



1949

**A mangánion hatásának technológiai és élettani alapjai**  
***Aspergillus niger* citromsav fermentáció során**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Bíró Vivien**

Témavezető: Prof. Dr. Karaffa Levente

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2025.



*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Debrecen, 2025.*

.....

*Bíró Vivien*

*Tanúsítom, hogy **Bíró Vivien** doktorjelölt **2020-2024** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2025.*

.....

*Prof. Dr. Karaffa Levente*



**A MANGÁNION HATÁSÁNAK TECHNOLOGIAI ÉS ÉLETTANI  
ALAPJAI *ASPERGILLUS NIGER* CITROMSAV FERMENTÁCIÓ  
SORÁN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: **Bíró Vivien** okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája  
(Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programja) keretében

Témavezető: **Prof. Dr. Karaffa Levente** egyetemi tanár

Az értekezés bírálói:

Dr. ....

Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 2025. április

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés .....	1
2. Irodalmi előzmények .....	3
2.1. A gombák és az élet szárazföldi evolúciója .....	3
2.2. Nyomelemek és a mangán biológiai szerepe: geokémiai háttértől az enzimatis funkciókig .....	3
2.3. <i>Aspergillus niger</i> .....	7
2.4. <i>Aspergillus niger</i> termékportfóliója - GOMBAbiztos jövő .....	9
2.5. Citromsav .....	11
2.6. Citromsav képződésének biokémiája .....	13
2.7. Citromsavtermelő <i>A. niger</i> törzsfeljesztése .....	16
2.8. Citromsav fermentációt befolyásoló tényezők .....	19
2.8.1. Szénforrás hatása a citromsavtermelésre .....	20
2.8.2. Nitrogén és foszfát limitáció .....	24
2.8.3. A pH szerepe a fermentáció különböző szakaszaiban .....	24
2.8.4. Az oldott oxigénszint és a levegőztetés szerepe a citromsav fermentációban .....	25
2.8.5. Nyomelemek hatása az <i>A. niger</i> növekedésére és citromsavtermelésére .....	26
2.8.6. Morfológia, inokulum és termelékenység közötti kapcsolat .....	27
2.9. Technológiai kihívások bioreaktorokban végzett fermentáció során .....	29
2.9.1. Léptéknövelés és süllyesztett fermentáció .....	29
3. Célkitűzés .....	32
4. Anyagok és módszerek .....	33
4.1. Felhasznált törzsek és fenntartásuk .....	33

4.2. Fermentációk előkészítése és kivitelezése .....	34
4.2.1. $Mn^{2+}$ mentes víz/ cukoroldat készítése .....	34
4.2.2. Üvegeszközök $Mn^{2+}$ mentesítése .....	35
4.2.3. Termelő táptalaj .....	36
4.2.4. Mangánion adagolása a fermentáció során .....	36
4.2.5. Sterilizálási eljárások .....	37
4.2.6. Üresgőzös sterilizálás.....	37
4.2.7. Rázott lombikos fermentációk/ inokulum.....	38
4.3. Bioreaktorban végzett fermentációk .....	38
4.3.1. Bioreaktor A és B összehasonlítása .....	39
4.3.2. Bioreaktorok működési paraméterei .....	40
4.3.3. $Mn^{2+}$ kioldódás vizsgálata pH-függő környezetben.....	40
4.4. Analitikai módszerek .....	41
4.4.1. Mintaelőkészítés .....	41
4.4.2. Citromsav és D-glükóz koncentrációjának analízise .....	42
4.4.3. $Mn^{2+}$ tartalom meghatározása .....	42
4.4.4. Száraz sejt tömeg meghatározása.....	43
4.4.5. Morfológiai vizsgálatok .....	43
4.4.6. Számítások .....	44
4.5. Statisztikai elemzések .....	45
4.6. Elektropolírozás .....	46
5. Kísérleti eredmények és értékelésük.....	47
5.1. <i>A. niger</i> NRRL 2270 $Mn^{2+}$ limitált citromsav fermentáció 5 literes fermentorban .....	47
5.2. $Mn^{2+}$ hatása az <i>A. niger</i> NRRL 2270 citromsav fermentációjára 5 literes fermentorban .....	49
5.3. Citromsav fermentációk jellemzése bioreaktor A és B-ben .....	50

5.4. Mangán koncentrációk alakulása sterilizálás után és fermentáció alatt..	55
5.5. A pH és az $Mn^{2+}$ kioldódás összefüggésének kísérleti vizsgálata bioreaktorban.....	58
5.6. $Mn^{2+}$ hatása eltérő időpontokban és koncentrációban rázatott lombikos fermentáció során .....	60
5.7. Genetikailag módosított ( <i>cexA</i> -túltermelő) törzssel végzett fermentációk	63
5.7.1. $Mn^{2+}$ adagolás hatása a citromsav moláris hozamára a <i>cexA</i> túltermelő és ATCC 1015 törzs esetében .....	63
5.7.2. <i>A. niger</i> ATCC 1015 és cE <i>cexA</i> túltermelő törzs összehasonlítása $Mn^{2+}$ terhelt környezetben 5 literes fermentorban.....	65
5.7.2.1. Morfológiai vizsgálatok $Mn^{2+}$ terhelt fermentáció során .....	68
5.7.3. <i>A. niger</i> ATCC 1015 és cE <i>cexA</i> túltermelő törzs összehasonlítása $Mn^{2+}$ limitált környezetben 5 literes fermentorban .....	70
5.7.3.1. Morfológiai vizsgálatok $Mn^{2+}$ limitált fermentáció során.....	72
6. Eredmények megbeszélése .....	73
7. Összefoglalás .....	79
8. Summary .....	82
9. Irodalomjegyzék .....	85
10. Függelék.....	102

## Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata:

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
acetyl-CoA	Acetil-koenzimA
AOX	Alternatív oxidáz
ATCC	American Type Culture Collection
	Constitutively expressed citrate exporter (konstitutívan expresszált citrát exporter)
cE <i>cexA</i>	
DCW	Dry cell weight (száraz sejttömeg)
dmtA	Divalent metal ion transporter (kétértékű fémion transzporter)
DO	Dissolved Oxygen (oldott oxigén)
	High Performance Liquid Chromatography (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
HPLC	
ICP-MS	Induktív csatolású plazma tömegspektrométer
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
SSF	Solid State Fermentation (szilárd fázisú fermentáció)
TCA	Trikarbonsav-ciklus
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

## Köszönetnyilvánítás

A doktori értekezésem szeretett testvérem, **Ádi** emlékének ajánlom, aki nélkül nem lehetnék, aki vagyok. Köszönöm neki mindazt, amit tőle tanulhattam és azt a tiszta szeretetet, amit nyújtott.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Prof. Dr. Karaffa Levente* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy az elmúlt 4 évben segítette a munkám előrehaladását és minden támogatást megadott annak érdekében, hogy szakmailag fejlődjek és a PhD fokozatot megszerezhessem.

Szeretném kifejezni hálámat *Prof. Dr. Fekete Erzsébet*nek, aki nélkül doktori kutatásaim nem valósulhattak volna meg. Köszönöm, hogy segítőkész és rugalmas hozzáállásával mindig támogatta a munkámat.

A kutatáshoz támogatást nyújtott a *Gróf Tisza István Debreceni Egyetemért Alapítvány Kiválósági PhD Ösztöndíja*, amely jelentős mértékben hozzájárult szakmai fejlődésemhez és személyes kibontakozásomhoz. Külön köszönet illeti *Dr. Takács Evelint* és *Jenei Zsuzsát*, akik mindig készséggel álltak rendelkezésemre az egyetemmel kapcsolatos kérdéseim és ötleteim során, és más helyzetekben is minden alkalommal számíthattam a segítségükre.

Köszönet illeti a Biomérnöki Tanszék minden egykori és jelenlegi tagját, akik elméleti és gyakorlati vonatkozásban segítettek kutatásomat, külön kiemelve *Dr. Kolláth Istvánt* és *Fekete Zoltánt*. Hálás vagyok továbbá *Faggyas Flórának*, aki középiskolás kutató diákként a közös munka során mindig érdeklődő és támogató hozzáállásával gazdagította a labor légkörét.

Külön köszönet illeti *Családomat*, akik végig mellettem álltak ebben a hosszú és kihívásokkal teli időszakban. Köszönöm a türelmet, a szeretetet és az állandó támogatást, amely nélkülözhetetlen volt ahhoz, hogy a nehéz

pillanatokban is kitartsak. Az ő bátorításuk és megértésük sokat jelentett számomra, és segített abban, hogy elérjem céljaimat.

Köszönetet szeretnék mondani *Dr. Márton Alexandra* egyetemi adjunktusnak, aki nemcsak kutatótársként, hanem a legjobb barátként is mindig ott volt az elmúlt években. A közös kísérletek, az örökös brainstorming-ok és a beszélgetések, amik néha egy-egy sör mellett szinte végtelenné váltak, nemcsak szakmailag, de emberileg is rengeteget adtak nekem. Az évek alatt verhetetlen csapattá váltunk és e disszertáció elkészítése során tapasztaltam meg igazán, milyen fontos a közösség, amely körülvesz, milyen sokat jelent a támogatás és barátság, amit a környezetemtől kaptam.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani *Jámbor Petrának*, aki az elmúlt időszakban nemcsak az érzelmi támogatásával, hanem azzal a különleges képességével is mellettem állt, hogy a legnehezebb pillanatokban is mosolyt csalt az arcomra. A közös pillanatok, beszélgetések és a minden helyzetben alkalmazott humoros megjegyzések ('répa') elengedhetetlenek voltak ahhoz, hogy megőrizsem az egyensúlyt és motivációm.

Végezetül, köszönet illeti mindazokat, akik közvetlenül vagy közvetetten hozzájárultak a disszertációm elkészítéséhez.

## 1. Bevezetés

A mikroorganizmusok megjelenése szorosan összefügg a Föld korai fejlődésével és az élet eredetével. A bioszféra első formái, amik nagy valószínűséggel mikroorganizmusok voltak, mintegy 3,5-4 milliárd évvel ezelőtt jelentek meg a Földön (Brown, 2007).

Az emberiség évezredek óta számos területen használja a mikroorganizmusokat. Észrevétlen hűséges „társaink” a civilizáció fejlődése során mindig jelen voltak (Umo, 1997). Az élesztőgombákat véletlenül házasították spontán erjedési folyamatok során, hogy élelmiszereket, például kenyeret, bort, sört és csokoládét készítsenek (Sicard & Legras, 2011). A modern gombabioteknológia, a gombák irányított tenyésztése bioreaktorokban, 1923-ben vált termelői ágazattá, amikor a Pfizer használni kezdte az *Aspergillus niger* citromsav túltermelő és kiválasztó képességét. Az *A. niger* azóta fehérjéket, enzimeket és más termékeket előállító, sokoldalú termelési platformmá vált (Corteseo és mtsai., 2020).

A citromsavtermelést régóta tanulmányozzák, de még napjainkban is vannak tisztázatlan kérdések (Angumeenal & Venkappayya, 2013). A magas hozamú *A. niger* citromsav fermentáció egyik kulcstényezője a mangán-ion: a táptalaj 3-5 µg/l feletti koncentrációja nagymértékben csökkenti a hozamot (100 ppb Mn<sup>2+</sup> koncentrációnál → a hozam több mint 75%-kal csökkent az alacsony Mn<sup>2+</sup> szinthez képest) (Clark és mtsai., 1966, Kisser és mtsai., 1980). Az ipari méretű citromsavtermelést túlnyomórészt rozsdamentes acél fermentorokban végzik, de a törzsek javítására és a gyártási folyamat fejlesztésére használt üveg bioreaktorok is tartalmazznak rozsdamentes acél alkatrészeket, amelyekben a mangán alapvető ötvözőelem (Shackelford & Alexander, 2001). Mivel a citromsav előállítására használt bioreaktorok minden fémrésze rozsdamentes acélból készült, a felületi korrózió miatt

fémionok, köztük magán-ionok oldódhatnak ki a fermentáció során, ezzel rontva a fermentáció hozamát (Fekete és mtsai., 2022).

Az *A. niger* citromsav kiválasztásának mangán(II) érzékenysége valószínűleg részben evolúciós válasz a Föld ősi környezeteiben jelen lévő változó fém koncentrációkra. A korai óceánokban és talajokban végbemenő mangán-oxidáció és lerakódás befolyásolhatta a mikroorganizmusok anyagcseréjét, beleértve a citromsav bioszintézishez kapcsolódó mechanizmusokat (Fischer és mtsai., 2015, Farkas és mtsai., 2021). A modern fermentációs technológiákban a mangán minimalizálása döntő jelentőségű a citromsavtermelés maximalizálása érdekében, amely egyfajta visszacsatolás a természetes evolúciós folyamatokból. Kutatásunknak tehát nem csak a biotechnológiai alkalmazások miatt, hanem az alap kutatás szempontjából is jelentősége van.

## 2. Irodalmi előzmények

### 2.1. A gombák és az élet szárazföldi evolúciója

A világegyetem 13,7 milliárd, a Föld 4,5 milliárd évvel ezelőtt keletkezett, a földi élet kialakulása ~3,7 milliárd éve történt (Brown, 2007, Hahn & Haug, 1986). Nem tisztázott, hogy pontosan mikor hódították meg az eukarióták (melyek ~1.8 milliárd évvel ezelőtt alakultak ki) a szárazföldet, illetve, hogy ez milyen hatással volt az akkori környezetre. Ugyanakkor a szimbiózis fontosságát ebben a folyamatban alátámasztja az arbuszkuláris mikorrhizák jelenléte a legkorábbi gombafossziliákban (460 millió éve) és néhány korai szárazföldi növényben (Selosse & Le Tacon, 1998). Zuzmókat már a devon időszakból (400 millió éve) is ismerünk, bár vannak feltételezések korábbi (prekambriumi; akár 1 milliárd éves) zuzmók és más gombák létezésére vonatkozóan is (Taylor és mtsai., 1995). A gombák evolúciójára vonatkozó molekuláris óra becslések, amelyek egy jól tanulmányozott riboszómális génre alapoznak, egy késő prekambriumi (600 millió éves) szárazföldi kolonizációt sugallanak (Heckman és mtsai., 2001).

### 2.2. Nyomelemek és a mangán biológiai szerepe: geokémiai háttértől az enzimatis funkciókig

A nyomelemek alapvető mikrotápanyagok (Strachan, 2010). Nagyon kis mennyiségben szükségesek a szervezet normális működéséhez. Többségük enzimkomponensként vagy kofaktorként működik; szerepük van a táplálkozási hiányállapotok megelőzésében, az immunfunkciókban, a gének kifejeződésének szabályozásában, az antioxidáns védelemben és a krónikus betegségek megelőzésében (Strachan, 2010, Swaine, 2000). Az esszenciális nyomelemek, mint például a kobalt, a réz, a jód, a vas, a mangán, a molibdén, a szelén és a cink, alapvető szerepet töltenek be a sejtek biokémiai

folyamataiban. Ezek az elemek részt vesznek az enzimatis reakciókban, biztosítva a megfelelő környezetet a szubsztrátok megkötéséhez és átalakításához. Emellett az elektrontranszfer folyamatokban is kulcsszerepet játszanak, amelyek az anyagcsere energiaellátását szolgálják. A vas például fontos szerepet játszik emlősökben az oxigén megkötésében és szállításában. A nyomelemek hozzájárulnak továbbá biológiai molekulák szerkezeti stabilitásához és szabályoznak olyan fontos folyamatokat, mint a sejtmembránok receptorhelyeinek működése vagy a génexpresszió szabályozása (Health, 1989).

A mangán az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló nyomelem a litoszférában, a földkéreg 12. leggyakoribb eleme (Kazantzis, 1981; Archibald & Tyree, 1987). Az átmenetifémek csoportjába tartozik, és egyike azoknak az elemeknek, amelyek több oxidációs állapottal rendelkeznek. A természetben leggyakrabban +2, +3, +4, és +7 oxidációs állapotban fordul elő. Specifikus körülmények között más állapotai is stabilak lehetnek (Nijjer és mtsai., 2000). A  $Mn^{2+}$  ionos forma a legstabilabb redukált állapot, különösen anaerob környezetben, míg a  $Mn^{4+}$  forma, amely jellemzően mangán-dioxidként ( $MnO_2$ ) van jelen, az egyik leggyakoribb oxidált forma (Stobbe és mtsai., 1999). A mangán jellemzően 350 és 2000 mg/kg közötti koncentrációban fordul elő különböző üledékes, magmás és metamorf kőzetekben, különösen mangánércekben, például piroluzitban ( $MnO_2$ ), rodokrozitban ( $MnCO_3$ ) és braunitban ( $Mn_2O_3$ ).

A mangán kémiaiilag a vas csoportjába tartozik, és szoros kapcsolatban áll vele a geokémiai folyamatokban. A természetben a mangán nem fordul elő elemi, tiszta formában, inkább szervetlen és szerves vegyületek részeként van jelen. Mind a mangán-, mind a vas-oxidok a Föld felszínén legnagyobb

mennyiségben előforduló vegyületek közé tartoznak (Archibald & Tyree, 1987).

A mangán többféle szerepet is betölt a szervezetben: aktivátor, amely különböző fém-enzim komplexek részeként serkenti az enzimek működését, másrészt egyes metalloenzimek elengedhetetlen alkotóeleme. Szerepet játszik a fejlődésben, az immunrendszer és az idegrendszer működésében. A sejtek szabadgyökökkel szembeni védelméhez szükséges antioxidáns enzimekhez is kapcsolódhat (Culotta és mtsai., 2006). Ezen kívül feltételezik, hogy a mangán szerepet játszik az asztrociták csillag alakú nyúlványainak kialakulásában, valamint az agyi glutamát glutaminná történő átalakításában, amit a glutaminszintetáz végez (Erikson & Aschner, 2003; Prohaska, 1987). Szerepe van a biogén aminok anyagcseréjében, valamint a szénhidrát-anyagcsere szabályozásában is (Hurley & Keen, 1987; IOM, 2001).

Az emberi szervezet mangánszükségletét egyensúlyi vizsgálatok alapján becsülik. 0,035-0,070 mg/ttkg/nap bevitele egyensúlyt eredményez (McLeod & Robinson, 1972; Stastny és mtsai., 1984; Health, 1989).

A mangán legjobb forrásai a növényi alapú élelmiszerek, különösen a gabonafélék, amelyek 10-100 mg/kg mennyiségben tartalmazzák ezt az elemet (Kazantzis, 1981). Bár embereknél előfordul mangánmérgezés, ezt főként munkahelyi belélegzés okozza (Cooper, 1984), az étrendi mangánbevitel nem toxikus.

A mangán redoxkémiai tulajdonságai különösen figyelemre méltók, mivel lehetővé teszik, hogy a mangán vegyületei elektrononorként vagy -akceptoroként működjenek különböző biokémiai folyamatokban. Az Mn(II) ionok oxidálódása Mn<sup>3+</sup> vagy Mn<sup>4+</sup> állapotba kulcsfontosságú szerepet játszik a mikroorganizmusok energiaanyagcseréjében. A Mn<sup>3+</sup> formák általában instabilak. Ezzel szemben a Mn<sup>4+</sup> állapotú mangán-oxidok stabilak és kiváló

elektronakceptorok, amelyek hozzájárulnak a mikrobiális légzéshez oxigénhiányos körülmények között (Archibald & Tyree, 1987).

Számos micéliumképző gomba képes elősegíteni a mangán oxidációját. A legtöbb esetben ez az oxidáció nem enzimátikus, a gombák valamely metabolikus termékével (pl. hidroxisavval) vagy valamely gomba sejtkomponenssel való kölcsönhatásnak köszönhető.

A mangán-oxidok különleges kémiai tulajdonságaik révén nagy jelentőséggel bírnak az iparban is, például a biobányászat területén (Tebo és mtsai., 2004; Das és mtsai., 2011). A mikroorganizmusok által termelt mangán-oxidok képesek fémionokat mobilizálni vagy megkötni, amely elengedhetetlen az értékes fémek kinyeréséhez vagy környezeti remediációs eljárásokhoz (Das és mtsai., 2011). Feltételezik, hogy a  $Mn^{2+}$ -oxidáló organizmusok az anaerob vagy mikroaerofil körülmények közti túlélés érdekében Mn-oxidokat halmoznak fel elektronakceptorként. Ennek a biobányászatban van jelentősége (Das és mtsai., 2011; de Vrind és mtsai., 1986; de Vrind, és mtsai., 1986).

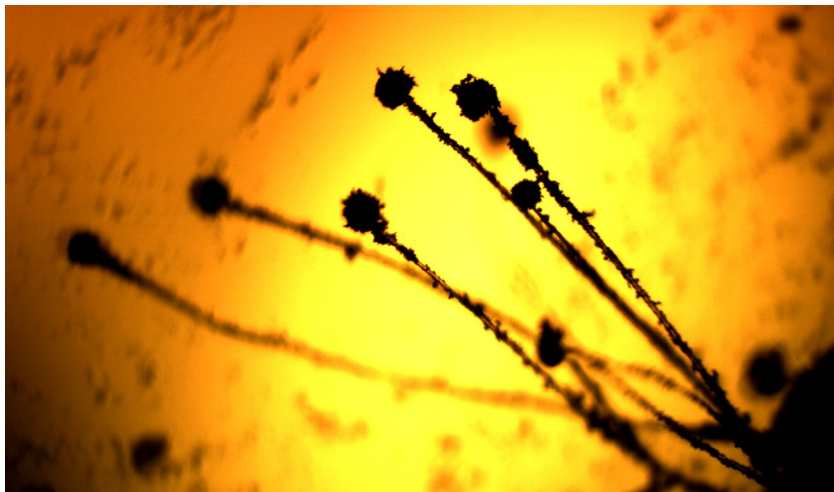
A Föld korai fejlődése meghatározta bolygónk légkörének és kérgének összetételét, beleértve a nehézfémek, például a mangán jelenlétét. A korai Föld légköre, valamint az óceánokban található ásványi anyagok- és fémek koncentrációja nagyban különbözött a maitól. A köpeny már számos alkalommal átalakult a lemeztektonika és a magmatikus folyamatok hatására. Jelenleg a nehéz elemek nagy része a magban, míg a könnyebb elemek a kéregben és a légkörben koncentráálódtak (Carlson és mtsai., 2014). A nehéz elemek nem differenciálódtak teljesen, így a köpenyben is magasabb volt a vas koncentrációja napjainkhoz viszonyítva. Ehhez a környezethez alkalmazkodva alakultak ki az első mikroorganizmusok. A Föld korai időszakában a mangán fontos szerepet játszott az ősi óceánokban. Oxidációs-redukciós folyamatokon

keresztül befolyásolta a környezet biogeokémiai ciklusait (Balistrieri & Murray, 1986). Az ősi mikroorganizmusok, köztük az *A. niger* ősei is, ebben a fémekben gazdag környezetben fejlődtek ki. Ennek eredményeként számos mikroorganizmus kifejlesztett olyan enzimatikus mechanizmusokat, amelyek segítették őket a nehézfémek, például a mangán kezelése során. Ezek közé tartozik a mangán-függő szuperoxid-diszmutáz, amely antioxidáns védelmet biztosít a sejtek számára az oxidatív stressz ellen (Lou, 2001; Bresciani és mtsai., 2015). A mangán jelenlétére adott evolúciós válaszok ma is meghatározzák számos mikroorganizmus növekedését, metabolikus folyamataik milyenségét (Eschenmoser, 2007). A mangán számos fehérje megfelelő működéséhez elengedhetetlen, például: oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok, ligázok kofaktora (Smith és mtsai., 2017). Az *A. niger* esetében is láthatóak ezek a hatások.

### 2.3. *Aspergillus niger*

Az *A. niger* (1. ábra) az egyik legfontosabb eukarióta biotechnológiai platform. Először 1923-ban nyert gyakorlati jelentőséget, amikor ipari léptékben hasznosították citromsav-termelő képességét (Schuster és mtsai., 2002).

A legújabb taxonómiai kutatások szerint az *Aspergillus* nemzetség jelenleg 592 fajt foglal magában, amelyek 6 alnemzetségbe és 27 szekcióba sorolhatók. Az *A. niger* a *Nigri* szekcióba tartozik, amely a legújabb besorolások szerint 13 fekete spórájú fajt foglal magában. Ezek közül több kriptikus fajnak tekinthető, mivel morfológiailag nehezen megkülönböztethetők egymástól (Bian és mtsai., 2022).



1. ábra: *A. niger* NRRL 2270

Az *A. niger* kiemelkedik alkalmazkodó- és túlélési képességében, emiatt mindenhol megtalálható a természetben: a talajban (Xie és mtsai., 2006), óceánban (Li és mtsai., 2016; Uchoa és mtsai., 2017), az Antarktiszon (Singh és mtsai., 2011) és a világűrben is (SPACE, 2024)). Széles spektrumú élőhelyet foglal el állatokban és növényekben, például gyógynövényekben (Shreelalitha & Sridhar, 2015), cserjékben (Kaur és mtsai., 2015; Liu és mtsai., 2016), fákban (Soltani & Moghaddam, 2014; Wang és mtsai., 2019), és zuzmókban (Elissawy és mtsai., 2019). Él garnélákban (Liu és mtsai., 2013; Fang és mtsai., 2016) és tengeri szivacsokban is (Takano és mtsai., 2001; Hiort és mtsai., 2004). Az *A. niger* jól fejlődik különböző szénforrásokat (glükóz, korpa, maltóz, xilán, xilóz, szorbit, laktóz) tartalmazó táptalajokon (Toghueo és mtsai., 2018). Anyagcseréjét jelentősen befolyásolja a tápközeg összetétele és az alkalmazott fermentációs technológia (Papagianni M., 2007).

Az *A. niger* ATCC 1015 egy vad típusú citromsav-termelő törzs, amelyet széles körben alkalmaznak ipari fermentációkban. Genomikai vizsgálatok kimutatták, hogy jelentős különbségek vannak közte és az

enzimtermelő törzsek között, különösen a szekunder metabolitok és a citromsav-transzport mechanizmusok tekintetében.

Az *A. niger* NRRL 2270 törzs széles körben alkalmazott az iparban, különösen a citromsav termelésében. Ez a törzs az ATCC 11414 kultúráként is ismert, és az ATCC 1015 törzsből származik. A citromsav-termelés optimalizálására irányuló kutatásokban gyakran használják, mivel képes nagy hozamú citromsav előállítására.

#### 2.4. *Aspergillus niger* termékportfóliója - GOMBAbiztos jövő

Az *A. niger* metabolikus sokoldalúsága és nagy hozamú termelési potenciálja miatt kiemelkedő szerepet tölt be a biotechnológiában, különösen az ipari fermentációk területén (Cairns és mtsai., 2021). A XX. század első felében csak citromsav termelő képessége miatt volt jelentős; később felismerték, hogy számos iparilag fontos enzim (oxidázok, dehidrogenázok, hidrolázok, cellulázok és pektinázok) előállítására is alkalmas. A kromatográfia fejlődése lehetővé tette az *A. niger* által termelt fehérjék tisztítását és elemzését, ami az enzimfunkciók megértéséhez is hozzájárult. Az 1960-as évek végén izolálták a gomba glükóamiláz izoenzimeit, amelyeket a keményítő → glükóz átalakítás révén a fermentációs-, élelmiszer- és italiparban hasznosították (Lineback és mtsai., 1969; Pazur és mtsai., 1971).

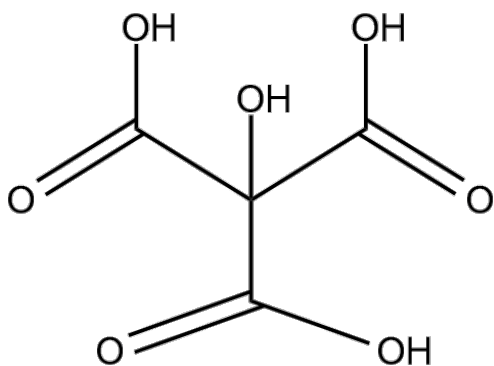
A fonalas gombák, így az *A. niger* is, képesek több tucat másodlagos (szekunder) metabolitot előállítani, amelyek közé tartoznak terápiás szerek, antimikrobiális anyagok és ízesítőanyagok. Felhasználhatók továbbá eukarióta fehérjék heterológ termelésére is (Richter és mtsai., 2014), de előállíthatók más szerves savak is, mint például a borkősav, amelyet az élelmiszer- és gyógyszeriparban használnak, és alternatívája lehet a vegyiparban alkalmazott

maleinsav-anhidridnek (Kövilein és mtsai., 2019). Bár a borkősavat jellemzően fosszilis alapú alapanyagokból szintetizálják, jelentős volumetrikus hozamot értek el *A. niger* fermentáció során (pl. 200 g/l) (Xu és mtsai., 2019; Xu és mtsai., 2020; Cao és mtsai., 2020). További fontos szerves sav az itakonsav, amelyet az *Aspergillus terreus* bioszintetikus és transzport génjeinek heterológ expressziójával sikerült *A. niger* izolátumokon keresztül előállítani (van der Straat és mtsai., 2014).

