



1949

***Aspergillus terreus* itakonsav fermentáció: az élettan és a
technológia kapcsolódási pontjai**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Kolláth István Sándor

Témavezető: Dr. Karaffa Levente

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai
Doktori Tanács Kémia Tudományok Doktori Iskola K/5 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, 202.....

.....

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy Kolláth István Sándor doktorjelölt 2016- 2021 között a
fent megnevezett Doktori Iskola K/5 programjának keretében
irányítással 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, 202.....

.....

a témavezető aláírása

***Aspergillus terreus* itakonsav fermentáció: az élettan és a technológia kapcsolódási pontjai**

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

Írta: Kolláth István Sándor okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok doktori iskolája
(K/5 programja) keretében

Témavezető: Dr. Karaffa Levente

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20.....

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi előzmények.....	3
2.1 Az itakonsav	3
2.2 <i>Aspergillus terreus</i>	4
2.3 Itakonsav bioszintézise <i>A. terreus</i> fonalas gombában.....	6
2.3.1 Bioszintézis D-glükózból kiindulva	6
2.3.2 Bioszintézis D-xilózból kiindulva.....	8
2.4 Az <i>A. terreus</i> itakonsav túltermelő táptalajainak tápanyag összetételi követelményei.....	11
2.4.1 Szénforrás.....	11
2.4.2 Nitrogénforrás, foszfát tartalom, és egyéb sók.....	13
2.4.3 Nyomelemek	14
2.5 Az <i>A. terreus</i> itakonsav fermentációinak technológiai paraméterei	15
2.5.1 Bioreaktorok.....	15
2.5.2 Kevertetés, levegőztetés	19
2.5.3 Kémhatás	21
3. Anyagok és módszerek.....	24
3.1 Alkalmazott törzs és törzsfenntartás	24

3.2 Mangán limitált környezet létrehozása	25
3.3 Fermentációk	26
3.3.1 Termelői táptalaj	26
3.3.2 Rázatot lombikos fermentációk.....	27
3.4 Analitikai módszerek.....	28
3.4.1 Mintaelőkészítés.....	28
3.4.2 Szénforrások és az itakonsav koncentrációjának meghatározása	28
3.4.3 Mangán- és rézionok koncentrációjának meghatározása	29
3.4.4 Száraz sejtömeg meghatározás.....	30
3.4.5 Morfológia vizsgálata.....	30
3.5 Számítások	31
3.6 Reprodukтивitás	32
4. Eredmények.....	33
4.1 Itakonsav túltermelésének vizsgálata D-xilóz szénforráson	33
4.1.1 Itakonsav fermentációk mangán érzékenységnek vizsgálata ..	33
4.1.2 Kezdeti szénforrás koncentráció hatásának vizsgálata.....	37
4.2 Stratégiák a mangán inhibíció kivédésére	42
4.2.1 Foszfát koncentráció hatása	43
4.2.2 Fermentlében található mangánionok ellensúlyozása rézionokkal	52

5. Eredmények értékelése.....	71
6. Összefoglalás.....	80
7. Summary	85
8. Köszönetnyilvánítás	89
9. Irodalomjegyzék.....	91
10. Függelék	100

1. Bevezetés

Az itakonsav elsődlegesen biotechnológiai úton előállított szerves sav, amelyet legnagyobb mennyiségben az *Aspergillus terreus* fonalas gomba sülyesztett fermentációjával állítanak elő [1]. Ipari termelése már 1940-es években megkezdődött [2]. Felhasználása a múltban is igen széles palettán mozgott: detergensektől kezdve, gyanták, festékek, lakkok alapanyagaként is hasznosították, de a lehetőségek napjainkban is folyamatosan bővülnek (akril üvegek, mesterséges fogzománc, gyógyszer hatóanyag carrier) [3]. Az itakonsavra alapozó ipari termelés azonban csak, akkor lehetne igazán sikeres, amennyiben az itakonsav jelenlegi előállítási költségei tovább csökkennének [4]. Számos tanulmány ezért az elérhető hozamok maximalizálását, valamint alternatív, olcsóbb szénforrás felkutatását célozza meg [5-7].

Doktori kutatásom során elsődleges célkitűzés volt D-xilóz és D-glükóz alapú fermentációk összehasonlítása az itakonsav termeltetése szempontjából. A D-glükóz alapú fermentációk szénforrás gradienstől függő itakonsav hozama és extrém mangánérzékenysége éppen doktori kutatómunkám megkezdése előtt került felfedésre, ezt a kutatást szerettem volna kiterjeszteni D-xilózra. A D-xilózt modellvegyületként kívántam alkalmazni. Távlati cél az itakonsav olcsóbb, növényi biomassza alapú termeltetése.

