülékben ismét növekedésnek indult az itakonsav koncentrációja.



3.3.8 ábra: Bipoláris elektrodialízis folyadékágai, balról jobbra: eredeti sejtmentesített fermentlé, művelet utáni itakonsav-oldat, művelet utáni lúg-oldat, diluátum

A bipoláris-elektrodialízis membránjai közül az anioncserélő membrán nagyon elszíneződött (3.3.9 ábra), a sötét lerakódás a heterogén polimer membrán anyagába is bediffundált. Több szakaszos művelet után kis mennyiségben a sav tartamú koncentrátum is enyhén színeződött.

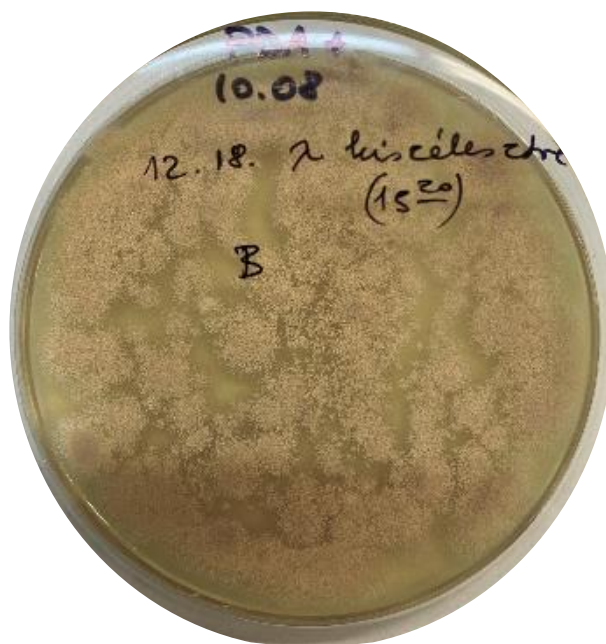


3.3.9 ábra: A bipoláris elektrodialízis készülék membránjai a valódi fermentlével végzett feldolgozás után:
BM – bipoláris membrán, KM – kationcserélő membrán, AM – anioncserélő membrán

A kinyerési eljárással tisztított itakonsav oldat minőségét hosszabb távon befolyásolja, hogy a fermentlé milyen színanyagokat tartalmaz az itakonsav mellett. Az első valódi fermentlével végzett kísérletekben még víztiszta savoldatot nyertünk, azonban néhány ciklus után enyhe sárgás színeződést tapasztaltunk, amelyet valószínűleg egy melléktermék okozott, amely átjutott az anioncserélő membránon.

Az ED-BPM kinyerésből visszavezetett tápoldat kiegészítés nélkül rontott a folyamat hatékonyságán, azonban nem okozott visszafordíthatatlan és szokatlan degeneratív változásokat, ezért mindenképp tovább kell vizsgálni, hogy milyen tápanyag kiegészítéssel lehet a negatív hatást kompenzálni.

A hosszú pH szabályozás nélküli fermentációs kísérlet során a sterilitást biztonsággal fenn tudtam tartani. Ehhez szükség volt arra, hogy a fermentáció steril körülmények között induljon, és zavarás nélkül kifejlődhessen a micélium. A végső mintában mikroszkóp alatt nem láttam idegen mikroorganizmust. A minta felületi szélesztésekor idegen mikroorganizmus-telep nem képződött a burgonya-glükóz agaron, csak a célorganizmusra jellemző fahéjszínű telepek fejlődtek (3.3.10 ábra).



3.3.10 ábra: A folyamatos fermentáció kiszélesztett mintája a 23. napon

A készülékben a bulk mennyiségének pontos meghatározása nagyon fontos lenne ahhoz, hogy megbízható hozam- és produktivitás számításokat lehessen végezni. A kísérletet értékelhetőségét végig limitálta a nagyon kis térfogat. A sejtömeg meghatározás aggregálódás és pelletképzés esetén már nem lehetséges, a még kivehető mintatérfogat nem

volt reprezentatív. De összességében megállapítható, hogy a folytonos rendszer megvalósítható, és kis hígítási sebesség mellett magasabb termékkoncentráció érhető el a szakirodalomban fellelhető folyamatos itakonsav-fermentációkkal összehasonlítva.

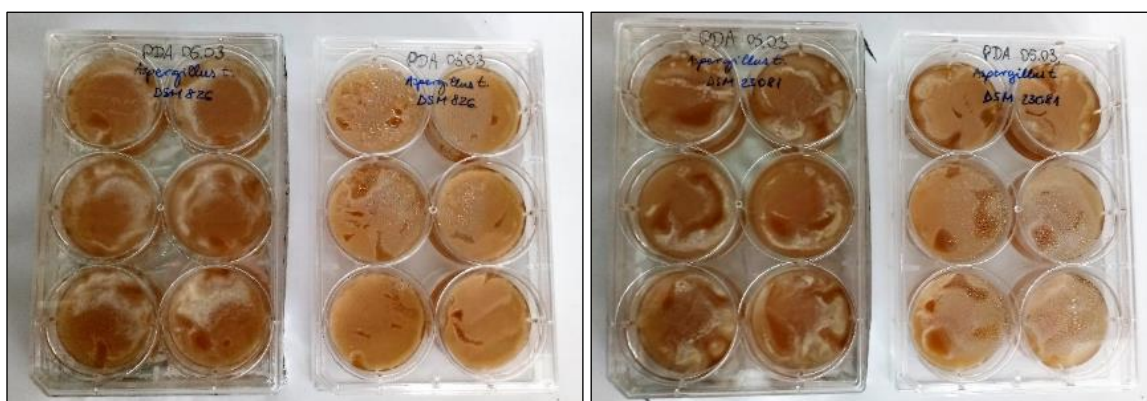
3.4 A fehér fénytel történő megvilágítás hatása az itakonsav túltermelő *Aspergillus terreus*-gombára

3.4.1 A fehér fény hatása a spóráképződésre

Azok a gombák, melyek evolúciós fejlődésének meghatározó része a talajban ment végbe, kifejlesztettek olyan módszereket, melyekkel a környező fényt érzékelné tudják. Egyes fajok cirkadián (nappal-éjszaka) ritmussal is rendelkeznek. A fény azt is jelezheti, hogy a levegőbe érve a konidiospórákat a szél szét tudja szórni. A két rendelkezésemre álló szubszpeciest megvizsgáltam, hogy állandó megvilágítás hatására változik-e a termelt konidiospórák száma.

Elsőként komplex tápanyagokban gazdag burgonya-glükóz agaron vizsgáltam a megvilágítás hatását. Azonos felületű szilárd tápközegeket oltottam le 100-100 µl spóraszuszpenzióval (DSM826 esetén $1,13 \times 10^8$ db/ml, DSM23081 esetén $9,92 \times 10^7$ db/ml). A leoltott lemezeket – törzsenként és beállításonként 6-6 párhuzamost – 33°C-on inkubáltam, 1 héten keresztül. A fényen inkubált beállításonként folyamatosan 70 lux megvilágítást alkalmaztam. Az inkubációs idő leteltével azonos mennyiségű fiziológias sóoldattal mostam le a spórákat minden lemezről, majd megfelelő hígítás után Bürker-kamrával meghatároztam a spóraszámokat.

A tenyészetek makroszkópikus megjelenése a fényviszonyoktól függően eltérő volt mindkét törzs esetén, a fényben inkubált lemezeket egyenletes, bársonyos barna bevonat fedte (3.4.1 ábra).



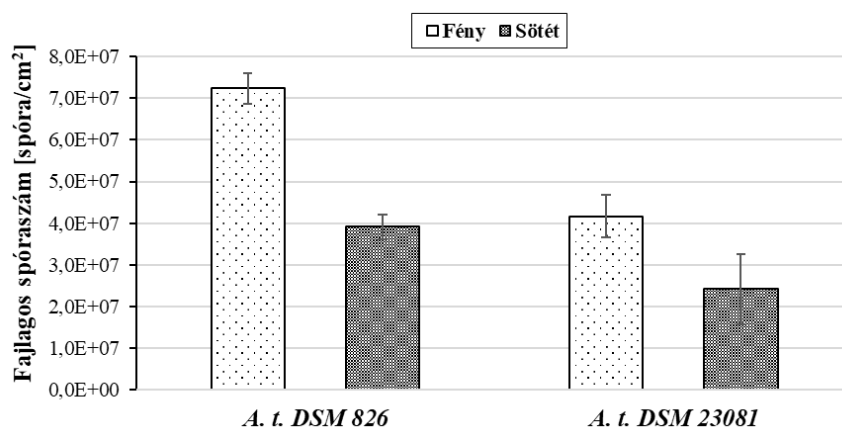
3.4.1 ábra: Szilárd tenyészetek megjelenése egy hét inkubáció után, balra az *A. terreus* DSM826, jobbra az *A. terreus* DSM23081 sötétben illetve fényben nevelt tenyészetei

A két itakonsav túltermelő szubszpeciesz eltérően reagált a megvilágításra. A fajlagos spóraszám-meghatározás eredményeit a STATISTICA programban értékeltem, variancia analízissel (one-way anova, F-próba). A megvilágítás hatását vizsgálva azt találtam, hogy mindkét mikroorganizmus esetén szignifikáns (a DSM826 esetén $p = 0,000002$, a DSM23081 esetén $p=0,018$) az egységnyi szilárd felületen képződő spórák számában tapasztalható eltérés. A két törzsre kapott eredményeket együttesen kezelve a Tukey-teszt alapján csak a sötétben nevelt DSM826 és a megvilágítás mellett nevelt DSM23081 tenyészetekre mért eredmények nem különböznek szignifikánsan (3.4.1 táblázat).

3.4.1 táblázat: A különböző beállítások közötti különbségek vizsgálata Tukey-teszttel (a dőlt és vastagon szedett, $p < 0,05$ értékeket szignifikánsnak tekintettem)

Kísérleti elrendezés	A. t. DSM23081 + Sötét	A. t. DSM23081 + Fény	A. t. DSM826 + Sötét	A. t. DSM826 + Fény
A. t. DSM 23081 + Sötét		<i>0.01861</i>	<i>0.04644</i>	<i>0.00018</i>
A. t. DSM 23081 + Fény	<i>0.01861</i>		0.97221	<i>0.00018</i>
A. t. DSM826 + Sötét	<i>0.04644</i>	0.97221		<i>0.00018</i>
A. t. DSM826 + Fény	<i>0.00018</i>	<i>0.00018</i>	<i>0.00018</i>	

A fény hatására tehát több konidiospóra képződött a komplex tápanyag tartamú burgonya-dextróz agaron mindkét törzs esetén. Az eredményeket egységnyi agarfelületre számítva adtam meg, és a 3.4.2 ábra szemlélteti.

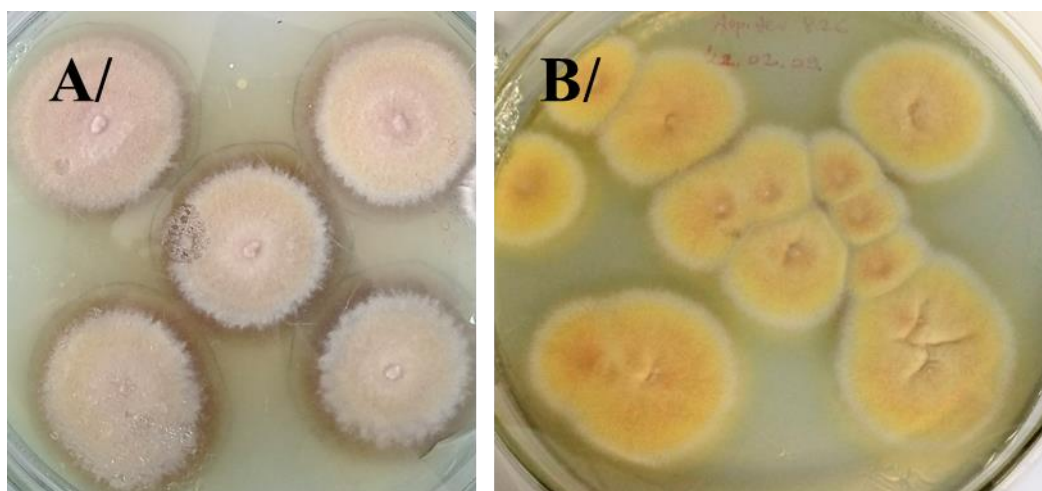


3.4.2 ábra: Burgonya-glükóz agaron képződött konidiospóra-számok (a standard hiba feltüntetésével) a két hatékony itakonsav-túltermelő *Aspergillus terreus* szubszpeciesz esetén

Az ábrán jól látható, hogy a DSM826 törzs spóráképzésére erőteljesebb serkentő hatást gyakorol a folytonos megvilágítás, mint a másik törzs esetén, és mindkét esetben növekedett az egységnyi felületen képződött spórák száma a megvilágítás hatására.

A DSM826 törzs esetén a megvilágítás spóráképzésre gyakorolt serkentő hatása a konídium-alapú oltóanyag előállítás során jól kihasználható, mivel kevesebb mennyiségű szilárd tápközegről gyűjthető a szükséges mennyiségű konídium.

