

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

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

Bíró Vivien

Témavezető: Prof. Dr. Karaffa Levente



**DEBRECENI EGYETEM**

**Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola**

**Debrecen, 2025**



## 1. Bevezetés

A mikroorganizmusok megjelenése a Föld korai fejlődéséhez és az élet eredetéhez köthető, első formáik ~3,5-4 milliárd éve alakultak ki (Brown, 2007).

Az emberiség évezredek óta számos területen használja a mikroorganizmusokat. Észrevétlen hűsége „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 gombabiotechnológia – 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 fehérjét, enzimeket és más termékeket előállító, sokoldalú termelési platformmá vált (Cortese 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 ~75%-kal csökken az alacsony Mn<sup>2+</sup> szinthez képest; Clark és mtsai., 1966, Kisser és mtsai., 1980). Az ipari léptékű citromsavtermelést rozsdamentes acél fermentorokban végzik, de a törzsek javítására és a gyártási folyamat fejlesztésére

használt kisméretű üveg bioreaktorok is tartalmaznak rozsdamentes acél alkatrészeket, amelyekben a mangán ötvözőelem (Shackelford & Alexander, 2001). A felületi korrózió miatt fémionok, köztük magánionok oldódhatnak ki a fermentáció során, ezzel rontva a fermentáció hozamát (Fekete és mtsai., 2022).

Az *A. niger* citromsav kiválasztásának mangán(II) érzékenysége evolúciós válasz lehet a Föld ősi környezeteinek változó fém koncentrációira. A korai óceánokban és talajokban végbemenő, jelentős mértékű mangán-oxidáció és lerakódás befolyásolhatta a mikroorganizmusok anyagcseréjét, köztük a citromsav bioszintézis mechanizmusait (Fischer és mtsai., 2015, Farkas és mtsai., 2021). A modern fermentációs technológiákban a mangán koncentráció minimalizálása döntő jelentőségű a citromsavtermelés maximalizálása érdekében, amely egyfajta visszacsatolás a természetes evolúciós folyamatokból. Kutatásunknak tehát nem csak a biotechnológiai alkalmazások miatt, hanem az alapkutatás szempontjából is jelentősége van.

## 2. 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 (Karaffa & Kubicek, 2003).

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 sterilizálás 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 fermentálébe. 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.

### 3. Alkalmazott módszerek

Kísérleteink során *Aspergillus niger* ATTC 1015, NRRL 2270 (ATCC 11414) és cE *cexA* citromsav termelő törzseket használtuk.

#### 3.1. Fermentációk előkészítése, kivitelezése és kiértékelése

##### 3.1.1. Fenntartó táptalaj

A törzseket NIG1 (6 g/l NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 g/l KCl, 1,5 g/l agar, 20 g/l D-glükóz, pH=5 ) minimál táptalajon (a táptalaj komponenseit a VWR International Kft., Debrecen és Sigma-Aldrich Kft. szolgáltatta) tartottuk fent. A Maillard reakció (Martins, Jongen, & van Boekel, 2000) elkerülése érdekében a D-glükóz törzsoldatot (50% (w/v)) külön sterilizáltuk és adtuk a táptalajhoz. A szükséges esszenciális fémionok megfelelő arányú biztosítása érdekében a táptalajt nyomelemoldattal egészítettük ki, amelyből 20 µl-t adagoltunk 100 ml táptalajhoz. A nyomelem törzsoldat komponensei és azok koncentrációi a következők voltak: 10 g/l EDTA, 4,4 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,01 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,32 g/l CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,315 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,22 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,47 g/l CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O és 1,1 g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

### 3.1.2. Termelő táptalaj

A fermentációhoz szükséges táptalaj (NIGT1) előkészítése során a komponenseket kimértük és mangánmentes vízben oldottuk fel. A fő összetevők a következők voltak: D-glükóz (140 g/l),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2,5 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,15 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (2,25 g/l) és NaCl (0,15 g/l). A szükséges nyomelemeket  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  ( $4,84 \times 10^{-4}$  g/l),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ( $6,59 \times 10^{-3}$  g/l) és  $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ( $2,36 \times 10^{-4}$  g/l) biztosította. A pH-t 3,5-re állítottuk be. A nyomelem-törzsoldatokat steril szűréssel készítettük elő, a D-glükóz törzsoldatot (50% w/v) pedig az előzőekben ismertetett módon adagoltuk a táptalajhoz.

### 3.1.3. Mangán- limitált környezet megteremtése

A magas hozam eléréséhez elengedhetetlen a mangán-ionok eltávolítása. A Mn(II)-mentes vizet és D-glükóz-oldatot kationcserélő gyantával (Dowex 50-W-X8) töltött oszlopon ioncserélt vízből állítottuk elő. A gyantát 1 M-os HCl-oldattal regeneráltuk, majd semleges pH-ig mostuk. Az így tisztított vizet lassú áramlással  $\text{Mn}^{2+}$ -mentes üvegedénybe gyűjtöttük, és minden további oldatot ebből készítettünk.

Az inokulumok előállításához 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokat, míg több literes fermentációkhoz üvegestű bioreaktorokat alkalmaztunk. Az üvegeszközöket  $\text{Mn}^{2+}$  eltávolítása céljából 1 M-os HCl-oldattal töltöttük meg, és 3-4 órán át állni hagytuk. Ezt követően  $\text{Mn}^{2+}$ -mentes vízzel öblítettük, hogy a savat és az ionokat teljes mértékben eltávolítsuk.