Az *A. niger* szerepet játszhat az űrkutatásban és a fenntartható technológiák fejlesztésében. Hosszú távú űrmissziók során az önellátó rendszerek kialakítása kulcsfontosságú, mivel az utánpótlás a Földről nem lehetséges. Az 1988-ban a Mir űrállomás felületein felfedezett gombás képződmények bizonyították először, hogy egyes mikroorganizmusok nemcsak túlélnek az űrbéli környezetet, hanem növekedni is tudnak (Corteseo és mtsai., 2020). Ezen felismerés nyomán hipergravitációs kísérleteket végeztek gombákkal, hogy megértsék túlélési mechanizmusait és alkalmazhatóságukat az űrben. A kutatások szerint az *A. niger* élelmiszer- és gyógyszergyártásban, valamint építőanyagként is alkalmazható lehet űrmissziók során (Corteseo és mtsai., 2020; Jemison & Olabisi, 2021; SPACE, 2024). További fejlesztések (pl. stresszválasz gének vizsgálata) szükségesek azért, hogy a gomba jobban ellenálljon az űrbéli környezetnek és megtartsa termelési kapacitását (Koch és mtsai., 2023; Zou és mtsai., 2015; Xu és mtsai., 2019).

## 2.5. Citromsav

A citromsav ( $C_6H_8O_7$ ) (2. ábra) széles körben – gyógyszeripar, vegyipar, kozmetikai ipar, műanyagipar, környezetvédelem, kohászat – alkalmazott vegyület (Socco és mtsai., 2006; Angumeenal & Venkappayya, 2013). Előállítása napjainkban szinte kizárólag mikroszkópikus gombák révén történik; a leggyakrabban használt faj az *A. niger*, de élesztőgombákat



2. ábra: Citromsav szerkezeti képlete

(*Yarrowia lipolytica*) is alkalmaznak erre a célra (Książek, 2024).

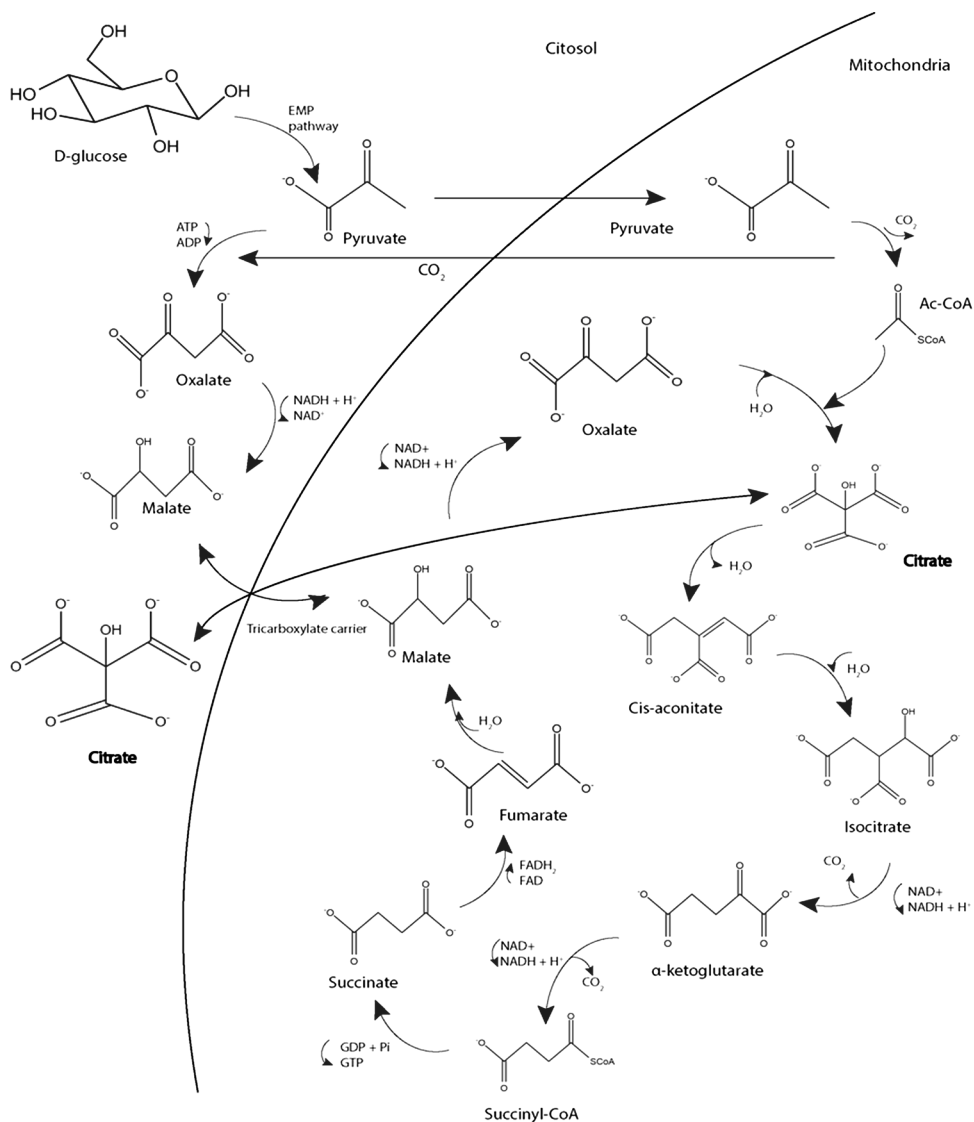
A citromsav megtalálható minden élőlényben (Karaffa & Kubicek, 2019). Viszonylag jelentős mennyiségben található a citrusfélékben. A termék szárazanyagának 1%-át

meghaladó mennyiségben jelen van a citromban (4-8%), a szederben (1,5-3,0%), a grapefruitban (1,2-2,1%), valamint narancsban, málnában és eperben (0,6-1,3%) (Show és mtsai., 2015). A citromsav a Krebs-ciklusban keletkezik. Széles körű alkalmazását magyarázza, hogy nem toxikus, továbbá fémionokat köt meg, kelátokat képezve (Karaffa & Kubicek, 2003). A globális citromsavtermelés évente mintegy 2,8-3 millió tonnát tesz ki. A citromsav az élelmiszer-adalékanyagipar egyik leggyorsabban növekvő szereplője (E330), de más piaci területeken is folyamatosan nő (Książek, 2024).

Bár számos mikroorganizmus felhasználható citromsav előállítására, az *A. niger* a fő ipari termelő. Az elméleti hozam 112 g anhidrid citromsav 100 g szacharózra vetítve. A gyakorlatban azonban a trofofázis során bekövetkező veszteségek miatt a citromsav hozama ezekből a törzsekből gyakran nem

haladja meg a szénforrás elméleti hozamának 80%-át. Annak ellenére, hogy a citromsav előállításának hosszú és sikeres története van, a folyamat biokémiai alapjainak egységes magyarázata még nem áll rendelkezésre (Max és mtsai., 2010).

## 2.6. Citromsav képződésének biokémiája



3. ábra: Citromsav szintézis sematikus ábrája *A. niger* fonalas gombában

A citromsav elsődleges metabolit, és felhalmozódása nagymértékben függ a lebontó anyagcsere folyamatoktól, például a glikolízistől és a trikarbonsav-ciklustól (TCA) (3. ábra) (El-Manis és mtsai., 2018). A fermentációt nagyon alacsony pH-értéken kell végrehajtani, hogy biztosítsuk, minden glükóz a citromsav szintézisére irányuljon (Karaffa és mtsai., 2001).

Az *A. niger* törzsek rendelkeznek glükóz-oxidázzal. Ez az enzim magas glükóz koncentráció, erőteljes levegőztetés (=magas oldott oxigénszint) és más tápanyagok (foszfát, nitrogén stb.) alacsony koncentrációja esetén aktiválódik, amelyek jellemző körülmények a citromsav termelése során (Karaffa és mtsai., 2001). Ezért a glükóz-oxidáz kifejeződik, átíródik és katalizálja a glükóz glükonsavvá alakulását. Mivel az enzimet közvetlenül befolyásolja a külső pH-szint, pH 3,5 alatt deaktiválódik. Figyelembe véve a citromsav pK értékeit, a tenyészet pH-ja akár 1,5 alá is csökkenhet, deaktiválva a glükóz-oxidázt és az összes glükózt a citromsav felhalmozás felé irányítva (Karaffa és mtsai., 2001).

A magas hozamú fermentációk előfeltétele, hogy a mangán koncentrációja a tápközegben 5 µg/l alatt maradjon (Fejes és mtsai., 2020), mivel a sejt képes citrátot exportálni, de annak visszavétele csak mangán-citrát kelát formájában lehetséges. Magasabb mangánszintek esetén fokozott kelátképződés léphet fel, ami csökkentheti az extracelluláris citrát akkumulációját, ezáltal rontva a fermentáció hozamát. (Karaffa és mtsai., 2001). A mangán-hiányos micéliumok vakuoláltak, erősen elágazók, vastagabb sejtfalúak és gumós megjelenésűek. Ez létrehozza a pellet formát, amely kulcsszerepet játszik a citromsav fermentációjában, és felhasználható a fermentáció nyomon követésére és kezelésére, mikroszkópos képelemzés segítségével (Karaffa & Kubicek, 2003).

Ha a pH-szintek elég alacsonyak, a citromsav felhalmozódásáért felelős metabolikus útvonal aktiválódik. A glükóz transzportja utáni első lépés a cukor foszforilációja, ehhez az *A. niger* két foszforiláló enzimmel rendelkezik: hexokináz és glükokináz (Max és mtsai., 2010). A hexokináz képes foszforilálni mind a glükózt, mind a fruktózt, míg a glükokináz kizárólag a glükóz foszforilálására képes. Ezt követően a glükóz-6-foszfát tovább

alakulhat a glikolízisben vagy a pentóz-foszfát ciklusban. A fermentáció korai szakaszaiban az utóbbi az előnyben részesített útvonal, mivel hozzájárul a biomassza és NADPH képződéséhez (Karaffa és mtsai., 2001). A fermentáció későbbi szakaszaiban a pentóz-foszfát ciklus kisebb szerepet játszik, és a glikolízis válik a szén metabolizmusának fő útvonalává. A glikolitikus útvonal végén piruvát termelődik, amely ezt követően dekarboxilálódik, így acetyl-CoA képződik (Berg és mtsai., 2019). E folyamat során CO<sub>2</sub> keletkezik, amelyet a piruvát-karboxiláz használ fel oxálacetát generálására (Cleland-Johnson mechanizmus), ezáltal biztosítva a citromsav két előanyagát, amelyek szükségesek a citrát-szintáz enzim aktiválásához. E folyamat során a citromsav felhalmozódása nagymértékben függ az intenzív levegőztetéstől, és bármilyen légzési zavar káros hatással lehet a citromsav termelésére, de nem a micélium növekedésére. Ennek oka a cianrezisztens, szalicil-hidroxámsav-érzékeny alternatív légzési út jelenléte, amely kedvez a citromsav termelésének (Karaffa és mtsai., 2001). Továbbá, a citokrom-függő enzimek aktivitása csökken, míg az alternatív oxidáz aktivitása növekszik. Az alternatív oxidáz (AOX) génje a nukleáris genomban található, de maga az enzim a mitokondrium belső membránjába van beágyazva (Flipphi és mtsai., 2023). Az AOX az ubiquinon (koenzim Q) oxidációját katalizálja, melynek során az oxigént négy elektron segítségével vízzé redukálja. A légzési lánc I., III. és IV. komplexeivel ellentétben – ahol az elektrontranszport proton transzlokációval jár, és a belső mitokondriális membrán két oldalán kialakult protongradiens az ATP szintéziséhez kapcsolódik – az AOX-on keresztüli elektrontranszport nem kapcsolódik az ATP szintéziséhez. A koenzim Q oxidációja során keletkező energia az alternatív elektrontranszport során hővé alakul (Rogov és mtsai., 2015). Tekintettel arra, hogy a citromsav felhalmozódásának idején a növekedés gyenge, a sejtek ATP-igénye alacsony. Ez lehetővé teszi, hogy átkapcsoljanak a citokrom-függő légzésről az AOX-ra, mely mint említettem,

NADH-t NAD<sup>+</sup>-vá oxidál anélkül, hogy ATP keletkezne. Az alternatív légzési útvonal hozzájárul a reaktív oxigénformák mennyiségének csökkentéséhez, amelyek az oxigénfüggő (aerob) anyagcsere során óhatatlanul keletkeznek, és lipid-peroxidációhoz, valamint a membrán károsodásához vezethetnek (Karaffa és mtsai., 2001).

### 2.7. Citromsavtermelő *A. niger* törzsfeljesztése

Egy magas hozamú citromsav fermentációnak több előfeltétele van (Reinfurt és mtsai., 2023). Fontos a kiindulási szénforrás, a megfelelő oxigén ellátottság és kevertetés, de a habképződés is befolyásolhatja a végső hozamot. Legfontosabb azonban a Mn<sup>2+</sup> jelenléte (Reinfurt és mtsai., 2023; Fekete és mtsai., 2022). Ezen fém ion jelenléte, törzstől függően, 3-5 µg/l koncentrációban befolyásolja a hozamot.

A citromsav bioszintéziséből adódóan feltételezték, hogy a glikolízis kulcsenzimeit, például a foszfofruktokináz és a piruvát kináz túltermelése növelheti a citromsav felhalmozódását (Karaffa, Sándor, Fekete, & Szentirmai, 2001). Ezen enzimek túltermelése azonban sem külön-külön, sem együtt nem eredményezett szignifikáns hozamnövekedést (Ruijter és mtsai., 1997). Valójában azt fedezték fel, hogy a foszfofruktokináz túltermelése csökkenti a fruktóz 2,6-biszfoszfát szintjét. A fruktóz 2,6-biszfoszfát egy pozitív alloszterikus szabályzó, ami növeli a foszfofruktokináz aktivitást (Ruijter és mtsai., 1997).

Ugyanezen logika mentén megpróbálták létrehozni olyan törzset, amely túltermelte a citrát szintetáz enzimet, amely az acetyl-CoA és az oxalacetát citráttá történő átalakításáért felelős a TCA-ciklus során (Karaffa és mtsai., 2001). A citromsav termelése azonban változatlan maradt. (Kobayashi és

mtsai., 2013). Ezek a tanulmányok azt mutatják, hogy a sebesség meghatározó lépések nem a központi anyagcsereáramokban találhatóak, hanem három fő transzport lépésben: hexóz felvétel és/vagy foszforiláció, citrát export a mitokondriumból, és citrát export a citoplazma membránon keresztül (Karaffa & Kubicek, 2003).

Torres (Torres, 1994) kiszámolta, hogy a citromsav fermentáció során az egyik sebességmeghatározó lépés a glükóz transzportja; bármilyen változás ebben a folyamatban közvetlenül befolyásolja a hozamot. Később azonosították és klónozták a HGT1 nevű, nagy affinitású glükóz transzportert kódoló gént (*hgt1*). Ennek túltermelése előnyös a citromsav hozamra, mivel közvetlenül növeli a cukor felhasználását, és közvetett pozitív hatást fejt ki a kulcsfontosságú anyagcsere-gének kifejeződésére (Xue és mtsai., 2021). A felvételt azonban nemcsak a glükóz transzporterek hatékonysága befolyásolja, hanem a szénforrás minősége és koncentrációja is. A gyorsan hasznosuló szénforrások magas koncentrációja magas citromsav hozamot eredményez (Xu és mtsai., 1989).

Hou és munkatársai (Hou és mtsai., 2018) az *A. niger* CGMCC10142 törzsben a cianid-rezisztens alternatív oxidáz (AOX) enzimet kódoló *aox1* gént deléciónal és túltermeléssel módosították. Kimutatták, hogy az *aox1* gén túltermelése növeli a citromsav termelését, továbbá cianid-rezisztens légzést (CRR) is észleltek az *A. niger* micéliumaiban citromsav termelési körülmények között. Az AOX jelenléte tehát enyhíti a foszfofruktokináz ATP-többlet miatti gátlását, és csökkenti a reaktív oxigénradikálok által okozott károkat is (Campos és mtsai., 2015). Amikor a citromsav elkezd felhalmozódni, a citokróm-függő légzés helyét átveszi az alternatív útvonal, amely lehetővé teszi a NADH oxidációját (regenerálódását) anélkül, hogy ATP keletkezne (Papagianni, 2007).

A mitokondriális citrát exportot *A. niger*-ben a mitokondriális citrát transzporterek (Ctps) végzik, melyek még nincsenek teljesen jellemezve (Cao és mtsai., 2022). Cao és munkatársai azonosítottak 6 db, feltételezetten di- és trikarbonsav szubsztrátumokat transzportáló *ctp* kódoló gént (*ctpA-ctpF*). A túltermeltetett *ctpA*, *ctpB* és *ctpD* gének rendre 32,8%, 19,3% és 24,2% -kal növelték a citromsav felhalmozódását. Felfedezték továbbá, hogy ezek a transzporterek szerepet játszanak a gomba növekedésében, pigmentációjában és a konídiumok kialakulásában (Cao és mtsai., 2022). Korábban azt hitték, hogy a citrátot csak a mitokondriális trikarboxil transzporter által lehet a citoszolba szállítani, amely a citráttal versenyez az akonitázért (Karaffa & Kubicek, 2003).

A citromsav felhalmozódásának utolsó sebességmeghatározó lépése a citromsav exportja a citoplazma membránon keresztül (Karaffa & Kubicek, 2003). Steiger és munkatársai (Steiger és mtsai., 2019) azonosítottak egy transzporter gént, amely a *CexA* nevű fehérjét kódolja. Amikor elnyomták a *cexA* gént, a citromsav kiválasztása teljesen leállt, míg a túltermelés jelentős citromsav kiválasztáshoz vezetett: indukálható rendszerben ~109 g/l citromsav kiválasztást eredményezett, ami ötszörös növekedést jelentett a vad típushoz képest. Ezzel megerősítve, hogy a *CexA* az *A. niger* fő citromsav transzportere. Azonban a *cexA* túltermelése csökkent konídium képződést eredményezett, vagyis ez a gén befolyásolhat más sejtfolyamatokat is, amelyek negatív hatással lehetnek a fermentációs folyamatra (Steiger és mtsai., 2019).

Az *A. niger* citromsav termelését alapvetően befolyásolja a mangán-ion felvétel is – a termelés és a felvétel között negatív korreláció áll fenn. Fejes és munkatársai (Fejes és mtsai., 2020) azonosították és jellemezték az *A. niger* NRAMP enzimes család permeázát (*DmtA*), ami egy magas affinitású mangántranszporter (más divalens kationokat is képes vélhetően

transzportálni, innen származik a név: divalent metal ion transporter). A *dmtA* gén hiányában a citromsav termelése lassabb, de a hozam változatlan volt. A mutáns törzs 5 µg/l mangán mellett 120 g/l citromsavat termelt 350 óra alatt, 40 órás késéssel a vad típushoz képest. A vad típusú törzsben 100 µg/l mangán jelenlétében a citromsav-termelés 60%-kal csökkent, míg a *dmtA* deléciós mutáns esetében csak 20%-os csökkenés volt tapasztalható. Amikor a *dmtA*-t túltermeltették, az intracelluláris mangán-koncentráció növekedett, változást okozva a citromsavtermeléstől a biomassza képződésig. A citromsav-termelése az eredeti érték mindössze 17%-ára csökkent, miközben ötször több biomasszát termelt. A *dmtA* manipulációja révén tehát fejleszthető a citromsav fermentáció (Fejes és mtsai., 2020).

## 2.8. Citromsav fermentációt befolyásoló tényezők

A citromsav felhalmozódását jelentősen befolyásolja a tápközeg összetétele, különösen sülllesztett fermentációs folyamatokban. Az első szisztematikus vizsgálatokat James N. Currie (Currie, 1917) végezte, aki kimutatta, hogy az *A. niger* megfelelő körülmények között jelentős mennyiségű citromsavat képes termelni. Currie munkája rávilágított arra, hogy a cukrok magas koncentrációja és a pH szabályozása kulcsfontosságú tényezők a citromsav-termelés szabályozásában (Currie, 1917).

A citromsav túltermelésének feltételei azonban az 1940-es évekig nem voltak teljesen tisztázottak (Shu & Johnson, 1948). Shu és Johnson kutatása (Shu & Johnson, 1948) bizonyította, hogy a tápközeg pontos összetétele és a mikroelemek koncentrációja – különösen a mangán(II)-ionok szintje – meghatározó a citromsav-termelés hatékonyságában. Kísérleteik során kimutatták, hogy a magas hozamú fermentációhoz az alábbi feltételek szükségesek:

- szacharóz, mint szénforrás (optimális koncentráció: 140–260 g/l),
- ammónium-nitrát ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), mint nitrogénforrás,
- optimális foszfátkoncentráció (~2,5 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),
- alacsony mangán(II)-ion-koncentráció,
- savas pH (2,2–4,2 tartományban), amely kedvez a citromsav-termelésnek, és gátolja az oxálsav képződését,
- megfelelő oxigénellátás a fermentáció során.

Shu és Johnson kutatása rávilágított arra is, hogy a mangán(II)-ionok szintje kritikus tényező, mivel a túlzott mennyiség gátolja a citromsav-felhalmozódást azáltal, hogy elősegíti az enzimatikus szabályozási mechanizmusok működését, amelyek másodlagos metabolitok, például oxálsav képződéséhez vezetnek (Shu & Johnson, 1948).

A későbbi kutatások tovább finomították a citromsav-termelés paramétereit, de a Currie és Shu & Johnson által meghatározott alapelvek a mai napig az ipari fermentáció optimalizálásának alapját képezik.

### 2.8.1. Szénforrás hatása a citromsavtermelésre

Azok a cukrok biztosítanak magas citromsav hozamot, amelyeket a mikroorganizmus gyorsan képes hasznosítani (Mattey, 1992). A poliszacharidok csak akkor alkalmasak fermentációs szénforrásnak, ha a gomba rendelkezik olyan hidrolitikus enzimekkel, amelyek a fermentációhoz szükséges alacsony pH-érték mellett is hatékonyak. Általánosan előnyösebb a szacharóz a glükózzal szemben (Gupta és mtsai., 1976; Hossain és mtsai.,

1984; Kubicek és mtsai., 1985), mivel az *A. niger* olyan extracelluláris micéliumhoz kötött invertázt termel, amely alacsony pH-n is aktív.

Az ipari fermentációkban a legelterjedtebb szénforrások a keményítő hidrolíziséből származó glükózszirupok, a cukorrépa-melasz, valamint a gyenge minőségű cukornád melléktermékek, amelyek általában magas kationtartalommal szennyezettek korábbi feldolgozási folyamatok miatt. Ezeknek az előkezeléseknek az összetettsége miatt számos kutatás finomított cukrokkal, főként glükózzal vagy szacharózzal folyt (Max, és mtsai., 2010).

A szénforrás koncentrációja kulcsfontosságú a magas hozamú citromsav fermentációhoz. A citromsav végső hozama nő a cukor kezdeti koncentrációjának növelésével batch eljárásokban, vagy a glükóz adagolási sebességével kemosztátokban, miközben a specifikus növekedési ráta fordított módon változik (Shu & Johnson, 1948; Honecker és mtsai., 1989; Papagianni és mtsai., 1999; Papagianni és mtsai., 1999). A legnagyobb termelékenységet általában 14-22%-os cukorkoncentrációval érik el, mivel az ilyen magas szénforrás-koncentrációk elnyomják az  $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenázt (Hossain és mtsai., 1984), ezáltal elősegítik a citromsav felhalmozódását. Az alacsony glükózsztint ezzel szemben nem kedvez a citromsav-termelésnek, és jelentős hatással van a micélium fejlődésére is (Papagianni és mtsai., 1999).

Hang és Woodams (Hang & Woodams, 2000) egy vizsgálat során *A. niger* NRRL 2001 törzs felhasználásával értékelték a kukoricahéj fermentálhatóságát, különös tekintettel az előkezelési és fermentációs paraméterek optimalizálására. A 0,5 mol/l NaOH-os előkezelés, majd enzimatikus hidrolízis Rapidase Pomaliq (celluláz és xilánáz) alkalmazásával jelentősen növelte a citromsav-hozamot. Az optimális körülmények között (30°C, 120 órás fermentáció) a citromsav-termelés elérte a  $259 \pm 10$  g/kg

szárazanyag értéket (Hang & Woodams, 2000). A szerzők a citromsav-termelést g/kg szárazanyag egységben adták meg. Tekintve, hogy a vizsgálat során 20 g szárazanyagot alkalmaztak 100 ml fermentációs közegben (ami 200 g/l szubsztrátkoncentrációnak felel meg), ez a hozam megközelítőleg 52 g/l citromsav-termelésnek számítható.

Az irodalomban számos törzs (*A. niger* és *Y. lipolytica*) citromsav-termelésének hozamai, szénforrás, különböző fermentációs körülmények és az alkalmazott mikroorganizmusok részletesen dokumentáltak. A következő táblázat (1. táblázat) ezek összefoglalását szemlélteti (Reena, és mtsai., 2022).

Felhasznált törzs	Felhasznált szubsztrát/ szénforrás	Fermentáció típusa	Citromsav hozam	Hivatkozások
<i>A. niger</i> AA120	Makk-keményítő	Rázatot lombik	32,9 g/l	Zhang, és mtsai., 2019
<i>A. niger</i>	Nádmelasz	Süllyesztett	32 g/l	Khatab és mtsai., 2017
<i>A. niger</i>	Mangó- és narancshéj	Felületi fermentáció	~12 g/l (mangó), ~14 g/l (narancs)	Abbas és mtsai., 2016
<i>A. niger</i> PLA30	Savó	Felületi fermentáció	72,11%	Alnassar és mtsai., 2016
<i>Y. lipolytica</i> CBS 2073	Nyers glicerin	Batch	9,4 ± 0,8 g/l	Ferreira és mtsai., 2016
<i>Y. lipolytica</i> W29	Nyers glicerin	Batch	10,3 ± 0,1 g/l	Ferreira és mtsai., 2016
<i>A. niger</i> GCB-117	Nádmelasz	Süllyesztett	14,17 g/l	Iqbal & Utara, 2015

<i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095	Glicerin	Batch	59 g/l	Avila-Neto és mtsai, 2014
<i>Y. lipolytica</i> NG40/UV7	Glicerin	Fed-batch	115 g/l	Morgunov és mtsai, 2013
<i>Y. lipolytica</i> NG40/UV7	Repceolaj	Rázatot lombik	175 g/l	Kamzolova és mtsai., 2011
<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5033	Glicerin	Batch	50,1 g/l	André és mtsai, 2009
<i>Y. lipolytica</i> H222	Glükóz	Batch	41 g/l	Moeller és mtsai, 2007
<i>A. niger</i> ATCC 9642	Savó	Felületi fermentáció	106,5 g/l	El-Holi & Al-Delaimy, 2003
<i>Y. lipolytica</i> LGAM S(7)1	Biodízelipari glicerin	Rázatot lombik	35 g/l	Papanikolaou és mtsai., 2002
<i>A. niger</i> NRRL 2001	Kukoricahéj	Rázatot lombik	259 ± 10 g/kg (~52 g/l)	Hang & Woodams, 2000
<i>A. niger</i> NRRL 2270	D-glükóz	Süllyesztett	120 g/l	Fejes, és mtsai., 2020
<i>A. niger</i> ΔdmtA	D-glükóz	Süllyesztett	~120 g/l	Fejes, és mtsai., 2020
<i>A. niger</i> dmtAOE	D-glükóz	Süllyesztett	25-30 g/l	Fejes, és mtsai., 2020

1. táblázat: Citromsavtermelés összehasonlítása különböző törzsek, szénforrások és fermentációs stratégiák alapján

### 2.8.2. Nitrogén és foszfát limitáció

Egyes komplex táptalajok (mint például a melasz) nitrogénben gazdagok, ezért ritkán szükséges nitrogénforrással kiegészíteni őket. A laboratóriumi kutatásokban használt nagy tisztaságú táptalajokat általában ammóniumsókkal, különösen ammónium-nitráttal és -szulfáttal egészítik ki, ami a pH csökkenését idézi elő, ez pedig kedvez a fermentációnak (Mattey M., 1992).