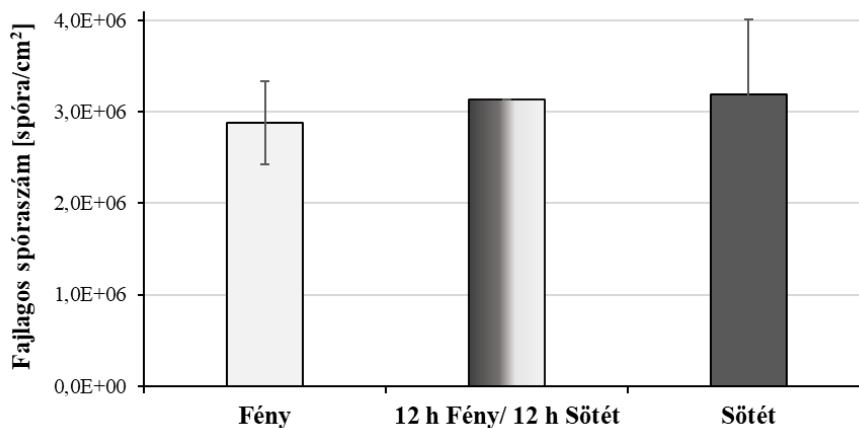
A törzs pontleoltással készült telepei Czapek-Dox agaron is jelentősen különböző formát öltöttek (3.4.3 ábra), a fényben növekvő kolóniák egységesen kör alakban növekedtek, és méretük is egyforma volt, míg a sötétben a növekedés szabálytalan telepformákat hozott létre.



3.4.3 ábra: DSM826 pontleoltással készített telepei Czapek-Dox agaron, 1 hét inkubációs idő után, A/ fényben inkubált tenyészet; B/ sötétben inkubált tenyészet

Megvizsgáltam, hogy a DSM826 törzsnél tapasztalt intenzívebb spóráképzés a a Czapek-Dox agaron is tapasztalható-e. A burgonya-glükózhoz képest ez a tápoldat kizárólag kémiaiailag jól definiált anyagokat tartalmaz, csak szerves formában tartalmaz nitrogént, a szénforrás pedig szacharóz benne.

A vizsgálat eredményét a 3.4.4 ábra mutatja. A közepső, ismétlés nélküli pont a nappal-éjszaka váltakozó megvilágítás melletti tenyésztés eredményét mutatja.



3.4.4 ábra: Czapek-Dox agaron mért, felületre fajlagosított spóraszámok a standard hiba feltüntetésével

Az eredményeket a STATISTICA programban is kiértékeltem, ez alapján ezen a tápközegen nincsen szignifikáns eltérés a felületegységenként kialakuló spóraszámok között a különböző megvilágítási beállítások mellett (3.4.2 táblázat). Elképzelhető, hogy a Bürker-kamrás spóraszámlálás saját hibája elfedi a különbséget, mely igen csekély.

3.4.2 táblázat: A nem egyenlő ismétlésszámú adatok kiértékelésére alkalmas Tukey-teszt eredménye Czapek-Dox agaron

Megvilágítás	A. t. DSM826 + Sötét	A. t. DSM826 + Fény/Sötét	A. t. DSM826 + Sötét
A. t. DSM826 + Sötét		0.99811	0.84462
A. t. DSM826 + Fény/Sötét	0.99811		0.96194
A. t. DSM826 + Sötét	0.84462	0.96194	

A kísérlet az előzőhöz hasonlóan 1 hét inkubációs ideig zajlott, azonos hőmérsékleten és fényerő mellett. A legmagasabb mért spóraszám $4,0 \cdot 10^6$ db spóra/cm² agarfelületnek adódott, ami a PGA tápközegen, ugyancsak ennél a törzsnél mért $7,6 \cdot 10^7$ db spóra/cm²-nek mindössze 19-ed része. Így megállapítható, hogy a Czapek-Dox agaron lényegesen lassúbb a spóráképződés – amint az a komplex táptalajkomponensek hiányában várható volt –, mint a burgonya-dextróz agaron. Ez a különbség eléri az egy nagyságrendet. A hatékony oltóanyag-előállításához tehát alkalmasabb a komplex burgonya-dextróz táptalaj, mint a szintetikus Czapek-Dox.

3.4.2 A különböző fényviszonyoknál nyert inokulumok itakonsav termelésének összevetése

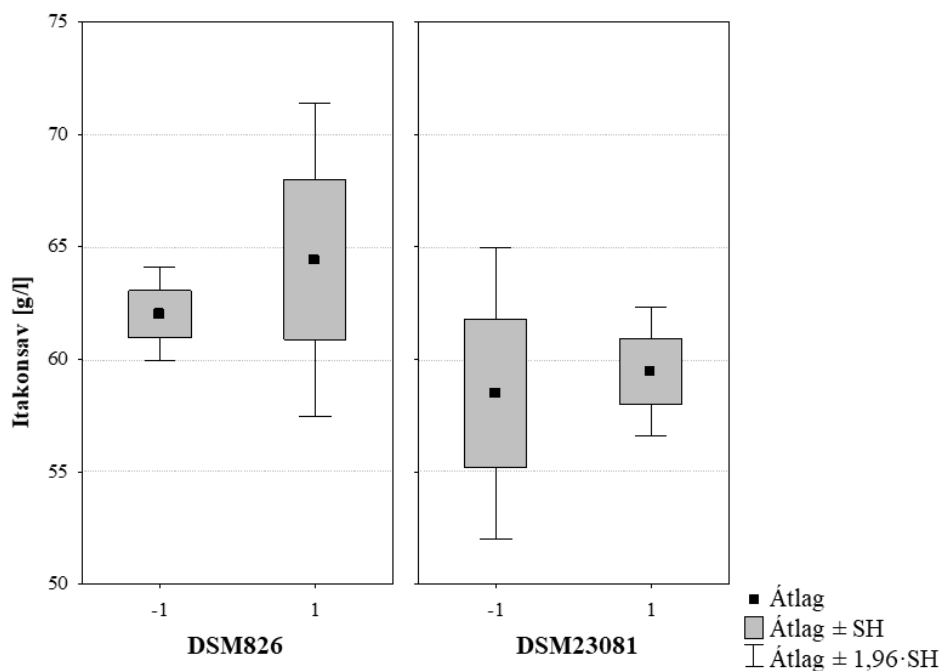
A fényben, illetve sötétben inkubált, komplex táptalajon nevelt tenyészetekről nyert spóraszuszpenziókat felhasználtam rázott lombikos fermentációkban annak vizsgálatára, hogy tapasztalható-e különbség az itakonsav termelésben.

A vizsgálat szükségességét az indokolja, hogy a konidiospóra képződését igen bonyolult szabályozási mechanizmusok koordinálják. A konídium érési folyamatának zavartalansága garantálja az életképességet. Az állandó megvilágítás mesterséges környezet az élőlények számára, így nem kizárható, hogy negatívan befolyásolja a képződött spórák életképességét, vagy a kifejlődő micélium metabolikus aktivitását. Bár szignifikánsan nagyobb számú konidiospóra képződött egységnyi felületen, az életképességről a spóraszám meghatározására alkalmazott Bürker-kamrás eljárás nem ad információt.

A kísérlethez 5-5 szuszpenziót használtam fel, és a Bürker-kamrával meghatározott spórakoncentrációk alapján a legalacsonyabbnak mérthez hígítottam minden szuszpenziót fiziológiás sóoldattal, biztosítva, hogy az esetleges oltásbéli különbségek ne befolyásolják a kísérlet eredményét.

Minden különböző beállítást (törzs + konídium előállítás fényviszonyai) 5-5 párhuzamos lombikban vizsgáltam. A statisztikailag kiértékelt eredményeket a 3.4.5 ábrán szemléltettem. Az itakonsav-képződésre nem volt szignifikáns hatása az oltóanyagként nyert spórák előállítási körülményeinek. Továbbá érdekes megfigyelés, hogy a két törzs hatékonysága között sem volt statisztikailag igazolható különbség.

Az egy hetes fermentációk alatt a lombikokban a glükóz elfogyott, így a termékhozamra is vonatkoztatható, hogy nincs szignifikáns hatása az alkalmazott oltóanyagoknak.



3.4.5 ábra: Különböző fényviszonyok között nevelt konídium-szuspenziókkal végzett 1 hetes rázott lombikos kísérlet eredménye (SH: standard hiba)

A fermentációs kísérlet eredményei alapján megállítható, hogy a fermentáció oltásához szükséges konídium alapú inokulum előállításánál hasznosítható a fény serkentő hatása, mivel ez a paraméter nem befolyásolja negatívan a képződő itakonsav mennyiséget.







3.4.3 Redukált kísérleti terv a fény és az itakonsav hatásának vizsgálatára

Az itakonsav nem egyértelműen primer metabolit, a fermentációban késleltetve jelenik meg, és a termelő mikroorganizmus akkor is életképes, ha nem képződik. Az itakonsav termelés célja és szelekciós előnye nem tisztázott egyelőre. A szakirodalomban ellentmondásos adatok érhetők el az itakonsav gátló hatásáról a termelő törzsre nézve. A félfolyamatos és folyamatos kísérleteknél én is szembesültem a gátló hatással. Ezért egy redukált kísérleti tervet alkalmazva megvizsgáltam a kiindulási itakonsav hatását a DSM826 törzsre.

A látható fény a talajeredetű gombák fejlődési formáinak alakulására és szekunder metabolit termelésére is hatással lehet. Ez a hatás bonyolult szabályozási mechanizmusokon

keresztül valósul meg, melyek alakulásában fotoreaktív molekulák felelősek a fény érzékeléséért.

Feltételezve, hogy az itakonsav képződésére is mérhető hatással van a megvilágítás, a 3.4.6 ábrán látható kísérleti tervben második független változóként a fényviszonyokat változtattam.

		<i>Tápanyag kiindulási itakonsav tartalma [g/L]</i>		
		0	15	30
Fényviszonyok	Sötét			
	Folyamatos megvilágítás			

3.4.6 ábra: Kísérleti elrendezés a fényviszonyok és a kiindulási itakonsav-tartalom fermentációra gyakorolt hatásának vizsgálatára

A kísérletben nyolc rázott lombikos fermentációt indítottam. A kiindulási itakonsav-tartalom 0-30 g/l között változott, az alkalmazott fényviszonyok pedig a teljes sötét és a folyamatos megvilágítás volt (3.4.7 ábra).



3.4.7 ábra: rázott lombikok, balra a teljes sötétséget biztosító csomagolással ellátott lombik

A kísérletben a pH-állításhoz ammónium-hidroxid oldatot használtam, így kémiailag az itakonsav-tartalom mellett az ammónium-ion koncentrációjában volt eltérés az egyes lombikok között. Mivel a tápoldat nem nitrogén-, hanem foszfát-limitált körülményeket biztosít a termelő törzs számára, a sejteken kívüli térben elsőként a foszfát ionok koncentrációja csökken le közel 0-ra. Ezután jelentősen lelassul az ammónium- és nitrát-ionok felhasználása. Feltételeztem, hogy a többlet ammónium-ion hatása elhanyagolható a bemért itakonsav hatásával szemben, míg a jelentős pH-eltérés önmagában hatással lett volna a lombikos fermentációk lefutására, így ezt el kellett kerülni.

A kísérlet során csak a kiindulási- és a végpontban végeztem analitikai méréseket. A kísérletet 1 hét inkubáció után állítottam le. Mértem glükóz-, itakonsav-, száraz sejt-tömeg-tartalmat, a pH-t, valamint mikroszkóp alatt vizsgáltam a kialakult jellemző morfológiát. A 2 faktoros kísérleti terv középpontján párhuzamos beállításokat is vizsgáltam. A mért értékek abszolút tömegek, amelyek az egyes lombikokban képződtek/fogytak.

A 3.4.3 táblázatban feltüntettem a mért eredményeket, amelyeket statisztikai kiértékelés alá vontam a szignifikáns hatások megállapításához.

3.4.3 táblázat: Az előkísérletben mért glükózfogyasztási, itakonsav- (IS), és sejt-tömeg-képződési (DMW) adatok, az ezekből számolt hozamok és a pH alakulása, (a hasznos térfogat minden lombikban 100 ml volt)

Lombik sorszáma	$m_{IS,0}$	Δm_{IS}	$\Delta m_{glükóz}$	glükóz felhasználás 1 hét alatt	$x_{végső}$	$Y_{DMW/glükóz}$	$Y_{IS/glükóz}$	$Y_{IS/glükóz}^m$	pH ₀	pH _{végső}}
	[g]	[g]	[g]	[%]	[g]	[g/g]	[g/g]	[mol/mol]	[-]	[-]
1 (sötét)	0,00	3,24	9,36	69,8	0,78	0,084	0,35	0,48	3,16	2,00
2 (fény)	0,00	3,64	9,43	70,3	0,85	0,090	0,39	0,53	3,13	2,10
3 (sötét)	3,00	1,90	6,25	46,6	2,21	0,353	0,30	0,42	2,99	2,60
4 (fény)	2,95	2,88	6,87	51,1	1,32	0,193	0,42	0,58	2,95	2,44
5 (sötét)	1,60	1,93	7,33	53,7	1,05	0,143	0,26	0,37	2,96	2,33
7 (sötét)	1,61	2,95	8,88	64,4	0,87	0,098	0,33	0,46	2,98	2,33
6 (fény)	1,61	3,05	9,59	71,2	0,99	0,103	0,32	0,44	2,99	2,31
8 (fény)	1,62	3,30	9,70	70,4	0,91	0,094	0,34	0,47	2,97	2,34

A kísérleti elrendezés statisztikai kiértékelése lehetővé teszi a két független paraméter kereszt hatásának feltárását is.