### **3.1.4. Sterilizálás**

Az üvegeszközök sterilizálását autoklávozással végeztük, 121°C-on, 30 percen keresztül. Amennyiben az üvegeszköz nem tartalmazott folyadékot (pl. táptalaj nélküli mérőhengerek), a sterilitás biztosítása érdekében ~5 ml mangánmentes vizet töltöttünk bele.

A fermentor csíramentesítésére üresgőzös sterilizálást alkalmaztunk. A fermentor üvegtestét mangánmentes vízzel töltöttük fel úgy, hogy az elektródák felett helyezkedjen el, megakadályozva a párolgás miatti szintcsökkenést. A sterilizálást 121°C-on, 30 percen keresztül végeztük, majd a fermentort üzembe helyeztük. A sterilizálás után a benne lévő vizet nyomás alatt eltávolítottuk, és a reaktort steril táptalajjal töltöttük fel, aszeptikus körülmények között.

### **3.1.5. Fermentációk**

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.

Kísérleteink egy részét laboratóriumi bioreaktorban végeztük, ahol a fermentáció és előkészületei hasonlóak voltak a korábban ismertetett lépésekhez. Két különböző, 6 literes autoklávozható üveggermentort alkalmaztunk: Sartorius Biostat BTwin (Göttingen, Németország) és egy Inel Kft. (Budapest, Magyarország) által gyártott rendszert. A továbbiakban ezeket Bioreaktor A (Sartorius) és Bioreaktor B (Inel) néven említem. A két bioreaktor azonos edénygeometriával és 4,5 literes munkatérfogattal rendelkezik. Fémszerkezeti elemeik egyaránt AISI 316L rozsdamentes acélból készültek ( $Mn^{2+}$  tartalom  $\leq 2\%$ ). 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.

A két bioreaktort azonos üzemi paraméterek mellett üzemeltettük annak érdekében, hogy az eredmények közvetlenül összehasonlíthatók legyenek.

### **3.1.6. Analitikai módszerek**

A betáplált szénforrás fogyasztását 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.

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 ródiium  $m/z=103$ -nál látható.

## 4. Új tudományos eredmények

**1. Bizonyítottuk, hogy a bioreaktor állapota és anyagi összetétele meghatározó szerepet játszik az *A. niger* citromsav-termelésében és morfológiájában.**

Párhuzamos fermentációk során kimutattuk, hogy bár a kezdeti feltételek azonosak voltak, a bioreaktor B-ben végzett fermentáció gyorsabb D-glükóz fogyást, fokozott biomassza-képződést és alacsonyabb citromsav-hozamot eredményezett ( $Y_{p/s} = 0,66$ ), míg a bioreaktor A-ban végzett fermentáció során a citromsav túltermelés jellemző jegyei voltak megfigyelhetők ( $Y_{p/s} = 0,91$ ). A két bioreaktorban fejlődő tenyészetek morfológiája is jelentősen eltért: a bioreaktor A-ban kompakt, kis átmérőjű aggregátumok és nagyobb hifaátmérő alakult ki, míg a bioreaktor B-ben hosszú hifák domináltak, amelyek az alacsony citromsav-termeléssel korrelálnak. Eredményeink alátámasztják, hogy a bioreaktor anyagából kioldódó komponensek, illetve a korrózió következtében bekövetkező változások metabolikus eltérésekhez vezethetnek, amelyek közvetlenül befolyásolják a citromsav-termelést.

## **2. Bizonyítottuk, hogy a hősterilizálás folyamán $Mn^{2+}$ kioldódás következik be.**

A bioreaktor A és B citromsavtermelésének és morfológiájának különbsége azt sugallta, hogy az extracelluláris  $Mn^{2+}$  koncentráció eltérő volt a két bioreaktorban (1. táblázat). A táptalajt mindkét esetben ugyanúgy készítettük el,  $2 \mu\text{g/l}$   $Mn^{2+}$  végső koncentrációval. 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 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 utaltak, 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 ± 0,10	2,90 ± 0,5	2,95 ± 0,4	0,85/0,90
Bioreaktor B	2,01 ± 0,18	20,30 ± 2,48	25,98 ± 3,02	18,29/23,97

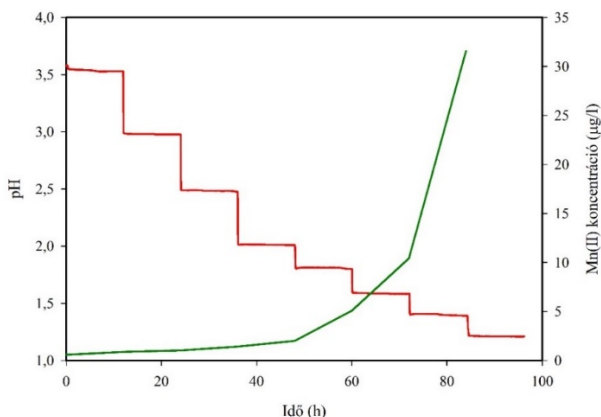
*1. táblázat: Mangán(II)-ion koncentráció (µg/l) a bioreaktor A és B-ben az autoklávban végzett 30 és 60 perces sterilizálás előtt és után, valamint az átlagos koncentrációk különbsége.*

### **3. Igazoltuk a Mn<sup>2+</sup> kioldódás minimalizálása érdekében alkalmazott üresgőzös sterilizálás és elektrokémiai polírozás hatékonyságát.**

Az üresgőzös sterilizálás csökkentette a kezdeti Mn<sup>2+</sup> szint megugrását, míg az elektrokémiai polírozás révén a bioreaktor B-ben a citromsav moláris hozama ( $Y_{p/s} = 0,80 \pm 0,03$ ) közelítette a bioreaktor A-ban kapott értéket. A két módszer kombinálása révén a citromsav moláris hozama  $Y_{p/s} = 0,88 \pm 0,04$ -re állt vissza, statisztikailag megegyezve a bioreaktor A hozamaival.