Nitrogén- és foszfáthiány hatásaival kapcsolatban ellentmondásos eredmények találhatók az irodalomban. Shu és Johnson (Shu & Johnson, 1948) szerint a foszfát nem feltétlenül szükséges korlátozó tényezőként a citromsav-termeléshez. Később Kubicek és Röhr (Kubicek & Röhr, 1977) kimutatták, hogy foszfát-hiány esetén a citromsav felhalmozódik, még akkor is, ha a nitrogén szintje nem limitált. Kristiansen és Sinclair (Kristiansen & Sinclair, 1979) folyamatos tenyészetekkel végzett kísérleteik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a citromsav-termeléshez elengedhetetlen a nitrogén korlátozása. Végül, Papagianni és munkatársai (Papagianni és mtsai., 1999; Papagianni és mtsai., 1999) azt találták, hogy ha a fémionok nem korlátozó tényezők, a foszfát többlete másodlagos reakciókhoz és biomassza-növekedéshez vezethet.

### 2.8.3. A pH szerepe a fermentáció különböző szakaszaiban

A közeg pH-ja két szakaszban is jelentős szerepet játszik a folyamat során. Először a fermentáció kezdeti szakaszában a spórának a csírázáshoz magasabb pH értékre van szüksége (Angumeenal & Venkappayya, 2013), mint a fermentáció későbbi szakaszaiban. Az ammónia felszívódása a csírázó spórák által protonok felszabadulását okozza, ami csökkenti a pH-t, és javítja a citromsavtermelést (Papagianni, 2007). Az alacsony pH-érték a termelési

fázisban ( $\text{pH} < 2$ ) csökkenti a mikrobiális fertőzés kockázatát, és gátolja a nem kívánt szerves savak (pl. glükonsav és oxálsav) képződését (Angumeenal & Venkappayya, 2013), ami egyszerűbbé teszi a termék visszanyerését (Max és mtsai., 2010).

#### 2.8.4. Az oldott oxigénszint és a levegőztetés szerepe a citromsav fermentációban

Az oldott oxigénszint jelentős hatással van a citromsav-termelésre, és számos vizsgálat igazolta, hogy már rövid ideig tartó levegőztetési zavarok is befolyásolhatják a hozamot. Kubicek és munkatársai (Kubicek és mtsai., 1980) kimutatták, hogy a kritikus oldott oxigénszint a növekedési szakaszban 18–21 mbar, míg a termelési szakasz során 23–26 mbar között van. Ha az oldott oxigénszint 25 mbar alá csökkent, a citromsav-termelés teljesen megszűnt. Az oldott oxigénszint 40 és 150 mbar között fokozatosan növelte a citromsav-termelést, azonban ha az oxigénellátás hirtelen csökkent, az a termelési ütem maradandó csökkenéséhez vezetett.

A levegőztetés megszakításának időtartama szintén kritikus tényező. Kubicek és munkatársai (Kubicek és mtsai., 1980) szerint egy 20 perces levegőztetési szünet a citromsav-termelés több mint 85%-os csökkenését okozta, és a termelés már nem állt helyre az eredeti szintre. Dawson és kutatócsoportja (Dawson és mtsai. 1986) ezzel szemben azt találták, hogy rövid ideig tartó ( $\leq 20$  perces) levegőztetési szünetek nem okoztak visszafordíthatatlan károsodást a citromsav-termelésben. Ha azonban az oldott oxigénszint 120 percig 0%-on maradt, a végső citromsav-koncentráció 45%-ról 21%-ra csökkent. Ugyanakkor még 85 percig tartó 0%-os oldott oxigénszint után is tapasztaltak helyreállást, bár egy késleltetési fázissal.

Ezek az eredmények jól szemléltetik, hogy az oldott oxigénszint finom szabályozása kulcsfontosságú a citromsav-termelés optimalizálásához, mivel mind a csökkenő, mind a hirtelen változó oxigénszint káros, és adott esetben visszafordíthatatlan hatással lehet a folyamatra.

#### 2.8.5. Nyomelemek hatása az *A. niger* növekedésére és citromsav-termelésére

Az *A. niger* többféle nyomelemet igényel a növekedéshez (Behera és mtsai., 2021), de többet közülük (Mn, Zn, Fe, Cu) limitált (szuboptimális) értéken kell tartani a citromsav túltermeléshez (Shu & Johnson, 1948; Behera és mtsai., 2021), különösen a süllyesztett fermentáció során.

Shu és Johnson (Shu & Johnson, 1948) kimutatták, hogy a  $Zn^{2+}$  és  $Fe^{2+}$  optimális szintje 0,3 - 1,3  $\mu\text{g/l}$ . Míg Clark és társai (Clark és mtsai., 1966) szerint 3  $\mu\text{g/l}$   $Mn^{2+}$  koncentráció csökkentette a citromsav hozamát, valamint Kisser és munkatársai (Kisser és mtsai., 1980) megerősítették a  $Mn^{2+}$  szabályozó szerepét. A fehérjék lebomlása  $Mn^{2+}$  hiány esetén magas intracelluláris ammónium koncentrációt eredményez, ami szembe megy a foszfofruktokináz citromsav általi gátlásával, így elősegíti a glikolízist. Ezenkívül a magas glükóz- és ammóniumkoncentráció kombinációja elnyomja az  $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenáz szintézisét, ezáltal gátolja a citromsav lebontását a TCA-ciklusban, és elősegíti annak túltermelését.

A mangán számos sejtfunkcióban is szerepet játszik, különösen a sejtfal szintézisében, a spóráképzésben és a másodlagos metabolitok termelésében (Shu & Johnson, 1948). Külön figyelmet kell fordítani a közeg összetevőinek kiválasztására, hogy a nyomnyi mennyiségű mangán ne csökkentse a fermentáció hozamát.

### 2.8.6. Morfológia, inokulum és termelékenység közötti kapcsolat

A sülylesztett fermentációk során a morfológia és a termelékenység közötti kapcsolatot régen felismerték (Berovič és mtsai., 1993).

Sülylesztett kultúrákban a gomba morfológiája a pelletes és a fonalas forma között változik az oltóanyag típusa, növekedési feltételek és a genotípus függvényében (Papagianni, 2004). Az *A. niger* morfológiáját befolyásoló tényezők tárgyalásakor meg kell különböztetni a makro- és mikromorfológiát. Képanalízises vizsgálatok azt mutatták, hogy megfelelő körülmények között a hozam meghaladja a 85%-ot, ha a makromorfológiai forma stabil, összefonódott fonalas részecskékből áll egy kis mag körül, míg a mikromorfológia rövid, duzzadt csúcsú hifákból álló ágakkal jellemezhető (Papagianni és mtsai., 1999).

Az *A. niger* morfológiáját és így a folyamat hatékonyságát befolyásoló fő tényezők a keverési intenzitás, a közeg pH-értéke, a növekedési sebesség, a tápanyagok és az inokulum típusa és koncentrációja. Az intenzív keverés rövid, vastag és erősen elágazó fonalak kialakulásához vezet, a túlzott nyírófeszültség a fonalak fragmentálódását okozhatja, és az új fragmentumok új citromsavat túltermelő fonalakat hoznak létre (Papagianni és mtsai., 1999). A preferált morfológia (azaz rövid fonalak kis aggregátumai), amely a termelés növekedésével járt, körülbelül  $2,0 \pm 0,2$  pH-értéken figyelhető meg. pH 1,6-nál a morfológiai fejlődés rendellenes volt, és a termelés hirtelen csökkent, míg pH 3,0-nál hosszabb peremű aggregátumok képződtek, és oxálsav-termelést figyeltek meg (Papagianni és mtsai., 1999).

A nyomelemek közül a legkritikusabb a  $Mn^{2+}$  koncentráció, amely jelentősen befolyásolja a fermentációt és az *A. niger* morfológiáját. Már néhány  $\mu\text{g/l}$  eltérés a  $Mn^{2+}$  koncentrációban jelentős változásokat idézhet elő

mind a sejtmorfológiában, mind a termelési hozamban (Kisser és mtsai., 1980). A 3  $\mu\text{g/l}$  alatti  $\text{Mn}^{2+}$  koncentráció esetén kompakt pelletes növekedés figyelhető meg, amely kedvező a citromsav felhalmozódása szempontjából. Ezzel szemben 22  $\mu\text{g/l}$   $\text{Mn}^{2+}$  koncentráció már 10%-os citromsav-termelés csökkenést eredményezett, és a sejtek fonalas növekedésre váltottak. 55  $\mu\text{g/l}$   $\text{Mn}^{2+}$  felett a biomassza teljesen diszpergált állapotba került, és a citromsav-termelés tovább csökkent. A vizsgálatok szerint 2750  $\mu\text{g/l}$   $\text{Mn}^{2+}$  jelenlétében a citromsav-termelés már csupán 16%-a volt a kontrolhoz képest, ami szinte teljes leállást jelentett (Kisser és mtsai., 1980).

Az inokulum spóraszintje egy másik fontos paraméter, amely befolyásolja a citromsav fermentációt. Papagianni és Matthey (Papagianni & Matthey, 2006) digitális képanalízis segítségével tiszta átmenetet figyeltek meg a pelletes és a diszpergált *A. niger* formák között, amikor az inokulum szintjét  $10^4$  -ről  $10^9$  spóra/ml-re változtatták. A citromsav-termelés szempontjából az inokulum szintjének optimalizálása kulcsfontosságú, mivel közvetlen hatással van az oxigénfelhasználásra, a biomassza növekedésére és az ammónium kimerülésére.  $10^4$ – $10^6$  spóra/ml inokulum-koncentráció esetén kedvezőbbek voltak a citromsav-termelés feltételei, mivel ekkor az oldott oxigénszint 100%-os telítettségen maradt, és az ammónium gyorsabb felhasználása révén hamarabb indult meg a citromsav-bioszintézis. Ezzel szemben  $10^7$  spóra/ml vagy nagyobb inokulum-koncentráció mellett a biomassza jelentősen megnövekedett, elérve 9 g/l-t 150 óra fermentáció után, míg  $10^6$  spóra/ml alatt a biomassza maximuma csak 7 g/l volt. Az oxigénigény megnövekedése miatt  $10^6$  spóra/ml felett az oldott oxigénszint nem haladta meg a 80%-os telítettséget a 30. órában, és a fermentáció előrehaladtával 70%-ra csökkent, míg  $10^4$  és  $10^5$  spóra/ml inokulum esetén az oldott oxigénszint végig 100%-on maradt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az optimális citromsav-termeléshez nemcsak a tápanyag-összetétel és a fermentációs körülmények,

hanem az inokulum mennyisége is meghatározó tényező, mivel az közvetlenül befolyásolja a morfológiát, az oxigénfelvételt és a citromsav-bioszintézis kinetikáját.

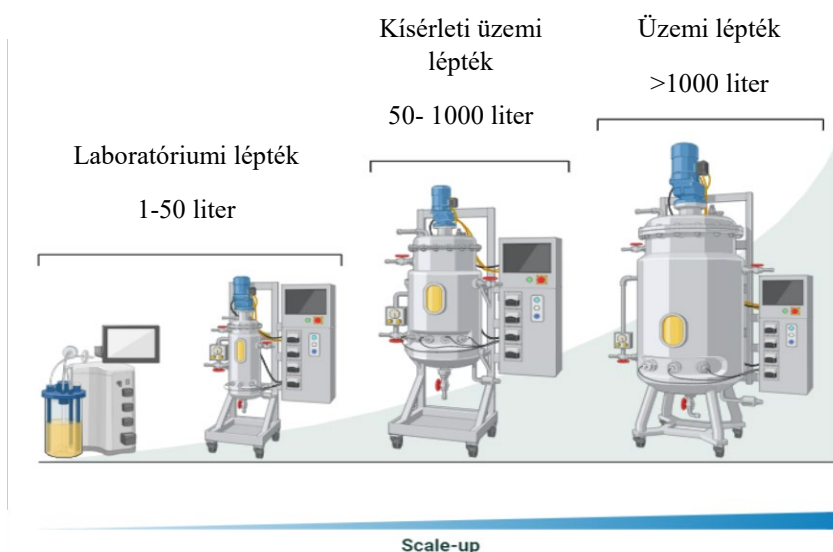
## 2.9. Technológiai kihívások bioreaktorokban végzett fermentáció során

A bioreaktorokban végzett fermentációs folyamatok számos technológiai kihívást rejtenek magukban, amelyek befolyásolhatják a hozamot, a termékminőséget és a folyamat gazdaságosságát (Sawant és mtsai., 2018; Mahdinia és mtsai., 2019).

### 2.9.1. Léptéknövelés és süllyesztett fermentáció

A fermentációs folyamatfejlesztés általában laboratóriumi léptékkal kezdődik, ahol asztali méretű bioreaktorokat használnak (1–50 l) (de Souza Vandenberghe & José, 2024), vagy rázatott lombikokat (100–1000 ml) (Darouneh, és mtsai., 2009), illetve mikrobiális sejteket néhány milliliteres mennyiségben. Miután az optimalizálás megerősíti, hogy a folyamat sikeres, megtervezhető és bevezethető a kísérleti üzemi léptéket (50–10 000 l), az optimális működési körülmények meghatározása érdekében. Csak a sikeres laboratóriumi és kísérleti üzemi vizsgálatok után kerülhet sor a nagy üzemi léptékű (> 10 000 l) alkalmazására kereskedelmi termelési céllal. Ezt a folyamatot, amely a kis léptékből nagy léptékben történő tenyésztést jelenti, léptéknövelésnek (4. ábra) nevezzük. Célja az, hogy a kis léptékű bioreaktorokban elért optimális feltételek megvalósíthatók legyenek nagyméretű bioreaktorban is. A léptéknövelési vizsgálatok nélkülözhetetlenek bármely fermentációs folyamat fejlesztésében, mivel ezek segítségével megfelelő kritériumokat lehet meghatározni a léptékváltáshoz anélkül, hogy a

mikroorganizmusok kinetikai viselkedése, és így a folyamat teljesítménye sérülne (Mahdinia és mtsai., 2019).



4. ábra: Léptéknövelés sematikus ábrája (biorender.com által szerkesztve)

A léptéknövelés a fermentációs folyamatok legnehezebb és legösszetettebb, számos tényezőtől függő lépése. Ezek a tényezők lehetnek fizikai (hő- és anyagátadási jelenségek, mint pl. az oxigénátadási sebesség és keverési idő), biokémiai (például a táptalaj összetétele és reológiai tulajdonságai), illetve a specifikusan folyamatra vonatkozóak (például inokulálás körülményei) (Sawant és mtsai., 2018; Mahdinia és mtsai., 2019).

A süllyesztett fermentációs folyamatban a tápanyagok oldott formában vannak jelen; a mikroorganizmus a közeg egészében képes növekedni (Lingappa és mtsai., 2002). A fermentáció bioreaktorokban zajlik, és 5-12 napon belül fejeződik be (Socco és mtsai., 2006). Ez a legszélesebb körben alkalmazott fermentációs technika. Becslések szerint a citromsav termelésének 90%-a ilyen módon történik (Roukas, 1991). A süllyesztett fermentációt a felszíni fermentáció kifejlesztése után alakították ki. Bonyolultabb szerelvényezést, magasabb energiaköltségeket és szigorúbb ellenőrzést

igényel, valamint habképződéssel jár (amit habzásgátló szerekkel lehet csökkenteni), de magasabb termelékenységet és hozamot biztosít, csökkentett tőke-, karbantartási és munkaerőköltségekkel, valamint alacsonyabb fertőzés veszéllyel. Emellett kevésbé érzékeny a közeg összetételének változásaira, szélesebb szubsztrátum választékot és jobb kontrollt tesz lehetővé (Dashen és mtsai., 2014).

### 3. Célkitűzés

Az *A. niger* citromsav fermentációt régóta tanulmányozzák, de sok kérdés máig megválaszolatlan. Egyik legfontosabb a mangánion-érzékenység: a táptalaj 5 µg/l feletti Mn<sup>2+</sup> koncentrációja befolyásolja a gomba fiziológiáját és morfológiáját, és drámaian csökken a citromsav hozam is.

A citromsav fermentációja saválló acélt is tartalmazó bioreaktorokban zajlik; az acél egyik nélkülözhetetlen ötvözőeleme a mangán. A disszertációm alapjául szolgáló kutatás egyik célkitűzése a mangán(II)-ionok kioldódásának vizsgálata volt a sterilizés és a fermentáció során. Ennek érdekében meg kívántuk határozni a kioldódást befolyásoló technológiai és biológiai tényezőket, valamint a kioldódás időbeli lefutását, és olyan megoldásokat kerestünk, amelyek csökkenthetik ezt a jelenséget.

A citromsav a *cexA* gén által kódolt transzporter fehérje révén jut ki a gombasejtéből a fermentlébe. Kutatásom másik célja a *cexA* gén és a Mn(II)-ionok kölcsönhatásának vizsgálata volt. Ehhez egy *cexA*-túltermelő *A. niger* mutánst alkalmaztunk, amely lehetőséget biztosított a kölcsönhatások részletes tanulmányozására.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált törzsek és fenntartásuk

Kísérleteink során *Aspergillus niger* ATTC 1015, NRRL 2270 (ATCC 11414) és cE *cexA* citromsav termelő törzseket használtunk. Utóbbi törzset Dr. Matthias Steiger (Bécsi Műszaki Egyetem, Ausztria) bocsátotta rendelkezésünkre. Félévente a  $-80^{\circ}\text{C}$ -on 50% (v/v) glicerinben (VWR International Kft., Debrecen) és 50% (v/v) spóramosóban (0,9g NaCl (Molar Chemicals Kft.), 2 csepp Tween 80 (Sigma-Aldrich Kft.)) tárolt spóraszuszpenzióból frissítettük törzsünket, amelyről, felhasználástól függően, 2-3 hónapon keresztül vegetatív átoltásokat végeztünk.

A törzset NIG1 (2. táblázat) agar tartalmú minimál táptalajon (a táptalaj komponenseit a VWR International Kft., Debrecen és Sigma-Aldrich Kft. szolgáltatta) tartottuk fent. A szükséges esszenciális fémionok megfelelő arányú biztosítása érdekében a táptalajt nyomelemoldattal egészítettük ki, amelyből 20  $\mu\text{l}$ -t adagoltunk 100 ml táptalajhoz. Ez egy előre meghatározott összetételű recept alapján készült, amelynek összetevőit a 3. táblázat mutatja.

Komponens	Koncentráció (g/l)
$\text{NaNO}_3$	6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
KCl	0,5
agar	1,5
D-glükóz	20
pH=5	

2. táblázat: NIG1 táptalaj összetétele

<b>Komponens</b>	<b>Koncentráció (g/l)</b>
EDTA	10
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	4,4
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,01
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,32
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,315
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,22
CaCl <sub>2</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,47
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,1

*3. táblázat: Nyomelem oldat összetétele*

Az átoltás minden esetben lamináris áramlású oltófülke (BL-1200 F, Radel & Hahn Zrt., Debrecen) alatt történt. A Maillard reakció (Martins, Jongen, & van Boekel, 2000) elkerülése érdekében a D-glükóz (VWR International Kft. Debrecen) törzsoldatot (50% (w/v)) külön sterilizáltuk és adtuk a táptalajunkhoz, úgy, hogy a végső koncentráció 20 g/l legyen. Átoltást követően T=30°C-os mikrobiológiai inkubátorba (Heraeus B6, Thermo Fisher Scientific, USA) helyeztük, ~4-5 napra, amíg a telepek teljes felszínén intenzív sporuláció meg nem jelent. A kinőtt telepeket tartalmazó Petri-csészéket inkubálást követően Parafilmmel lezárva 4°C-os hűtőszobában tároltuk. Az így tárolt telepeket felhasználástól függően legalább havonta átoltottuk.

## 4.2. Fermentációk előkészítése és kivitelezése

### 4.2.1. Mn<sup>2+</sup> mentes víz/ cukoroldat készítése

A magas hozam eléréséhez a mangán-ionok eltávolítása a fermentációs környezetből elengedhetetlen. Amennyiben Mn<sup>2+</sup> 5 µg/l koncentráció feletti mennyiségben vannak jelen, a hozam jelentősen lecsökken, a morfológia

megváltozik, ami a fermentáció energia- és költséghatékonyságát csökkenti (Fejes, és mtsai., 2020).

A Mn(II)-mentes vizet/ D-glükóz cukor-oldatot kationcserélő gyantával (Dowex 50-W-X8 (100/200, Thermo Fisher Scientific, USA) töltött oszlopon (440 x 45 mm) ioncserélt vízből állítottuk elő, cukor oldat esetében előre elkészített 50% (w/v) oldat formájában. A gyanta regenerálásához ~100-150 cm<sup>3</sup> 1 M-os HCl-oldatot (VWR International Kft., Debrecen) alkalmaztunk. Ezt követően semleges pH eléréséig ioncserélt vízzel mostuk. A vizet a térfogatáram megfelelő értékre történő beállításával, előkészített Mn<sup>2+</sup>-mentes üvegedénybe lassú áramlással, csepegtetve engedték le. A fermentáció során alkalmazott további oldatokat minden esetben a Mn(II) ionoktól mentesített vízből készítettük.

#### 4.2.2. Üvegeszközök Mn<sup>2+</sup> mentesítése

Laboratóriumi léptékben üvegeszközök használata elengedhetetlen. Az inokulumok előállításához 500 ml-es Erlenmeyer lombikokat (VWR International Kft. Debrecen, Magyarország) alkalmaztunk, több literes fermentációk során pedig üvegtessel rendelkező bioreaktorokat használtunk. Az üveg eszközöket 1M-os HCl-oldattal töltöttük meg és 3-4 órán keresztül állni hagytuk az üveg falán kitapadt pozitív töltésű kationok (Mn<sup>2+</sup>) eltávolításának céljából. Ezt követően, az előzőekben ismertetett, Mn<sup>2+</sup> mentes vízzel öblítettük, annak érdekében, hogy a savat és ionokat maradéktalanul kimossuk.

#### 4.2.3. Termelő táptalaj

Az 4. táblázatban felsorolt komponenseket kimértük, majd mangán(II)-mentes vízben oldottuk fel mágneses keverőt alkalmazva. A szénforrás hozzáadása az előzőekben ismertetett módon történt, azzal a különbséggel, hogy a koncentráció a termelő táptalaj esetében 140 g/l volt.

<b>Komponens</b>	<b>Koncentráció (g/l)</b>
D-glükóz	140
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,25
NaCl	0,15
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	4,84 x 10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	6,59 x 10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,36 x 10 <sup>-4</sup>
pH= 3,5	

4. táblázat: NIGT1 minimál táptalaj (Kubicek & Röhr, 1977)

A nyomelem törzsoldatokat (Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) sterilre szűrtük és hasonlóképpen jártunk el, mint a szénforrás hozzáadásakor.

#### 4.2.4. Mangánion adagolása a fermentáció során

A kísérlet célja annak vizsgálata volt, hogy az eltérő időpontokban hozzáadott, meghatározott mennyiségű Mn<sup>2+</sup> milyen hatással van a fermentációs folyamatokra. A vizsgálat során mindig két kontrol csoportot alkalmaztunk:

1. Alacsony mangántartalmú kontrol – a táptalajban <5 µg/l koncentrációban volt jelen a Mn<sup>2+</sup>.

2. Magasabb mangántartalmú kontrol – a  $Mn^{2+}$  koncentrációja meghaladta az előző értéket.

A kísérleteket három párhuzamos, 500 mL-es Erlenmeyer-lombikban végeztük, amelyekbe az inokulációt követően különböző időpontokban adagoltunk mangániont oldat formájában. A hozzáadást minden esetben steril körülmények között, lamináris áramlású oltófülkében végeztük, pipetta segítségével.

#### 4.2.5. Sterilizálási eljárások

Az üvegeszközök sterilizálását – beleértve az Erlenmeyer-lombikokat, különböző méretű Schott-palackokat és mérőhengereket – autoklávozással (Raypa AES-75, Raypa, Spanyolország) végeztük. A sterilizálás során  $121^{\circ}C$  hőmérsékletet alkalmaztunk 30 perces időtartammal. Amennyiben az üvegeszköz nem tartalmazott folyadékot (például táptalaj nélküli mérőhengerek esetében), a belső tér sterilitásának biztosítása érdekében ~5 ml mangánmentes vizet töltöttünk bele.

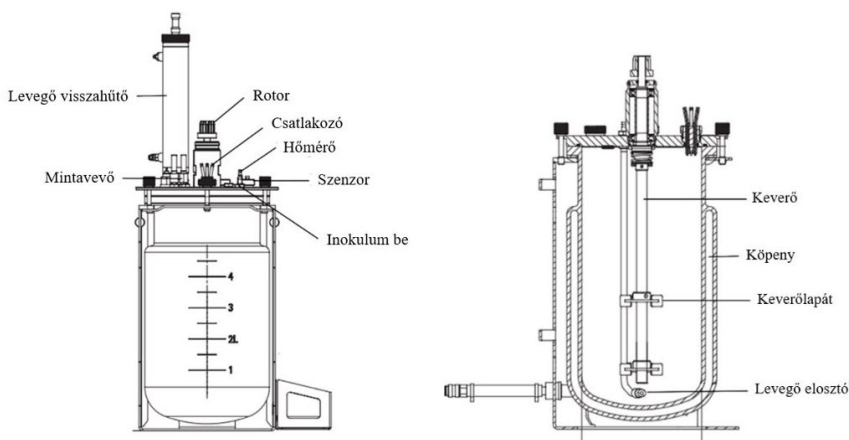
#### 4.2.6. Üresgőzös sterilizálás

Ezt a sterilizálási eljárást a fermentor csíramentesítésére alkalmaztuk. A fermentor üvegtestét mangánmentes vízzel töltöttük fel oly módon, hogy a folyadékszint a behelyezett elektródák felett helyezkedjen el, biztosítva, hogy a párolgás során se csökkenjen az elektródák alá. A sterilizálást  $121^{\circ}C$ -on, 30 perces időtartammal végeztük, mint a standard módszer során. A folyamat befejezését követően a fermentort üzembe helyeztük, és a benne lévő vizet nyomás segítségével eltávolítottuk, majd sterilizált táptalajjal töltöttük fel az előírt szintig, aseptikus körülmények között.

#### 4.2.7. Rázott lombikos fermentációk/ inokulum

A rázatott lombikos fermentációhoz 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokat használtunk (VWR International Kft., Debrecen), 100 ml-es munkatérfogattal. A tenyésztéseket Infors AG CH-4103 (Infors AG, Bottmingen, Svájc) horizontális rázógépen végeztük, 250 rpm fordulatszámon és 30°C-on inkubálva. A mintavételezést steril lamináris áramlású fülkében végeztük. A mintavétel alatt a lombikokat kézzel ráztuk, az oxigén-hiányos állapot kiküszöbölése érdekében.

#### 4.3. Bioreaktorban végzett fermentációk



5. ábra: Sartorius BTwin 5 literes bioreaktor sematikus ábrája

Kísérleteink egy részét laboratóriumi bioreaktorban (5. ábra) végeztük, ahol a fermentáció és előkészületei hasonlóak voltak a korábban ismertett lépésekhez. Az üvegből készült alkatrészeket alapos savas mosásnak vetettük alá, míg az acél részeket ebből a folyamatból kihagytuk.

#### 4.3.1. Bioreaktor A és B összehasonlítása

A fermentációkhoz két különböző, 6 literes autoklávozható üvegfermentort alkalmaztunk: egy Sartorius Biostat B (Göttingen, Németország) és egy Inel Kft. (Budapest, Magyarország) által gyártott rendszert. A továbbiakban ezeket Bioreaktor A (Sartorius) és Bioreaktor B (Inel) néven említjük.

A két bioreaktor azonos edénygeometriával és 4,5 literes munkatérfogattal rendelkezik. Fémszerkezeti elemeik egyaránt AISI 316L rozsdamentes acélból készültek ( $Mn^{2+}$  tartalom  $\leq 2\%$ ), amely a biotechnológiai alkalmazásokban leggyakrabban használt acélötvözet (Zhou et al., 2011). Mindkét bioreaktor 65 mm átmérőjű, hatlapátos Rushton-típusú tárcsás turbinakeverőkkel van felszerelve.

Jelentős különbség, hogy míg a bioreaktor A közvetlenül a kísérletek előtt került beszerzésre, a bioreaktor B mintegy 10 éve folyamatos használatban van. Az évek során a rozsdamentes acél alkatrészek felületi korróziója megfigyelhetővé vált. A kezdeti kísérletek még a polírozatlan állapotban zajlottak, majd a korrózió hatásainak vizsgálata érdekében a bioreaktor B összes rozsdamentes acél komponensét (fedőlemez, szenzorfoglatok, keverő tengely, mintavételi cső, keverőlapátok) elektropolírozásnak vetettük alá. Az elektropolírozást a Zolend Kft. (Debrecen, Magyarország) végezte, és ezt követően további fermentációs kísérleteket folytattunk a kezelt bioreaktorral a kioldódási folyamatok és a citromsav-termelés összehasonlítása céljából.