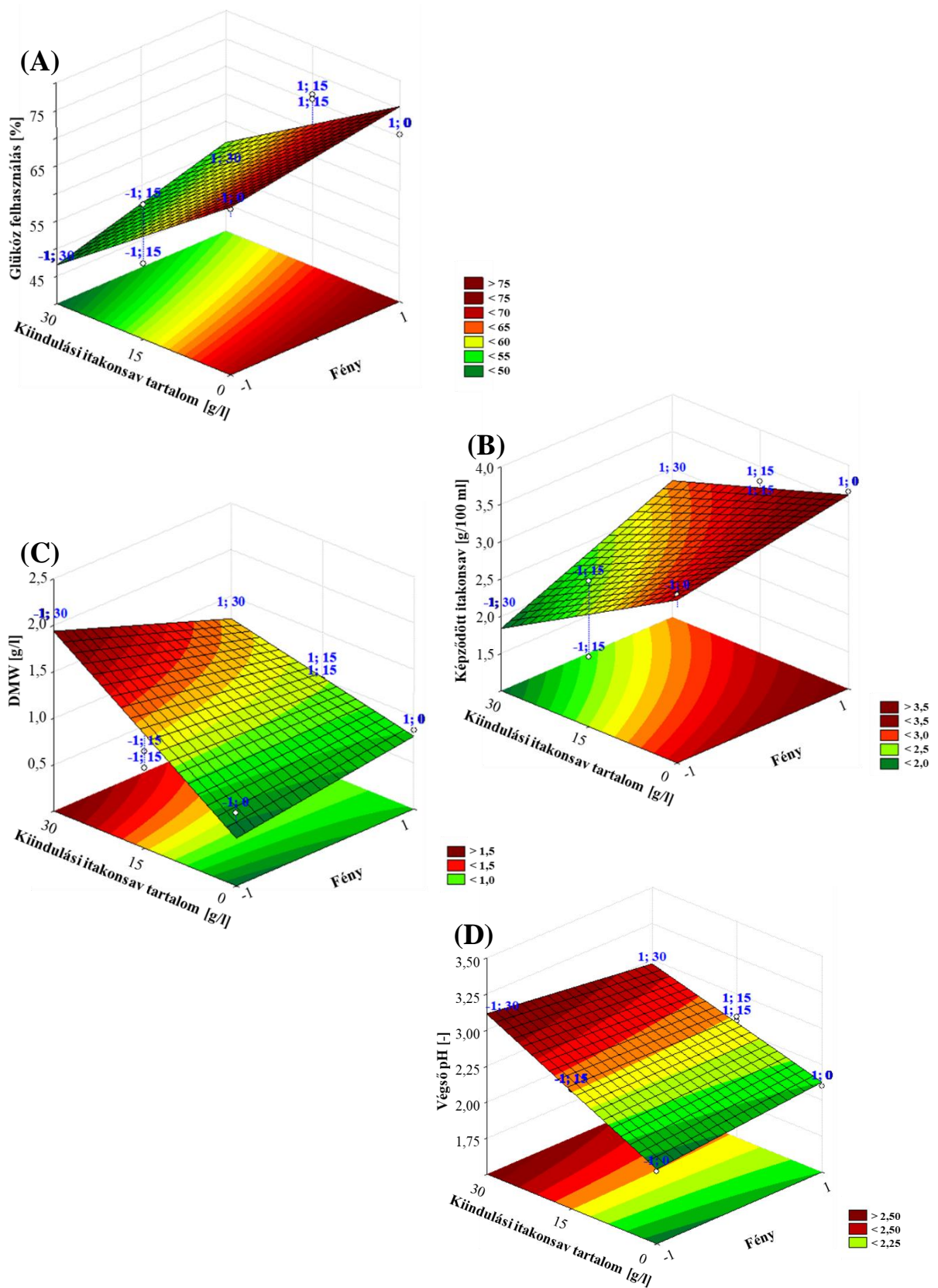
A kiindulási itakonsav-tartalom az itakonsav-hozamon kívül minden paraméterre szignifikáns hatást gyakorolt. A fényviszonyok változtatása önmagában nem mutatott szignifikáns hatást a vizsgált paraméterekre, bár éppen az itakonsav-képződés esetén megközelítette. A kereszt hatás a fermentálé végső pH-értékére mutatott szignifikáns hatást. Egyszempontú varianciaanalízist végeztem (F-próba/statisztika), a p-értékek a 3.4.4 táblázatban találhatóak (p < 0,05 esetén szignifikánsnak tekintettem a hatást).

3.4.4 táblázat:, a p-értékek a kísérleti elrendezés statisztikai értékelése alapján (a félkövéren kiemelt értékeket tekintettem szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$)

<i>Független változók</i>	Itakonsav-képződés	Glükóz-felhasználás	Sejttömeg-képződés	Végző pH	Termékhozam
<i>Kiindulási itakonsav-tartalom</i>	<i>p=0,047</i>	<i>p=0,034</i>	<i>p=0,041</i>	<i>p=0,00004</i>	p=0,874
<i>Fényviszonyok</i>	p=0,057	p=0,209	p=0,434	p=0,483	p=0,185
<i>Kereszthatás</i>	p=0,478	p=0,744	p=0,210	<i>p=0,007</i>	p=0,483

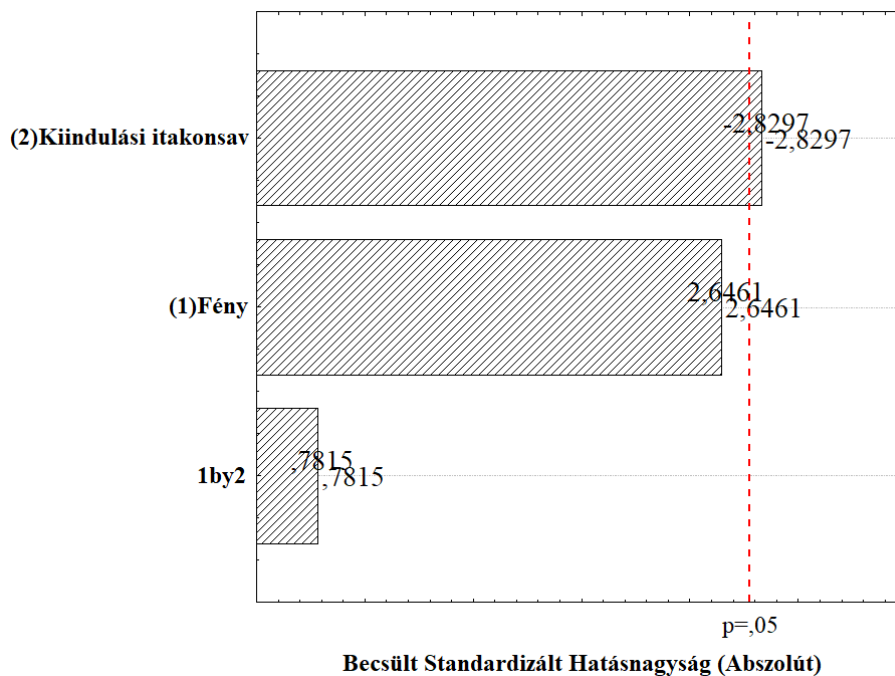
A hatás irányának szemléltetésére alkalmasak a mérési pontokra illesztett felületek, melyek a 3.4.9 ábrán láthatók.

A glükóz felhasználás lassul a kiindulási itakonsav-tartalom hatására, ezzel összhangban az itakonsav képződése is lelassul a kiindulási itakonsav-tartalom hatására. Ez az eredmény alátámasztja, hogy termékgátlás lép fel, legalábbis a vizsgált koncentráció tartományban. A sejttömeg intenzívebb növekedése figyelhető meg a kiindulási itakonsav-tartalom hatására. A kísérleti terv egy kereszthatásra is rámutat a nem szabályozott pH paraméter esetén: az 1 hetes fermentáció végén kialakult pH magasabb értéket vesz fel a kiindulási itakonsav-tartalom hatására, megvilágítás hatására azonban szignifikánsan kisebb mértékű a kiindulási itakonsav-tartalom hatása. A tenyészet itakonsav termelési képességét jelentősen befolyásolja, hogy a fermentáció első szakaszában 2 alá csökken-e a pH érték, így ennek a hatásnak jelentősége van.



3.4.9 ábra: Illesztett felület-ábrák a hatások irányának szemléltetésére, (A) a glükóz felhasználásra; (B) az itakonsav képződésre; (C) a sejttömeg alakulására; (D) kialakuló pH értékre

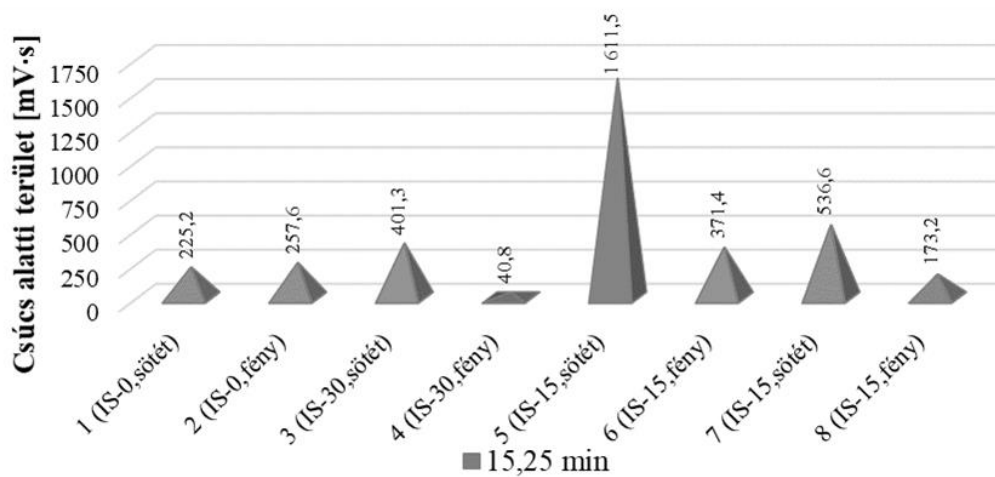
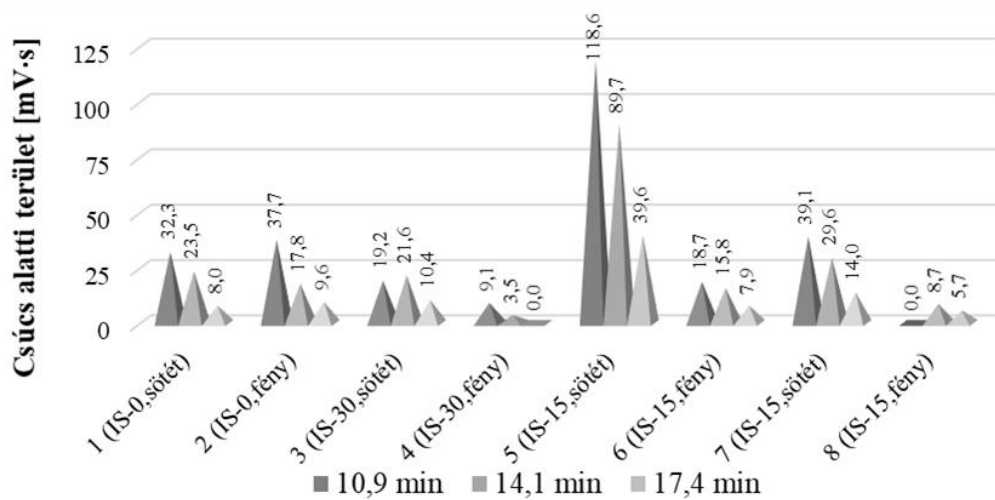
A képződő itakonsav mennyiségére a megvilágítás hatása ugyan nem szignifikánsnak adódott a statisztikai értékelés alapján, azonban nagyon megközelíti. Több ismétléssel lehet tisztázni, hogy a hatás valóban nem szignifikáns-e (3.4.10 ábra).



3.4.10 ábra: Kiindulási itakonsav és megvilágítás hatás-kereszthatás $\alpha = 0,95$ konfidenciaszinten

Egy pillantást vetve az egyes kísérleti beállításokra a leállításkor (3.4.11 ábra), nyilvánvaló, hogy a tenyészet színét adó metabolitok termelődésére is együttesen hat a kezdeti itakonsav-tartalom és a megvilágítás. Az 1. és 2. lombikban kiinduláskor 0 g/l itakonsav volt, ezek színe alig különbözik az eltérő megvilágítás ellenére, míg a többi esetben a páros számú, folyamatos megvilágításnak kitett lombikok fakóbb színűek a páratlan, sötétben nevelt párjuknál.