#### 4. Megállapítottuk, hogy az $Mn^{2+}$ kioldódása szoros összefüggést mutat a közeg pH-értékével.

pH 3,5 és 2,2 közötti tartományban az  $Mn^{2+}$  kioldódás elhanyagolható mértékű volt, azonban pH 2,0 alatt a kioldódás üteme meredeken nőtt (1. ábra). A pH 1,6 alatti értékeknél az  $Mn^{2+}$ -koncentráció ugrásszerű emelkedése volt megfigyelhető, vagyis az acélötvözetből történő fémion kioldódás ezen a pH-tartományon belül erősödik fel jelentősen.



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

A puffer koncentrációjának növelése (10 mM-ről 100 mM-ra) nem befolyásolta az  $Mn^{2+}$  kioldódásának mértékét, ami arra utal, hogy a pufferkapacitás nem meghatározó tényező a fémion oldódási mechanizmusában.

## **5. Megállapítottuk, hogy a mangánionok hatása időfüggő, és csak a fermentáció kezdeti szakaszában befolyásolja jelentősen a citromsavtermelést.**

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, a legmagasabb értékeket 172 óránál mértük.

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 enzimatis 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 a fermentáció kezdeti szakaszára korlátozódik.

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

**6. Megállapítottuk, hogy a *cexA* túltermelő törzs ellenállóbb a  $Mn^{2+}$  jelenlétére, mint az ATCC 1015 szülői törzs.**

Megállapítottuk, hogy a  $Mn^{2+}$  jelenléte és koncentrációja eltérő mértékben befolyásolja a citromsav moláris hozamát. A *cexA* túltermelő törzs toleránsabb a  $Mn^{2+}$  jelenlétére, mint az ATCC 1015 törzs.  $Mn^{2+}$  jelenlétében (100  $\mu\text{g/l}$ ) az ATCC 1015 törzs citromsav-termelése jelentősen visszaesett, és mindössze 1,51 g/l végső koncentrációt ért el. Ezzel szemben a *cexA* túltermelő törzs ugyanezen körülmények között 36,83 g/l citromsavat termelt, ami 24,39-szer magasabb hozamot jelentett. A biomassa-koncentráció mindkét törzs esetében hasonló maradt.  $Mn^{2+}$ -limitált körülmények között az ATCC 1015 törzs végső citromsav-koncentrációja 107,22 g/l volt, a *cexA* túltermelő törzs 117,69 g/l volumetrikus hozamot produkált. Ez azt jelzi, hogy a *cexA* túltermelése  $Mn^{2+}$  hiányában is mérhető előnyt biztosít.

## 5. Összefoglalás

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

Igazoltuk, hogy az  $Mn^{2+}$  kioldódása függ a pH értéktől és az alkalmazott sterilizálási eljárástól. Megállapítottuk, hogy a kioldódás pH 2,0 alatt fokozódik, és pH 1,4-nél felgyorsul. Kimutattuk, hogy az *A. niger* NRRL 2270 törzs nem járul hozzá az  $Mn^{2+}$  kioldódásához, mivel a jelenség hasonlóan jelentkezett sejtmentes foszfátpufferben is. A foszfátkoncentráció növelése (10-ről 100 mM-ra) nem fokozta az  $Mn^{2+}$  kioldódását, jelezve a foszfát csekély szerepét a folyamatban.

A kutatásunk során elsőként alkalmaztuk az üres gőzös sterilizálást a fémionok eltávolítására citromsav fermentáció során. Az eljárás szinte teljesen megakadályozta a korai  $Mn^{2+}$ -szint emelkedést, minimalizálva annak negatív hatását a citromsav termelésre. A leoltás után azonban a fémionok kioldódása változatlan maradt, ami jelzi a bioreaktor anyagi minőségének fontosságát a korrózió és fémkioldódás csökkentésében.

Bebizonyítottuk, hogy az  $Mn^{2+}$  hiánya csak 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 citromsav-termelést. Mangán-adagolósos kísérletekkel

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. A  $Mn^{2+}$  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 (2. táblázat). Ezen túlmenően a *cexA* túltermelő törzs magasabb rátával vette fel a glükózt, ami szintén hozzájárul a magasabb citromsav hozamhoz.

	<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>

2. táblázat: Különböző *A. niger* törzsek fermentációs eredményeinek összefoglalása

Eredményeink szerint ha 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.

## 6. Irodalomjegyzék

Angumeenal, A. R., & Venkappayya, D. (2013). An overview of citric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, 367-370.

Brown, C. S. (2007). Big history: from the Big Bang to the present. United States of America: The New Press.

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.

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.

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, 7(10), 808.

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.