#### 4.3.2. Bioreaktorok működési paraméterei

A két bioreaktort azonos üzemi paraméterek mellett üzemeltettük annak érdekében, hogy az eredmények közvetlenül összehasonlíthatók legyenek. A fermentációk során mindkét rendszerben azonos oldott oxigénszintet (DO) és hőmérsékleti beállításokat alkalmaztunk. Az üzemi körülmények a következők voltak:

- Hőmérséklet: 30°C
- Levegőztetés: 0,75 térfogat per perc (VVM)
- Kezdeti pH: 3,0, amelyet 3M HCl segítségével állítottunk be inokuláció előtt

A pH-t a fermentáció során nem szabályoztuk. Az oldott oxigénszintet a keverőlapátok csúcsebességének módosításával biztosítottuk, fenntartva a 30%-os telítettséget. A hőmérsékletet, az oldott oxigénszintet és a keverőcsúcsebességet a bioreaktorok automata vezérlőegységei szabályozták. A táptalajveszteség minimalizálása érdekében a fejtérből távozó gázt egy visszafolyó kondenzátoron vezettük át, amely egy 4°C-os külső hűtőfürdőhöz csatlakozott, mielőtt a rendszert elhagyta volna. A fermentációkat aszeptikus körülmények között indítottuk. Mindkét bioreaktorban addig folytattuk, amíg a kezdeti 140 g/l koncentrációjú D-glükóz teljes mértékben elfogyott.

#### 4.3.3. $Mn^{2+}$ kioldódás vizsgálata pH-függő környezetben

A kísérletek során a bioreaktor A sterilizálását üresgőzös autoklávozási eljárással végeztük annak érdekében, hogy minimalizáljuk a kezdeti  $Mn^{2+}$ -koncentrációt. Ezt követően a reaktort foszfátpuffer-oldattal töltöttük fel, amelynek koncentrációját egyik esetben 10 mM és másik esetben 100 mM értékre állítottuk, biztosítva ezzel a megfelelő pH-stabilitást. A kísérlet  $Mn^{2+}$ -

limitált közeggel indult, így a kioldódási folyamat kizárólag a reaktor faláról származó fémionokból származhatott. A vizsgálat kontrollált körülmények között zajlott. A bioreaktorban zajló folyamatot azonos hőmérsékleti, levegőztetési és keverési paraméterek mellett tanulmányoztuk, hogy a pH fokozatos csökkentése hogyan befolyásolja a kioldódás mértékét. A kezdeti pH-érték 3,5 volt, amelyet HCl oldat adagolásával szabályoztunk. A pH-t 12 óras időközönként csökkentettük az alábbi lépésekben: 3,0; 2,5; 2,2; 2,0; 1,8; 1,6 és 1,4.

#### 4.4. Analitikai módszerek

##### 4.4.1. Mintaelőkészítés

A minták megfelelő előkészítése rendkívül fontos, a műszeres analitikai mérések során használt eszközök egyes részei érzékenyek, könnyen eltömődhetnek, így a szilárd szennyezők eltávolítása elsődleges.

Az előzetesen Falcon (20 ml) /Eppendorf (2 ml) csövekbe levett mintákat 5-7 percig 13.000 rpm-en centrifugáltuk (Pico 17, Thermo Fisher Scientific, USA), majd a tiszta felülúszót másik csőbe pipettáztuk. A visszamaradt biomasszát mikroszkópos vizsgálatok során használtuk fel. Esetenként egyetlen centrifugálás nem biztosította a teljes sejttörmelék-mentesítést, ezért a mintákat további 15 percig centrifugáltuk. Az így előkészített biológiai mintákat a mérésig -20°C-on tároltuk. Elemzés előtt a mintákat a fermentációs hőmérsékletre (30°C) visszamelegítettük és további felhasználás előtt Vortex segítségével homogenizáltuk.

#### 4.4.2. Citromsav és D-glükóz koncentrációjának analízise

A betáplált szénforrás fogyását illetve a termelődött citromsav mennyiségét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) követtük nyomon. A méréseket Agilent 1260 Infinity II típusú (Agilent Technologies 1260 Infinity, USA) készülékkel végeztük, BioRad HPX 87H (Bio-Rad Inc., USA) kolonna segítségével választottuk el a kívánt molekulákat, a detektálást refraktív index detektorral végeztük. A mérés során izokratikus elúciót végeztünk, 0,5 ml/perc áramlási sebességgel, 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mozgófázis segítségével. A kolonna és a detektor hőmérsékletét 55°C-on tartottuk. A HPLC kiértékelés első lépéseként kalibrációs görbét készítettünk, amelyhez pontos koncentrációjú D-glükóz és citromsav oldatokat használtunk. A mérések során a citromsav retenciós ideje körülbelül 9 perc, míg a D-glükózé megközelítőleg 12 perc volt.

#### 4.4.3. Mn<sup>2+</sup> tartalom meghatározása

A mangán koncentrációjának meghatározásához induktív csatolású plazma tömegspektrométert (ICP-QMS) alkalmaztunk (Thermo Fischer Scientific, Bréma, Németország). A műszer vezérlését a PlasmaLab 2.5 szoftver biztosította. Szállítógázként 7% (v/v) hidrogén és 93% (v/v) hélium keveréket használtunk, melyet 6 ml/perc áramlási sebességgel vezettünk be a készülékbe. A mangánkalibrációs görbéket elemi referencia oldattal állítottuk elő (1000 mg/l, Scharlab, Sentmenat, Spanyolország). Belső standardként ródiomot adagoltunk minden mintába és kalibráló sorozatba, melynek beállított koncentrációja 20 µg/l volt. A spektrogram elemzése során a mangán jele  $m/z = 55$ -nél, a ródiom  $m/z=103$ -nál látható.

#### 4.4.4. Száraz sejttömeg meghatározása

Az 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban végzett kísérleteink során közvetlenül a szénforrás kimerülése után, a fermentáció végén, határoztuk meg a gomba biomassza száraz sejttömegét (DCW). Ehhez 10 ml mintát vettünk. Bioreaktorban végzett fermentációk esetén 24 óránkénti mintavételből határoztuk meg a DCW-t.

A sejt tartalmú mintákat előre lemért tömegű szűrőpapíron, vákuumszivattyú (Welch 2546C-02, Gardner Denver, USA) segítségével szűrtünk át, majd 25 ml ioncserélt vízzel alaposan átöblítettünk. A szűrőpapírok kezdeti tömegét analitikai mérlegen (Ohaus E01140 Explorer, Ohaus Corporation, USA) mértük meg. Ezután a mintákat 70°C-on szárítószekrényben szárítottuk tömegállandóságig, majd a végső tömeget szintén analitikai mérlegen határoztuk meg.

#### 4.4.5. Morfológiai vizsgálatok

A sejtek morfológiai vizsgálatát AxioCam MRc5 kamerával felszerelt Zeiss Axio Imager (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) mikroszkóppal végeztük. A mintákat mintavétel után centrifugáltuk, a felülúszót lepipettáztuk, majd az Eppendorf-csőben maradt sejteket tárgylemezen vizsgáltuk. A morfológiai jellegzetességeket 40-szeres nagyításon tanulmányoztuk. A képeket az AxioVision AC elemző szoftver segítségével értékeltük ki.

#### 4.4.6. Számítások

- Specifikus moláris hozam

A specifikus moláris hozam megmutatja, hogy a sejtek a felhasznált glükóz mekkora részét fordították citromsav előállítására.

Ennek számítása a következő képlettel történik:

$$Y_{(p/s)} = \frac{n_{\text{citromsav}}}{n_{\text{felhasznált szénforrás}}}$$

A képlettel való számolás során figyelembe vettük a kiindulási és a fermentáció végén megmaradt szénforrás mennyiségét, valamint a citromsav moláris tömegét.

- Biomassa képződési hozama

$$Y_{(x/s)} = \frac{m_{\text{biomassa}}}{m_{\text{felhasznált szénforrás}}}$$

- Glükóz hasznosulási ráta

$$\frac{C_{\text{kezdeti koncentráció}} - C_{\text{végső koncentráció}}}{t_{\text{fermentáció kezdete}} - t_{\text{fermentáció vége}}}$$

- Mangán kioldódási sebességének meghatározása

A fermentációs folyamat során a  $Mn^{2+}$  kioldódási sebességét a bioreaktorokból időegységre vetített koncentrációváltozás alapján számítottuk ki. A  $Mn^{2+}$  koncentrációját időszakos mintavételezéssel határoztuk meg, amelyet (ICP-MS) technikával elemeztük. A kioldódási sebességet a következő egyenlet alapján számítottuk:

$$v = (\Delta c / \Delta t)$$

ahol

- $v$  a  $Mn^{2+}$  kioldódási sebessége ( $\mu g/l/h$ ),
- $\Delta c$  a  $Mn^{2+}$  koncentráció változása a mérési időszak alatt ( $\mu g/l$ ),
- $\Delta t$  az adott időintervallum (óra).

A számításokat két különböző pH-tartományra végeztük ( $pH > 2$  és  $pH < 2$ ), teljes fermentációs időszak alatt mért kioldódási sebességek átlagát is meghatároztuk. Az időszakos mintavételezés lehetővé tette a pH-függő mangánkioldódási profilok elemzését az egyes bioreaktorokban.

#### 4.5. Statisztikai elemzések

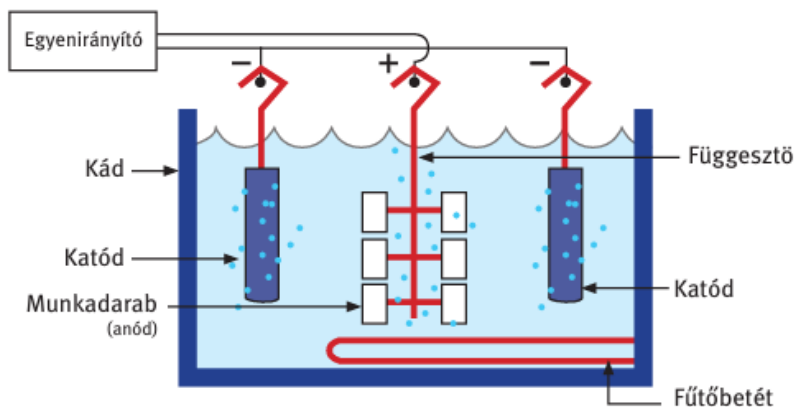
A fermentációkkal kapcsolatos valamennyi bemutatott adat három független kísérletből (biológiai ismétlések: ugyanazon paraméterek, különböző spóra inokulummal) valósult meg, és minden egyes elsődleges adat két párhuzamos mérés átlaga ugyanabban a kísérletben (technikai ismétlések). Az adatokat Sigmaplot 12.0 szoftver (Jandel Scientific, USA) segítségével ábráztuk és elemeztük. Az adatok változékonyságát az egyes eljárások standard deviációjával (SD) jellemeztük. A kvantitatív adatokat ( $n \geq 3$ )

ANOVA (varianciaanalízis) segítségével hasonlítottuk össze Holm-Sidak-próbával. A szignifikancia kritériuma minden esetben  $p < 0,05$  volt.

#### 4.6. Elektropolírozás

Az elektropolírozás egy elektrokémiai felületkezelési eljárás (6. ábra), amelyet széles körben alkalmaznak fémes anyagok, különösen rozsdamentes acél korrózióállóságának növelésére és a felületi szennyeződések eltávolítására. Az eljárás során az adott fém alkatrészt elektrolitba merítik, majd anódként csatlakoztatják egy egyenáramú áramkörhöz, míg a katód egy inert elektródából áll. Az alkalmazott egyenáram hatására az anód felszínén lévő mikroszkopikus egyenetlenségek és oxidrétegek fokozatosan feloldódnak, ami simább, passzívált felületet eredményez.

A fermentációhoz használt rozsdamentes acél komponenseket elektrokémiai polírozásnak vetettük alá. Ezt a kezelést egy külső szolgáltató végezte, így az eljárás pontos paraméterei nem álltak rendelkezésünkre. Az elektropolírozás célja a fémionok, különösen a  $Mn^{2+}$  kioldódásának minimalizálása volt.

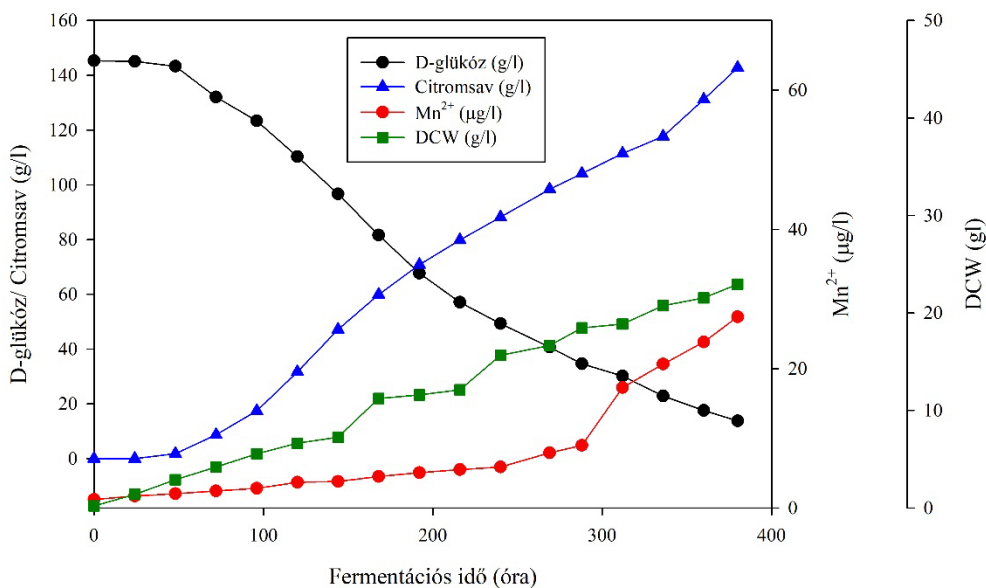


6. ábra: Az elektropolírozás sematikus ábrája (Euro Inox, 2009)

## 5. Kísérleti eredmények és értékelésük

### 5.1. *A. niger* NRRL 2270 $Mn^{2+}$ limitált citromsav fermentáció 5 literes fermentorban

Az alábbi kontrol fermentációs kísérlet (7. ábra) referenciaként szolgált a későbbi vizsgálatokhoz, bemutatva a mangán(II) ion limitált jelenlétének hatását. Mivel minden további vizsgálat erre épül, ennek a fermentációnak a részletes bemutatása elengedhetetlen a kísérletek eredményeinek pontos értelmezéséhez.



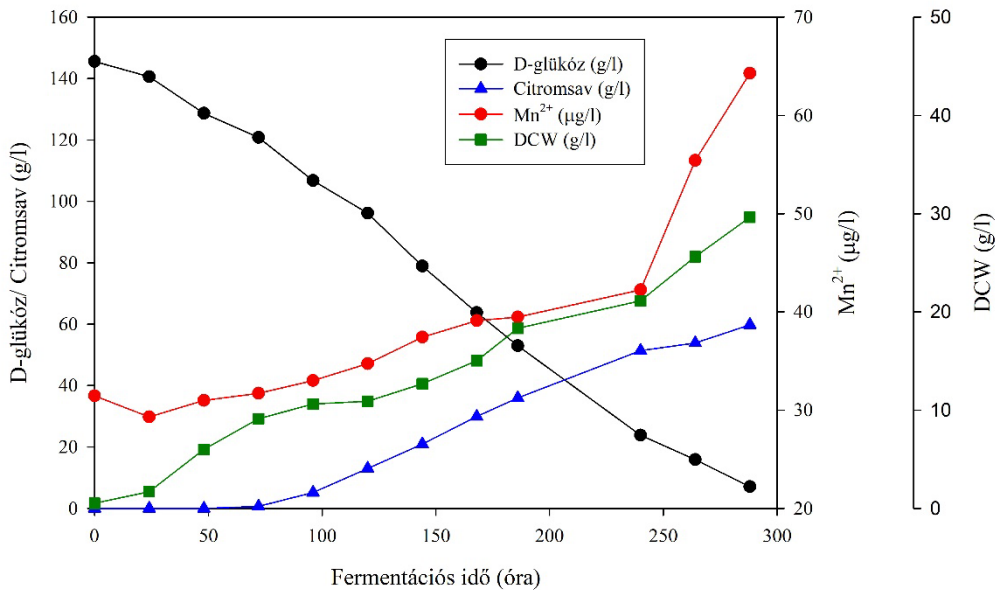
citromsav (CA) és a fermentáció végéig növekedést mutatott. A 380. órában leállítottuk a fermentációt (végső citromsav koncentráció: 142,75 g/l, maradék glükóz a fermentlében: 13,80 g/l). A kiszámolt moláris hozam 101,8%, jellemzően nem haladja meg az 100%-ot, mert minden glükóz molekulából csak egy meghatározott mennyiségű termék keletkezhet. Az ilyen eredmény több okból is adódhat:

1. Mérési pontatlanságok: Lehet, hogy a kiindulási vagy megmaradt glükóz, illetve a citromsav koncentrációjának mérése nem volt teljesen pontos, ami a hozam túlszámításához vezethet.
2. Fizikai veszteségek: A rendszerben lévő anyagok (pl. glükóz vagy citromsav) egy része veszendőbe mehetett (pl. elpárolgás, adszorpció a fermentációs edény falára), így a valódi mennyiségek eltérhetnek a számítottaktól.

A 7. ábrán és a Függelék 16. táblázatban szemléltetésre került a  $Mn^{2+}$  koncentráció időbeni változása. Jól látható, hogy ~300 óráig fokozatosan, de lassan növekedett majd a 300. óra után gyors emelkedést mutatott. A fermentáció kezdetén 1,223  $\mu\text{g/l}$  értéket detektálhattunk, míg a folyamat végére 27,22  $\mu\text{g/l-t}$ . A végső  $Mn(II)$  koncentráció 22,26-szor volt magasabb, mint a kiindulási.

## 5.2. $Mn^{2+}$ hatása az *A. niger* NRRL 2270 citromsav fermentációjára 5 literes fermentorban

Hasonlóan az előző kísérlethez, a következő fermentáció szintén kontrolként szolgált (8. ábra), ezúttal  $\sim 30 \mu\text{g/l}$   $Mn^{2+}$  jelenlétében, lehetővé téve a mangán(II) ion emelt koncentrációjának bemutatását.



8. ábra: *A. niger* NRRL 2270  $Mn^{2+}$  terhelt ( $30 \mu\text{g/l}$ ) fermentációjának HPLC (D-glükóz, citromsav), DCW és ICP-MS ( $Mn^{2+}$  koncentráció) mérési eredményei

A 8. ábra és a Függelék 17. táblázat alapján megfigyelhető, hogy a fermentáció kezdeti szakaszában ( $\sim 48$ . óráig) a D-glükóz nagyobb mértékben csökkent, mint a  $Mn^{2+}$  limitált fermentáció esetében. A szénforrás csökkenés mellett nem volt citromsav termelődés, az idő előrehaladtával a termék koncentráció lassabban növekedett, mint az előzőekben ismertetett fermentáció során. A folyamat 288 órán keresztül tartott, a végére  $59,79 \text{ g/l}$  citromsav termelődött. Összehasonlítva a  $Mn^{2+}$  limitált fermentációval  $1,32$ -szer volt gyorsabb, ami azt jelenti, hogy a fermentáció  $32\%$ -kal hamarabb

zajlott le, viszont 2,4-szer alacsonyabb koncentrációban termelődött a szerves sav. A  $Mn^{2+}$  limitált fermentáció során 142,75 g/l és a  $Mn^{2+}$  terhelt során 59,79 g/l citromsav termelődött. Moláris hozamok tekintetében ezek: 1,018 és 0,257 voltak. Az alábbi összehasonlítás szemlélteti a mangán(II)-ionok gátló hatását.

A  $Mn^{2+}$  koncentráció időbeni változása hasonlóképpen írható le, mint az előző fermentáció során, azzal a kivétellel, hogy a kezdeti koncentráció 31,45  $\mu\text{g/l}$  volt ( $Mn^{2+}$  terhelt fermentáció) és folyamat végére ez az érték 2,045-ször (64,29  $\mu\text{g/l}$ ) lett magasabb a kiinduláshoz képest.

### 5.3. Citromsav fermentációk jellemzése bioreaktor A és B-ben

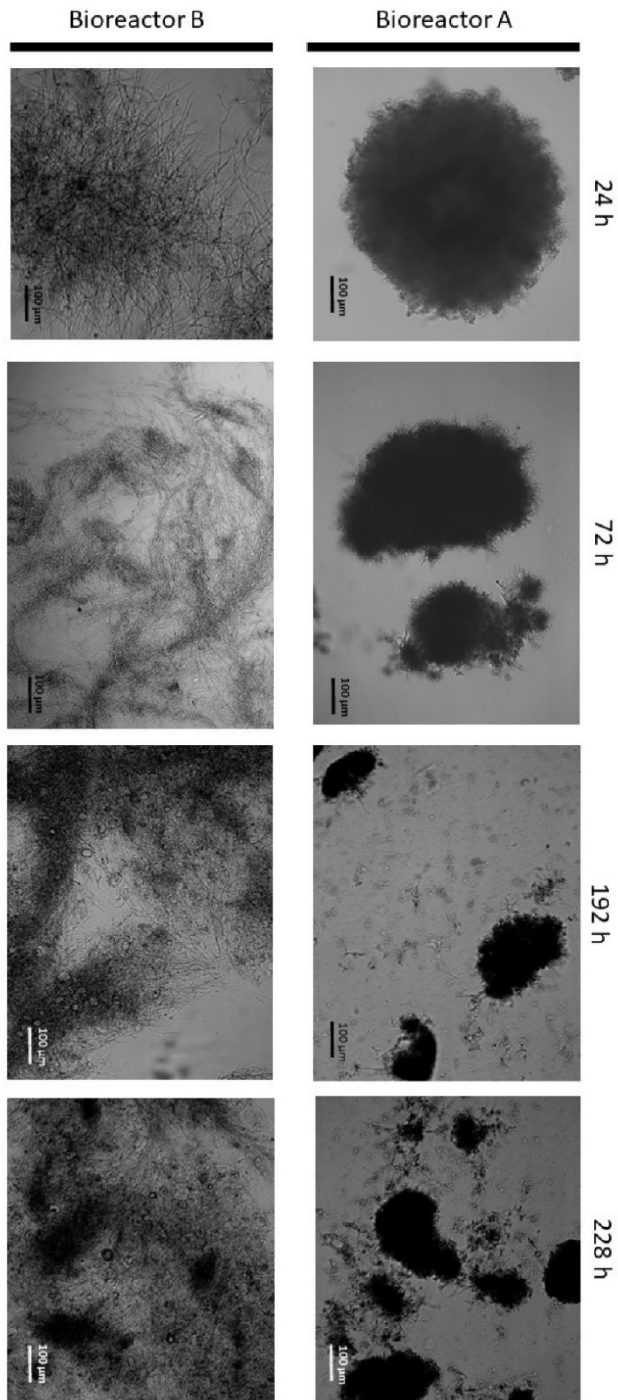
A standard sterilizálási eljárást követően párhuzamos citromsav fermentációkat végeztünk bioreaktor A és B-ben azonos körülmények között (Függelék 20. és 21. ábra). A szénforrás D-glükóz volt, amelynek kezdeti koncentrációját 140 g/l-re állítottuk be. Annak ellenére, hogy az indulási feltételek azonosak voltak, a két bioreaktorban a fermentációk jelentősen eltértek a négy standard paraméter (pH, biomassza-, szénforrás-, és termék koncentráció) tekintetében. A bioreaktor B-ben a D-glükóz szintje gyorsabban csökkent, a kezdeti szénforrás 300 óra alatt merült ki, szemben a bioreaktor A-val, ahol ez 360 órát vett igénybe. A végső biomassza-koncentráció a bioreaktor B-ben kétszerese volt a bioreaktor A-énak (33,9 és 15,9 g/l). Az első 24 órában különösen a bioreaktor B biomassza-koncentrációja nőtt gyorsabban, elérve az inokuláció utáni érték 19-szeresét, míg a bioreaktor A-ban csak ötszörös növekedést tapasztaltunk ugyanennyi idő alatt.

A citromsav moláris hozamai azonban magasabbak voltak a bioreaktor A-ban, mint a B-ben (5. táblázat). A magas moláris hozamot a  $Y_{p/s} > 0,8$  (80%)

értékkel definiáltuk (Karaffa & Kubicek, 2003). A bioreaktor B-ben növekedett kultúrákat nem tekintettük magas hozamú fermentációnak ( $Y_{p/s} = 0,66 \pm 0,04$ ), míg a bioreaktor A-ban tenyésztett kultúrák magas moláris citromsav hozamot produkáltak ( $Y_{p/s} = 0,91 \pm 0,02$ ).

	<b>Bioreaktor A</b>	<b>Bioreaktor B</b>
<b>Maximális biomassza konc. (g/l)</b>	15,9 ± 2,4	33,9 ± 3,5
<b>Biomassza hozam (<math>Y_{x/s}</math>)</b>	0,11 ± 0,01	0,24 ± 0,01
<b>Citromsav konc. (g/l)</b>	135 ± 3,7	99 ± 2,6
<b>Moláris hozam (<math>Y_{p/s}</math>)</b>	0,91 ± 0,02	0,66 ± 0,04
<b>Maximális glükóz hasznosulási ráta (g/l/h)</b>	0,50 ± 0,03	0,58 ± 0,04
<b>Maximális biomassza képződési ráta (g/l/h)</b>	0,087 ± 0,01	0,150 ± 0,03

5. táblázat: Bioreaktor A és B-ben végzett fermentációk összefoglaló táblázata



9. ábra: Bioreaktor A és B-ben kivitelezett *A. niger* NRRL 2270 citromsav fermentációjának morfológiai nyomonkövetése

A két bioreaktorban végzett fermentáció során megfigyelt tenyészetek morfológiája eltért egymástól (9. ábra): a bioreaktor A-ban az első szakaszokban (168 óráig) a kis, pelletszerű csomók (aggregátumok) és a rövid hifák domináltak, amelyek jellemzőek a magas hozamú citromsavtermelő kultúrákra. A bioreaktor B-ben a hosszú hifák jellemezték a tenyészetet, amely alacsony hozamú citromsavtermelő kultúrákkal társul. A magas hozamú morfológia nagyobb hifaátmérőkkel (=mikromorfológia) és kisebb pellet-átmérőkkel (=makromorfológia) rendelkezik. Ezen két kvantitatív paraméter változásait a fermentációk során rögzítettük (6. táblázat). A bioreaktor A-ban a 24 órás kultúrák átlagos hifaátmérője  $5,98 \pm 1,63 \mu\text{m}$  volt, amely 360 órára  $8,67 \pm 1,66 \mu\text{m}$ -re nőtt. A bioreaktor B-ben a maximális átlagos hifaátmérők jelentősen alacsonyabbak voltak, mint a bioreaktor A-ban, míg a korai mintavételi időpontok átmérői jelentősen kisebbek voltak, mint a későbbi mintáké. Az átlagos aggregátum méretek jelentősen megnövekedtek a fermentációk során mindkét bioreaktorban, és minden időpontban szignifikánsan nagyobbak voltak a bioreaktor B-ben, mint a bioreaktor A-ban.

Mintavétel ideje	Bioreaktor A		Bioreaktor B	
	Átlagos sejtátmérő	Átlagos aggregátum méret	Átlagos sejtátmérő	Átlagos aggregátum méret
24	$5,98 \pm 1,63$	$68 \pm 11$	$1,92 \pm 0,48$	$218 \pm 81$
48	$6,56 \pm 1,50$	$79 \pm 15$	$1,90 \pm 0,49$	$298 \pm 96$
72	$7,12 \pm 1,75$	$74 \pm 13$	$2,10 \pm 0,51$	$306 \pm 78$
96	$7,01 \pm 1,48$	$75 \pm 20$	$2,28 \pm 0,55$	>350

<b>120</b>	6,78 ± 1,49	80 ± 12	2,05 ± 0,68	>350
<b>144</b>	8,12 ± 1,84	84 ± 10	2,90 ± 0,49	>350
<b>168</b>	7,76 ± 1,90	96 ± 13	2,48 ± 0,67	>350
<b>192</b>	7,99 ± 1,48	102 ± 16	2,87 ± 0,74	>350
<b>216</b>	7,12 ± 1,75	125 ± 21	3,23 ± 0,99	>350
<b>240</b>	8,05 ± 1,85	138 ± 24	3,90 ± 0,87	>350
<b>264</b>	8,56 ± 1,90	185 ± 21	3,90 ± 0,71	>350
<b>288</b>	8,88 ± 2,01	201 ± 28	4,14 ± 0,75	>350
<b>312</b>	8,76 ± 1,86	222 ± 32	4,25 ± 0,77	>350
<b>336</b>	8,99 ± 1,54	268 ± 48	4,68 ± 1,01	>350
<b>360</b>	8,67 ± 1,66	301 ± 68	5,02 ± 0,99	>350

6. táblázat: Az *A. niger* NRRL2270 micéliumának átlagos sejtátmérője és átlagos aggregátum mérete mintavételi idő (órák) függvényében a bioreaktor A és bioreaktor B esetében citromsav fermentációk során. Az összes eredmény mikrométerben ( $\mu\text{m}$ ) van megadva

Összegzésként, az *A. niger* NRRL 2270 törzssel végzett fermentációk során a bioreaktor A-ban tenyésztett kultúrák kiváló citromsav-termelőknek bizonyultak, és a túltermelő metabolizmus minden jellegzetességét mutatták. Ugyanezzel a törzssel végzett fermentáció a bioreaktor B-ben azonban azt eredményezte, hogy a kultúrák a rendelkezésre álló szénforrás nagyobb részét biomassza szintézisre fordították, ami jelentősen csökkentette a moláris citromsavhozamot.