Ennek számszerűsítése nehézkes, ugyanis az *Aspergillus terreus* törzsek többféle színes metabolittal rendelkeznek. A BioRad Aminex HPX-87H HPLC oszlopon a glükózon kívül más, jellemzően fermentációs metabolitokat is meg lehet határozni. A készülékhez csatolt UV detektoron 254 nm-en mértem a komponensek jeleit. A végső mintákban jellemző retenciós idejű csúcsok jelennek meg a tápoldatban a fermentáció végére, az itakonsav 11,8 perces retenciós idővel eluálódik, azonban az alkalmazott hígításban a jel olyan nagy, hogy az itakonsav csúcs nem értékelhető ezekből a mérésekből.

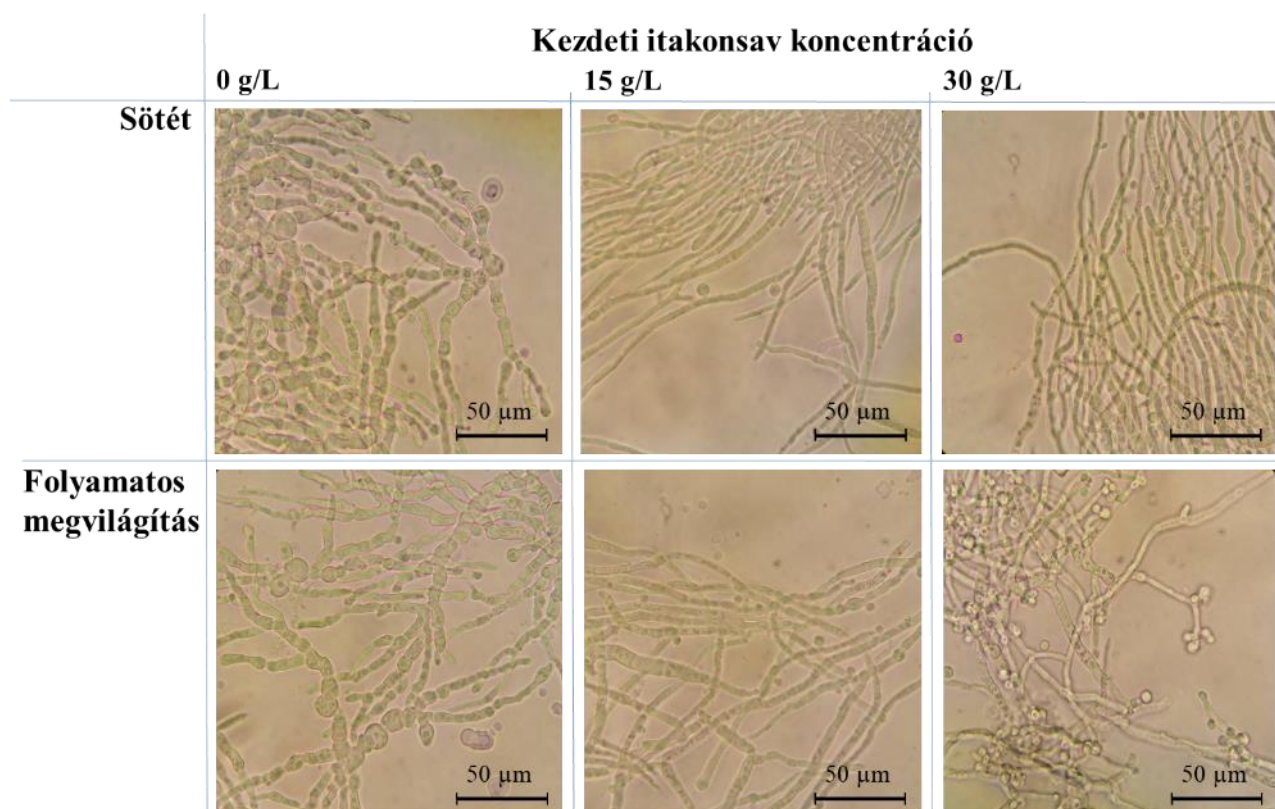


3.4.11 ábra: Fermentációs lombikok a kísérlet végén, közepén és alul HPLC-n eluálódó metabolitok csúcsterülete UV = 254 nm detektálással (IS – itakonsav koncentráció az indulásnál)

Az itakonsavat, mint terméket tartalmazó szűrt fermentlé tulajdonságai meghatározzák a terméktisztítás követelményeit. A színanyagok képződésének visszaszorítása előnyös lehet a felhasznált berendezések élettartalma szempontjából (pl. membrános koncentráció vagy fázisváltó művelet esetén a polimer membránok felületén ezek az anyagok jelentős

elszíneződést okoznak – ld. 3.3.9 ábra), és a szükséges tisztítási lépések száma is minimalizálható. Ennek megfelelően a jelenséget a későbbiekben tovább vizsgáltam.

A mikroszkópos morfológiai vizsgálat során jelentős eltérések adódtak a kiindulási itakonsav-koncentráció függvényében (3.4.12 ábra). Az itakonsavat nem tartalmazó lombikok esetén nincs jelentős különbség az eltérő fényviszonyok hatására, azonban az itakonsav jelenlétében vékonyabb, hosszabb fonalas sejttömeg képződik, és a képződő spórák számában mutatkozik meg a megvilágítás hatása. A 30 g/l kezdeti itakonsav-tartalmú, megvilágított lombikban egyértelműen jelentős konidiáció zajlott, azaz viszonylag rövid fonalnövekedés után apikális spórák jelentek meg. Szubmerz fermentációban, 30 g/l kezdeti itakonsav tartalom esetén tehát szintén megfigyelhető konidiáció-serkentés a fény hatására, hasonlóan a komplex szilárd tápközegen végzett kísérletek tapasztalataihoz.



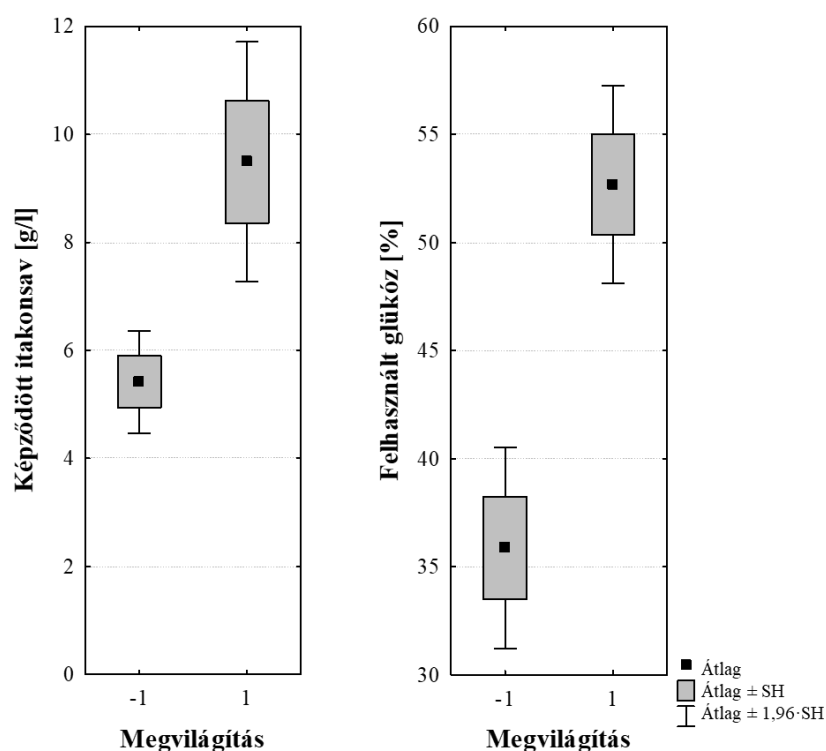
3.4.12 ábra: A különböző kísérleti beállításokhoz adódott jellemző mikromorfológia

Az itakonsavat eleve tartalmazó lombikokban a fermentáció leállításakor jelentősen meghaladja az itakonsav koncentrációja a 30 g/l-t, míg a 0 g/l itakonsav beállítások a folyamat végén alig haladták meg azt. A kísérleti terv statisztikai értékelése a kezdetben adagolt itakonsav szignifikáns gátló hatását mutatta a további itakonsav képződésre. A

párhuzamos 15 g/l itakonsav-tartalmú lombikokban azonban olyan nagy szórást mutatott a képződő itakonsav mennyiség, a felhasznált glükóz és a kialakuló sejtömeg (3.4.3 táblázat), amely indokolja, hogy további, nagyobb ismétlésszámú vizsgálatokkal ezt a hatást igazoljuk.

3.4.4 Végponti vizsgálat emelt ismétlésszámban – megvilágítás hatása

Annak igazolására, hogy a redukált kísérleti tervben tapasztalt feltűnően szintelen tényészet nem egy mérési hiba, 5-5 párhuzamos lombikban vizsgáltam a 30 g/l koncentrációban alkalmazott itakonsav hatását. Öt kísérleti lombikot sötétben inkubáltam, ötöt pedig 70 lux megvilágításban. A kísérlet egy hétig tartott. A leállítás után megmértem a képződött sejtömeget, és a sejtmentes fermentlé itakonsav- és glükóztartalmát. Az eredményeket a Statistica programban értékeltem.

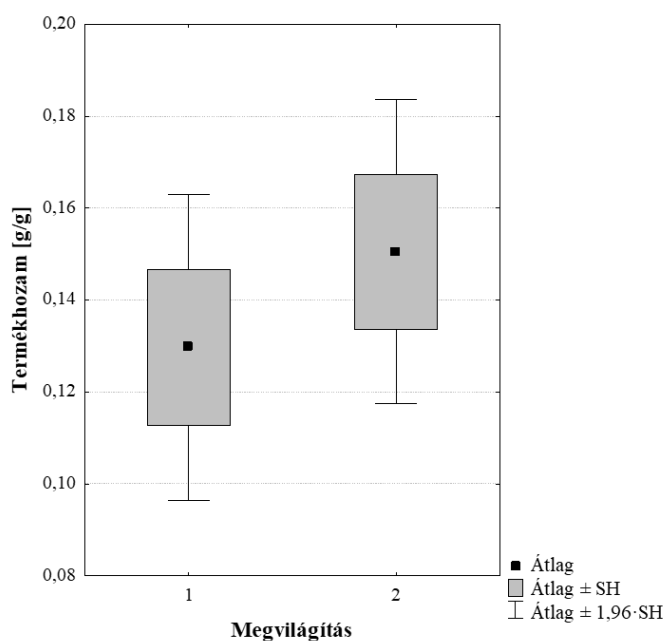


3.4.13 ábra: Az itakonsav képződés és a glükózfelhasználás összehasonlítása a sötét (-1) illetve a megvilágított (1) beállításokban

A független változó ezúttal csak a megvilágítás hiánya (-1) vagy megléte (1) volt.

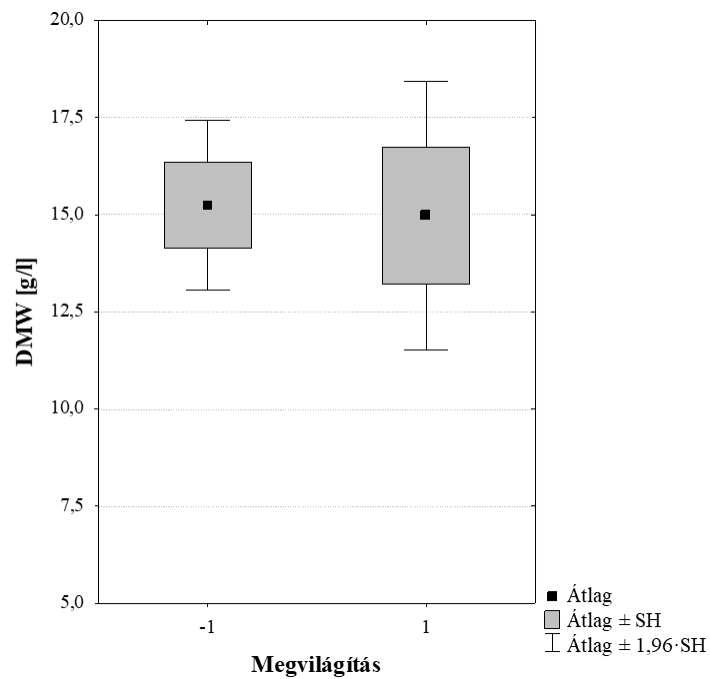
30 g/l kiindulási itakonsav-tartalom mellett a további itakonsav képződés megvilágítás mellett szignifikánsan nagyobb volumenű, mint a sötét beállítás esetén, csakúgy, mint a glükóz felhasználása (3.4.13 ábra).

Az itakonsav-képződés és a glükóz-felhasználás olyan mértékben változik, hogy a termékhozam esetén nincs szignifikáns különbség a megvilágítás hatására (3.4.14 ábra), tehát a megvilágítás a folyamat sebességére van elsősorban hatással, nem a metabolikus sztöchiometriájára.