Fischer, W. W., Hemp, J., & Johnson, J. E. (2015). Manganese and the Evolution of Photosynthesis. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 351–357.

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.

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.

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.

Shackelford, J. F., & Alexander, W. (2001). *The CRC materials science and engineering handbook*. Boca Raton: CRC Press.

Sicard, D., & Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus. Biologies*, 334(3), 229-236.

Umo, H. E. (1997). The economic importance of microorganism in food processing. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 1-6.



Nyilvántartási szám: DEENK/57/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bíró Vivien  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10069159

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. Reinfurt, A., Fritsche, S., **Bíró, V.**, Márton, A., Ellena, V., Fekete, E., Karaffa, E. M., Karaffa, L., Steiger, M. G.: Manganese(II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger*.  
*Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1-11, 2023. EISSN: 2296-4185.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2023.1292337>  
IF: 4.3
2. Fekete, E., **Bíró, V.**, Márton, A., Bakondi-Kovács, I., Németh, Z., Karaffa, E. M., Kovács, B., Fábán, I., Kubicek, C. P., Tsang, A., Karaffa, L.: Bioreactor as the root cause of the "manganese effect" during *Aspergillus niger* citric acid fermentations.  
*Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 1-12, 2022. EISSN: 2296-4185.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.935902>  
IF: 5.7

### További közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (5)

3. Fekete, E., **Bíró, V.**, Márton, A., Bakondi-Kovács, I., Karaffa, E. M., Kovács, B., Geoffrion, N., Tsang, A., Kubicek, C. P., Karaffa, L.: Transcriptomics identify the triggering of citrate export as the key event caused by manganese deficiency in.  
*Microbiol. Spectr.* -, 1-18, 2024. ISSN: 2165-0497.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01906-24>  
IF: 3.7 (2023)
4. Flippi, M., Márton, A., **Bíró, V.**, Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Generation, Transfer, and Loss of Alternative Oxidase Paralogs in the Aspergillaceae Family.  
*J. Fungi.* 9 (12), 1-18, 2023. EISSN: 2309-608X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9121195>  
IF: 4.2





5. Flippi, M., Márton, A., **Bíró, V.**, Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Mutations in the Second Alternative Oxidase Gene: A New Approach to Group *Aspergillus niger* Strains.  
*J. Fungi*. 9 (5), 1-17, 2023. EISSN: 2309-608X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9050570>  
IF: 4.2
6. Karaffa, E. M., Kolláth, I. S., Fekete, E., **Bíró, V.**, Flippi, M., Kovács, B., Kubicek, C. P., Karaffa, L.: Carbon-source dependent interplay of copper and manganese ions modulates the morphology and itaconic acid production in *Aspergillus terreus*.  
*Front. Microbiol.* 12, 1-14, 2021. EISSN: 1664-302X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.680420>  
IF: 6.064
7. Szabó, M., **Bíró, V.**, Simon, F., Fábíán, I.: The decomposition of N-chloro amino acids of essential branched-chain amino acids: kinetics and mechanism.  
*J. Hazard. Mater.* 382, 1-8, 2020. ISSN: 0304-3894.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120988>  
IF: 10.588

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 38,752**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.17.





**Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)**

**Technological and Physiological Basis of  
Manganese Ion Effects in *Aspergillus niger* Citric  
Acid Fermentation**

by Vivien Bíró

Supervisor: Prof. Dr. Levente Karaffa



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2025

# 1. Introduction

The appearance of microorganisms is linked to the early development of the Earth and the origin of life, with their first forms emerging approximately 3.5–4 billion years ago (Brown, 2007).

Humanity has been utilizing microorganisms in various fields for thousands of years. As unnoticed yet faithful "companions," they have always been present throughout the development of civilization (Umo, 1997). Yeasts were domesticated accidentally through spontaneous fermentation processes to produce foods such as bread, wine, beer, and chocolate (Sicard & Legras, 2011). Modern fungal biotechnology — the controlled cultivation of fungi in bioreactors — became an industrial sector in 1923 when Pfizer began utilizing *Aspergillus niger*'s ability to overproduce and secrete citric acid. Since then, *A. niger* has evolved into a versatile production platform for proteins, enzymes, and other valuable products (Cortese et al., 2020).

Citric acid production has been studied for a long time, yet there are still unresolved questions today (Angumeenal & Venkappayya, 2013). One key factor in high-yield *A. niger* citric acid fermentation is the manganese ion: a culture medium concentration exceeding 3–5  $\mu\text{g/L}$  significantly reduces yield (at 100  $\mu\text{g/L}$   $\text{Mn}^{2+}$  concentration, the yield decreases by approximately 75% compared to low  $\text{Mn}^{2+}$  levels; Clark et al., 1966, Kissler et al., 1980). Industrial-scale citric acid production is carried out in stainless steel fermenters, but the small-scale glass bioreactors used for strain improvement and

process development also contain stainless steel components in which manganese is an alloying element (Shackelford & Alexander, 2001). Due to surface corrosion, metal ions, including manganese ions, can dissolve into the fermentation broth, thereby reducing fermentation yield (Fekete et al., 2022).

The manganese(II) sensitivity of *A. niger* citric acid secretion may be an evolutionary response to fluctuating metal concentrations in ancient Earth environments. The extensive manganese oxidation and deposition processes occurring in early oceans and soils may have influenced microbial metabolism, including the biosynthesis mechanisms of citric acid (Fischer et al., 2015, Farkas et al., 2021). In modern fermentation technologies, minimizing manganese concentration is crucial for maximizing citric acid production, representing a form of feedback from natural evolutionary processes. Therefore, our research is significant not only for biotechnological applications but also from a fundamental research perspective.