#### 5.4. Mangán koncentrációk alakulása sterilizálás után és fermentáció alatt

A bioreaktor A és B citromsavtermelésének és morfológiájának különbsége arra engedett következtetni, hogy az extracelluláris  $Mn^{2+}$  koncentrációja eltérő volt a két bioreaktorban. A táptalajt mindkét esetben ugyanúgy készítettük el,  $2 \mu\text{g/l}$   $Mn^{2+}$  végső koncentrációval. A 7. táblázat mutatja a  $Mn^{2+}$  koncentrációkat mindkét bioreaktorban a hősterilizálás előtt és után. A várakozásoknak megfelelően a táptalajok  $Mn^{2+}$  koncentrációja a sterilizálás előtt mindkét bioreaktor esetében  $\sim 2 \mu\text{g/l}$  volt. A 30 perces hősterilizációt ( $121^\circ\text{C}$ ) követően a bioreaktor A-ban  $Mn^{2+}$  koncentráció  $\sim 41\%$ -kal nőtt, míg a bioreaktor B-ben 10-szeresére ugrott. A 60 perces hősterilizálás után a bioreaktor A-ban a  $Mn^{2+}$  koncentrációja  $44\%$ -kal magasabb volt, mint a sterilizálás előtt, míg a bioreaktor B-ban a koncentráció 13-szorosa volt a sterilizálás előtti értéknek. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hősterilizálás  $Mn^{2+}$  kioldódást okozott a bioreaktorokból, valamint a kioldódás lényegesen intenzívebb volt a régi bioreaktor (B) esetében, mint az újban (A).

	Sterilizálás előtt	Sterilizálás után		Különbség
		30 perc	60 perc	
Bioreaktor A	$2,05 \pm 0,10$	$2,90 \pm 0,5$	$2,95 \pm 0,4$	0,85/0,90
Bioreaktor B	$2,01 \pm 0,18$	$20,30 \pm 2,48$	$25,98 \pm 3,02$	18,29/23,97

7. táblázat: Mangán (II)-ion koncentráció ( $\mu\text{g/l}$ ) a bioreaktor A és B-ben az autoklávban végzett 30 és 60 perces sterilizálás előtt és után, valamint az átlagos koncentrációk különbsége.

	pH > 2	pH < 2	Teljes fermentáció
Bioreaktor A	0,0073 ± 0,0006	0,0900 ± 0,0085	0,0677 ± 0,0062
Bioreaktor B	0,0239 ± 0,0016	0,2758 ± 0,0189	0,1208 ± 0,0105

8. táblázat:  $Mn^{2+}$  kioldódási sebességek ( $\mu\text{g/l/h}$ ) bioreaktor A és B-ben, a tenyésztési közeg pH-ja >2, illetve <2 esetén, az *A. niger* NRRL 2270 által végzett citromsav-fermentációk során

A 8. táblázat az  $Mn^{2+}$  kioldódási sebességeit mutatja be két különböző bioreaktorban (A és B) az *A. niger* NRRL 2270 törzs által végzett citromsav-fermentáció során. Az eredmények alapján megfigyelhető, hogy a mangán kioldódása erősen függ a tenyésztési közeg pH-jától. Mindkét bioreaktor esetében jelentősen magasabb kioldódási sebesség volt mérhető pH < 2 tartományban, mint pH > 2 esetén. A bioreaktor A-ban a mangán kioldódási sebessége pH > 2 értéknél 0,0073  $\mu\text{g/l/h}$  volt, míg pH < 2 körülmények között több mint tízszeresére, 0,0900  $\mu\text{g/l/h}$ -ra emelkedett. A bioreaktor B-ben a különbség még nagyobb volt: pH > 2 esetén 0,0239  $\mu\text{g/l/h}$ , míg pH < 2 esetén 0,2758  $\mu\text{g/l/h}$ , ami több mint tizenegyszeres növekedést jelentett. A teljes fermentációs időszakra vonatkoztatva is jelentős különbség mutatkozott a két bioreaktor között: míg bioreaktor A-ban az átlagos  $Mn^{2+}$  kioldódási sebesség 0,0677  $\mu\text{g/l/h}$  volt, addig bioreaktor B-ben 0,1208  $\mu\text{g/l/h}$ . Az eltérő kioldódási sebességek arra utalnak, hogy a két bioreaktor felületi tulajdonságai különbözhetett, ami befolyásolta a mangán kioldódásának mértékét. A nagyobb kioldódási sebesség bioreaktor B-ben azt is jelezheti, hogy nagyobb a reaktor felület/térfogat aránya, vagy az acél felülete érzékenyebb a pH-csökkenésre. A magasabb mangánkoncentráció a gombák morfológiai változásait is előidézhetheti, amely befolyásolhatja a fermentáció hatékonyságát.

A  $\text{pH} < 2$  melletti kioldódás emelkedése arra is utalhat, hogy ebben a tartományban a bioreaktor anyagának korróziója fokozottabb volt, ami hosszabb fermentációs folyamatok során még jelentősebb hatást gyakorolhat a kioldódott fémionok koncentrációjára.

Az egyik eljárás, amelyet a  $\text{Mn}^{2+}$  kioldódás mérséklésére alkalmaztunk, az üres gőzös sterilizálásának nevezett autoklávozási módszer. Ebben az eljárásban az autoklávozási ciklus befejezése után a kioldható fémionokat tartalmazó minimális vízmennyiséget  $\text{Mn}^{2+}$ -mentes steril vízzel helyettesítettük. Ezzel a módszerrel a  $\text{Mn}^{2+}$  szint korai megugrását szinte teljesen ki lehetett küszöbölni, bár a kioldódási arányok az oltás után is hasonlóak maradtak.

Egy másik módszer a fémionok kioldódásának minimalizálására a rozsdamentes acél alkatrészek elektrokémiai polírozása. Míg a  $\text{Mn}^{2+}$  kioldódás kinetikai profiljai még mindig jelentős kioldódást mutattak mind az autoklávozás, mind az azt követő fermentáció során, az  $5 \mu\text{g/l}$  küszöbértéket csak 48 órával az inokulálás után lépte túl. Következésképpen a citromsav moláris hozama csak  $\sim 10\%$ -kal (bár statisztikailag még mindig szignifikánsan) volt kevesebb, mint a bioreaktor A-ban elért hozam, elérve az  $Y_{p/s} = 0,80 \pm 0,03$  értéket. Végül a két utóbbi módszer kombinálásával a citromsav moláris hozama még a (elektrokémiaileg polírozott) bioreaktor B-ben is  $Y_{p/s} = 0,88 \pm 0,04$ -re állt vissza. Ezek az értékek statisztikailag megegyeznek a bioreaktor A-ban kapott értékekkel.

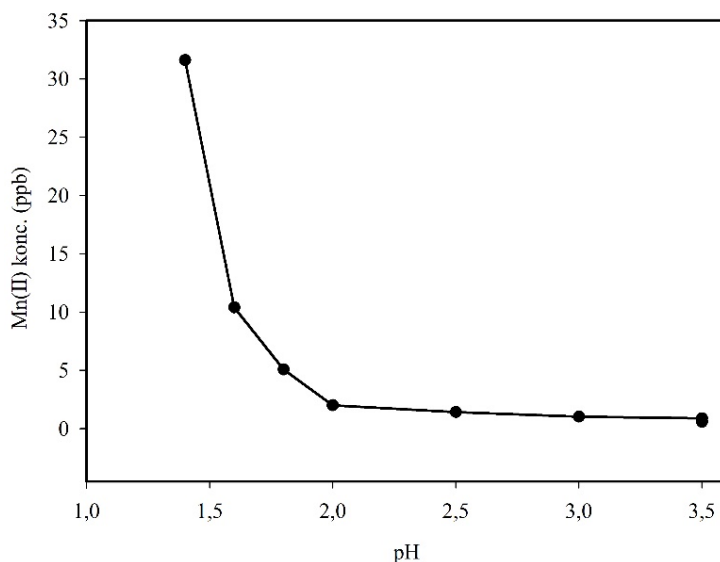
Ezen kombinált eredmények (üresgőzös sterilizálás és elektrokémiai polírozás) a citromsav fermentáció hatékonyságának optimalizálása szempontjából jelentős lépéseket jelentenek, különös tekintettel az  $\text{Mn}^{2+}$  koncentráció kontrolljára és a fermentáció korai szakaszában történő hatékony beavatkozásra. További vizsgálatok szükségesek annak meghatározására,

hogy milyen egyéb fémionok oldódhatnak ki a bioreaktor acélrészeiből, valamint, hogy a különböző felületkezelési technikák, milyen mértékben csökkenthetik a  $Mn^{2+}$  kioldódását. Emellett célszerű részletesen elemezni a mangánkoncentráció és a fermentáció során bekövetkező pH-változások közötti közvetlen összefüggést.

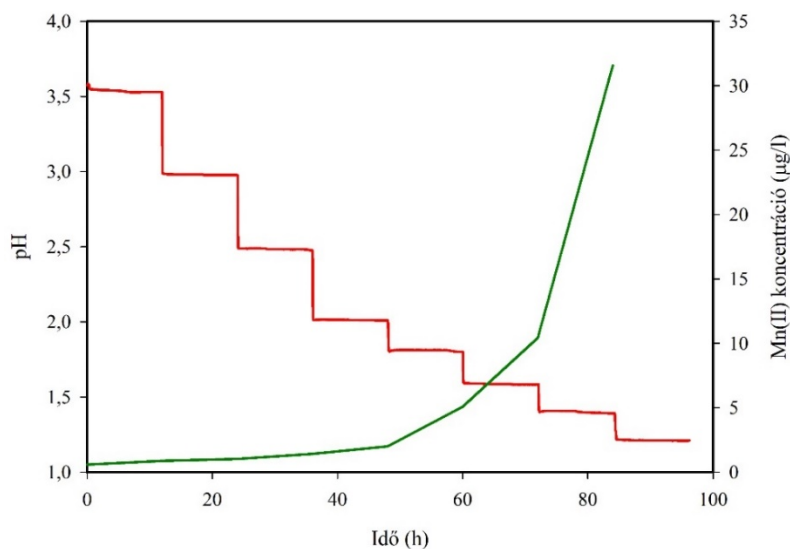
### 5.5. A pH és az $Mn^{2+}$ kioldódás összefüggésének kísérleti vizsgálata bioreaktorban

Az előzőekben ismertetett kísérleteink eredményei arra utaltak, hogy a mangán kioldódása összefügghet a közeg pH-értékének változásával.

További kísérleteink célja az volt, hogy meghatározzuk a pH és az  $Mn^{2+}$  kioldódás közötti összefüggést a bioreaktor A-ban, valamint azt, hogy mely pH-tartományokban kezdődik és gyorsul fel jelentősen a fémion kioldódása a fermentor acél részeiből.



10. ábra:  $Mn^{2+}$  kioldódásának mértéke 10 mM foszfát puffer oldatban



11. ábra: A pH csökkenés (piros) hatása a  $Mn^{2+}$  kioldódása a bioreaktor A-ból (zöld)

pH	$Mn^{2+}$ kioldódás	
	10 mM foszfát	100 mM foszfát
3,5	0,494 ± 0,3	0,477 ± 0,2
3,0	1,030 ± 1,3	1,104 ± 1,4
2,5	1,420 ± 2,2	1,457 ± 2,4
2,2	1,660 ± 2,1	1,691 ± 2,4
2,0	2,001 ± 2,5	2,040 ± 3,2
1,8	5,080 ± 12	5,104 ± 23
1,6	10,400 ± 48	10,466 ± 32
1,4	31,600 ± 105	32,075 ± 120

9. táblázat:  $Mn^{2+}$  kioldódása ( $\mu\text{g/l}$ ) a bioreaktor A-ból a pH függvényében

Az eredmények megerősítették, hogy az  $Mn^{2+}$ -felhalmozódás pH-függő: 3,5 és 2,2 között elhanyagolható volt, 2,0-nél kezdett növekedni, majd 2,0 pH alatt meredeken gyorsult (10. és 11. ábra). A  $Mn^{2+}$  kioldódási jelleg görbéje hasonló és az arányok azonosak voltak azokkal, amelyeket az *A. niger* fermentáció során mértünk.

Érdekes megfigyelés, hogy a puffer koncentrációjának növelése (10 mM-ről 100 mM-ra) nem befolyásolta érdemben a kioldódást (9. táblázat), ami azt jelzi, hogy a pufferkapacitás ebben az esetben nem meghatározó tényező a fémion oldódási mechanizmusban.

#### 5.6. $Mn^{2+}$ hatása eltérő időpontokban és koncentrációban rázatott lombikos fermentáció során

A korábbi kísérletek során megállapítottuk, hogy az  $Mn^{2+}$  kioldódása pH-függő, ami fermentáció közben is végbemegy. Ipari szempontból releváns következő kérdés az volt, hogy különböző időpontokban és koncentrációkban adagolt  $Mn^{2+}$  milyen hatással van a citromsavtermelés hatékonyságára és a biomassza képződésére. Ennek vizsgálatára rázatott lombikos fermentációkat végeztünk *A. niger* NRRL 2270 törzsszel, amely során három különböző  $Mn^{2+}$ -koncentrációt alkalmaztunk (5, 30 és 100  $\mu\text{g/l}$ ), valamint különböző időpontokban adagoltuk a fémionokat a tenyészetbe.

Mn <sup>2+</sup> ráadagolás (óra)	5 µg/l		30 µg/l		100 µg/l	
	Y <sub>p/s</sub>	Y <sub>x/s</sub>	Y <sub>p/s</sub>	Y <sub>x/s</sub>	Y <sub>p/s</sub>	Y <sub>x/s</sub>
0	0,73 ± 0,05	0,25 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,04
	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
3	0,67 ± 0,05	0,27 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,04
	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
6	0,71 ± 0,04	0,26 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,05
	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
12	0,70 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,26 ± 0,04	0,40 ± 0,05	0,33 ± 0,05
	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
24	0,72 ± 0,06	0,25 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,24 ± 0,05	0,44 ± 0,04	0,35 ± 0,04
	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
48	0,78 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,65 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,52 ± 0,05	0,30 ± 0,04
	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
72	0,83 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,77 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,21 ± 0,04
	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05
172	0,88 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,89 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,87 ± 0,04	0,16 ± 0,03
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

10. táblázat: A mangán(II)-ion ráadagolásának hatása a citromsav moláris hozamára (Y<sub>p/s</sub>) és a biomassza képződési hozamára (Y<sub>x/s</sub>) az idő függvényében citromsav fermentáció során *A. niger* NRRL2270 törzssel. A kontrol tenyészetek kezdeti mangán(II)-ion koncentrációja ~2 µg/l volt. A kontrol tenyészetek termék- és biomassza-hozamai: Y<sub>p/s</sub> (%) = 90,1 ± 2,5 és Y<sub>x/s</sub> (%) = 18,5 ± 1,8.

A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy az  $Mn^{2+}$  adagolása jelentős hatással van a citromsav-termelésre, különösen a fermentáció korai szakaszában. Az  $Y_{p/s}$  értékek az idő előrehaladtával fokozatos növekedést mutattak, és a legmagasabb értékeket 172 óránál mértük (10. táblázat).

A kezdeti  $Mn^{2+}$  koncentrációk közül az 5  $\mu g/l$  és 30  $\mu g/l$  hasonló hatást mutattak, míg a 100  $\mu g/l$  adagolás szignifikánsan csökkentette a citromsav moláris hozamát a fermentáció kezdeti szakaszában ( $p < 0,05$ ). Ez arra utal, hogy a túl magas  $Mn^{2+}$  koncentráció gátolja az optimális metabolikus folyamatokat, valószínűleg a citromsav-termelés szempontjából kedvezőtlen enzimikus és sejtszintű változásokat idézve elő.

Ezzel szemben a későbbi  $Mn^{2+}$  adagolás (120 és 172 óra) már nem eredményezett statisztikailag szignifikáns eltérést a citromsav hozamban ( $p > 0,05$ ), ami megerősíti, hogy a  $Mn^{2+}$  negatív hatása elsősorban a fermentáció kezdeti szakaszára korlátozódik.

A biomassa-képződés tekintetében a változások kevésbé voltak markánsak, és a különböző időpontokban történő  $Mn^{2+}$  adagolás nem eredményezett következetesen szignifikáns eltéréseket.

## 5.7. Genetikailag módosított (*cexA*-túltermelő) törzssel végzett fermentációk

### 5.7.1. $Mn^{2+}$ adagolás hatása a citromsav moláris hozamára a *cexA* túltermelő és ATCC 1015 törzs esetében

Rázatot lombikos kísérletek során vizsgáltuk, hogy a különböző időpontokban és koncentrációkban adagolt  $Mn^{2+}$  hogyan befolyásolja a citromsav moláris hozamát a törzsek esetében. A cE *cexA* túltermelő törzs egy újonnan előállított mutáns törzs volt, amelynek sem a termelékenységét, sem a mangánnal szembeni viselkedését nem ismertük korábban. A kísérletek célja az volt, hogy meghatározzuk, milyen mértékben képes tolerálni a fémion jelenlétét, és hogyan viszonyul teljesítménye az ATCC 1015 törzshöz.

<b><math>Mn^{2+}</math> adagolás</b>	<b><math>Y_{(p/s)}</math></b>
kontrol <5 $\mu\text{g/l}$	$0,89 \pm 0,08$
0 h 100 $\mu\text{g/l}$	$0,33 \pm 0,02$
0 h 30 $\mu\text{g/l}$	$0,31 \pm 0,03$
0 h 500 $\mu\text{g/l}$	$0,36 \pm 0,03$
24 h 100 $\mu\text{g/l}$	$0,34 \pm 0,02$
48 h 100 $\mu\text{g/l}$	$0,50 \pm 0,08$
120 h 100 $\mu\text{g/l}$	$0,68 \pm 0,11$

11. táblázat: A cE *cexA* túltermelő törzssel végzett ráadagolási kísérletek moláris hozam eredményei

A kontrol csoportban, ahol a tápközegben nem volt hozzáadott mangán, a citromsav moláris hozama volt a legmagasabb ( $0,89 \pm 0,08$ ). Ez azt mutatja, hogy  $Mn^{2+}$  jelenléte nélkül a *cexA* túltermelő törzs hatékonyan termelte a

citromsavat. A fermentáció kezdetén (0. óra) történő  $Mn^{2+}$  adagolás jelentős hozamcsökkenést eredményezett minden alkalmazott koncentráció esetén (11. táblázat). Ez megerősíti, hogy a fermentáció korai szakaszában az  $Mn^{2+}$  gátolja a citromsav-termelést, függetlenül attól, hogy alacsony (30  $\mu g/l$ ) vagy magasabb (500  $\mu g/l$ ) koncentrációban van jelen.

További kísérletek során összehasonlítottuk az *A. niger* ATCC 1015 és cE *cexA* túltermelő törzs hozamait. Az eredmények azt mutatták, hogy a *cexA* túltermelő törzs ellenállóbb a  $Mn^{2+}$  jelenlétére, míg az ATCC 1015 törzs termelése erősen gátolt, különösen a fermentáció kezdeti szakaszában történő  $Mn^{2+}$  adagolás esetén (12. táblázat).

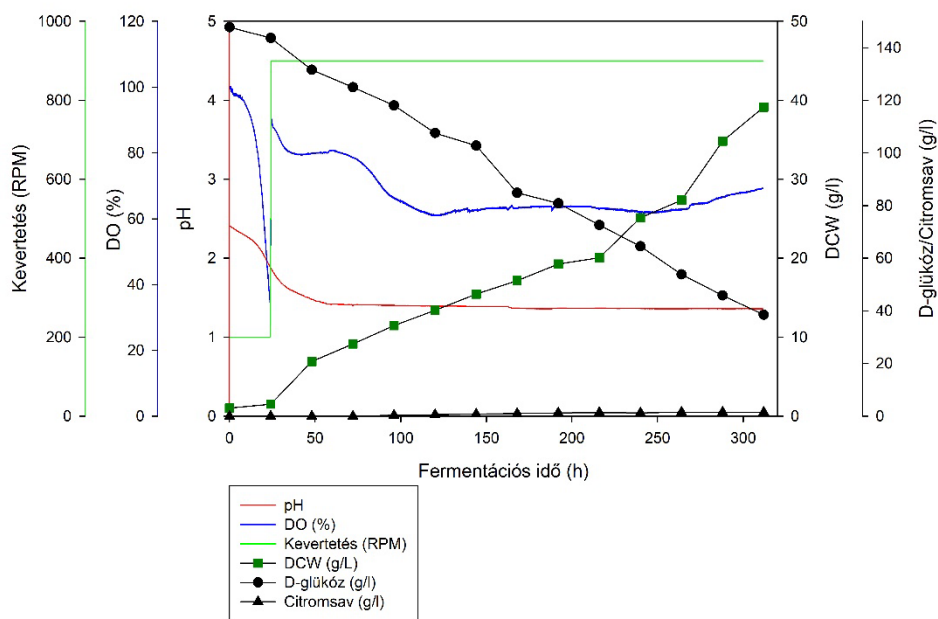
$Mn^{2+}$ konc. ( $\mu g/l$ )	30		100		100		100	
Adagolás ideje (óra)	0		24		48		120	172
Törzs	cE <i>cexA</i>	ATCC 1015	cE <i>cexA</i>	ATCC 1015	cE <i>cexA</i>	ATCC 1015	cE <i>cexA</i>	ATCC 1015
$Y_{(p/s)}$	<b>0,31</b> ± <b>0,01</b>	<b>0,02</b> ± <b>0,01</b>	<b>0,34</b> ± <b>0,08</b>	<b>0,09</b> ± <b>0,02</b>	<b>0,50</b> ± <b>0,03</b>	<b>0,25</b> ± <b>0,02</b>	<b>0,68</b> ± <b>0,01</b>	<b>0,50</b> ± <b>0,04</b>

12. táblázat: A cE *cexA* túltermelő és az ATCC 1015 törzssel végzett ráadagolási kísérletek moláris hozam eredményei

Az eredmények megerősítették, hogy az  $Mn^{2+}$  jelenléte a fermentáció korai szakaszában jelentősen gátolja a citromsav-termelést, míg későbbi hozzáadása már kevésbé befolyásolja a hozamot. Ez összhangban áll korábbi vizsgálatainkkal.

5.7.2. *A. niger* ATCC 1015 és cE *cexA* túltermelő törzs  
összehasonlítása  $Mn^{2+}$  terhelt környezetben 5 literes  
fermentorban

A rázatott lombikos fermentációs kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy az  $Mn^{2+}$  adagolásától és koncentrációtól függően eltérő mértékben befolyásolja a citromsav moláris hozamát, és a *cexA* túltermelő törzs nagyobb toleranciát mutatott a fémionok jelenlétére, mint az ATCC 1015 törzs. A következő lépésként 5 literes fermentorban vizsgáltuk meg, hogy nagyobb léptékben hogyan alakul a két törzs teljesítménye  $Mn^{2+}$ -terhelt (0. órától kezdve) közegben. A fermentációs időprofil t ábrázoló grafikon valamennyi mért adatot tartalmazza, mivel a bioreaktorban zajló folyamatok értékelése során az egyes paraméterek együttes elemzése elengedhetetlen. A tényezők változása kölcsönösen befolyásolhatja egymást, így egy adott paraméter önálló vizsgálata nem feltétlenül tárja fel a mögöttes összefüggéseket.



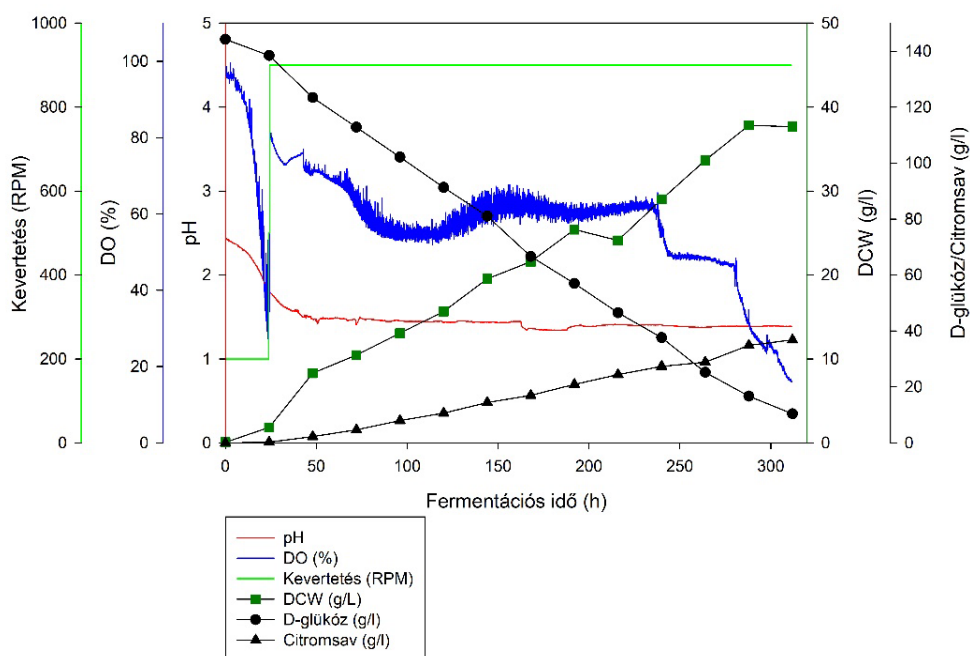
12. ábra: *A. niger* ATCC 1015 törzssel végzett 100 µg/l Mn<sup>2+</sup> terhelt fermentáció időprofilja

A fermentációs időprofil (12. ábra) jól szemlélteti az egyes paraméterek változásait, információt szolgáltat a folyamat különböző fázisairól, valamint a mikroorganizmus metabolikus aktivitásáról. A pH értéke a fermentáció kezdetén 2,5 volt, amely fokozatosan csökkent. A pH csökkenése a 20. óra után felgyorsult, és pH 1,2-nél stabilizálódott. Az oldott oxigénszint (DO) kezdetben 100% volt, amit 200 rpm kevertetéssel és intenzív levegőztetéssel biztosítottunk. A 12. óra körül azonban az oxigénszint drasztikusan csökkent, amely a sejtek gyors növekedési ütemének és az intenzív metabolikus aktivitásnak tulajdonítható. Az első 24 óra után a kevertetés emelésével (konstans 900 rpm) biztosítottuk a magasabb (70 - 90%) oldott oxigénszintet.

Citromsav termelés tekintetében a folyamat, kifejezetten alacsony hozamot produkált, aminek vélhető oka a Mn<sup>2+</sup> jelenléte volt (Fekete és mtsai., 2024). A végső koncentráció 1,51 g/l volt, szerves savat 96. órában detektáltuk

először, ekkor 0,355 g/l értéket mértünk HPLC segítségével. 216 óra elteltével 1,155 g/l-rel több termék volt a fermentáléban (Függelék: 18. táblázat).

A száraz sejtömeget (DCW) a végső érték 39,14 g/l volt. Ez az érték biomassza viszonylatban magasnak számít citromsav fermentáció során, mert a szénforrás hasznosulása nem a termékképződésre fordítódott, hanem a sejt gyarapodásra.