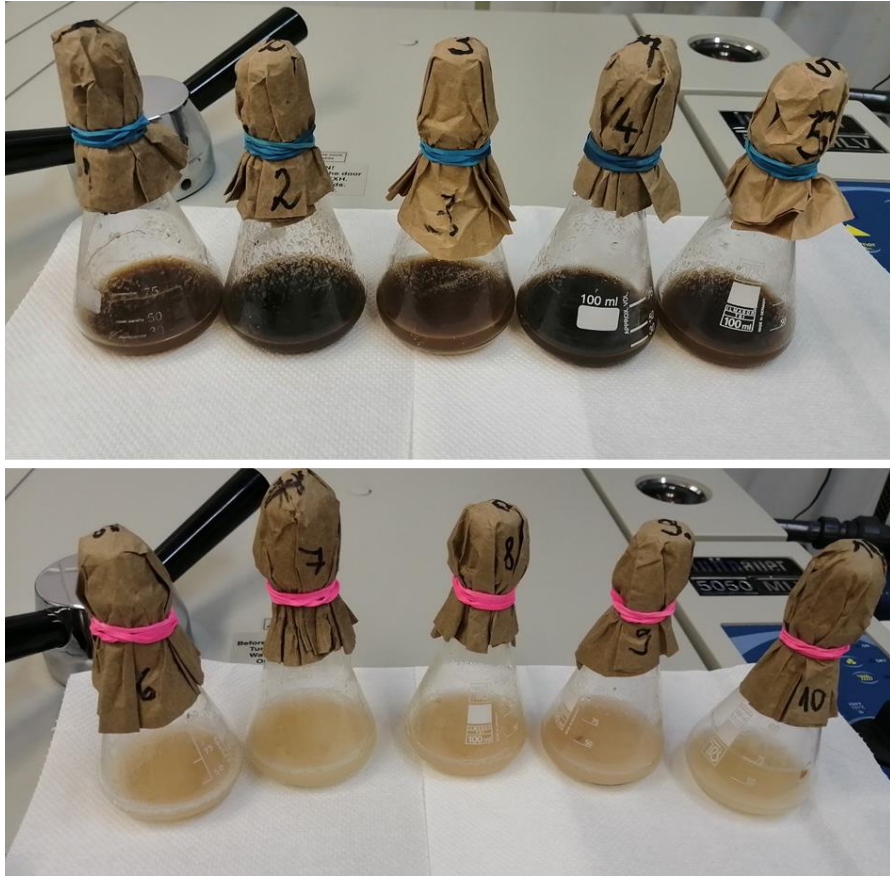
3.4.14 ábra: Termékhozamok a sötét illetve a megvilágított beállításban

A képződő sejtömeg mennyiségére sincs szignifikáns hatással a megvilágítás (3.4.15 ábra), ami szintén alátámasztja, hogy a fény hatására nem változik a glükóz metabolikus útja.



3.4.15 ábra: Képződött száraz sejtömeg koncentrációk a sötét illetve a megvilágított beállításokban

A színanyagok képződése megvilágítás mellett jelentősen visszaszorul, amint az a 3.4.16 és 3.4.17 ábrán jól megfigyelhető. Az utóbbiból látható, hogy nem csak a sejtömeg pigmentáltsága változik, de az extracelluláris térbe kiválasztott metabolitok is.

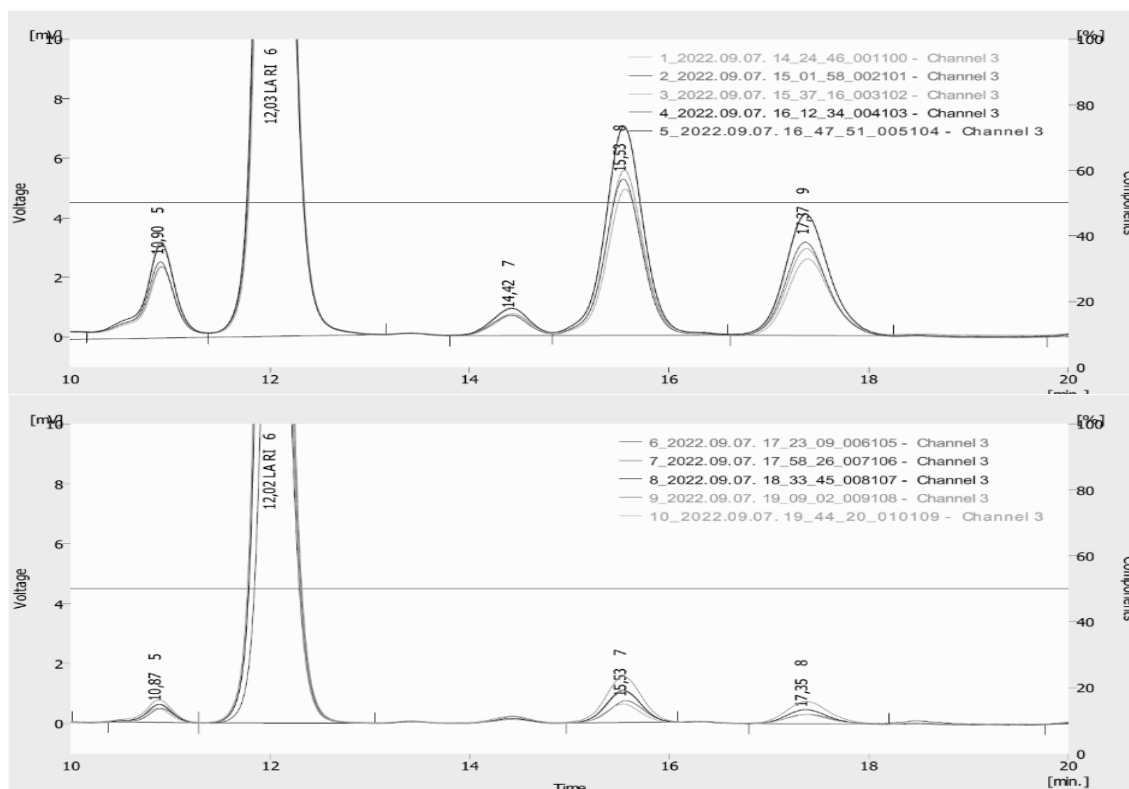


3.4.16 ábra: Felül a sötétben, alul az állandó megvilágítás mellett inkubált lombikok, kiindulásként már tartalmaztak 30 g/l itakonsavat



3.4.17 ábra: Sötétben illetve állandó megvilágítás mellett tenyésztett, sejtmentesített fermentlé

A fermentációs termékek képződésének nyomon követésére alkalmas HPLC vizsgálatok során négy csúcsot sikerült azonosítanom, amelyek területe szignifikánsan különbözött a megvilágítás függvényében (3.4.18 ábra).



3.4.18 ábra: HPLC-s metabolit csúcsok a sötétben (fent) és 70 lux megvilágításban (alul) inkubált tenyészetek esetén

A csúcsokat adó anyagok azonosítására molekulaszervezeti vizsgálati módszerek bevetése szükséges. A HPLC mérés során azonban lehetőség van a csúcs spektrumának felvételére, amennyiben az elég nagy. A 15,5 perc retenciós idejű csúcs adódott a legnagyobb minden mintában, így ennek spektrumát vettem fel. Ennek módja, hogy a kérdéses csúcs detektoron való áthaladásakor az áramlást megállítjuk, és a detektor vezérlő programban felvesszük a detektorban levő minta spektrumát adott hullámhossz tartományban (az általunk alkalmazott UV-VIS detektor ugyanis csak két hullámhosszon tud mérni egyszerre). A glükóz és a szekunder metabolitok mérésére alkalmazott kolonna azonban érzékeny az áramlás drasztikus változásaira, ezért egy szelepet szereltünk be a kolonna és a detektor közé, amelyet átfordítva a kolonnáról eluálódó anyag nem a detektor felé folyt, míg a detektor ágban megállt az áramlás. Az UV-VIS spektrumon több elnyelési maximum adódott a 300-700 nm között, amely a látható fény hullámhossz tartományába esik, így megállapítható, hogy ezek között az eluálódó metabolitok között bizonyíthatóan van olyan, amely a színhatásért felelős.

4 ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkámban az *Aspergillus terreus* gomba itakonsav termelésének vizsgálatára összpontosítottam. Az itakonsav ígéretes biotechnológiai eredetű karbonsav, polimerjei és származékai sokrétű felhasználásra alkalmasak.

A fermentáció alapú vegyszergyártás során az alapanyagok jelentős része a termelő mikroszervezet igényeinek kielégítését szolgálja, a termék szempontjából járulékos költség. Ezen anyagok felhasználásának minimalizálása korszerű technikákkal a kutatók egyik fő kihívása a 21. században, mivel nyilvánvalóvá vált az erőforrások, nyersanyagok véges hozzáférhetősége.

Munkámmal egy folyamatos üzemű integrált itakonsav előállítását célzó rendszer kidolgozásához járulok hozzá, amelyben a szénforrás és a víz felhasználása, valamint a melléktermékek képződése minimalizálható.

A fermentáció lefutását meghatározó tényező az oltás. Fonalas gombák esetén spóraszuszpenzió alkalmazásával lehet leegyszerűbben standardizálni az oltóanyagot. Az itakonsav esetén az oltóanyag arányának optimalizálása elhanyagolt kérdés. Kísérleteim megmutatták, hogy az oltási spóraszámnak létezik egy optimális tartománya, azaz igazolhatóan van egy felső határ, ami fölött már az itakonsav előállítás szempontjából káros hatása van a további növelésnek. A hozamra hatással van ez a paraméter, és bár lassabban fejlődik az alacsonyabb spóraszámú oltott fermentáció, a betáplált glükóz nagyobb része alakul itakonsavvá a folyamat során.

A folyamatos fermentáció vizsgálatát félfolyamatos fermentációs kísérlet előzte meg, amelyben megvizsgáltam, hogy a szakaszos rendszerben jól alkalmazott magas glükózkoncentráció félfolyamatos eljárás esetén is hozzájárul a jobb hozam eléréséhez. Az eredmények azt mutatták, hogy a magasabb glükóz-koncentrációval elsősorban a sejttömeg szignifikáns növekedése érhető el, a mért itakonsav koncentráció alig lépte túl a 30 g/l értéket. A szakirodalom alapján szakaszos rendszerben akár 90 g/l is megközelíthető az alkalmazott körülmények között, ezért gyaníthatóan gátlás lép fel a további itakonsav termelődésben, amelyet eddig csak egy folyamatos kísérletben igazoltak hitelt érdemlően.

A folyamatos kísérletben a szakirodalomban leírt *Aspergillus terreus*-szal végzett folyamatos fermentációkkal összevetve a legmagasabb, 30 g/l itakonsav koncentrációt értem

el az elfolyóban, amelyhez nagyon kis hígítási sebességet alkalmaztam. Azonban ebben a kísérletben sem sikerült a 30 g/l itakonsav koncentrációt meghaladni. A sejtömeg légzési sebességének mérésével egy eddig nem tisztázott folyamatra lettem figyelmes, a micéliumtömeg légzési aktivitása körülbelül 48 órás periodicitással jelentősen ingadozik.

Az oltóanyag előállítás során tapasztaltam, hogy a napfénynek hatása van a kísérleteimre, és az alapkutatói eredmények alátámasztották a feltételezésem, hogy ez a hatás molekuláris-genetikai szinten fellép. A termék gátló hatása és a fény hatása az itakonsav fermentációra nézve további vizsgálatokat kívánt, ezért szakaszos, rázott lombikos kísérleteket végeztem a hatások igazolására. A redukált kísérleti terv a két paraméter keresztthatásának feltárására is alkalmas volt.

Az itakonsav és a fehér fény keresztthatását sikerült igazolnom. A két paraméter együttesen lehetővé teszi a közel víztiszta fermentlé előállítását, a színanyagok képződésének visszaszorulása miatt, amely egy folyamatos rendszerben kihasználható előny. Itt ugyanis a sejtömeg folyamatosan itakonsav jelenlétében újul meg. Membrános termékkinyerés esetén a melléktermékek képződésének elnyomásával a szeparáció javítható, az eljárás legnagyobb költségtényezőjének, a membránoknak az élettartama növelhető lehet.

Doktori munkám eredményeivel remélhetőleg hozzájárultam az itakonsav előállítás jobb hatékonysággal történő megvalósításához.

TÉZISPONTOK

Oltóanyag előállítása

T-1.1 Elsőként állapítottam meg, hogy *Aspergillus terreus* DSM826 gombával végzett rázott lombikos itakonsav fermentáció esetén – amennyiben az oltóanyag konidiospóra szuszpenzió –a kezdeti spórakoncentrációnak szignifikáns hatása van a kialakuló száraz micélium koncentrációra, miközben a végső itakonsav titer nem változik.

Alacsony oltási csíraszám – 10^4 – 10^5 db/ml mellett 5 g/l DMW alakult ki a glükóz kimerüléséig, míg 10^6 – 10^7 db/ml tartomány esetén 8 g/l fölötti értéket mértem.

T-1.2 Bebizonyítottam, hogy az *Aspergillus terreus* DSM826 gombával végzett itakonsav fermentációnál az oltási spóraszámra érvényes egy optimális értéktartomány.

Az alacsony, $1 \cdot 10^6$ db/ml spórakoncentráció esetén a folyamat lassabb, de az itakonsav hozam magasabb, mint az $5-11 \cdot 10^6$ db/ml tartományban. Az $1,1 \cdot 10^7$ db/ml esetén pedig a folyamat szintén lassúbb, mint az $5-8 \cdot 10^6$ db/ml kiindulási spóraszám esetén. $1,1 \cdot 10^7$ db/ml-nél a spórák csírázása gátlás alá került, és a hozam minimumot mutatott a kísérlet körülményei között.