## 2. Objectives

The *A. niger* citric acid fermentation has been studied for a long time, but many questions remain unanswered. One of the most important is manganese ion sensitivity: an  $\text{Mn}^{2+}$  concentration exceeding 5  $\mu\text{g/L}$  in the culture medium affects the fungus's physiology and morphology, dramatically reducing citric acid yield (Karaffa & Kubicek, 2003).

Citric acid fermentation takes place in bioreactors that contain stainless steel, where manganese is an essential alloying element. One of the objectives of the research forming the basis of my dissertation was to investigate the leaching of Mn(II) ions during sterilization and fermentation. To achieve this, we aimed to determine the technological and biological factors influencing leaching, analyze its temporal dynamics, and explore solutions to mitigate this phenomenon.

Citric acid is transported from the fungal cell into the fermentation broth via the transporter protein encoded by the *cexA* gene. Another objective of my research was to examine the interaction between the *cexA* gene and Mn(II) ions. For this, we utilized an *A. niger* mutant that overexpresses *cexA*, providing an opportunity for a detailed study of these interactions.

### **3. Materials and methods**

During our experiments, we used *Aspergillus niger* ATCC 1015, NRRL 2270 (ATCC 11414), and the cE *cexA*-overexpressing strain.

#### **3.1. Fermentation Preparation, Execution, and Evaluation**

##### **3.1.1. Culture Media**

The strains were maintained on NIG1 minimal medium, consisting of 6 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L KCl, 1.5 g/L agar, and 20 g/L D-glucose, with a pH of 5. To prevent Maillard reactions (Martins, Jongen, & van Boekel, 2000), the 50% (w/v) D-glucose stock solution was sterilized separately before being added to the medium. To ensure the proper ratio of essential metal ions, the medium was supplemented with a trace element solution, adding 20 µL per 100 mL of medium. The trace element stock solution contained 10 g/L EDTA, 4.4 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.01 g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.32 g/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.315 g/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.22 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.47 g/L CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 1.1 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

### **3.1.2. Production Medium**

For fermentation, the NIGT1 medium was prepared by dissolving its components in  $\text{Mn}^{2+}$ -free water. The main components were: D-glucose (140 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2.5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.15 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2.25 g/L), and NaCl (0.15 g/L). The required trace elements were provided by  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $4.84 \times 10^{-4}$  g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $6.59 \times 10^{-3}$  g/L), and  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $2.36 \times 10^{-4}$  g/L). The pH was adjusted to 3.5. The trace element stock solutions were sterilized by filtration, and the 50% (w/v) D-glucose stock solution was added following the previously described procedure.

### **3.1.3. Establishment of Manganese-Limited Conditions**

The removal of  $\text{Mn}(\text{II})$  ions was essential to achieve high yields.  $\text{Mn}^{2+}$ -free water and D-glucose solutions were prepared by passing ion-exchanged water through a cation exchange resin column (Dowex 50-W-X8). The resin was regenerated with 1 M HCl and rinsed to neutral pH. The purified water was collected in  $\text{Mn}^{2+}$ -free glass containers and used for all further solution preparations.

For inoculum preparation, 500 mL Erlenmeyer flasks were used, while glass bioreactors were applied for larger-scale fermentations. To remove  $\text{Mn}^{2+}$  residues, all glassware was filled with 1 M HCl and left to stand for 3–4 hours, then rinsed thoroughly with  $\text{Mn}^{2+}$ -free water to eliminate residual acid and metal ions.

### **3.1.4. Sterilization**

Glassware was sterilized by autoclaving at 121°C for 30 minutes. If glassware did not contain liquid (e.g., measuring cylinders without media), ~5 mL of Mn<sup>2+</sup>-free water was added to ensure sterility.

For fermenter sterilization, a steam sterilization (empty-steam method) was applied. The bioreactor vessel was filled with Mn<sup>2+</sup>-free water up to a level above the electrodes, preventing evaporation-induced level reduction. Sterilization was performed at 121°C for 30 minutes, after which the fermenter was put into operation. Following sterilization, the water was removed under pressure, and the reactor was filled with sterile medium under aseptic conditions.

### **3.1.5. Fermentations**

For shake flask fermentations, 500 mL Erlenmeyer flasks (VWR International Kft., Debrecen) with 100 mL working volumes were used. Cultures were incubated on an Infors AG CH-4103 (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) horizontal shaker at 250 rpm and 30°C. Sampling was performed under sterile conditions in a laminar flow hood. To prevent oxygen depletion, flasks were manually shaken during sampling.

Some experiments were conducted in laboratory bioreactors, following similar fermentation preparation steps. Two different 6 L

autoclavable glass bioreactors were used: a Sartorius Biostat BTwin (Göttingen, Germany) and a system manufactured by Inel Kft. (Budapest, Hungary), referred to as Bioreactor A (Sartorius) and Bioreactor B (Inel), respectively. Both bioreactors had identical vessel geometry and a 4.5 L working volume, with AISI 316L stainless steel components ( $\text{Mn}^{2+}$  content  $\leq 2\%$ ) and 65 mm diameter, six-bladed Rushton-type disc turbine impellers.