13. ábra: *cE cexA* túltermelő törzssel végzett fermentáció időprofilja

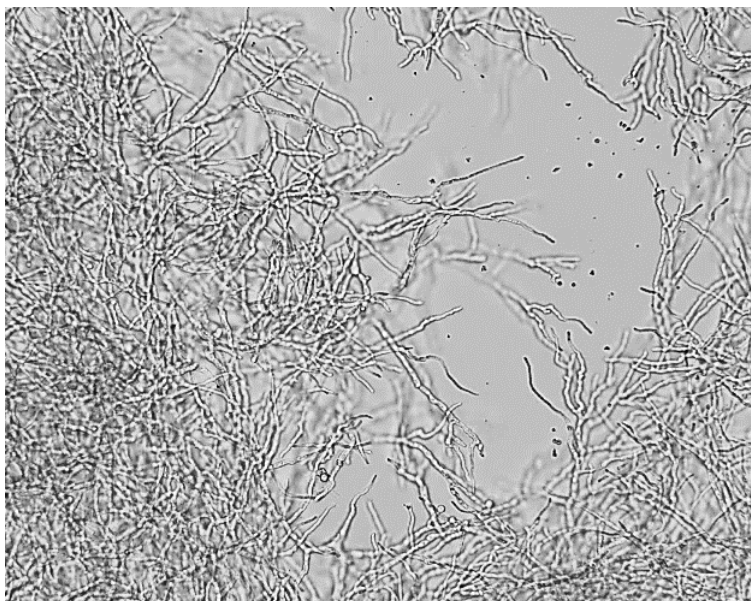
A *cE cexA A. niger* törzs esetében az előzőekben ismertetett paraméterek hasonlóan alakultak a fermentáció során (13. ábra). Kivételt képez a citromsav termelődésének mértéke: végső koncentrációja 36,83 g/l volt, ami 24,39-szer magasabb hozam, mint a szülői törzsé (ATCC 1015) (Függelék 19. táblázat).

A száraz sejttömeg (DCW) volumetrikus hozamában nem észlelhettünk kiugró változásokat, ebben az esetben a biomassza tömege a folyamat végére 37,66 g/l volt, ami közel azonos az ATCC 1015 törzs fermentációjának eredményével.

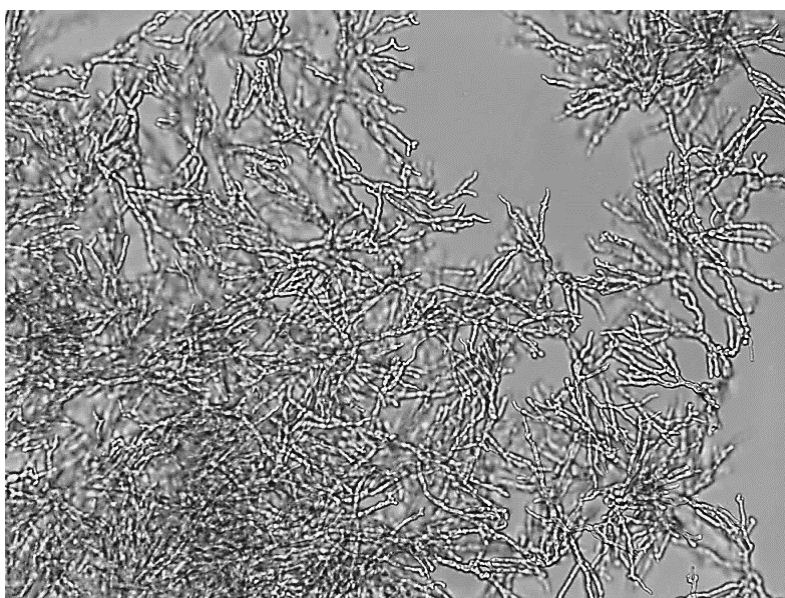
#### 5.7.2.1. Morfológiai vizsgálatok $Mn^{2+}$ terhelt fermentáció során

A morfológiai analízis a fermentációk során elengedhetetlen; több, mikroszkóppal látható élettani következtetést lehet belőle levonni (pl. a  $Mn^{2+}$  koncentrációmérés ICP-QMS-sel történik, de a morfológiai sajátosságok is megmutatják, hogy a  $Mn^{2+}$  limitáció fennáll-e). Rázott lombikos fermentáció során a morfológia – legalábbis a disszertációmban használt törzsek esetében – egyértelműen megmutatta a mangán-ionok jelenlétét (fonalas) vagy hiányát (pelletes).

A mangán-hatás következményeként, a fonalásodás (14. és 15. ábra) hatására a fermentlé viszkózusabbá válik, így a kevertetés, levegőztetés és az anyagátadás is nehezebben mennek végbe. Energetikai szempontból nem feltétlenül hatékonyabb a rövidebb ideig tartó fermentáció, mivel a viszkózusabb fermentlé nagyobb energiaigényű, mint a mangán-limitált pelletes fermentlé.



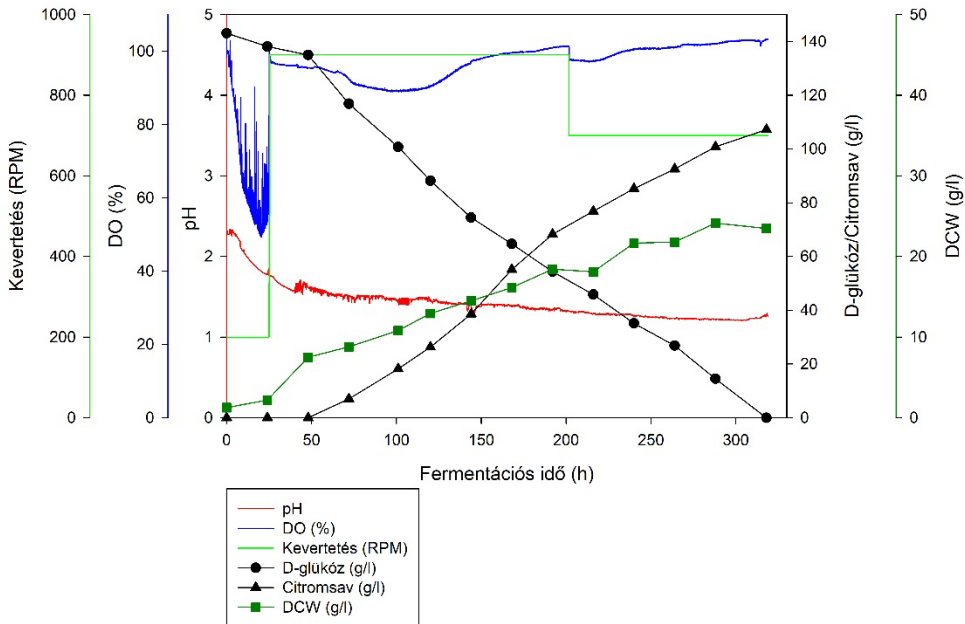
14. ábra: Az *A. niger* ATCC 1015 törzs morfológiája  $Mn^{2+}$  terhelt körülmények között



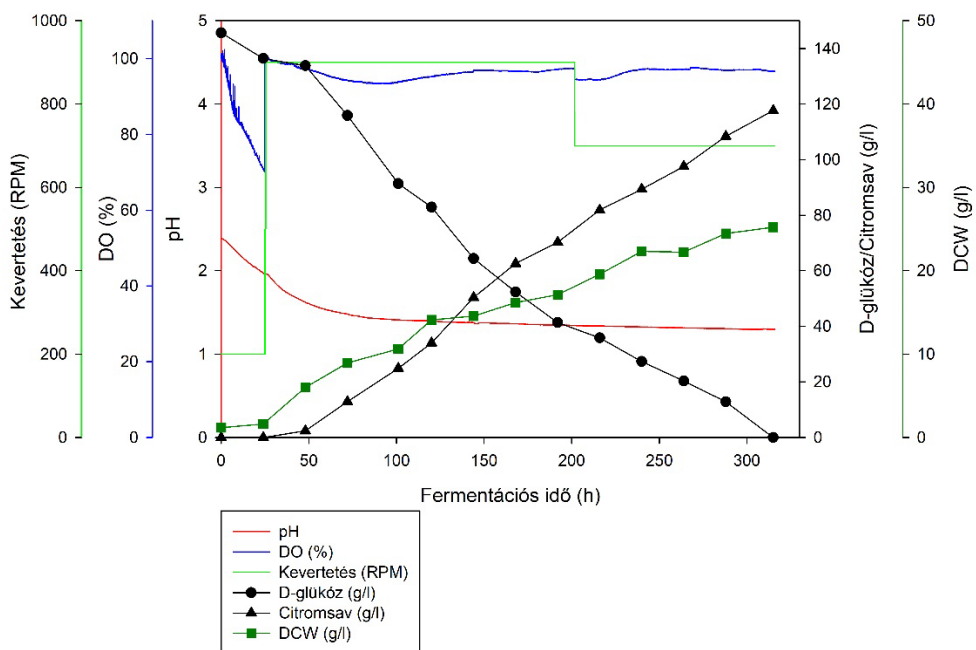
15. ábra: Az *A. niger* *cE cexA* túltermelő törzs morfológiája  $Mn^{2+}$  terhelt körülmények között

### 5.7.3. *A. niger* ATCC 1015 és cE *cexA* túltermelő törzs összehasonlítása $Mn^{2+}$ limitált környezetben 5 literes fermentorban

A  $Mn^{2+}$ -terhelt fermentációs kísérleteink eredményei alapján világosan kirajzolódott a fémion jelenlétének hatása a citromsav-termelésre. Mivel a  $Mn^{2+}$  hiánya jelenti az optimális körülményt a citromsav túltermelés szempontjából, szükséges volt vizsgálni, hogy ilyen kontrollált,  $Mn^{2+}$  limitált környezetben tapasztalható-e érdemi különbség a két törzs viselkedésében. Bár nem vártunk jelentős eltéréseket, a kísérletek célja az volt, hogy meghatározzuk, mennyiben befolyásolja a *cexA* gén túltermelése a citromsav termelést, morfológiát optimális környezetben, azaz amikor a mangán(II)-ion jelenléte nem korlátozó tényező.



16. ábra: ATCC 1015 törzssel végzett fermentáció időprofilja



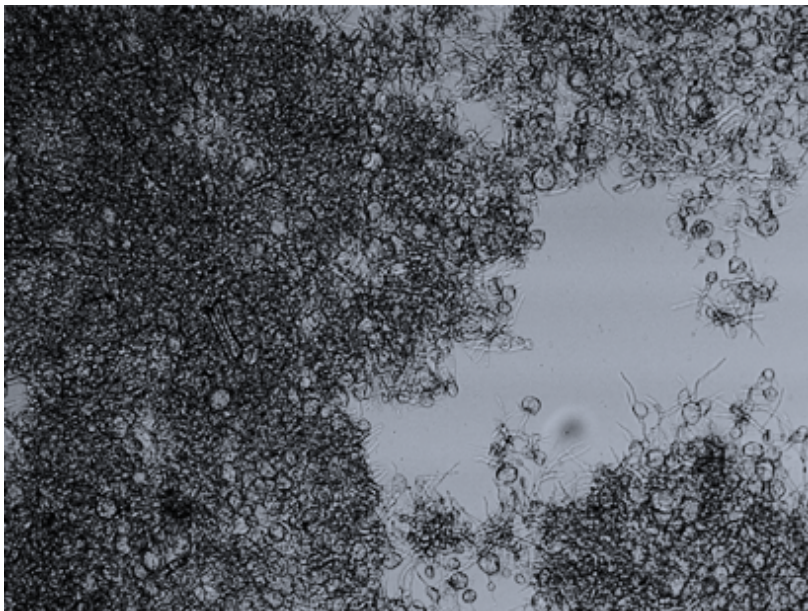
17. ábra: *cE cexA* túltermelő törzssel végzett fermentáció időprofilja

A fermentáció során mért pH, oldott oxigénszint, kevertetési sebesség, citromsavtermelés, glükózfogyás, valamint a száraz sejt tömeg (DCW) változásának időbeli alakulását az 16. és 17. ábrák szemléltetik. Az oldott oxigénszint változásában kisebb eltérés volt megfigyelhető a két törzs között. A fermentáció első 24 órájában az ATCC 1015 szülői törzs esetében nagyobb mértékű csökkenést észleltünk, mint a *cE cexA* mutáns törzsnél, ami arra utalhat, hogy a szülői törzs kezdeti metabolikus aktivitása intenzívebb volt, ezáltal nagyobb oxigénfelhasználást eredményezett. Ezt az eltérést azonban nem támasztottuk alá statisztikai elemzéssel. A citromsav képződése a  $Mn^{2+}$ -terhelt fermentációhoz hasonlóan később indult meg (jelen esetben ~48 óra után), azonban a mért koncentrációk alapján a termelés intenzív növekedést mutatott egészen a fermentáció végéig. Ez összhangban áll a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint a citromsav túltermelése a korai adaptációs szakasz után indul meg jelentősebben. A két törzs végső hozama között nem

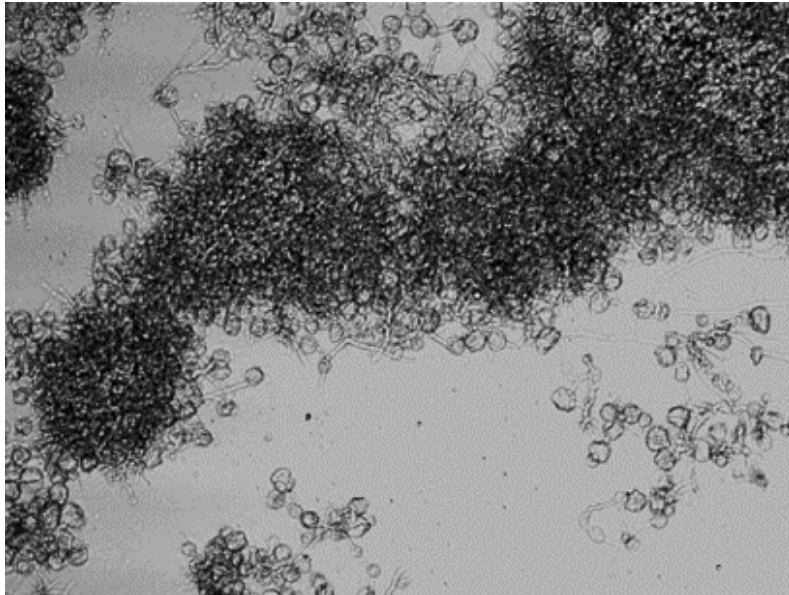
mutatkozott jelentős különbség. Az ATCC 1015 szülői törzs 107,22 g/l citromsavat termelt, míg a cE *cexA* túltermelő törzs hozama 117,69 g/l volt 318 óra alatt (Függelék: 20. és 21. táblázat). Bár a cE *cexA* törzs valamivel magasabb citromsav-koncentrációt produkált, az eltérés nem tekinthető jelentősnek.

#### 5.7.3.1. Morfológiai vizsgálatok $Mn^{2+}$ limitált fermentáció során

A mikroszkópos felvételek célja a két törzs (ATCC 1015 és cE *cexA*) morfológiai különbségeinek szemrevételezése volt, anélkül, hogy kvantitatív elemzést végeztünk volna. Az összehasonlítás során a sejtek elrendeződésére és aggregációs mintázatára koncentráltunk; átmérő-méréseket és más morfometriai elemzéseket nem végeztünk. A vizuális megfigyelések alapján jelentős különbség nem volt észlelhető a két törzs között (18. és 19. ábra).



18. ábra: Az *A. niger* ATCC 1015 törzs morfológiája  $Mn^{2+}$  limitált körülmények között



19. ábra: Az *A. niger* *cE cexA* túltermelő törzs morfológiája  $Mn^{2+}$  limitált körülmények között

## 6. Eredmények megbeszélése

Kutatómunkám kezdetén még viszonylag kevés információ állt rendelkezésre a mangán(II) ionok kioldódásának mechanizmusairól; nem tudtuk, hogy milyen tényezők befolyásolják mértékét és dinamikáját.

Az *A. niger* táptalajában  $5 \mu\text{g/l}$  alatti  $Mn^{2+}$  koncentráció elengedhetetlen feltétele a magas citromsavhozam elérésének (Kisser és mtsai., 1980). Ez azonban kihívást jelent, mivel már a csapvíz is tartalmazhat akár  $3 \mu\text{g/l}$   $Mn^{2+}$ -t, egy 1% (w/v) D-glükóz oldat ennek kétszeresét érheti el, míg egy 15% (w/v) D-glükóz oldat akár harmincszorosan is meghaladhatja a kritikus szintet (Karaffa és mtsai., 2015). Teszteltük és igazoltuk azt a hipotézist, miszerint a táptalajban lévő szennyeződés mellett a bioreaktor maga is jelentős  $Mn^{2+}$  forrás lehet, mivel a korrózió által kiváltott kioldódás a kritikus szint fölé emelkedhet,

ezáltal akár 30%-kal csökkentve a citromsav moláris hozamát. Igazoltuk, hogy a rozsdamentes acélötvözetekből történő  $Mn^{2+}$  kioldódás elsősorban a standard autoklávozás és a fermentáció során jellemző erősen savas ( $pH < 2$ ) tápközeg hatására következik be. Emellett azt is kimutattuk, hogy felületkezelés és/vagy egy módosított sterilizációs protokoll alkalmazásával a magas citromsav hozam teljes mértékben helyreállítható.

Bár az egyszer használatos bioreaktorok az elmúlt két évtizedben egyre elterjedtebbé váltak a biotechnológiában, alkalmazásuk még mindig elsősorban emlős-, rovar- és növényi sejtenyésztésre korlátozódik (Langer & Rader, 2018). A mikrobiális fermentációs eljárások nem tértek át műanyag és elasztomer alapú egyszer használatos rendszerekre, főként a relatíve alacsony oxigéntranszfer-kapacitás miatt (Rader & Langer, 2014). A rozsdamentes acél bioreaktorokat ezzel szemben több száz köbméteres kapacitásra is szabhatják, miközben magasabb keverési teljesítményt biztosítanak, mint az egyszer használatos bioreaktorok. A világ biotechnológiai termelési kapacitásának becslések szerint 97%-át rozsdamentes acél bioreaktorok teszik ki (Langer & Rader, 2018). Az ipari méretű fermentorok mellett a törzsfejlesztés és a gyártási folyamatok optimalizálására szolgáló kis léptékű üveg bioreaktorok is tartalmaznak több rozsdamentes acél alkatrészt, például a keverő- és levegőztetőrendszert, a mintavevő csöveket, és az elektródák tartóit. Az acél komponensek korróziója során fellépő fémion kioldódás tehát egy széles körben előforduló jelenség lehet, amelyet azonban a szakirodalomban ritkán vesznek figyelembe.

Kioldódási kísérleteink során nem vizsgáltunk a rozsdamentes acélban jelenlévő más fémiont, így felmerülhet a kérdés, hogy okozhatnak-e, legalább részben, bármilyen problémát a metabolizmusban vagy citromsav termelődésben. A vas például, amely a rozsdamentes acélban a legnagyobb

mennyiségben van jelen, bizonyos koncentráció fölött csökkenteni képes a citromsav hozamot (Shu & Johnson, 1948). Azonban míg mi 0,1 mg/l vasat adagoltunk a táptalajhoz, más citromsav-termelési protokollok akár 1,3 mg/l  $\text{Fe}^{2+}$  koncentrációt is javasolnak. Ezenkívül lehetséges, bár kísérletileg még nem igazolt, hogy az emelt vastartalom gátló hatása a citromsav hozamára a  $\text{Mn}^{2+}$  hatáshoz kapcsolódik, mivel még analitikai tisztaságú vas-sók is tartalmazhatnak akár 0,5% (w/w)  $\text{Mn}^{2+}$  szennyeződést (Karaffa és mtsai., 2021). Ilyen Fe/Mn kölcsönhatások – az alacsony kiindulási vastartalom miatt – a mi kísérleti rendszerünkben nem léteztek.

A 316L rozsdamentes acél ötvözetek degradációja savas közegben jól dokumentált jelenség, amelynek bizonyítására Atapour és munkatársai (Atapour és mtsai., 2020) híg sósavas kioldódási kísérleteket végeztek. A rozsdamentes acél korróziója következtében különböző fémionok szabadulhatnak fel, amelyek befolyásolhatják a mikroorganizmusok metabolizmusát. Noha a rozsdamentes acélből kioldódó  $\text{Mn}^{2+}$  mennyiségére vonatkozó vizsgálatok korlátozottak, a savas közeg és a citromsav komplexképződési tulajdonságai feltételezhetően fokozzák az oldódási folyamatot (Bastug és mtsai., 2007). A citromsav fermentációja során alkalmazott  $\text{pH} \leq 2$  döntő jelentőségű, mivel segít minimalizálni a nem kívánt melléktermékek, például az oxálsav képződését (Ruijter és mtsai., 1999). Ugyanakkor az ilyen alacsony pH-szint növeli a fémion-kioldódás kockázatát, amely hatással lehet az *A. niger* metabolizmusára. Ennek megfelelően kulcskérdés, hogy mangán kioldódik-e és ha igen, akkor mikor, milyen koncentrációban.

Williamson és munkatársai (Williamson és mtsai., 2018) monoklonális antitest termelés során vizsgálták a rozsdamentes acél bioreaktorokból kioldódó  $\text{Mn}^{2+}$  hatásait különböző léptékben. Eredményeik összevethetők a

saját fermentációs kísérleteinkkel, különös tekintettel a  $Mn^{2+}$ -koncentrációt. A kutatás során 2 l-es, 100 l-es és 6000 l-es bioreaktorokban vizsgálták a  $Mn^{2+}$  kioldódását. 2 l-es bioreaktorban: a  $Mn^{2+}$ -koncentráció  $6,4 \pm 0,2$  nM-re nőtt a fermentáció során, ami magasabb terminális galaktozilációhoz vezetett. 100 l-es bioreaktorban kioldódott mennyiség  $3,1 \pm 0,4$  nM volt, ami már kisebb hatást gyakorolt a glikozilációs mintázatra. 6000 l-es bioreaktorban a mangán kioldódása  $1,8 \pm 0,3$  nM-ra csökkent, ami azt mutatja, hogy a nagyobb méretű rendszerekben kevesebb fémion szabadult fel az acélfelületekből. A kutatás megállapította, hogy a bioreaktor anyaga és mérete befolyásolja az  $Mn^{2+}$  kioldódást, amely képes enzimatikus és metabolikus változásokat kiváltani.

A Waksman & Karow (Waksman & Otto, 1946) szabadalomban ismertetett fermentációs eljárása több ponton is összevethető a jelen kutatás során alkalmazott stratégiákkal. Az általuk bevezetett közcseres (Replacement Medium) technika célja az volt, hogy a fermentáció során folyamatosan biztosítsa az optimális tápanyagellátást, miközben eltávolította a felesleges metabolitokat és potenciálisan gátló anyagokat. Ez a megközelítés párhuzamba állítható az üres gőzös sterilizálással, amelynek célja a fémionok, különösen a  $Mn^{2+}$  eltávolítása a fermentáció kezdeti szakaszában, így csökkentve azok negatív hatását a citromsav-termelésre. A morfológiai optimalizálás terén is hasonlóságok figyelhetők meg. A szabadalom hangsúlyozza, hogy a pelletképződés előnyös a citromsav-termelés szempontjából, mivel javítja az oxigénfelhasználást és csökkenti a melléktermékek képződését. Hasonló megfigyelések történtek a jelen kutatásban is, ahol a  $Mn^{2+}$  koncentráció szabályozásával befolyásolható volt a micélium szerkezete, és a pelletes morfológia kedvezőbb citromsav hozamot eredményezett.

További alternatív megoldást jelenthet a kálium-ferrocianid alkalmazása, amely megköti a fémionokat, ezáltal csökkenti azok biológiai hatásait. A US 3941656 szabadalom (Hustede & Rudy, 1976) egy olyan fermentációs eljárást mutatott be, amely során meghatározott időben és koncentrációban kálium-ferrocianidot adtak a tápközeghez. Az eljárás segíti a fémionok eltávolítását a fermentációs rendszerből, csökkentve ezzel a mangán gátló hatását a citromsav fermentáció során. Az adagolás optimális időzítése kulcsfontosságú: a fermentáció korábbi szakaszában a spóranövekedést segítheti, míg a citromsav-termelés fázisában a fémionok megkötése miatt hozzájárulhat a hozam növekedéséhez.

A fermentációs közeg összetételének módosítása mellett a bioreaktorok szerkezeti anyagának kezelése is kulcsfontosságú szerepet játszhat a fémion-kioldódás minimalizálásában. Az eltérő felületkezelési technikák alkalmazásával csökkenthető a korrózió, ezáltal mérsékelve a fermentáció során felszabaduló fémionok, köztük a  $Mn^{2+}$  mennyiségét. A 13. táblázat azokat a leggyakrabban alkalmazott felületkezelési eljárásokat mutatja be, amelyek hozzájárulhatnak a bioreaktorok korrózióállóságának javításához, valamint azok előnyeit és hátrányait is összefoglalja.

<b>Módszer</b>	<b>Előnyök</b>	<b>Hátrányok</b>	<b>Hivatkozás</b>
Elektropolírozás	Tartós, egyenletes felületet ad, csökkenti a kioldódást	Berendezést és áramforrást igényel	Han & Fang, 2019
Plazmakezelés	Korrózióálló, vékony, erős réteg	Speciális berendezés szükséges, költséges	Török és mtsai., 2015

Kerámiabevonatok	Kémiailag ellenálló, kopásálló	Sérülés esetén elveszíti hatékonyságát	Bejinariu és mtsai., 2022
Teflonbevonatok (PTFE, PFA)	Kémiailag inert, megakadályozza a fémkioldódást	Kopásra hajlamos, idővel cserére szorul	Mahieux, 2005

*13. táblázat: Különböző felületkezelési technikák előnyei és hátrányai a fémion-kioldódás minimalizálása érdekében*

A felületkezelési technikák összehasonlítása alapján az elektropolírozás kiemelkedő lehetőséget kínál a fémion-kioldódás csökkentésére, különösen az ipari fermentációk során. Ennek hatékonyságát saját kísérleteink alkalmával is teszteltük, amelyek során a bioreaktor B-t vizsgáltuk mind polírozás előtti, mind polírozott állapotában. Bár a  $Mn^{2+}$  kioldódási kinetikai profilok továbbra is jelentős fémion-felszabadulást mutattak mind az autoklávozás, mind az azt követő fermentáció során, az 5  $\mu\text{g/l}$ -es küszöbértéket csak 48 órával az inokuláció után érte el. Ennek eredményeként a citromsav moláris hozama körülbelül 10%-kal volt alacsonyabb, mint a bioreaktor A-ban elért érték.

Végül, az üres gőzös sterilizálás és az elektrokémiai polírozás együttes alkalmazásával a citromsav moláris hozama  $Y_{p/s} = 0,88 \pm 0,04$ -re növekedett, még a polírozott bioreaktor B-ben is.

## 7. Összefoglalás

Doktori munkám során részletesen vizsgáltuk az  $Mn^{2+}$  kioldódásának mértékét és hatását, valamint közvetlen összefüggést találtunk a Mn(II) ion koncentrációja és a fő citrát exporter fehérjét kódoló *cexA* gén kifejeződése között *A. niger* esetében.

Vizsgálataink igazoltuk, hogy az  $Mn^{2+}$  kioldódása jelentős mértékben függ a pH értékétől és az alkalmazott sterilizálási eljárástól. Megállapítottuk, hogy a kioldódás pH 2,0 alatt fokozódik, és pH 1,4-nél jelentősen felgyorsul. Kimutattuk, hogy az *A. niger* NRRL 2270 törzs nem járul hozzá az  $Mn^{2+}$  kioldódásához, mivel a jelenség hasonlóan jelentkezett steril foszfátpufferben is. A fehérjék, komplexképző szerek (például EDTA) és pufferanyagok (például foszfát) gyorsíthatják a fémek kioldódását rozsdamentes acélból (Allain & Wang, 2007). A foszfátkoncentráció növelése (10-ről 100 mM-ra) nem fokozta az  $Mn^{2+}$  kioldódását, jelezve, a foszfátok szerepe csekély a folyamatban.

A kutatásunk során elsőként alkalmaztuk az üres gőzös sterilizálást a fémionok eltávolítására citromsav fermentáció során. Az eljárás lehetővé tette a korai  $Mn^{2+}$ -szint emelkedésének szinte teljes megszüntetését, ezáltal minimalizálva annak negatív hatását a citromsavtermelésre. Ennek ellenére a leoltás után a fémionok kioldódásának aránya változatlan maradt, ami felveti a bioreaktorok anyagválasztásának optimalizálási szükségességét a korrózió és fémkioldódás csökkentése érdekében.

Eredményeink rávilágítottak arra, hogy az  $Mn^{2+}$  hiánya a fermentáció első 48 órájában kritikus a citromsav túltermelés szempontjából. A bioreaktor A-ban 168 óra elteltével az  $Mn^{2+}$  koncentráció meghaladta az 5  $\mu\text{g/l}$  értéket, és a fermentáció végére elérte a 30  $\mu\text{g/l}$ -t, de ez nem csökkentette a citromsavtermelést. Rázatotott lombikos kísérletek során 5, 30 és 100  $\mu\text{g/l}$   $Mn^{2+}$

hozzáadásával igazoltuk, hogy a fermentáció korai szakaszában a magasabb  $Mn^{2+}$  koncentrációk jelentősen csökkentették a citromsav hozamot és növelték a biomassza képződését, míg a későbbi szakaszokban hatásuk csökkent. Az  $Mn^{2+}$  hatása tehát időfüggő.