Félfolyamatos és folyamatos fermentációs kísérletek

T-2.1 Megállapítottam, hogy *Aspergillus terreus* DSM826 itakonsav túltermelő mikrogombával megvalósított félfolyamatos fermentációban, 24 órás beavatkozási ciklusok és 13,4%-os térfogatcserek mellett periodikusan változik a produktivitás és a hozam.

A produktivitás minimumai 0,05-0,17 g/l/h, maximumai 0,23-0,27 g/l/h tartományokban mozogtak. A hozam minimumai 0,07-0,25 g/g, maximumai 0,28-0,50 g/g közötti értékeket vettek fel [1].

T-2.2 Bizonyítottam, hogy az *Aspergillus terreus* DSM826 itakonsav túltermelő mikroorganizmussal megvalósított félfolyamatos fermentációban, (24 órás beavatkozási ciklusok és 13,4%-os térfogatcserek mellett) a szakaszos kísérletekben optimalizált 120 g/l kiindulási glükóztartalom visszaállítása a sejtömeg megkétszereződéséhez vezet az állandó 100 g/l glükóz tartalmú rátáplálás alkalmazásával szemben.

A száraz sejtömeg koncentráció 10 g/l-ről 20 g/l-re nőtt, miközben jelentős hozam vagy produktivitás növekedés nem történt [1].

T-2.3 *Aspergillus terreus* gombával sikeresen, a releváns szakirodalmi értéket jelentős mértékben meghaladva valósítottam meg szabad micéliumos itakonsav fermentációt folyamatos üzemben.

Megállapítottam, hogy kis – 0,007 1/h – hígítási sebesség mellett az 1,7 literes fermentorban átlagosan 29 g/l itakonsav keletkezett [2].

A fehér fényel történő megvilágítás hatása az itakonsav túltermelő Aspergillus terreus gombára

T-3.1 Megállapítottam, hogy állandó, 70 lux fehér fényel történő megvilágítás hatására a komplex burgonya-glükóz-agar (PGA) tápközeg egységnyi felületéről nyerhető konidiospóra-szám 1,8-szeresére növelhető az *Aspergillus terreus* DSM826 törzs sötétben inkubált tenyészetéhez viszonyítva [8].

T-3.2 Elsőként vizsgáltam meg a fénynek az *Aspergillus terreus* konidiospóráinak érésére kifejtett hatását, és megállapítottam, hogy az állandó megvilágítás mellett illetve a sötétben előállított konidiospóra alapú oltóanyagok között nincs szignifikáns különbség az itakonsav termelékenység tekintetében, ha azonos oltási spóraszámot alkalmazunk bennük.

T-3.3 Kísérleteimmel bizonyítottam, hogy az alkalmazott szintetikus fermentációs tápoldatot 30 g/l itakonsavval kiegészítve inokulálás előtt a konidiospórából kifejlődő sejtömeg állandó megvilágítás mellett szignifikánsan kevesebb járulékos metabolitot termel, mint a sötétben inkubált tenyészetek. A színes metabolitok termelődése is gátlás alá kerül [8].

T-3.4 Elsőként állapítottam meg, hogy a 30 g/l kiindulási itakonsav-tartalom mellett folyamatos 70 lux megvilágításban kifejlődő gomba sejttömeg, a vizsgált egyhetes folyamat során, szignifikánsan több itakonsavat termelt és több glükózt fogyasztott a sötétben inkubált tenyészetekkel összevetve, miközben a hozam és a képződő sejttömeg mennyisége nem mutatott szignifikáns eltérést.

Tehát 30 g/l kiindulási itakonsav-tartalom mellett az állandó megvilágítás serkenti az itakonsav képződést, de a metabolikus sztöchiometriára nincs hatással.

THESIS STATEMENTS

In my Ph.D. work, the following scientific results have been achieved:

1. *Studying the impact of inoculation on the fermentation process, it was found that:*

- a. in the case of shaken flask fermentation with *Aspergillus terreus* DSM826, when the inoculum is a suspension of conidia, the initial spore concentration has a significant effect on the dry mycelial weight concentration (DMW) formed, while the final itaconic acid titer does not change.**

At low inoculum spore concentrations - 10^4 - 10^5 spores/ml, 5 g/l DMW was formed until glucose depletion, while a value above 8 g/l DMW was measured for the range 10^6 - 10^7 spores/ml.

- b. an optimal range of values for the inoculum spore number is valid for the fermentation of the yeast *Aspergillus terreus* DSM826.**

At low spore concentrations of $1 \cdot 10^6$ spores/ml, the process is slower but the yield of itaconic acid is higher than in the range 5 - $11 \cdot 10^6$ spores/ml. At $1.1 \cdot 10^7$ spores/ml, the process is also slower than at the initial spore count of 5 - $8 \cdot 10^6$ spores/ml. At $1.1 \cdot 10^7$ spores/ml, spore germination is inhibited and yields are at a minimum under the experimental conditions.

2. *Based on the semi-continuous and continuous fermentation experiments, it was found that:*

- a. semi-continuous fermentation with *Aspergillus terreus* DSM826, with 24 h intervention cycles and 13.4% volume changes, results in periodic changes in productivity and yield.**

Productivity minima ranges from 0.05-0.17 g/l/h and maxima from 0.23-0.27 g/l/h.

Yield minima ranges from 0.07-0.25 g/g and maxima from 0.28-0.50 g/g [1].

- b. in semi-continuous fermentation *Aspergillus terreus* DSM826 (24 h intervention cycles and 13.4% volume changes), restoring the 120 g/l initial glucose content in the fermentation broth during interventions leads to a doubling of mycelial mass compared to a constant 100 g/l glucose feed.**

The dry mycelial weight concentration increased from 10 g/l to 20 g/l, while no significant increase in yield or productivity occurred [1].

- c. continuous itaconic acid fermentation, that significantly exceeds the achievable product concentration in relevant literature value, is feasible applying *Aspergillus terreus* DSM826 free mycelium as producing cell mass.**

At a low dilution rate of 0.007 1/h, an average of 29 g/l of itaconic acid was produced in a 1.7 L fermentor [2].

3. *Studying the impact of illumination with white light on the development of *Aspergillus terreus* DSM826, it was found that:*

- a. constant illumination with 70 lux white light can increase the number of conidia per unit area of complex potato glucose agar (PGA) medium by a factor of 1.8 compared to dark incubated cultures of *Aspergillus terreus* DSM826 strain [8].**
- b. speaking of conidia based inoculation, there is no significant difference in the productivity of itaconic acid in batch fermentations, depending on whether inoculum produced under constant light or dark conditions is used, provided that they have the same spore concentration.**
- c. if 30 g/l of itaconic acid is added to the fermentation medium prior to inoculation, the mycelial mass developing from conidia under constant illumination produces significantly less by-products than cultures incubated in the dark. The production of coloured metabolites is also inhibited [8].**
- d. if 30 g/l of itaconic acid is added to the fermentation medium before inoculation, then under continuous 70 lux illumination, significantly more itaconic acid is produced and more glucose is consumed during a one-week batch process compared to cultures incubated in dark, while the yield and mycelial mass produced are not significantly different.**

Thus, at an initial itaconic acid content of 30 g/l, constant illumination stimulates itaconic acid production but has no effect on metabolic stoichiometry.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Amato, A., Becci, A., & Beolchini, F. (2020). Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(2), 199–212. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709799>
- Anastassiadis, S., Morgunov, I., Kamzolova, S., & Finogenova, T. (2008). Citric Acid Production Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(2), 107–123. <https://doi.org/10.2174/187220808784619757>
- Arabatzis, M., & Velegraki, A. (2017). Sexual reproduction in the opportunistic human pathogen *Aspergillus terreus*. *Mycologia*, 105(1), 71–79. <https://doi.org/10.3852/11-426>
- Bagar, T., Altenbach, K., Read, N. D., & Benčina, M. (2009). Live-cell imaging and measurement of intracellular pH in filamentous fungi using a genetically encoded ratiometric probe. *Eukaryotic Cell*, 8(5), 703–712. <https://doi.org/10.1128/EC.00333-08>
- Barrios-González, J., Martínez, C., Aguilera, A., & Raimbault, M. (1989). Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 11(8), 551–554. <https://doi.org/10.1007/BF01040034>
- Bayram, Ö., Braus, G. H., Fischer, R., & Rodriguez-Romero, J. (2010). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genetics and Biology*, 47(11), 900–908. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.008>
- Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Jin, W. B., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N. J., Keller, N. P., Yu, J. H., & Braus, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320(5882), 1504–1506. <https://doi.org/10.1126/science.1155888>
- Berovic, M., & Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*, 13, 303–343. [https://doi.org/10.1016/s1387-2656\(07\)13011-8](https://doi.org/10.1016/s1387-2656(07)13011-8)
- Bharathiraja, B., Ebenezer Selvakumari, I. A., Iyyappan, J., & Varjani, S. (2019). Itaconic acid: an effective sorbent for removal of pollutants from dye industry effluents. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 12, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.07.004>
- Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. (2010). The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 41–54. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0140-1>
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., & Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Current Biology*, 15(20), 1833–1838. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.061>

- Boczonádi, I. (2020). *Aspergillus* fajok nehézfém-szennyezések bioremediációjában való alkalmazásának potenciális lehetőségei. Phd értekezés. Debreceni Egyetem. <https://dea.lib.unideb.hu/server/api/core/bitstreams/0660fddd-55e9-4d58-9d56-3690e31912af/content>
- Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 527–535. <https://doi.org/10.1128/ec.3.2.527-535.2004>
- Boruta, T., & Bizukojc, M. (2017). Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2206-9>
- Bunyard, B. A. (2022). *The Lives of Fungi: A Natural History of Our Planet's Decomposers*. Princeton University Press. Könyv. ISBN: 9780691229843.
- Burgstaller, W. (2006). Thermodynamic boundary conditions suggest that a passive transport step suffices for citrate excretion in *Aspergillus* and *Penicillium*. *Microbiology*, 152(3), 887–893. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28454-0>
- Casas López, J. L., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., Rodríguez Porcel, E. M., & Chisti, Y. (2005). Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*, 116(1), 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.10.005>
- Chiloeches, A., Cuervo-Rodríguez, R., López-Fabal, F., Fernández-García, M., Echeverría, C., & Muñoz-Bonilla, A. (2022). Antibacterial and compostable polymers derived from biobased itaconic acid as environmentally friendly additives for biopolymers. *Polymer Testing*, 109, 107541. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2022.107541>
- Colleran, E., Pender, S., Philpott, U., O'Flaherty, V., & Leahy, B. (1998). Full-scale and laboratory-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. *Biodegradation*, 9(3–4), 233–245. <https://doi.org/10.1023/a:1008389722892>
- Corrochano, L. M. (2011). Fungal photobiology: A synopsis. *IMA Fungus*, 2(1), 25–28. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.04>
- da Cruz, J. C., Camporese Sérvulo, E. F., & de Castro, A. M. (2017). Chapter 10 - Microbial production of itaconic acid. A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Szerk.), *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*, 291–316. Academic Press. Könyv. ISBN: 978-0-12-811520-6. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811520-6.00010-6>
- Darabi Mahboub, M. J., Dubois, J. L., Cavani, F., Rostamizadeh, M., & Patience, G. S. (2018). Catalysis for the synthesis of methacrylic acid and methyl methacrylate. *Chemical Society Reviews*, 47(20), 7703–7738. <https://doi.org/10.1039/c8cs00117k>
- Deak, E., Wilson, S. D., White, E., Carr, J. H., & Balajee, S. A. (2009). *Aspergillus terreus* accessory conidia are unique in surface architecture, cell wall composition and germination kinetics. *PLOS ONE*, 4(10), e7673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007673>