További célkitűzés a fermentációs táptalaj komponenseinek manipulálása a mangán negatív hatásainak visszaszorításának érdekében. Szakirodalmi előzmények alapján, elsősorban a termelő táptalaj foszfát

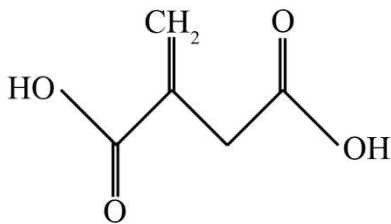
koncentrációjának [8], valamint Cu(II)-ion tartalmának változtatásával nyílik esély arra [9], hogy Mn(II)-ionok jelenlétének negatív hatásait csökkentsük. Kísérletek tervezésekor sokszor nagyon hasznos támasznak számított, a már sokkal jobban körüljárt, *Aspergillus niger* citromsav túltermelésének tanulmányozása, amely rokon fajnak és „testvér fermentációnak” tekinthető. Kísérleteinket első lépésben rázatott lombikos fermentációk formájában végeztük el, majd az optimális paraméterek beállítása után laboratóriumi fermentorokban.

Kutatásunk során mindig kitüntetett figyelmet szenteltünk a gombák morfológiájának tanulmányozására. Noha korábban több publikáció rávilágított, mennyire fontos összefüggés állítható fel az *A. terreus* morfológiája és a süllyesztett fermentáció itakonsav hozama között [10, 11], ennek ellenére a mai napig viszonylag kevés információ áll a témából rendelkezésünkre.

2. Irodalmi előzmények

2.1 Az itakonsav

Az itakonsav (2-metilén butándisav) egy konjugált kettőskötéssel rendelkező dikarbonsav, szobahőmérsékleten fehér színű kristályos anyag. Olvadáspontja 168°C, forráspontja 268°C. 20°C-on vízdoldékonysága 83 g/l. Savi disszociációs állandói rendre: 3,84 és 5,55 [12].



1. ábra Itakonsav szerkezeti képlete

Az első itakonsavval kapcsolatos feljegyzés 1837-ből származik, ahol a citromsav termikus bomlástermékeként írják le [13]. Későbbiekben egy ozmotoleráns, fonalas gombafaj

fermentációs termékeként is azonosítják, az előállító mikroorganizmust pedig *Aspergillus itaconicus*-nak nevezik el [14]. Konjugált kettőskötésének köszönhetően igen reaktív vegyület, főként észter származékai révén felhasználása széleskörű. Leggyakrabban szintetikusgyanták, lakkok, bevonatok készülnek belőle, valamint a poliitakonát származékának sóit az iparban korábban detergensként is alkalmazták [1]. Az itakonsav iránti növekvő igény kielégítése végett az amerikai Northern Regional Research Laboratory grandiózus izolálási projektbe kezdett egy megfelelőbb termelő organizmus megtalálásának reményében. Végül a több mint háromszáz megvizsgált törzs közül az *Aspergillus terreus* NRRL 1960-ot találták a legígéretesebbnek, amely a jelenleg is leggyakrabban alkalmazott ipari itakonsavtermelő törzs [12]. Gyakorlatilag a második

világháború végéig ki is dolgozták az itakonsav süllyesztett fermentációs előállítási technológiáját [2], és megkezdődött az itakonsav ipari léptékű termelése. Az itakonsav ugyan kémiai úton is szintetizálható, viszont biotechnológiai előállítása máig gazdaságosabb [4].

Az itakonsav piaca még elmarad az abszolút vezető citromsavétól, amely egy szintén biotechnológiai eljárással termeltetett szerves sav. Becslések szerint jelenleg 80000 tonna itakonsavat állítanak elő évente, 1 kg itakonsav ára 1,8-2 USD között ingadozik, a termék minőségétől, és tisztaságától függően [4, 15]. Ennek ellenére üzleti szempontból is rengeteg potenciál rejlik az itakonsavban. 2004-ben az Amerikai Egyesült Államok energetikáért felelős kormányügynöksége bevásárolta a 12 „legígéretesebb biológiai alapú kémiai építőegység” közé [16]. Azonban a tényleges áttöréshez az itakonsav előállítási költségét tovább kell csökkenteni. Számítások alapján, ha a poliitakonát jelenlegi 3 USD/kg előállítási költséget 1,5 USD/kg-ra sikerülne redukálni, akkor az itakonsav kiválthatná a petrokémiai alapú poliakrilsavat [4]. Ennek érdekében, viszont új stratégiák kidolgozása és tesztelése szükséges.