A *cexA* túltermelő törzs magasabb citromsav-hozamot eredményezett  $Mn^{2+}$  jelenlétében is. Míg a vad típusú törzs csak 1,5 g/l citromsavat termelt kezdeti 100  $\mu\text{g/l}$   $Mn^{2+}$  koncentráció mellett, és 107,2 g/l-t  $Mn^{2+}$  hiányában, addig a *cexA* túltermelő törzs 36,8 g/l citromsavat termelt  $Mn^{2+}$  terhelt körülmények között és 117,7 g/l-t  $Mn^{2+}$ -limitált környezetben (14. táblázat). Ezen túlmenően a *cexA* túltermelő törzs hatékonyabb glükózfelvételt mutatott, amely hozzájárult a magasabb citromsav hozam eléréséhez.

	<i>A. niger</i>					
	NRRL 2270		ATCC 1015		cE <i>cexA</i>	
	$Mn^{2+}$ limitált	100 $\mu\text{g/l}$ $Mn^{2+}$	$Mn^{2+}$ limitált	100 $\mu\text{g/l}$ $Mn^{2+}$	$Mn^{2+}$ limitált	100 $\mu\text{g/l}$ $Mn^{2+}$
<b>Moláris hozam</b>	<b>1,018</b>	<b>0,26</b>	<b>0,70</b>	<b>0,13</b>	<b>0,76</b>	<b>0,27</b>
<b>DCW (g/l)</b>	<b>29,58</b>	<b>47,1</b>	<b>23,48</b>	<b>39,14</b>	<b>25,22</b>	<b>37,66</b>

14. táblázat: Összefoglaló táblázat: kísérleteink során alkalmazott *A. niger* törzsek citromsav fermentációinak összehasonlítása

Az eredmények azt is sugallják, hogy ha egyszer az *A. niger* citromsav túltermelése megkezdődik a specifikus fermentációs körülmények hatására, akkor az folytatódik a bioreaktor változó környezeti feltételei ellenére is. A fermentáció előrehaladtával fokozatosan csökken az egyik legkritikusabb

paraméter, a D-glükóz magas kezdeti koncentrációja is, de ez sem befolyásolja a cukor/sav átalakulási sebességet. Ezért azt feltételezzük, hogy az  $Mn^{2+}$  hiányra adott válaszban részt vevő gének a fermentáció nagyon korai szakaszában fejeződnek ki.

Ezek az eredmények hozzájárulhatnak a citromsav fermentáció ipari optimalizálásához. A bioreaktorok tervezésekor új korrózióálló anyagok alkalmazása csökkentheti a fémionok kioldódását, míg a mutáns törzsek fejlesztése révén lehetőség nyílik stabilabb és hatékonyabb citromsavtermelő rendszerek kialakítására.

## 8. Summary

During my doctoral research, we conducted a more detailed investigation of  $Mn^{2+}$  leaching and its effects compared to previous studies. We identified a direct correlation between Mn(II) ion concentration and the expression of the *cexA* gene, which encodes the main citrate exporter protein in *A. niger*.

Our investigations confirmed that  $Mn^{2+}$  leaching is significantly influenced by the pH and the sterilization method used. We determined that the leaching process intensifies below pH 2.0 and accelerates significantly at pH 1.4. Our experiments demonstrated that the *A. niger* NRRL 2270 strain does not contribute to  $Mn^{2+}$  leaching, as the phenomenon was observed in a similar manner in cell-free phosphate buffer. It is known that proteins, chelating agents (such as EDTA), and buffering compounds (such as phosphate) can accelerate metal leaching from stainless steel (Allain & Wang, 2007). However, increasing the phosphate concentration from 10 mM to 100 mM did not enhance  $Mn^{2+}$  leaching, indicating that phosphates play a minimal role in this process.

We were the first to apply empty steam sterilization to remove metal ions prior to citric acid fermentation. This approach effectively prevented the early increase in  $Mn^{2+}$  levels, thereby minimizing its negative impact on citric acid production. However, after inoculation, the rate of metal ion leaching remained unchanged, raising the need for optimization of bioreactor material selection to reduce corrosion and metal leaching.

Our results highlighted that the presence of  $Mn^{2+}$  during the first 48 hours of fermentation is critical for citric acid overproduction. In bioreactor A (A significant difference is that while bioreactor A was newly acquired just before the experiments, bioreactor B has been in continuous use for approximately 10 years), after 168 hours, the  $Mn^{2+}$  concentration exceeded 5  $\mu\text{g/L}$  and reached

30  $\mu\text{g/L}$  by the end of fermentation, but this phenomenon did not reduce citric acid production. In shake flask experiments, the addition of 5, 30, and 100  $\mu\text{g/L}$   $\text{Mn}^{2+}$  demonstrated that higher  $\text{Mn}^{2+}$  concentrations in the early fermentation phase significantly reduced citric acid yield and increased biomass formation, while in later stages, its impact diminished. These findings confirmed that the effect of  $\text{Mn}^{2+}$  is time-dependent.

Another achievement of our research was the application of the *cexA* overexpressing strain, which exhibited higher citric acid production even in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$ . While the wild-type strain produced only 1.5 g/L citric acid at an initial  $\text{Mn}^{2+}$  concentration of 100  $\mu\text{g/L}$  and 107.2 g/L under  $\text{Mn}^{2+}$  limited conditions, the *cexA* overexpressing strain produced 36.8 g/L citric acid under  $\text{Mn}^{2+}$  sufficient conditions and 117.7 g/L in  $\text{Mn}^{2+}$  limited medium (Table 15.). Additionally, the *cexA* overexpressing strain showed more efficient glucose uptake, which contributed to achieving higher citric acid yields.

	<i>A. niger</i>					
	NRRL 2270		ATCC 1015		cE <i>cexA</i>	
	$\text{Mn}^{2+}$ limited	100 $\mu\text{g/L}$ $\text{Mn}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$ limited	100 $\mu\text{g/L}$ $\text{Mn}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$ limited	100 $\mu\text{g/L}$ $\text{Mn}^{2+}$
<b>Molar yield</b>	<b>1.018</b>	<b>0.26</b>	<b>0.70</b>	<b>0.13</b>	<b>0.76</b>	<b>0.27</b>
<b>DCW (g/L)</b>	<b>29.58</b>	<b>47.1</b>	<b>23.48</b>	<b>39.14</b>	<b>25.22</b>	<b>37.66</b>

15. Table: Summary Table: Comparison of Citric Acid Fermentations Using *A. niger* Strains in Our Experiments

The results also suggest that once citric acid overproduction kicks in under the specific fermentation conditions, the process in the bioreactor will continue despite of the changing environmental conditions. As the fermentation progresses, the initially high concentration of one of the most critical components, D-glucose, gradually decreases, yet this does not affect the sugar-to-acid conversion rate. Therefore, we hypothesize that the genes involved in the response to  $Mn^{2+}$  deficiency are expressed at a very early stage of fermentation, after which citric acid overproduction becomes less sensitive to environmental fluctuations.

These findings could contribute to the industrial optimization of citric acid fermentation. The application of new corrosion-resistant materials in bioreactor design could reduce metal ion leaching, while the development of mutant strains offers the potential to create more stable and efficient citric acid production systems.

## 9. Irodalomjegyzék

- Abbas, N., Safdar, W., Ali, S., Choudhry, S., & Elahi, S. (2016). Citric acid production from *Aspergillus niger* using mango (*Mangifera indica* L.) and sweet orange (*Citrus sinensis*) peels as substrate. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 7(2), 868-872.
- Allain, L., & Wang, Q. (2007). Impact of package leachables on the stability of pharmaceutical products. *American Pharmaceutical Review*, 10(4), 38-40.
- Alnassar, M., Tayfour, A., & Afif, R. (2016). The study of lactose effect on citric acid production by *Aspergillus niger* PLA30 in cheese whey. *International Journal of ChemTech Research*, 9(1), 318-322.
- Amato, A., Becci, A., & Beolchini, F. (2020). Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Critical Reviews in Biotechnology*, 199-212.
- André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M. et al. (2009). Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 468-478.
- Angumeenal, A. R., & Venkappayya, D. (2013). An overview of citric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, 367-370.
- Archibald, F. S., & Tyree, C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 638-650.
- Atapour, M., Wang, X., Färnlund, K., Wallinder, I. O., & Hedberg, Y. (2020). Corrosion and metal release investigations of selective laser melted 316L stainless steel in a synthetic physiological fluid containing proteins and in diluted hydrochloric acid. *Electrochimica Acta*, 136748.
- Avila Neto, P. M., Silva, G. D., Lima, C. J. B., Paula, F. D., & Contiero, J. (2014). Evaluation and optimization of growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 using glycerol as

- carbon source as an alternative to use biodiesel byproduct. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 25-31.
- Balistrieri, L. S., & Murray, J. W. (1986). The surface chemistry of sediments from the Panama Basin: The influence of Mn oxides on metal adsorption. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2235-2243.
- Bastug, S. A., Gokturk, S., & Sismanoglu, T. (2007). 1:1 Binary Complexes of Citric Acid with Some Metal Ions: Stability and Thermodynamic Parameters. *Reviews in Inorganic Chemistry*, 53-65.
- Behera, B. C., Mishra, R., & Mohapatra, S. (2021). Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Frontiers*, 2(1), 62-76.
- Bejinariu, C., Paleu, V., Stamate, C. V., Cimpoesu, R., Coteață, M., Bădărău, G. et al. (2022). Microstructural, Corrosion Resistance, and Tribological Properties of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Coatings Prepared by Atmospheric Plasma Spraying. *Materials*, 15(24), 9013.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2019). *Biochemistry*. New York: W.H. : Freeman/McMillan Learning.
- Berovič, M., Koloini, T., Olsvik, E. S., & Kristiansen, B. (1993). Rheological and morphological properties of submerged citric acid fermentation broth in stirred-tank and bubble column reactors. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, B35-B40.
- Bian, C., Kusuya, Y., Sklenář, F., D'hooge, E., Yaguchi, T., Ban, S. et al. (2022). Reducing the number of accepted species in *Aspergillus* series *Nigri*. *Studies in Mycology*, 102(1), 95-132.
- Bresciani, G., da Cruz, I. B., & González-Gallego, J. (2015). Chapter Four - Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation. *Advances in Clinical Chemistry*, 87-130.
- Brown, C. S. (2007). *Big history: from the Big Bang to the present*. United States of America: The New Press.

- Cairns, T. C., Barthel, L., & Meyer, V. (2021). Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. *Essays Biochemistry*, 213-224.
- Cairns, T. C., Nai, C., & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1-14.
- Campos, C., Cardoso, H., Nogales, A., Svensson, J., Lopez-Raez, J. A., Pozo, M. J. et al. (2015). Intra and Inter-Spore Variability in *Rhizophagus irregularis* AOX Gene. *PLoS One*, 10(11), e0142339.
- Cao, W., Yan, L., Li, M., Liu, X., Xu, Y., Xie, Z., & Liu, H. (2020). Identification and engineering a C4-dicarboxylate transporter for improvement of malic acid production in *Aspergillus niger*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 9773-9783.
- Cao, W., Zhang, L., Wu, L., Zhang, M., Liu, J., Xie, Z., & Liu, H. (2022). Identification and genetic characterization of mitochondrial citrate transporters in *Aspergillus niger*. *Frontiers in Microbiology*, (13) 1009491.
- Carlson, R. W., Garnero, E., Harrison, T. M., Li, J., Manga, M., McDonough, W. F. et al. (2014). How Did Early Earth Become Our Modern World? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 151-178.
- Clark, D. S., Ito, K., & Horitsu, H. (1966). Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. *Biotechnology and Bioengineering*, 465-471.
- Cooper, W. C. (1984). The health implications of increased manganese in the environment resulting from the combustion of fuel additives: a review of the literature. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A Current Issues, 14(1), 23-46.
- Cortese, M., Schütze, T., Marx, R., Moeller, R., & Meyer, V. (2020). Fungal Biotechnology in Space: Why and How? In *Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, 501-535.

- Culotta , V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 747-758.
- Currie, J. N. (1917). The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, 15-37.
- Darouneh, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Seifkordi, A., & Rajabi, R. (2009). Citric acid production: Surface culture versus submerged culture. *African Journal of Microbiology Research*, 541-545.
- Das, A. P., Sukla, L. B., Paradhan, N., & Nayak, S. (2011). Manganese biomining: A review. *Bioresource Technology*, 7381-7387.
- Dashen, M. M., Ado, S. A., Ameh, J., Amapu, T., & Zakari, H. (2014). Screening and Improvement of Local Isolates of *Aspergillus niger* for Citric Acid Production. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 105-111.
- Dawson, M. W., Maddox, I. S., & Brooks, J. D. (1986). Effect of interruptions to the air supply on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(1), 37-40.
- de Souza Vandenberghe, L. P., & José, W. (2024). Scale-Up Technology. *Bioreactor Technology in Food Processing*, 123.
- de Vrind, J. P., Boogerd, F. C., & de Vrind-de Jong, E. W. (1986). Manganese reduction by a marine *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 30-34.
- de Vrind, J. P., de Vrind-de Jong, E. W., de Voogt, J.-W. H., Westbroek, P., Boogerd, F. C., & Rosson, R. A. (1986). Manganese Oxidation by Spores and Spore Coats of a Marine *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1096-1100.
- El-Holi, M. A., & Al-Delaimy, S. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, 2(10), 356-359.

- Elissawy, A. M., Ebada, S. S., Ashour, M. L., El-Neketi, M., Ebrahim, W., & Singab, A. B. (2019). New secondary metabolites from the mangrove-derived fungus *Aspergillus* sp. AV-2. *Phytochemistry Letters*, 29, 1-5.
- El-Manis, M., Nielsen, J., Mousdale, D. M., Allman, T., & Carlson, R. (2018). *Fermentation microbiology and biotechnology*. CRC Press.
- Erikson, K. M., & Aschner, M. (2003). Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International*, 475-480.
- Eschenmoser, A. (2007). The search for the chemistry of life's origin. *Tetrahedron*, 12821-12844.
- Euro Inox. (2009). Rozsdamentes acélok elektropolírozása. *Anyagok és alkalmazások sorozat, 11. kötet*. Euro Inox.
- Fang, W., Lin, X., Wang, J., Liu, Y., Tao, H., & Zhou, X. (2016). Asperpyrone-type bis-naphtho- $\gamma$ -pyrones with COX-2-inhibitory activities from marine-derived fungus *Aspergillus niger*. *Molecules*, 21(7), 941.
- Farkas, B., Bujdoš, M., Polák, F., Matulová, M., Cesnek, M., Duborská et al. (2021). Bioleaching of Manganese Oxides at Different Oxidation States by Filamentous Fungus *Aspergillus niger*. *Bioleaching of manganese Journal of Fungi*, 7(10), 808.
- Fejes, B., Ouedraogo, J.-P., Fekete, E., Sándor, E., Flippi, M., Soós, Á. et al. (2020). The effects of external Mn<sup>2+</sup> concentration on hyphal morphology and citric acid production are mediated primarily by the NRAMP-family transporter DmtA in *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories*, 1-11.
- Fekete, E., Bíró, V., Márton, A., Bakondi-Kovács, I., Németh, Z., Sándor, E. et al. (2022). Bioreactor as the root cause of the “manganese effect” during *Aspergillus niger* citric acid fermentations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (10) 935902.
- Fekete, E., Bíró, V., Márton, A., Bakondi-Kovács, I., Sándor, E., Kovács, B. et al. (2024). Transcriptomics identify the triggering of citrate export as the key event caused by manganese deficiency in *Aspergillus niger*. *Microbiology Spectrum*, 0:e01906-24.

- Ferreira, P., Lopes, M., Mota, M., & Belo, I. (2016). Oxygen transfer rate and pH as major operating parameters of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* W29 and CBS 2073. *Chemical Papers*, 70(7), 869-876.
- Fischer, W. W., Hemp, J., & Johnson, J. E. (2015). Manganese and the Evolution of Photosynthesis. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 351-357.
- Flipphi, M., Márton, A., Bíró, V., Ág, N., Sándor, E., Fekete, E., & Karaffa, L. (2023). Mutations in the Second Alternative Oxidase Gene: A New Approach to Group *Aspergillus niger* Strains. *Journal of Fungi*, 9(5), 570.
- Gupta, J. K., Heding, L. G., & Jorgensen, O. B. (1976). Effect of sugars, hydrogen ion concentration and ammonium nitrate on the formation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 63-37.
- Hahn, J., & Haug, P. (1986). Traces of archaebacteria in ancient sediments. *Systematic and Applied Microbiology*, 178-183.
- Han, W., & Fang, F. (2019). Fundamental aspects and recent developments in electropolishing. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, 139, 1-23.
- Hang, Y. D., & Woodams, E. E. (2000). Corn husks: a potential substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger*. *LWT-Food Science and Technology*, 33(7), 520-521.
- Health, N. R. (1989). *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., & Hedges, S. B. (2001). Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science*, 1129-1133.
- Hiort, J., Maksimenka, K., Reichert, M., Perović-Ottstadt, S., Lin, W. H., Wray, V. et al. (2004). New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, 67(9), 1532-1543.

- Honecker, S., Bisping, B., Yang, Z., & Rehm, H. J. (1989). Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 17-24.
- Hossain, M., Brooks, J. D., & Maddox, I. S. (1984). The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 393-397.
- Hou, L., Liu, L., Zhang, H., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, J. et al. (2018). Functional analysis of the mitochondrial alternative oxidase gene (aox1) from *Aspergillus niger* CGMCC 10142 and its effects on citric acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 7981-7995.
- Hurley, L. S., & Keen, C. L. (1987). Manganese. In *Trace Elements in Human and Animal Nutrition* (old.: 185-223). New York: Vol. I. Academic Press.
- Hustede, H., & Rudy, H. (1976). U.S. Patent No. 3,941,656. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- IOM, I. (2001). *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington DC (US): National Academies Press (US).
- Iqbal, J., & Utara, U. (2015). Isolation of *Aspergillus niger* strains from soil and their screening and optimization for enhanced citric acid production using cane molasses as carbon source. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 5(4), 128-137.
- Iwuh, D. (2023). Life On Earth as a Product of Biological Interaction? An Inquiry. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences.*, 4(10): 1532-1539.
- Jemison, M., & Olabisi, R. (2021). Biomaterials for human space exploration: A review of their untapped potential. *Acta Biomaterialia*, 77-99.

- Kamzolova, S. V., Lunina, J. N., & Morgunov, I. G. (2011). Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1965-1976.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 189-196.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2019). Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2889-2902.
- Karaffa, L., Fekete, E., & Kubicek, C. P. (2021). The Role of Metal Ions in Fungal Organic Acid Accumulation. *Microorganisms*, 1267.
- Karaffa, L., Sándor, E., Fekete, E., & Szentirmai, A. (2001). The biochemistry of citric acid of accumulation by *Aspergillus niger* (A review). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 429-440.
- Kaur, T., Singh, B., Kaur, A., & Kaur, S. (2015). Endophyte-mediated interactions between cauliflower, the herbivore *Spodoptera litura*, and the ectoparasitoid *Bracon hebetor*. *Oecologia*, 179, 487-494.
- Kazantzis, G. (1981). Role of cobalt, iron, lead, manganese, mercury, platinum, selenium, and titanium in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 143-161.
- Khattab, A. A., Salem, A. A., & Soheam, A. E. (2017). Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* isolated from different habitats. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 8(6), 614-623.
- Kisser, M., Kubicek, C. P., & Röhr, M. (1980). Influence of manganese on morphology and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation. *Archives of Microbiology*, 26-33.
- Kobayashi, K., Hattori, T., Honda, Y., & Kirimura, K. (2013). Gene Identification and Functional Analysis of Methylcitrate Synthase in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger* WU-2223L. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1492-1498.

- Koch, S. M., Freidank-Pohl, C., Siontas, O., Cortesao, M., Mota, A., Runzheimer, K. et al. (2023). *Aspergillus niger* as a cell factory for the production of pyomelanin, a molecule with UV-C radiation shielding activity. *Frontiers in Microbiology*, 1233740.
- Kövilein, A., Kubisch, C., Cai, L., & Ochsenreither, K. (2019). Malic acid production from renewables: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 513-526.
- Kristiansen, B., & Sinclair, C. G. (1979). Production of citric acid in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 297-315.
- Książek, E. (2024). Citric Acid: Properties, Microbial Production, and Applications in Industries. *Molecules*, 29(1), 22.
- Kubicek, C. P., & Röhr, M. (1977). Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 167-175.
- Kubicek, C. P., Röhr, M., & Rehm, H. J. (1985). Citric acid fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 331-373.
- Kubicek, C. P., Zehentgruber, O., El-Kalak, H., & Röhr, M. (1980). Regulation of citric acid production by oxygen: Effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 101-115.
- Langer, E. S., & Rader, R. A. (2018). Biopharmaceutical manufacturing is shifting to single-use systems. Are the dinosaurs, the large stainless steel facilities, becoming extinct. *American Pharmaceutical Review*, 21(6), 114-19.
- Li, D.-H., Han, T., Guan, L.-P., Bai, J., Zhao, N., Li, Z.-L. et al. (2016). New naphthopyrones from marine-derived fungus *Aspergillus niger* 2HL-M-8 and their in vitro antiproliferative activity. *Natural Product Research*, 1116-1122.
- Lineback, D. R., Russell, I. J., & Rasmussen, C. (1969). Two forms of the glucoamylase of *Aspergillus niger*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539-553.

- Lingappa, K., Naik, C., Babu, C. V., Ramakrishna, D., & Reddy, M. V. (2002). Coconut cake: a novel substrate for citric acid production under solid state fermentation. *Indian Journal of Microbiology*, 347-350.
- Liu, D., Li, X. M., Li, C. S., & Wang, B. G. (2013). Nigerasterols A and B, antiproliferative sterols from the mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. *Helvetica Chimica Acta*, 96(6), 1055-1061.
- Liu, Y., Nan, L., Liu, J., Yan, H., Zhang, D., & Han, X. (2016). Isolation and identification of resveratrol-producing endophytes from wine grape Cabernet Sauvignon. *Springerplus*, 5, 1-13.
- Lou, J. (2001). Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD). *B-180 Medical Laboratories Free Radical and Radiation Biology Program*, 1-10.
- Mahdinia, E., Cekmecelioglu, D., & Demirci, A. (2019). Bioreactor scale-up. Essentials in fermentation technology. In A. Berenjian, *Essentials in fermentation Technology*, Basel: Springer, 213-136
- Mahieux, C. A. (2005). Experimental characterization of the influence of coating materials on the hydrodynamic behavior of thrust bearings: a comparison of Babbitt, PTFE, and PFA. *Journal of Tribology*, 127(3), 568-574.
- Martins, S. I., Jongen, W. M., & van Boekel, M. A. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 364-373.
- Mattey, M. (1992). The Production of Organic Acids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 87-132.
- Max, B., Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 862-875.
- McIntyre, M., & McNeil, B. (1997). Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60. *Enzyme and Microbial Technology*, 135-142.

- McLeod, B. E., & Robinson, M. F. (1972). Dietary intake of manganese by New Zealand infants during the first six months of life. *The British Journal of Nutrition*, 229-232.
- Moeller, L., Strehlitz, B., Aurich, A., Zehnsdorf, A., & Bley, T. (2007). Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 504-511.
- Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., & Lunina, J. N. (2013). The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7387-7397.
- Moyer, A. J. (1953). Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture: I. Nature of the alcohol effect. *Applied Microbiology*, 1, 1-7.
- Nijjer, S., Thonstad, J., & Haarberg, G. M. (2000). Oxidation of manganese(II) and reduction of manganese dioxide in sulphuric acid. *Electrochimica Acta*, 395-399.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 189-259.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 244-263.
- 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, 1-12.
- Papagianni, M., Mattey, M., & Kristiansen, B. (1999). Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch culture of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production. *Process Biochemistry*, 359-366.
- Papagianni, M., Mattey, M., & Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of

- Aspergillus niger* in batch and fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 710-717.
- Papagianni, M., Matthey, M., Berovic, M., & Kristiansen, B. (1999). *Aspergillus niger* morphology and citric acid production in submerged batch fermentation: effects of culture pH, phosphate and manganese levels. *Food Technology and Biotechnology*, 165-171.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., & Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 737-744.
- Pazur, J. H., Knull, H. R., & Cepure, A. (1971). Glycoenzymes: Structure and properties of the two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, 83-96.
- Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, 1138-1150.
- Prescott, S. C., & Dunn, C. G. (1959). The citric acid fermentation in industrial microbiology. 3rd ed. New York (NY): McGraw Hill Book Company, 533-577.
- Prohaska, J. R. (1987). Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiological reviews*, 858-901.
- Rader, R. A., & Langer, E. S. (2014). Biopharmaceutical Manufacturing: Historical and Future Trends in Titrers, Yields, and Efficiency in Commercial-Scale Bioprocessing. *BioProcessing Journal*, 13(4).
- Reinfurt, A., Fritsche, S., Bíró, V., Márton, A., Ellena, V., Fekete, E. et al. (2023). Manganese(II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (11) 1292337.
- Remick, K. A., & Helmann, J. D. (2023). Chapter One - The elements of life: A biocentric tour of the periodic table. *Advances in Microbial Physiology*, 82: 1-127.

- Richter, L., Wanka, F., Boecker, S., Storm, D., Kurt, T., Vural, Ö. et al. (2014). Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1-13.
- Rogov, A. G., Sukhanova, E. I., Uralskaya, L. A., Aliverdieva, D. A., & Zvyagilskaya, R. A. (2015). Alternative oxidase: Distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry (Moscow)*, 1615-1634.
- Roukas, T. (1991). Production of Citric Acid from Beet Molasses by Immobilized Cells of *Aspergillus niger*. *Journal of food science*, 56(3), 878-880.
- Ruijter, G. G., Panneman, H., & Visser, J. (1997). Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 317-326.
- Ruijter, G. J., van de Vondervoort, P. J., & Visser, J. (1999). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology*, 2569-2576.
- Sawant, O., Mahale, S., Ramchandran, V., Nagaraj, G., & Bankar, A. (2018). Fungal citric acid production using waste materials: a mini-review. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(2), 821.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., & van Dijck, P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 426-435.
- Selosse, M., & Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution*, 15-20.
- Shackelford, J. F., & Alexander, W. (2001). *The CRC materials science and engineering handbook*. Boca Raton: CRC Press.
- Show, P., Oladele, K., Siew, Q., Zakry, F., Lan, J.-W., & Ling, T. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*, 271-283.

- Shu, P., & Johnson, M. J. (1948). The Interdependence of Medium Constituents in Citric Acid Production by Submerged Fermentation. *Journal of Bacteriology*, 577-585.
- Shreelalitha, S. J., & Sridhar, K. R. (2015). Endophytic fungi of wild legume *Sesbania bispinosa* in coastal sand dunes and mangroves of the Southwest coast of India. *Journal of Forestry Research*, 26, 1003-1011.
- Sicard, D., & Legras, J.-L. (2011). Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus. Biologies*, 229-236.
- Singh, S. M., Yadav, L. S., Singh, S. K., Singh, P., Singh, P. N., & Ravindra, R. (2011). Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus niger* strains. *Polar Research*, 30(1), 7283.
- Smith, A. D., Logeman, B. L., & Thiele, D. J. (2017). Copper Acquisition and Utilization in Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 597-623.
- Soltani, J., & Moghaddam, M. S. H. (2014). Diverse and bioactive endophytic *Aspergilli* inhabit Cupressaceae plant family. *Archives of Microbiology*, 196, 635-644.
- Socco, C. R., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology*, 141-149.
- SPACE. (2024. 08 24). Forrás: <https://www.space.com/fungus-in-space-long-duration-astronaut-missions>
- Stastny, D., Vogel, R. S., & Picciano, M. F. (1984). Manganese intake and serum manganese concentration of human milk-fed and formula-fed infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 872-878.
- Steiger, M. G., Rassinger, A., Mattanovich, D., & Sauer, M. (2019). Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. *Metabolic Engineering*, 224-231.
- Stobbe, E. R., de Boer, B. A., & Geus, J. W. (1999). The reduction and oxidation behaviour of manganese oxides. *Catalysis Today*, 161-167.