- De Carvalho, J. C., Magalhães, A. I., & Soccol, C. R. (2018). Biobased itaconic acid market and research trends – is it really a promising chemical? *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 36(4). https://www.researchgate.net/publication/327701663_Biobased_itaconic_acid_market_and_research_trends_-_is_it_really_a_promising_chemical
- Dias, M. A., Lacerda, I. C. A., Pimentel, P. F., De Castro, H. F., & Rosa, C. A. (2002). Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Letters in Applied Microbiology*, 34(1), 46–50. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01040.x>
- Ding, L., Li, T., Liao, X., He, S., & Xu, S. (2018). Asperitaconic acids A–C, antibacterial itaconic acid derivatives produced by a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *The Journal of Antibiotics*, 71(10), 902–904. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0079-2>
- El-Imam, A. M. A., Kazeem, M. O., Odebisi, M. B., Oke, M. A., & Abidoye, A. O. (2013). Production of itaconic acid from *Jatropha curcas* seed cake by *Aspergillus terreus*. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(1), 57–61. <https://doi.org/10.15835/nsb518355>
- Fencl, Z. (1970). Comments on differentiation and product formation in molds. *Biotechnology and Bioengineering*, 12(5), 845–847. <https://doi.org/10.1002/bit.260120510>
- Feng, W., Chen, C., Mo, S., Qi, C., Gong, J., Li, X. N., Zhou, Q., Zhou, Y., Li, D., Lai, Y., Zhu, H., Wang, J., & Zhang, Y. (2019). Highly oxygenated meroterpenoids from the Antarctic fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry*, 164, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.05.015>
- Fuller, K. K., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. *Current Genetics*, 61(3), 275–288. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0451-0>
- Gao, Q. G., Liu, J., & Liu, L. (2014). Relationship between morphology and itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 168–176. <https://doi.org/10.4014/jmb.1303.03093>
- Gibbons, J. G., & Rokas, A. (2013). The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiology*, 21(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.005>
- Gradišnik-Grapulin, M., & Legiša, M. (1996). Comparison of specific metabolic characteristics playing a role in citric acid excretion between some strains of the genus *Aspergillus*. *Journal of Biotechnology*, 45(3), 265–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00180-8](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00180-8)
- Gradmann, D., Hansen, U.-P., Long, W. S., Slayman, C. L., & Warncke, J. (1978). Current-voltage relationships for the plasma membrane and its principal electrogenic pump in *Neurospora crassa*: I. Steady-state conditions. *The Journal of Membrane Biology*, 39(4), 333–367. <https://doi.org/10.1007/bf01869898>
- Greene, A. V., Keller, N., Haas, H., & Bell-Pedersen, D. (2003). A circadian oscillator in *Aspergillus* spp. regulates daily development and gene expression. *Eukaryotic Cell*, 2(2), 231–237. <https://doi.org/10.1128/ec.2.2.231-237.2003>

- Guan, N., & Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 51-65. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>
- Gyamerah, M. (1995). Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(3–4). <https://doi.org/10.1007/bf00169929>
- Hagiwara, D., Sakamoto, K., Abe, K., & Gomi, K. (2016). Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(9), 1667–1680. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1162085>
- Hajian, H., & Yusoff, W. M. W. (2015). Itaconic acid production by microorganisms: A review. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 7(2). <https://doi.org/10.19026/crjbs.7.5205>
- Hatakeyama, R., Nakahama, T., Higuchi, Y., & Kitamoto, K. (2007). Light represses conidiation in koji mold *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(8), 1844–1849. <https://doi.org/10.1271/bbb.60713>
- Hawksworth, D. L., Crous, P. W., Redhead, S. A., Reynolds, D. R., Samson, R. A., Seifert, K. A., Taylor, J. W., Wingfield, M. J., Abaci, Ö., Aime, C., Asan, A., Bai, F. Y., de Beer, Z. W., Begerow, D., Berikten, D., Boekhout, T., Buchanan, P. K., Burgess, T., Buzina, W., ... Zhang, N. (2011). The Amsterdam Declaration on fungal Nomenclature. *IMA Fungus : The Global Mycological Journal*, 2(1), 105. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.14>
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. H., & Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, 297(5582), 840–843. <https://doi.org/10.1126/science.1072795>
- Hevekerl, A., Kuenz, A., & Vorlop, K. D. (2014a). Filamentous fungi in microtiter plates – An easy way to optimize itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 6983–6989. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5743-2>
- Hevekerl, A., Kuenz, A., & Vorlop, K. D. (2014b). Influence of the pH on the itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 10005–10012. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6047-2>
- Himmelsbach, A., Schneider-Chaabane, A., Lienkamp, K., Himmelsbach, A., Schneider-Chaabane, A., & Lienkamp, K. (2019). Asymmetrically substituted poly(diitaconates) obtained by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization: Synthesis, copolymerization parameters, and antimicrobial activity. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 220(24), 1900346. <https://doi.org/10.1002/macp.201900346>
- Horitsu, H., Takahashi, Y., Tsuda, J., Kawai, K., & Kawano, Y. (1983). Production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* immobilized in polyacrylamide gels. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 358–360. <https://doi.org/10.1007/bf00504745>
- Huang, C., Xu, T., Zhang, Y., Xue, Y., & Chen, G. (2007). Application of electro dialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent

- developments. *Journal of Membrane Science*, 288(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.11.026>
- Ianchis, R., Ninciuleanu, C. M., Gifu, I. C., Alexandrescu, E., Nistor, C. L., Nitu, S., & Petcu, C. (2018). Hydrogel-clay nanocomposites as carriers for controlled release. *Current Medicinal Chemistry*, 27(6), 919–954. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180831151055>
- Idnurm, A., & Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLOS Biology*, 3(4), e95. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030095>
- Jianlong, W., Xinmin, Z., Decai, D., & Ding, Z. (2001). Bioadsorption of lead(II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 87(3), 273–277. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00379-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00379-5)
- Ju, N., & Wang, S. S. (1986). Continuous production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* immobilized in a porous disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 311–314. <https://doi.org/10.1007/bf00257025>
- Kane, J. H., Finlay, A. C., & Amann, P. F. (1945). *Production of itaconic acid* (Patent US2385283A). <https://patents.google.com/patent/US2385283A/en>
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., & Cullimore, D. R. (1999). Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 70(1), 95–104. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00192-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00192-8)
- Karaffa, L., Díaz, R., Papp, B., Fekete, E., Sándor, E., & Kubicek, C. P. (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*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7937–7944. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6735-6>
- Kautola, H., Vahvaselkä, M., Linko, Y. Y., & Linko, P. (1985). Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose and glucose. *Biotechnology Letters*, 7(3), 167–172. <https://doi.org/10.1007/bf01027812>
- Kobayashi, T., & Nakamura, I. (1966). Dynamics in mycelial concentration of *Aspergillus terreus* K 26 in steady state of continuous culture (Proceedings of the US Japan seminar on dynamics of microbial populations). *Journal of Fermentation Technology*, 44, 264–274. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1574231876863356416>
- Kocsubé, S., Perrone, G., Magistà, D., Houbraken, J., Varga, J., Szigeti, G., Hubka, V., Hong, S. B., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2016). *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*, 85, 199–213. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.006>
- Komáromy, P., Bakonyi, P., Kucska, A., Tóth, G., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K., & Nemestóthy, N. (2019). Optimized pH and its control strategy lead to enhanced itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* on glucose substrate. *Fermentation*, 5(2), 31. <https://doi.org/10.3390/fermentation5020031>
- Kreyenschulte, D., Heyman, B., Eggert, A., Maßmann, T., Kalvelage, C., Kossack, R., Regestein, L., Jupke, A., & Büchs, J. (2018). In situ reactive extraction of itaconic

- acid during fermentation of *Aspergillus terreus*. *Biochemical Engineering Journal*, 135, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.014>
- Krishania, M., Sindhu, R., Binod, P., Ahluwalia, V., Kumar, V., Sangwan, R. S., & Pandey, A. (2018). Chapter 5 - Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Szerk.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 83–96. Elsevier. Könyv. ISBN: 978-0-444-63990-5. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00005-0>
- Krull, S., Eidt, L., Hevekerl, A., Kuenz, A., & Prüße, U. (2017). Itaconic acid production from wheat chaff by *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.010>
- Krull, S., Hevekerl, A., Kuenz, A., & Prüße, U. (2017). Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4063–4072. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8192-x>
- Kuenz, A., Gallenmüller, Y., Willke, T., & Vorlop, K. D. (2012). Microbial production of itaconic acid: Developing a stable platform for high product concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1209–1216. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4221-y>
- Kuenz, A., & Krull, S. (2018). Biotechnological production of itaconic acid—things you have to know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(9), 3901–3914. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8895-7>
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., & Singhanian, R. R. (2021). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, 323, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- Lansing, J. C., Murray, R. E., & Moser, B. R. (2017). Biobased methacrylic acid via selective catalytic decarboxylation of itaconic acid. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(4), 3132–3140. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6B02926>
- Laothanachareon, T., Bruinsma, L., Nijssse, B., Schonewille, T., Suarez-Diez, M., Tamayo-Ramos, J. A., Martins Dos Santos, V. A. P., & Schaap, P. J. (2021). Global transcriptional response of *Aspergillus niger* to blocked active citrate export through deletion of the exporter gene. *Journal of Fungi*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/jof7060409>
- Larsen, H., & Eimhjellen, K. E. (1955). The mechanism of itaconic acid formation by *Aspergillus terreus*. 1. The effect of acidity. *Biochemical Journal*, 60(1), 135–139. <https://doi.org/10.1042/bj0600135>
- Lawson, T., Emmerson, R., Battle, M., Pullin, J., Wall, S., & Hofmann, T. A. (2022). Carbon fixation. *Photosynthesis in Action: Harvesting Light, Generating Electrons, Fixing Carbon*, 31–58. Academic Press. Könyv. ISBN: 978-0-12-823781-6. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823781-6.00008-3>
- Le Nôtre, J., Witte-van Dijk, S. C. M., van Haveren, J., Scott, E. L., & Sanders, J. P. M. (2014). Synthesis of bio-based methacrylic acid by decarboxylation of itaconic

- acid and citric acid catalyzed by solid transition-metal catalysts. *ChemSusChem*, 7(9), 2712–2720. <https://doi.org/10.1002/cssc.201402117>
- Liu, Y., & Bell-Pedersen, D. (2006). Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 5(8), 1184–1193. <https://doi.org/10.1128/ec.00133-06>
- López-Carrasquero, F., De Ilarduya, A. M., Cárdenas, M., Carrillo, M., Arnal, M. L., Laredo, E., Torres, C., Méndez, B., & Müller, A. J. (2003). New comb-like poly(n-alkyl itaconate)s with crystalizable side chains. *Polymer*, 44(17), 4969–4979. [https://doi.org/10.1016/s0032-3861\(03\)00470-1](https://doi.org/10.1016/s0032-3861(03)00470-1)
- López-Carrasquero, F., Rangel-Rangel, E., Cárdenas, M., Torres, C., Dugarte, N., & Laredo, E. (2013). Copolymers of long-side-chain di-n-alkyl itaconates or methyl n-alkyl itaconates with styrene: Synthesis, characterization, and thermal properties. *Polymer Bulletin*, 70(1), 131–146. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0788-9>
- Luan, H. H., & Medzhitov, R. (2016). Food fight: role of itaconate and other metabolites in antimicrobial defense. *Cell Metabolism*, 24(3). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.013>
- Magnuson, J. K., & Lasure, L. L. (2004). Organic Acid Production by Filamentous Fungi. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*, 307–340. Könyv. ISBN: 978-1-4419-8859-1. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8859-1_12
- Mansoldo, F. R. P., Firpo, R., Cardoso, V. da S., Queiroz, G. N., Cedrola, S. M. L., Godoy, M. G. de, & Vermelho, A. B. (2020). New method for rapid identification and quantification of fungal biomass using ergosterol autofluorescence. *Talanta*, 219, 121238. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121238>
- Mielczarek, K., Łabanowska, M., Kurdziel, M., Konefał, R., Beneš, H., Bujok, S., Kowalski, G., & Bednarz, S. (2020). High-Molecular-Weight Polyampholytes Synthesized via Daylight-Induced, Initiator-Free Radical Polymerization of Renewable Itaconic Acid. *Macromolecular Rapid Communications*, 41(4), 1900611. <https://doi.org/10.1002/marc.201900611>
- Möglich, A., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2009). Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure*, 17(10), 1282–1294. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.011>
- Mohanta, T. K., & Bae, H. (2015). The diversity of fungal genome. *Biological Procedures Online*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0020-Z>
- Molnár, Á. P., Németh, Z., Kolláth, I. S., Fekete, E., Flippi, M., Ág, N., Soós, Á., Kovács, B., Sándor, E., Kubicek, C. P., & Karaffa, L. (2018). High oxygen tension increases itaconic acid accumulation, glucose consumption, and the expression and activity of alternative oxidase in *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(20), 8799–8808. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9325-6>
- Moore, D., McNulty, L. J., & Meskauskas, A. (2005). Branching in Fungal Hyphae and Fungal Tissues. *Branching Morphogenesis*, 75–90. https://doi.org/10.1007/0-387-30873-3_4

- Murthy, P. S., Sano, M., Hattori, R., Kusumoto, K. I., & Suzuki, S. (2018). *Aspergillus oryzae* strain with improved conidiation after light stimulation. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 52(1). <https://doi.org/10.6090/jarq.52.23>
- Nelson, G. E. N., Traufler, D. H., Kelley, S. E., & Lockwood, L. B. (1952). Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* in 20-Liter Fermentors. *Industrial & Engineering Chemistry*, 44(5), 1166–1168. <https://doi.org/10.1021/ie50509a062>
- Niu, J., Arentshorst, M., Nair, P. D. S., Dai, Z., Baker, S. E., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Punt, P. J., & Ram, A. F. J. (2016). Identification of a classical mutant in the industrial host *Aspergillus niger* by systems genetics: LaeA is required for citric acid production and regulates the formation of some secondary metabolites. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(1), 193–204. <https://doi.org/10.1534/g3.115.024067>
- Novodvorska, M., Stratford, M., Blythe, M. J., Wilson, R., Beniston, R. G., & Archer, D. B. (2016). Metabolic activity in dormant conidia of *Aspergillus niger* and developmental changes during conidial outgrowth. *Fungal Genetics and Biology*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.002>
- Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., & Park, E. Y. (2009). Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 597–606. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2132-3>
- Osharov, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, 199(2), 153–160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x>
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Papagianni, M., & Mattey, M. (2006). Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-3>
- Perković, I., Beus, M., Schols, D., Persoons, L., & Zorc, B. (2022). Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents. *Molecular Diversity*, 26(1). <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10147-6>
- Porcel, E. R., Casas López, J. L., Ferrón, M. A. V., Pérez, J. A. S., Sánchez, J. L. G., & Chisti, Y. (2006). Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by *Aspergillus terreus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s00449-006-0048-1>
- Probstein, R. F., Sonin, A. A., & Gur-Arie, E. (1972). A turbulent flow theory of electro dialysis. *Desalination*, 11(2), 165–187. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(00\)80066-1](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(00)80066-1)
- Pukánszky, B., & Móczó, J. (2012). *Műanyagok* (Zsuga Miklós Phd, Ed.). Typotex Kiadó. ISBN: 978-963-2794-81-5.
- Purschwitz, J., Müller, S., & Fischer, R. (2009). Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the