A significant difference between them was that Bioreactor A was newly acquired before the experiments, whereas Bioreactor B had been in continuous use for approximately 10 years. Over time, surface corrosion of stainless steel components was observed. Initial experiments were conducted without surface treatment, followed by electropolishing of all stainless steel components of Bioreactor B (including the lid, sensor ports, agitator shaft, sampling tube, and impellers) to investigate the impact of corrosion. Electropolishing was carried out by Zolend Kft. (Debrecen, Hungary), after which additional fermentation experiments were conducted to compare  $\text{Mn}^{2+}$  leaching and citric acid production in the treated and untreated bioreactors.

Both bioreactors were operated under identical conditions to ensure direct comparability of results.

### 3.1.6. Analytical Methods

The consumption of the carbon source (D-glucose) and the concentration of produced citric acid were monitored using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Measurements were performed with an Agilent 1260 Infinity II system (Agilent Technologies, USA) using a BioRad HPX 87H column (Bio-Rad Inc., USA). Detection was conducted via a Refractive Index Detector (RID). The analysis was carried out under isocratic conditions with a flow rate of 0.5 mL/min using 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the mobile phase. The column and detector temperatures were maintained at 55°C. Calibration curves were established using standard solutions of D-glucose and citric acid, with retention times of approximately 9 minutes for citric acid and 12 minutes for D-glucose.

The manganese concentration was determined using Inductively Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometry (ICP-QMS) with a Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) instrument controlled by PlasmaLab 2.5 software. The carrier gas mixture contained 7% (v/v) hydrogen and 93% (v/v) helium at a flow rate of 6 mL/min. Calibration curves were prepared using elemental reference solutions (1000 mg/L, Scharlab, Sentmenat, Spain). Rhodium was added as an internal standard to each sample and calibration series, with a set concentration of 20 µg/L. During the spectrogram analysis, the manganese signal appeared at  $m/z= 55$ , while the rhodium signal was detected at  $m/z= 103$ .

## **4. New scientific results**

### **1. We proved that the condition and material composition of the bioreactor play a crucial role in *A. niger* citric acid production and morphology.**

Parallel fermentations demonstrated that, despite identical initial conditions, fermentation in bioreactor B resulted in faster D-glucose consumption, increased biomass formation, and lower citric acid yield ( $Y_{p/s} = 0.66$ ), whereas fermentation in bioreactor A exhibited characteristics of citric acid overproduction ( $Y_{p/s} = 0.91$ ). The morphology of the cultures developing in the two bioreactors also differed significantly: in bioreactor A, compact aggregates with small diameters and larger hyphal diameters were formed, while in bioreactor B, long hyphae dominated, which correlated with low citric acid production. Our results support the conclusion that components leaching from the bioreactor material, as well as changes caused by corrosion, can lead to metabolic differences that directly affect citric acid production.

### **2. We proved that $Mn^{2+}$ leaching occurs during heat sterilization.**

The differences in citric acid production and morphology observed in bioreactors A and B suggested that extracellular  $Mn^{2+}$  concentrations differed between the two systems. The culture medium

was prepared identically in both cases, with a final  $Mn^{2+}$  concentration of 2  $\mu g/L$ . As expected, the  $Mn^{2+}$  concentration of the media before sterilization was  $\sim 2 \mu g/L$  in both bioreactors. After 30 minutes of heat sterilization, the  $Mn^{2+}$  concentration increased by approximately 41% in bioreactor A, while in bioreactor B, it increased tenfold (Table 1.). After 60 minutes of heat sterilization, the  $Mn^{2+}$  concentration in Bioreactor A was 44% higher than before sterilization, whereas in Bioreactor B, it reached 13 times the pre-sterilization value. These results indicate that heat sterilization caused  $Mn^{2+}$  leaching from the bioreactors, with leaching being significantly more intense in the old bioreactor (B) compared to the new one (A).

	<b>Before Sterilization</b>	<b>After Sterilization</b>		<b>Differences</b>
		<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	
Bioreactor A	$2.05 \pm 0.10$	$2.90 \pm 0.5$	$2.95 \pm 0.4$	0.85/0.90
Bioreactor B	$2.01 \pm 0.18$	$20.30 \pm 2.48$	$25.98 \pm 3.02$	18.29/23.97

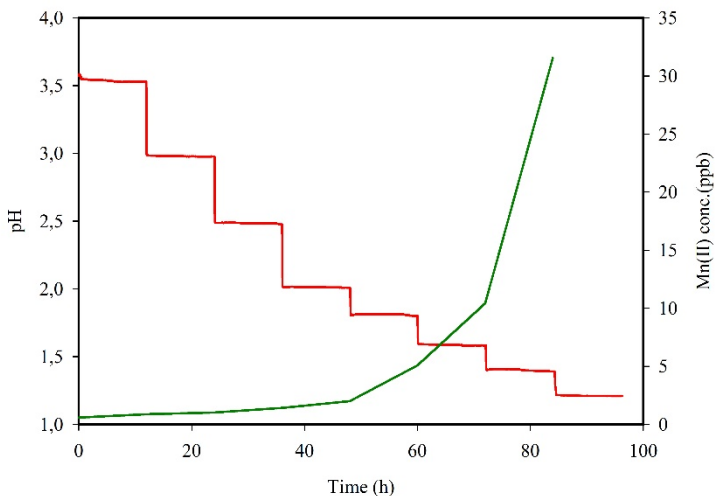
*Table 1: Manganese (II) Ion Concentration ( $\mu g/l$ ) in Bioreactor A and B Before and After 30- and 60-Minute Autoclave Sterilization, Along with the Differences in Average Concentrations*