- Strachan, S. (2010). Trace elements. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 44-48.
- Swaine, D. J. (2000). Why trace elements are important. *Fuel Processing Technology*, 21-33.
- Takano, D., Nagamitsu, T., Ui, H., Shiomi, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R. et al. (2001). Absolute configuration of nafuredin, a new specific NADH-fumarate reductase inhibitor. *Tetrahedron Letters*, 42(16), 3017-3020.
- Taylor, T., Hass, H., Remy, W., & Kerp, H. (1995). The oldest fossil lichen. *Nature*, 244.
- Tebo, B. M., Bargar, J. R., Clement, B. G., Dick, G. J., Murray, K. J., Parker, D. et al. (2004). Biogenic Manganese Oxides: Properties and Mechanisms of Formation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 287-328.
- Toghueo, R. M., Sahal, D., Zabalgoceazcoa, Í., Baker, B., & Boyom, F. F. (2018). Conditioned media and organic elicitors underpin the production of potent antiplasmodial metabolites by endophytic fungi from Cameroonian medicinal plants. *Parasitology Research*, 2473-2485.
- Torres, N. V. (1994). Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*: II. Sensitivity analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 112-118.
- Török, T., Urbán, P., & Lassú, G. (2015). Surface cleaning and corrosion protection using plasma technology. *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 4(2), 116-124.
- Uchoa, P. S., Pimenta, A. T., Braz-Filho, R., Maria da Conceição F de Oliveira, Saraiva, N. N., Rodrigues, B. S. et al. (2017). New cytotoxic furan from the marine sediment-derived fungi *Aspergillus niger*. *Natural Product Research*, 2599-2603.
- Umo, H. E. (1997). The economic importance of microorganism in food processing. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 1-6.

- van der Straat, L., Vernooij, M., Lammers, M., van den Berg, W., Schonewille, T., Cordewener, J. et al. (2014). Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories*, 1-9.
- Vandenbergh, L. P., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J. M. (1999). Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 263-276.
- Waksman, S. A., & Otto, K. E. (1946). U.S. Patent No. 2,394,031. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Wang, L. X., Ren, L. L., Liu, X. B., Shi, J., Wang, J. Z., & Luo, Y. Q. (2019). Effects of endophytic fungi in Mongolian pine on the selection behavior of woodwasp (*Sirex noctilio*) and the growth of its fungal symbiont. *Pest Management Science*, 75(2), 492-505.
- Williamson, J., Miller, J., McLaughlin, J., Combs, R., & Chu, C. (2018). Scale-dependent manganese leaching from stainless steel impacts terminal galactosylation in monoclonal antibodies. *Biotechnology Progress*, 34(5), 1290-1297.
- Xie, H., Zhuang, X., Bai, Z., Qi, H., & Zhang, H. (2006). Isolation of levoglucosan-assimilating microorganisms from soil and an investigation of their levoglucosan kinases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 887-892.
- Xu, D.-B., Madrid, C. P., Röhr, M., & Kubicek, C. P. (1989). The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 553-558.
- Xu, Y., Shan, L., Zhou, Y., Xie, Z., Ball, A. S., Cao, W., & Liu, H. (2019). Development of a Cre-loxP-based genetic system in *Aspergillus niger* ATCC1015 and its application to construction of efficient organic acid-producing cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 8105-8114.
- Xu, Y., Zhou, Y., Cao, W., & Liu, H. (2020). Improved Production of Malic Acid in *Aspergillus niger* by Abolishing Citric Acid Accumulation and Enhancing Glycolytic Flux. *ACS Synthetic Biology*, 1418-1425.

- Xue, X., Bi, F., Liu, B., Li, J., Zhang, L., Zhang, J. et al. (2021). Improving citric acid production of an industrial *Aspergillus niger* CGMCC 10142: identification and overexpression of a high-affinity glucose transporter with different promoters. *Microbial Cell Factories*, 1-13.
- Yu, R., Liu, J., Wang, Y., Wang, H., & Zhang, H. (2021). *Aspergillus niger* as a secondary metabolite factory. *Frontiers in Chemistry*, 9, 701022.
- Zhang, N., Jiang, J. C., Yang, J., Wei, M., Zhao, J., Xu, H. et al. (2019). Citric acid production from acorn starch by tannin tolerance mutant *Aspergillus niger* AA120. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188, 1-11.
- Zhou, S., Schöneich, C., and Singh, S. K. (2011). Biologics formulation factors affecting metal leachables from stainless steel. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12 (1), 411–421.
- Zou, S.-P., Zhong, W., Xia, C.-J., Gu, Y.-N., Niu, K., Zheng, Y.-G., & Shen, Y.-C. (2015). Mutagenesis breeding of high echinocandin B producing strain and further titer improvement with culture medium optimization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1845-1854.

## 10. Függelék

### 10.1 *A. niger* NRRL 2270 Mn<sup>2+</sup> limitált citromsav fermentáció 5 literes fermentorban

Fermentációs idő (h)	D-glükóz (g/l)	Citromsav (g/l)	DCW (g/l)	Mn <sup>2+</sup> (µg/l)
0	145,28 ± 1,2	0	0,32 ± 0,01	1,223 ± 0,04
24	145,03 ± 1,9	0	1,39 ± 0,3	1,705 ± 0,73
48	143,28 ± 1,3	1,82 ± 1,5	2,9 ± 1,8	2,052 ± 1,6
72	132,05 ± 0,8	8,7 ± 1,9	4,2 ± 2,0	2,445 ± 2,3
0,96	123,35 ± 1,3	17,46 ± 1,4	5,56 ± 1,9	2,806 ± 0,7
120	110,3 ± 1,3	31,64 ± 1,6	6,64 ± 2,2	3,688 ± 2,1
144	96,69 ± 1,7	47,13 ± 2,1	7,26 ± 2,4	3,813 ± 1,9
168	81,65 ± 1,9	59,9 ± 1,8	11,22 ± 2,5	4,511 ± 2,2
192	67,75 ± 2,1	70,84 ± 1,7	11,6 ± 0,9	5,06 ± 2,0
216	57,1 ± 1,8	79,86 ± 2,5	12,12 ± 1,9	5,509 ± 1,3
240	49,3 ± 2,2	88,21 ± 2,4	15,66 ± 1,8	5,87 ± 1,6
269	40,7 ± 1,8	98,38 ± 2,0	16,66 ± 2,0	7,91 ± 1,5
288	34,63 ± 1,6	104,09 ± 1,8	18,46 ± 1,7	8,97 ± 0,9
312	30,14 ± 0,8	111,43 ± 1,3	18,86 ± 1,5	17,27 ± 0,6
336	22,88 ± 0,4	117,68 ± 0,7	20,74 ± 1,1	20,65 ± 1,3
360	17,6 ± 0,2	131,2 ± 1,5	21,54 ± 0,6	23,81 ± 0,4
380	13,8 ± 0,7	142,75 ± 0,1	22,96 ± 0,2	27,44 ± 2,3

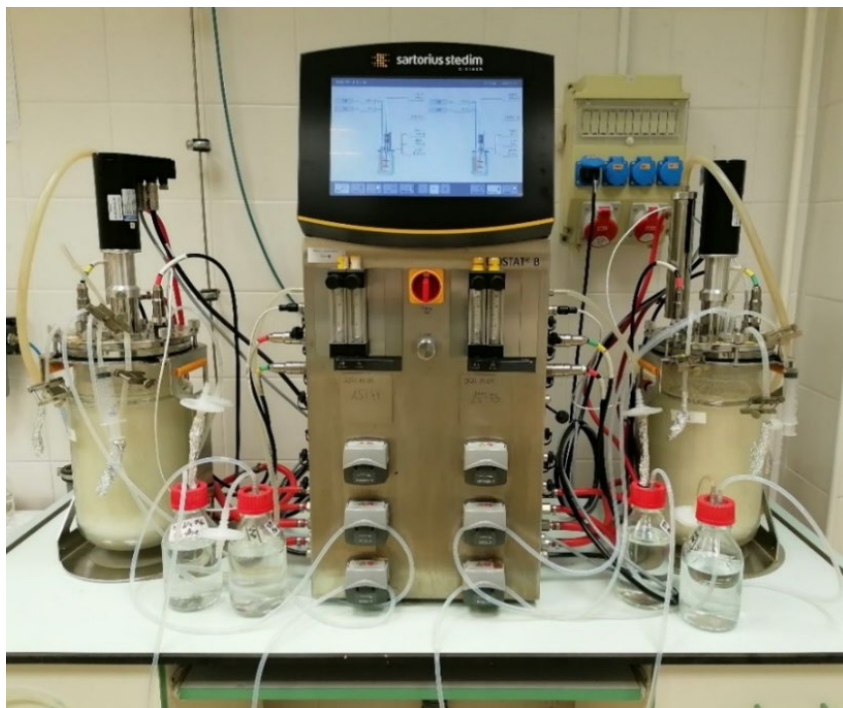
16. táblázat: Az *A. niger* NRRL 2270 mangán limitált fermentációjának mérési eredményei (HPLC, DCW, ICP-MS)

10.2  $Mn^{2+}$  hatása az *A. niger* NRRL 2270 citromsav fermentációjára 5 literes fermentorban

Fermentációs idő (h)	D-glükóz (g/l)	CA (g/l)	DCW (g/l)	$Mn^{2+}$ ( $\mu$ g/l)
0	145,58 $\pm$ 0,9	0	0,52 $\pm$ 0,37	31,45 $\pm$ 0,3
24	140,60 $\pm$ 0,6	0	1,70 $\pm$ 0,3	29,31 $\pm$ 0,5
48	128,66 $\pm$ 1,2	0	6,00 $\pm$ 0,9	30,99 $\pm$ 0,4
72	120,83 $\pm$ 1,6	0,65 $\pm$ 0,8	9,12 $\pm$ 1,3	31,70 $\pm$ 1,1
96	106,79 $\pm$ 1,8	5,19 $\pm$ 1,2	10,62 $\pm$ 1,7	33,00 $\pm$ 1,6
120	96,15 $\pm$ 2,1	12,98 $\pm$ 1,6	10,90 $\pm$ 1,4	34,73 $\pm$ 1,9
144	78,91 $\pm$ 1,7	20,95 $\pm$ 1,9	12,68 $\pm$ 1,9	37,42 $\pm$ 1,5
168	63,76 $\pm$ 2,7	29,91 $\pm$ 2,0	15,02 $\pm$ 2,5	39,10 $\pm$ 2,0
186	52,94 $\pm$ 1,9	35,95 $\pm$ 2,2	18,32 $\pm$ 2,6	39,47 $\pm$ 2,4
240	23,83 $\pm$ 1,4	51,39 $\pm$ 1,7	21,12 $\pm$ 1,9	42,25 $\pm$ 1,8
264	15,89 $\pm$ 0,7	53,86 $\pm$ 0,9	25,62 $\pm$ 1,6	55,41 $\pm$ 1,4
288	7,090 $\pm$ 0,3	59,79 $\pm$ 0,5	29,64 $\pm$ 1,8	64,29 $\pm$ 0,9

17. táblázat: Az *A. niger* NRRL 2270 mangán terhelt fermentációjának mérési eredményei (HPLC, DCW, ICP-MS)

### 10.3 Bioreaktor A és B



20. ábra: Sartorius Biostat BTwin 51-es fermentor (bioreaktor A)



*21. ábra: Zentai 12 l-es laboratóriumi fermentor (bioreaktor B)*

10.4 *A. niger* ATCC 1015 és cE *cexA* túltermelő törzs Mn<sup>2+</sup> terhelt fermentációjának analízise

10.4.1 ATCC 1015 Mn<sup>2+</sup> terhelt fermentációja

Ferm. idő (óra)	Citromsav (g/l)	D-glükóz (g/l)	DCW (g/l)
0	0	147,74 ± 3,4	1,02 ± 0,2
24	0	143,66 ± 3,6	1,52 ± 0,1
48	0	131,58 ± 2,9	6,92 ± 0,5
72	0	124,97 ± 1,3	9,14 ± 0,9
96	0,355 ± 0,32	118,07 ± 1,9	11,46 ± 1,2
120	0,557 ± 1,5	107,57 ± 2,1	13,4 ± 1,4
144	0,806 ± 1,9	102,79 ± 2,5	15,46 ± 1,2
168	1,015 ± 2,0	84,85 ± 2,4	17,16 ± 0,9
192	1,27 ± 2,3	80,88 ± 1,9	19,26 ± 1,1
216	1,36 ± 1,8	72,64 ± 1,8	20,06 ± 1,3
240	1,27 ± 2,1	64,48 ± 1,4	25,12 ± 0,8
264	1,52 ± 1,6	53,82 ± 1,2	27,36 ± 0,5
288	1,53 ± 0,32	45,81 ± 0,7	34,84 ± 0,7
312	1,51 ± 0,4	38,49 ± 0,4	39,14 ± 1,4

18. táblázat: *A. niger* ATCC 1015 törzs fermentációjának nyomonkövetése

10.4.2 cE *cexA* túltermelő törzs Mn<sup>2+</sup> terhelt fermentációja

Ferm. idő (óra)	Citromsav (g/l)	D-glükóz (g/l)	DCW (g/l)
0	0	144,24 ± 0,3	0,8 ± 0,05
24	0,274 ± 0,05	138,44 ± 0,6	1,84 ± 0,4
48	2,279 ± 0,5	123,39 ± 0,9	8,3 ± 0,8
72	4,66 ± 1,1	112,8 ± 1,2	10,46 ± 0,9
96	8,00 ± 1,4	102,15 ± 1,6	13,06 ± 1,3
120	10,629 ± 1,7	91,31 ± 1,3	15,66 ± 1,4
144	14,407 ± 2,0	81,05 ± 1,7	19,54 ± 1,9
168	17,01 ± 2,1	66,62 ± 2,2	21,58 ± 1,8
192	20,89 ± 1,8	56,96 ± 2,4	25,42 ± 2,3
216	24,4 ± 1,6	46,5 ± 1,9	24,12 ± 2,1
240	27,34 ± 1,9	37,63 ± 1,4	29,02 ± 1,7
264	28,87 ± 1,3	25,21 ± 1,6	33,66 ± 1,3
288	34,86 ± 0,7	16,69 ± 0,9	37,84 ± 1,5
312	36,83 ± 0,6	10,39 ± 0,4	37,66 ± 1,2

19. táblázat: *A. niger* ATCC cE *cexA* túltermelő törzs fermentációjának nyomonkövetése

10.5 *A. niger* ATCC 1015 és cE *cexA* túltermelő törzs Mn<sup>2+</sup> limitált fermentációjának analízise

10.5.1 ATCC 1015 Mn<sup>2+</sup> limitált fermentációja

Ferm. idő (óra)	Citromsav (g/l)	D-Glükóz (g/l)	DCW (g/l)	Mn <sup>2+</sup> (µg/l)
0	0	143,06 ± 0,2	1,25 ± 0,6	5,68 ± 0,5
24	0	138,12 ± 0,5	2,20 ± 0,7	8,008 ± 0,4
48	0	135 ± 0,7	7,50 ± 0,3	9,37 ± 0,9
72	6,99 ± 1,2	116,85 ± 1,1	8,80 ± 0,9	5,48 ± 1,2
101	18,17 ± 1,4	100,75 ± 1,3	10,82 ± 1,1	n. m.
120	26,29 ± 1,5	88,2 ± 1,7	12,94 ± 1,5	7,69 ± 1,7
144	38,58 ± 1,9	74,5 ± 1,8	14,50 ± 1,3	n. m.
168	55,14 ± 2,1	64,67 ± 2,3	16,14 ± 1,7	8,88 ± 1,9
192	68,25 ± 2,5	54,36 ± 2,2	18,42 ± 1,9	n. m.
216	76,87 ± 1,8	45,84 ± 1,9	18,10 ± 2,2	9,001 ± 1,2
240	85,25 ± 1,9	35,12 ± 1,6	21,66 ± 2,4	n. m.
264	92,58 ± 1,5	26,84 ± 1,7	21,78 ± 1,9	11,58 ± 0,9
288	100,84 ± 1,2	14,52 ± 1,1	24,16 ± 1,5	n. m.
318	107,22 ± 0,5	0	23,48 ± 0,9	n. m.

20. táblázat: *A. niger* ATCC 1015 törzs fermentációjának nyomonkövetése

10.5.2 cE *cexA* túltermelő törzs Mn<sup>2+</sup> limitált fermentációja

Ferm. idő (óra)	Citromsav (g/l)	D-glükóz (g/l)	DCW (g/l)	Mn <sup>2+</sup> (µg/l)
0	0	145,6 ± 1,2	1,18 ± 0,28	4,90 ± 0,5
24	0	136,4 ± 0,6	1,62 ± 0,47	6,13 ± 0,3
48	2,4 ± 0,98	133,8 ± 0,9	6,00 ± 1,6	4,46 ± 0,9
72	12,88 ± 1,9	115,9 ± 0,5	8,94 ± 1,5	6,11 ± 1,5
101	24,86 ± 2,2	91,4 ± 1,2	10,62 ± 0,9	n. m.
120	34,03 ± 1,7	82,91 ± 1,9	14,10 ± 1,3	11,42 ± 0,6
144	50,36 ± 2,1	64,39 ± 2,4	14,56 ± 1,6	n. m.
168	62,58 ± 1,9	52,36 ± 2,2	16,18 ± 2,3	9,57 ± 1,4
192	70,25 ± 1,5	41,36 ± 1,8	17,12 ± 2,5	n. m.
216	81,89 ± 1,7	35,84 ± 1,9	19,58 ± 1,6	10,67 ± 0,7
240	89,36 ± 1,3	27,32 ± 1,4	22,32 ± 1,5	n. m.
264	97,58 ± 1,6	20,36 ± 1,8	22,24 ± 1,3	13,22 ± 0,5
288	108,41 ± 1,1	12,85 ± 1,5	24,48 ± 1,7	n. m.
315	117,69 ± 0,9	0	25,22 ± 1,1	n. m.

21. táblázat: *A. niger* ATCC cE *cexA* túltermelő törzs fermentációjának nyomonkövetése

## Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

### *Az értekezés alapját képező közlemények*

1. Aline Reinfurt, Susanne Fritsche, **Vivien Bíró**, Alexandra Márton, Valeria Ellena, Erzsébet Fekete, Erzsébet Sándor, Levente Karaffa, Matthias G. Steiger

**Manganese(II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger***

*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023 (IF:4,25)

2. Erzsébet Fekete, **Vivien Bíró**, Alexandra Márton, István Bakondi-Kovács, Zoltán Németh, Erzsébet Sándor, Béla Kovács, István Fábíán, Christian P. Kubicek, Adrian Tsang, Levente Karaffa

**Bioreactor as the root cause of the “manganese effect” during *Aspergillus niger* citric acid fermentations**

*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022 (IF: 5,59)

### *Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó közlemények*

1. Erzsébet Fekete#, **Vivien Bíró#**, Alexandra Márton, István Bakondi-Kovács, Erzsébet Sándor, Béla Kovács, Nicholas Geoffrion, Adrian Tsang, Christian Kubicek, Levente Karaffa

**Transcriptomics identify the triggering of citrate export as the key event caused by manganese deficiency in *Aspergillus niger***

*Microbiology Spectrum*, 2024 (IF: 3,78)

2. Michel Flippi#, Alexandra Márton#, **Vivien Bíró**, Norbert Ág, Erzsébet Sándor, Erzsébet Fekete, Levente Karaffa

**Generation, Transfer, and Loss of Alternative Oxidase Paralogues in the *Aspergillaceae* Family**

*Journal of Fungi*, 2023 (IF: 5,724)

3. Michel Flippi#, Alexandra Márton#, **Vivien Bíró**, Norbert Ág, Erzsébet Sándor, Erzsébet Fekete, Levente Karaffa

**Mutations in the Second Alternative Oxidase Gene: A New Approach to Group *Aspergillus niger* Strains**

*Journal of Fungi*, 2023 (IF: 5,724)

4. Erzsébet Sándor, István S. Kolláth, Erzsébet Fekete, **Vivien Bíró**, Michel Flippi, Béla Kovács, Christian P. Kubicek, Levente Karaffa

**Carbon-source dependent interplay of copper and manganese ions modulates the morphology and itaconic acid production in *Aspergillus terreus***

*Frontiers in Microbiology*, 2020 (IF: 5,640)

***Az értekezés témájában elhangzott előadások***

1. Karaffa Levente, **Bíró Vivien**, Márton Alexandra, Fekete Erzsébet  
**A mangán(II) ion koncentráció és citrát export kapcsolata *Aspergillus niger* citromsav fermentáció során**  
előadás, Biotechnológia a Debreceni Egyetemen- 2024 Szimpózium, DAB székház, Debrecen (2024)
2. **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Az acél csapdájában: Mn<sup>2+</sup> hatása az *Aspergillus niger* citromsav termelésére**  
előadás, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2024. évi Nagygyűlése, Siófok, Panoráma Hotel (2024)

3. Karaffa Levente; **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Bakondi-Kovács István; Kubicek Christian P.; Fekete Erzsébet  
**Fémionok szerepe gomba alapú szerves sav fermentációiban**  
előadás, VII. Magyar Mikológiai Konferencia, Magyar Agrar- és Élettudományi Egyetem (MATE) Kertészettudományi Intézete, Budapest (2024)
4. **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Manganese effect on citric acid production by *Aspergillus niger*: unlocking an efficiency boosting hidden key**  
előadás, FIBOK2024 6th National Conference of Young Biotechnologists, HUN-REN ATK Martonvásár (2024)
5. Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Flipphi Michel; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Insights into the evolution and mutations of second alternative oxidase genes in *Aspergillaceae***  
előadás, FIBOK2024 6th National Conference of Young Biotechnologists, HUN-REN ATK, Martonvásár (2024)
6. Karaffa Levente; Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Bakondi-Kovács István; Fekete Erzsébet  
**Bioreactor as a source of manganese (II) ion contamination during citric acid fermentation by *Aspergillus niger***  
előadás, „FIBOK 2022”: Fiatal Biotechnológusok V. Országos Konferenciája, Gödöllő (2022)

7. **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Flippfi Michel; Karaffa Levente  
**Fémionok szerepe a citromsav és az itakonsav túltermelésében**  
előadás, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét (2022)
  
8. Daróczy Csilla, **Bíró Vivien**, Elek János  
**Raman spektroszkópia, kemometria és sokváltozós kalibráció HPLC kiváltására fermentációk követésében**  
előadás, KeMoMo-QSAR 2021, MTA SZAB-Székház, Szeged, (2021)
  
9. Erzsébet Sándor; István Kolláth; **Vivien Bíró**; Erzsébet Fekete; Levente Karaffa  
**Copper ions mitigate manganese(II) ion inhibition of itaconic acid production in *Aspergillus terreus* in a carbon source-dependent manner**  
előadás, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló Kecskemét (2021)
  
10. **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Az *Aspergillus terreus* itakonsav fermentáció mangán(II)-ion érzékenységének vizsgálata**  
előadás, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét (2020)

### *Az értekezés anyagához kapcsolódó poszterek*

1. **Bíró Vivien**, Márton Alexandra, Faggyas Flóra, Nagy Martin, Fekete Erzsébet, Karaffa Levente  
**Robusztus gomba: az *Aspergillus niger* biotechnológiai jelentősége**  
Biotechnológia a Debreceni Egyetemen- 2024 Szimpózium, DAB székház, Debrecen (2024)

2. **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Robusztus gomba: az *Aspergillus niger* biotechnológiai jelentősége**  
Magyar Mikrobiológiai Társaság 2024. évi Nagygyűlése, Siófok (2024)
  
3. Levente Karaffa; **Vivien Bíró**; Alexandra Márton; István Bakondi-Kovács;  
Nicholas Geoffrion; Adrian Tsang; Christian P. Kubicek; Erzsébet Fekete  
**Transcriptome analysis of manganese(II) ion depletion during high-yield  
citric acid fermentation in *Aspergillus niger***  
The 20th International Aspergillus Meeting, Asperfest 20, Asilomar  
Conference Center, Pacific Grove CA, USA (2024)
  
4. Levente Karaffa; Michel Flippi; Alexandra Márton; **Vivien Bíró**; István  
Bakondi-Kovács; Viktória Ág-Rácz; Norbert Ág; Erzsébet Fekete  
**Second Alternative Oxidase Genes in *Aspergillaceae*: Genesis, Loss and  
Mutations**  
1 The 20th International Aspergillus Meeting, Asperfest20, Asilomar  
Conference Center, Pacific Grove CA, USA (2024)
  
5. Levente Karaffa; **Vivien Bíró**; Alexandra Márton; István Bakondi-Kovács;  
Andrea Kun; Erzsébet Fekete; Christian Peter Kubicek; Adrian Tsang  
**The "manganese effect" during *Aspergillus niger* citric acid fermentation  
is dependent on the cultivation stage**  
16 th European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria (2023)

6. **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Manganese effect on citric acid production by *Aspergillus niger*: unlocking an efficiency boosting hidden key**  
FIBOK2024 6th National Conference of Young Biotechnologists, HUN-REN ATK Martonvásár (2024)
  
7. **Vivien Bíró**  
**Manganese mystery of *Aspergillus niger* slowly gets untangled**  
GTIDEA Tudományos és Társadalmi Tanácsadó Testület éves ülése, Debrecen (2024)
  
8. Aline Reinfurt; **Vivien Bíró**; Alexandra Márton; Valeria Ellena; Erzsébet Fekete; Levente Karaffa; Matthias Steiger  
**Manganese and its regulatory role on the citrate transporter CexA – exploring the citric acid production mechanism of *Aspergillus niger***  
16 th European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria (2023)
  
9. **Vivien Bíró**; Alexandra Márton; István Bakondi-Kovács; Andrea Kun; Erzsébet Fekete; Christian Peter Kubicek; Levente Karaffa  
**Trace metal ions in fungal organic acid fermentation**  
16 th European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria (2023)
  
10. Levente Karaffa; **Vivien Bíró**; Alexandra Márton; István Bakondi-Kovács; Andrea Kun; Erzsébet Fekete; Christian Peter Kubicek; Adrian Tsang  
**The final 30 percent: optimizing the *Aspergillus niger* citric acid fermentation up to the theoretical maximum**  
16 th European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria (2023)

11. Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente

**A saválló acél minőségének és a termék hozamának kapcsolata *Aspergillus niger* citromsav fermentáció során**

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium Kecskemét, (2022)

12. **Bíró Vivien**; Márton Alexandra; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Flippi Michel; Karaffa Levente

**Alternatív oxidáz paralóg gének *Aspergillaceae* fajokban**

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium Kecskemét, (2022)

13. Alexandra Márton#; **Vivien Bíró#**; István Bakondi-Kovács; Erzsébet Fekete; Levente Karaffa

**The final 30 percent: optimizing the *Aspergillus niger* citric acid fermentation up to the theoretical maximum**

6 th Central European Forum for Microbiology

Hotel Aranyhomok, Kecskemét, Hungary

14. Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Fejes Balázs; Fekete Erzsébet; My Pham Thi Thanh; Adrian Tsang; Karaffa Levente

**Alternatív oxidázok szerepe az *Aspergillus niger* citromsav termelésében**

A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét, (2020)

*Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó előadások/ poszterek*

1. Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Faggyas Flóra, Nagy Martin; Fekete Erzsébet, Karaffa Levente  
**Alternatív oxidáz a biotechnológiában: a kevesebb néha több?**  
poszter, Biotechnológia a Debreceni Egyetemen- 2024 Szimpózium, DAB színház, Debrecen (2024)
2. Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Michel Flippi; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Egy gén élete: az alternatív oxidáz evolúciója az *Aspergillaceae* családban**  
előadás, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2024. évi Nagygyűlése, Siófok, Panoráma Hotel (2024)
3. Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Michel Flippi; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
**Alternatív oxidáz a biotechnológiában: a kevesebb néha több?**  
poszter, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2024. évi Nagygyűlése, Siófok, Panoráma Hotel (2024)
4. Erzsébet Fekete; Norbert Ág; Viktória Ág-Rác; Alexandra Márton; **Vivien Bíró**; Michel Flippi; Levente Karaffa  
**Continual propagation of [D1,2] stwintrons in divergent *Xylariales***  
előadás, GSA – The 32th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, CA, Egyesült Államok (2024)
5. Erzsébet Fekete; Norbert Ág; Viktória Ág-Rác; Alexandra Márton; **Vivien Bíró**; Michel Flippi; Levente Karaffa  
**Continual propagation of [D1,2] stwintrons in divergent *Xylariales***  
poszter, GSA – The 32th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, CA, Egyesült Államok (2024)

6. Alexandra Márton; Michel Flippi; **Vivien Bíró**; Norbert Ág; Viktória Ág - Rác; Erzsébet Fekete; Levente Karaffa

**Mutations in the second alternative oxidase gene: a new approach to group *Aspergillus niger* strains**

előadás, előadás, 19 th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary (2023)

7. **Bíró Vivien**

**Egy terminális oxidázt kódoló gén (*aoxB*) filogenetikája és evolúciója gombákban**

előadás, 'Rising Stars 2022' – Tehetséges fiatal biológusok bemutatkozása, MTA DAB Székház, Debrecen (2022)

8. Márton Alexandra; **Bíró Vivien**; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Michel Flippi; Karaffa Levente

**A második alternatív oxidáz enzimet kódoló *aoxB* gén mutációi *Aspergillus niger* gombában**

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium Kecskemét, (2022)