- White Collar protein LreB. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0390-x>
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., & Fischer, R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.011>
- Riscaldati, E., Moresi, M., Federici, F., & Petruccioli, M. (2000). Effect of pH and stirring rate on itaconate production by *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*, 83(3), 219–230. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00322-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00322-9)
- Roos, W., & Luckner, M. (1984). Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *Journal of General Microbiology*, 130(4), 1007–1014. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-4-1007>
- Rychtera, M., & Wase, D. A. J. (1981). The growth of *Aspergillus terreus* and the production of itaconic acid in batch and continuous cultures. The influence of pH. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 31(1), 509–521. <https://doi.org/10.1002/jctb.503310168>
- Saha, B. C., & Kennedy, G. J. (2019). Phosphate limitation alleviates the inhibitory effect of manganese on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101016. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.054>
- Sakai, A., Kusumoto, A., Kiso, Y., & Furuya, E. (2004). Itaconate reduces visceral fat by inhibiting fructose 2,6-bisphosphate synthesis in rat liver. *Nutrition*, 20(11–12), 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.08.007>
- Salichos, L., & Rokas, A. (2010). The diversity and evolution of circadian clock proteins in fungi. *Mycologia*, 102(2), 269–278. <https://doi.org/10.3852/09-073>
- Sano, M., Tanaka, T., Ohara, H., & Aso, Y. (2020). Itaconic acid derivatives: structure, function, biosynthesis, and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(21), 9041–9051. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10908-1>
- Sawant, O., Mahale, S., Ramchandran, V., Nagaraj, G., & Bankar, A. (2018). Fungal citric acid production using waste materials: A mini-review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(2), 821–828. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.2.821-828>
- Schütz, G., Haltrich, D., & Atanasova, L. (2020). Influence of spore morphology on spectrophotometric quantification of *Trichoderma* inocula. *BioTechniques*, 68(5), 279–282. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0152>
- Scott, B. R., & Alderson, T. (1974). A rapid method for preparing single cell suspension of *Aspergillus* conidia depleted in germination inhibitor. *Journal of General Microbiology*, 85(1), 173–176. <https://doi.org/10.1099/00221287-85-1-173>
- Sethy, B., Hsieh, C. F., Lin, T. J., Hu, P. Y., Chen, Y. L., Lin, C. Y., Tseng, S. N., Horng, J. T., & Hsieh, P. W. (2019). Design, synthesis, and biological evaluation of itaconic acid derivatives as potential anti-influenza agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(5), 2390–2403. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01683>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). Principles of fermentation technology: Third edition. Könyv. ISBN: 9780080999531.

- Stoyanov, S., & Simeonov, I. (1996). Robust compensator control of continuous fermentation processes. *Bioprocess Engineering*, 15(6), 295–300. <https://doi.org/10.1007/bf02426437>
- Strathmann, H., Grabowski, A., & Eigenberger, G. (2013). Ion-exchange membranes in the chemical process industry. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 52(31), 10364–10379. <https://doi.org/10.1021/ie4002102>
- Sun, W., Yu, Y., Chen, J., Yu, B., Chen, T., Ying, H., Zhou, S., Ouyang, P., Liu, D., & Chen, Y. (2021). Light signaling regulates *Aspergillus niger* biofilm formation by affecting melanin and extracellular polysaccharide biosynthesis. *mBio*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.03434-20>
- Sun, Y. M., Horng, C. Y., Chang, F. L., Cheng, L. C., & Tian, W. X. (2010). Biosorption of lead, mercury, and cadmium ions by *Aspergillus terreus* immobilized in a natural matrix. *Polish Journal of Microbiology*, 59(1). <https://doi.org/10.33073/pjm-2010-005>
- Suzuki, S., & Kusumoto, K. (2020). Transcriptome analysis of two strains of *Aspergillus oryzae* with different responses to light. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 54(1), 13–20. <https://doi.org/10.6090/jarq.54.13>
- Svardal, K., Gotzendorfer, K., Nowak, O., & Kroiss, H. (1993). Treatment of citric acid wastewater for high quality effluent on the anaerobic-aerobic route. *Water Science and Technology*, 28(2), 177–186. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0100>
- Teleky, B. E., Mitrea, L., Plamada, D., Nemes, S. A., Călinoiu, L. F., Pascuta, M. S., Varvara, R. A., Szabo, K., Vajda, P., Szekely, C., Martău, G. A., Elemer, S., Ranga, F., & Vodnar, D. C. (2022). Development of pectin and poly(vinyl alcohol)-based active packaging enriched with itaconic acid and apple pomace-derived antioxidants. *Antioxidants*, 11(9), 1729. <https://doi.org/10.3390/antiox11091729>
- Tisch, D., & Schmoll, M. (2009). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1259–1277. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>
- Trotta, J. T., Watts, A., Wong, A. R., Lapointe, A. M., Hillmyer, M. A., & Fors, B. P. (2019). Renewable thermosets and thermoplastics from itaconic acid. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(2), 2691–2701. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05766>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. Md. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>
- Varga, J., Tóth, B., Kocsubé, S., Farkas, B., Szakács, G., Téren, J., & Kozakiewicz, Z. (2005). Evolutionary relationships among *Aspergillus terreus* isolates and their relatives. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88(2), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-3870-6>
- Vrabl, P., Fuchs, V., Pichler, B., Schinagl, C. W., & Burgstaller, W. (2012). Organic acid excretion in *Penicillium ochrochloron* increases with ambient pH. *Frontiers in Microbiology*, 3(4), 121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00121>

- Wang, W., Yang, J., Liao, Y. Y., Cheng, G., Chen, J., Mo, S., Yuan, L., Cheng, X. D., Qin, J. J., & Shao, Z. (2020). Aspeterreurenone A, a cytotoxic dihydrobenzofuran-phenyl acrylate hybrid from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus terreus* CC-S06-18. *Journal of Natural Products*, 83(6), 1998–2003. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00189>
- Welter, K. (2000). Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen. *Phd disszertáció*. <http://doi.org/10.24355/dbbs.084-200511080100-117>
- Wiegand, K. E. (1971). *Process for the preparation of citric acid* (Patent US3769337A). <https://patents.google.com/patent/US3769337A/en>
- Wilhelm, F. G. (2001). Bipolar membrane electrodialysis. *Phd disszertáció*. University of Twente. ISBN: 9036515270.
- Worrich, A., Stryhanyuk, H., Musat, N., König, S., Banitz, T., Centler, F., Frank, K., Thullner, M., Harms, H., Richnow, H. H., Miltner, A., Kästner, M., & Wick, L. Y. (2017). Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nature Communications*, 8, 15472. <https://doi.org/10.1038/ncomms15472>
- Yahiro, K., Takahama, T., Park, Y. S., & Okabe, M. (1995). Breeding of *Aspergillus terreus* mutant TN-484 for itaconic acid production with high yield. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(5), 506–508. [https://doi.org/10.1016/0922-338x\(95\)91272-7](https://doi.org/10.1016/0922-338x(95)91272-7)
- Yoshinobu, K., Aki, K., & Eisuke, F. (1999). *Use of itaconic acid for regulation of glycolytic metabolism* (Patent EP1062954B1). <https://patents.google.com/patent/EP1062954B1>
- Zhang, J., Chen, H., Sumarah, M. W., Gao, Q., Wang, D., & Zhang, Y. (2018). VeA gene acts as a positive regulator of conidia production, ochratoxin A biosynthesis, and oxidative stress tolerance in *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(50), 13199–13208. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04523>
- Zhang, Z., Jiang, W., Xie, X., Liang, H., Chen, H., Chen, K., Zhang, Y., Xu, W., & Chen, M. (2021). Recent developments of nanomaterials in hydrogels: characteristics, influences, and applications. *ChemistrySelect*, 6(44), 12358–12382. <https://doi.org/10.1002/slct.202103528>
- Zhao, M., Lu, X., Zong, H., Li, J., & Zhuge, B. (2018). Itaconic acid production in microorganisms. *Biotechnology Letters*, 40(3), 455–464. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2500-5>
- Zhgun, A. A., Nuraeva, G. K., & Eldarov, M. A. (2019). The role of LaeA and LovE regulators in lovastatin biosynthesis with exogenous polyamines in *Aspergillus terreus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(6), 639–648. <https://doi.org/10.1134/s0003683819060176>

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

- [1] Hülber-Beyer, É., Bélafi-Bakó, K., Rózsenszki, T., Komáromy, P., & Nemestóthy, N. (2023) Evaluating the potential of semi-continuous itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus*: operational profile and experiences. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39, 346. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03797-9>
- [2] Hülber-Beyer, É., Bélafi-Bakó, K., & Nemestóthy, N. (2023). Case study of continuous itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* in a bench-scale bioreactor. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 51(2), 57–63. <https://doi.org/10.33927/hjic-2023-19>
- [3] Hülber-Beyer, É., Bélafi-Bakó, K., & Nemestóthy, N. (2021). Low-waste fermentation-derived organic acid production by bipolar membrane electro dialysis—an overview. *Chemical Papers*, 75(10). <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01720-w>
- [4] Hülber-Beyer, É., Bélafi-Bakó, K., & Nemestóthy, N. (2020). Az eredő folyadékoldali térfogati oxigénabszorpciós együttható (K_{La}) meghatározása itakonsav fermentációnál. *Membrántechnika és Ipari Biotechnológia*, 3(XI.), 26-37. ISSN: 2061-6392
- [5] Komáromy, P., Bélafi-Bakó, K., Hülber-Beyer, É., & Nemestóthy, N. (2020). Enhancement of Oxygen Transfer through Membranes in Bioprocesses. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 48(2), 5–8. <https://doi.org/10.33927/hjic-2020-21>
- [6] Rózsenszki, T., Komáromy, P., Hülber-Beyer, É., Bakonyi, P., Nemestóthy, N. & Bélafi-Bakó, K. (2021). Demonstration of bipolar membrane electro dialysis technique for itaconic acid recovery from real fermentation effluent of *Aspergillus terreus*. *Chemical Engineering Research and Design*, 175(2021), 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.09.022>
- [7] Poszter: Hülber-Beyer, É., Nemestóthy, N. & Bélafi-Bakó, K. (2021) Production of itaconic acid by continuous fermentation – bipolar membrane electro dialysis integrated system. *Interdisciplinary Doctoral Conference*, 2021. november 12-13. Pécs, Magyarország.
- [8] Előadás: Hülber-Beyer, É., Bélafi-Bakó, K. & Nemestóthy, N. (2022) Influence of light on the itaconic acid producer *Aspergillus terreus*. *48th International conference of SSCHE*, 2022. május 23-26. Szlovákia, Tatranske Mateliare.
- [9] Rózsenszki, T., Komáromy, P., Hülber-Beyer, É., Pesti, A., Koók, L., Bakonyi, P., Bélafi-Bakó, K. & Nemestóthy, N. (2023). Bipolar membrane electro dialysis integration into the biotechnological production of itaconic acid: A proof-of-concept study. *Chemical Engineering Research and Design*, 190, 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.12.023>
- [10] Hülber-Beyer, É., Tóth, G. & Bélafi-Bakó, K. (2022). Bioszorpció *Aspergillus terreus* fonalas gomba biomasszával. *Membrántechnika és Ipari Biotechnológia*, 4(XIII.), 38-43. ISSN: 2061-6392

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a segítségért és támogatásért témavezetőimnek, Bélafiné Bakó Katalinnak és Nemestóthy Nándornak. Köszönet kollégáimnak a Pannon Egyetem Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutatócsoportjában, akik mindig készen álltak az inspiráló szakmai beszélgetésekre.

Köszönet férjemnek, Árpinak a támogatásért, a sok átvállalt feladatért az otthonunkban, amíg dolgozatomat készítettem. A kutatómunka gyakran egész embert kíván, és nélküle nem sikerült volna helytállnom. Köszönet továbbá gyermekeimnek, Péternek, Dórinak, Fridának és Imolának, akik mindig lelkesen támogattak és bíztattak a nehezebb időszakokban.

És nem utolsó sorban köszönet illeti Szelényi Dorottyát és Bokor Barbarát, a hallgatókat akikkel együtt dolgozhattam a laboratóriumban, remek szakdolgozatok születtek a közös munkánkból, és a legjobb hangulatú időszakként emlékszem a velük töltött hónapokra.