**3. We confirmed the effectiveness of empty-steam sterilization and electrochemical polishing in minimizing  $Mn^{2+}$  leaching.**

Empty-steam sterilization reduced the initial surge in  $Mn^{2+}$  levels, while electrochemical polishing improved the molar yield of citric acid in bioreactor B ( $Y_{p/s} = 0.80 \pm 0.03$ ), bringing it closer to the value obtained in bioreactor A. The combination of both methods restored the molar yield of citric acid to  $Y_{p/s} = 0.88 \pm 0.04$ , which was statistically equivalent to the yield observed in bioreactor A.

**4. We determined that  $Mn^{2+}$  leaching is strongly correlated with the pH of the medium.**

Within the pH range of 3.5 to 2.2,  $Mn^{2+}$  leaching was negligible; however, below pH 2.0, the leaching rate increased sharply (Figure 1.). At pH values below 1.6, a sudden rise in  $Mn^{2+}$  concentration was observed, indicating that metal ion leaching from the steel alloy is significantly intensified within this pH range.



*Figure 1: The effect of pH decrease (red) on Mn<sup>2+</sup> leaching from bioreactor A (green)*

Increasing the buffer concentration from 10 mM to 100 mM had no impact on the extent of Mn<sup>2+</sup> leaching, suggesting that buffer capacity is not a determining factor in the metal ion dissolution mechanism.

**5. We determined that the effect of manganese ions is time-dependent and significantly influences citric acid production only in the initial phase of fermentation.**

Experimental results showed that Mn<sup>2+</sup> supplementation had a significant impact on citric acid production, particularly during the

early stages of fermentation. The  $Y_{p/s}$  values gradually increased over time, with the highest values recorded at 172 hours.

Among the initial  $Mn^{2+}$  concentrations tested, 5  $\mu\text{g/L}$  and 30  $\mu\text{g/L}$  exhibited similar effects, whereas the addition of 100  $\mu\text{g/L}$  significantly reduced the molar yield of citric acid during the early phase of fermentation ( $p < 0.05$ ). This suggests that excessively high  $Mn^{2+}$  concentrations inhibit optimal metabolic processes, likely inducing enzymatic and cellular changes unfavorable for citric acid production.

In contrast,  $Mn^{2+}$  supplementation at later time points (120 and 172 hours) did not result in statistically significant differences in citric acid yield ( $p > 0.05$ ), confirming that the negative impact of  $Mn^{2+}$  is restricted to the early phase of fermentation.

Regarding biomass formation, the observed changes were less pronounced, and  $Mn^{2+}$  supplementation at different time points did not consistently lead to statistically significant differences.

## **6. We determined that the *cexA*-overexpressing strain is more resistant to $Mn^{2+}$ than the ATCC 1015 parent strain.**

We found that the presence and concentration of  $Mn^{2+}$  differentially affect citric acid molar yield. The *cexA*-overexpressing strain exhibited higher tolerance to  $Mn^{2+}$  than the ATCC 1015 strain. In the presence of 100  $\mu\text{g/L}$   $Mn^{2+}$ , citric acid production in the ATCC

1015 strain dropped significantly, reaching a final concentration of only 1.51 g/L. In contrast, under the same conditions, the *cexA*-overexpressing strain produced 36.83 g/L of citric acid, representing a 24.39-fold higher yield. Biomass concentration remained similar for both strains.

Under  $Mn^{2+}$ -limited conditions, the ATCC 1015 strain reached a final citric acid concentration of 107.22 g/L, while the *cexA*-overexpressing strain achieved a volumetric yield of 117.69 g/L. This indicates that *cexA* overexpression provides a measurable advantage even in the absence of  $Mn^{2+}$ .

## 5. Summary

During my doctoral research, we extensively investigated the extent and impact of  $Mn^{2+}$  leaching and 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*.

We confirmed that  $Mn^{2+}$  leaching depends on pH and the applied sterilization method. We determined that leaching intensifies below pH 2.0 and accelerates significantly at pH 1.4. We demonstrated that the *A. niger* NRRL 2270 strain does not contribute to  $Mn^{2+}$  leaching, as the phenomenon occurred similarly in cell-free phosphate buffer. Increasing the phosphate concentration (from 10 mM to 100 mM) did not enhance  $Mn^{2+}$  leaching, indicating that phosphate plays a minimal role in the process.

Our study was the first to apply empty-steam sterilization for metal ion removal in citric acid fermentation. The procedure almost completely prevented the early  $Mn^{2+}$  surge, minimizing its negative impact on citric acid production. However,  $Mn^{2+}$  leaching remained unchanged after inoculation, highlighting the importance of bioreactor material quality in reducing corrosion and metal dissolution.

We demonstrated that the absence of  $Mn^{2+}$  is critical for citric acid overproduction only during the first 48 hours of fermentation. In bioreactor A, after 168 hours,  $Mn^{2+}$  concentration exceeded 5  $\mu\text{g/L}$  and reached 30  $\mu\text{g/L}$  by the end of fermentation, yet this did not reduce

citric acid production. Manganese supplementation experiments confirmed that high  $Mn^{2+}$  concentrations significantly reduced citric acid yield and increased biomass formation during the early fermentation phase, whereas their effect diminished in later stages. Thus, the impact of  $Mn^{2+}$  is time-dependent.

The *cexA*-overexpressing strain exhibited higher citric acid yield even in the presence of  $Mn^{2+}$ . While the wild-type strain produced only 1.5 g/L citric acid at an initial  $Mn^{2+}$  concentration of 100  $\mu\text{g/L}$  and 107.2 g/L in  $Mn^{2+}$  limited conditions, the *cexA*-overexpressing strain produced 36.8 g/L citric acid under  $Mn^{2+}$ -rich conditions and 117.7 g/L in a  $Mn^{2+}$  limited environment (Table 2.). Furthermore, the *cexA*-overexpressing strain exhibited a higher glucose uptake rate, which also contributed to the increased citric acid yield.

	<i>A. niger</i>					
	NRRL 2270		ATCC 1015		cE <i>cexA</i>	
	$Mn^{2+}$ limited	100 $\mu\text{g/L}$ $Mn^{2+}$	$Mn^{2+}$ limited	100 $\mu\text{g/L}$ $Mn^{2+}$	$Mn^{2+}$ limited	100 $\mu\text{g/L}$ $Mn^{2+}$
<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>

Table 2: Summary of Fermentation Results of Different *A. niger* Strains

Our results suggest that once *A. niger* initiates citric acid overproduction under specific fermentation conditions, the process continues despite changing environmental conditions in the bioreactor. As fermentation progresses, one of the most critical parameters—the initially high D-glucose concentration—gradually decreases, yet this does not affect the sugar-to-acid conversion rate. Therefore, we hypothesize that the genes involved in the response to  $\text{Mn}^{2+}$  deficiency are expressed during the very early phase of fermentation.

## 6. References

- Angumeenal, A. R., & Venkappayya, D. (2013). An overview of citric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, 367-370.
- Brown, C. S. (2007). *Big history: from the Big Bang to the present*. United States of America: The New Press.
- 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.
- Cortês, 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.
- 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, 7(10), 808.
- 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.
- Fischer, W. W., Hemp, J., & Johnson, J. E. (2015). Manganese and the Evolution of Photosynthesis. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 351–357.

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.

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.

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.

Shackelford, J. F., & Alexander, W. (2001). *The CRC materials science and engineering handbook*. Boca Raton: CRC Press.

Sicard, D., & Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus. Biologies*, 334(3), 229-236.

Umo, H. E. (1997). The economic importance of microorganism in food processing. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 1-6.



Registry number: DEENK/57/2025.PL  
Subject: PHD Publication List

Candidate: Vivien Biró

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10069159

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. Reinfurt, A., Fritsche, S., **Biró, V.**, Márton, A., Ellena, V., Fekete, E., Karaffa, E. M., Karaffa, L., Steiger, M. G.: Manganese(II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger*.  
*Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1-11, 2023. EISSN: 2296-4185.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2023.1292337>  
IF: 4.3
2. Fekete, E., **Biró, V.**, Márton, A., Bakondi-Kovács, I., Németh, Z., Karaffa, E. M., Kovács, B., Fábrián, I., Kubicek, C. P., Tsang, A., Karaffa, L.: Bioreactor as the root cause of the "manganese effect" during *Aspergillus niger* citric acid fermentations.  
*Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 1-12, 2022. EISSN: 2296-4185.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.935902>  
IF: 5.7

### List of other publications

#### Foreign language scientific articles in international journals (5)

3. Fekete, E., **Biró, V.**, Márton, A., Bakondi-Kovács, I., Karaffa, E. M., Kovács, B., Geoffron, N., Tsang, A., Kubicek, C. P., Karaffa, L.: Transcriptomics identify the triggering of citrate export as the key event caused by manganese deficiency in.  
*Microbiol. Spectr.* -, 1-18, 2024. ISSN: 2165-0497.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01906-24>  
IF: 3.7 (2023)
4. Flippi, M., Márton, A., **Biró, V.**, Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Generation, Transfer, and Loss of Alternative Oxidase Paralogues in the Aspergillaceae Family.  
*J. Fungi.* 9 (12), 1-18, 2023. EISSN: 2309-608X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9121195>  
IF: 4.2





5. Flippi, M., Márton, A., **Biró, V.**, Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Mutations in the Second Alternative Oxidase Gene: A New Approach to Group *Aspergillus niger* Strains.  
*J. Fungi*. 9 (5), 1-17, 2023. EISSN: 2309-608X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9050570>  
IF: 4.2
6. Karaffa, E. M., Kolláth, I. S., Fekete, E., **Biró, V.**, Flippi, M., Kovács, B., Kubicek, C. P., Karaffa, L.: Carbon-source dependent interplay of copper and manganese ions modulates the morphology and itaconic acid production in *Aspergillus terreus*.  
*Front. Microbiol.* 12, 1-14, 2021. EISSN: 1664-302X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.680420>  
IF: 6.064
7. Szabó, M., **Biró, V.**, Simon, F., Fábán, I.: The decomposition of N-chloro amino acids of essential branched-chain amino acids: kinetics and mechanism.  
*J. Hazard. Mater.* 382, 1-8, 2020. ISSN: 0304-3894.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120988>  
IF: 10.588

Total IF of journals (all publications): 38,752

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 10

The Candidate's publication data submitted to the Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

17 February, 2025