2.2 Aspergillus terreus

Az *Aspergillus terreus* egy fonalas tömlősgomba, azaz aszkomikóta. Ezen belül az *Eurotiomycetes* osztályhoz és az *Aspergillus* nemzetséghez tartozik. Az *Aspergillus* nemzetség tagjai a világ szinte minden táján megtalálhatóak [17]. Leírhatatlanul fontos szerepet vállalnak a szerves anyagok körforgásában, mivel széles palettájú enzim expressziójuknak köszönhetően a növényi lignocellulóz biomasszát effektíven bontják, más élőlények számára is könnyen felhasználható

monomerekké [18]. Néhány fajuk meghatározó szerepet tölt be a biotechnológiában, mint például a citromsav túltermelő *A. niger*, a koji típusú fermentációkért „felelős” *A. oryzae*, vagy a fejezet címében szereplő *A. terreus*, amely itakonsav mellett lovasztatin termelésre is alkalmazható [19]. Másrészről jelentős károkat képesek okozni mezőgazdaságban toxintermelésük által, illetve állat- és humán patogének is lehetnek [20].

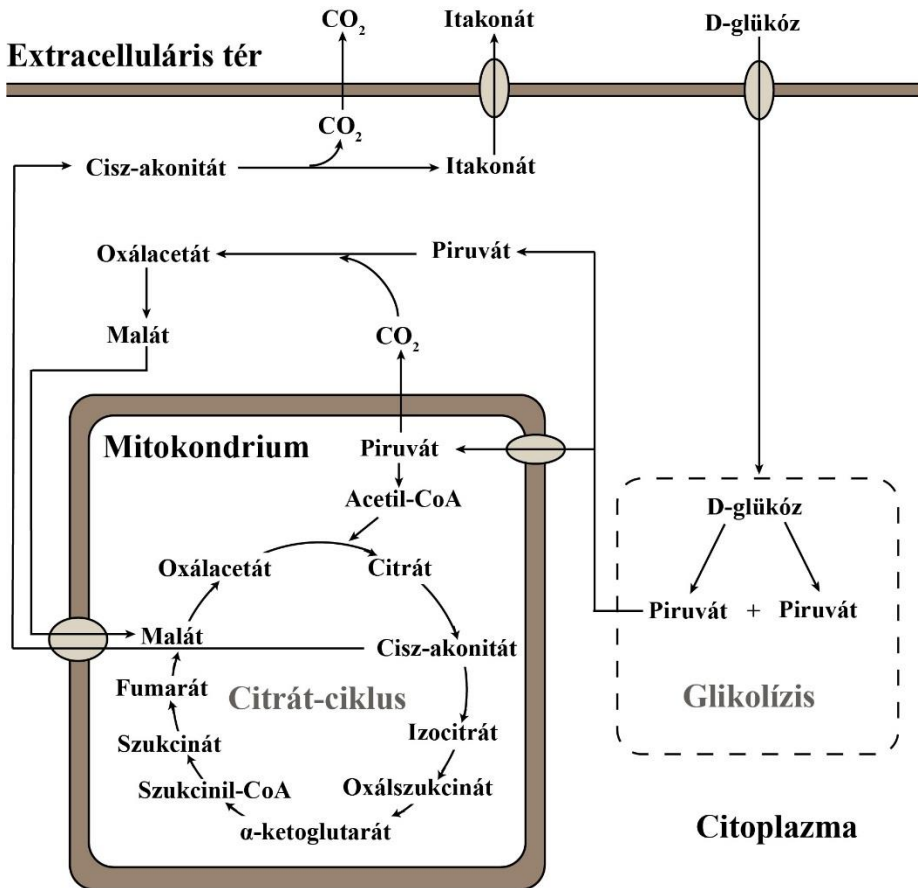
Az *A. terreus* szaprofita életmódot folytató mezofil gomba, 35-40°C közé tehető növekedési optimummal, ezért a trópusi, szubtrópusi és mérsékelt övezetben egyaránt fellelhető. Rendkívül ozmotoleráns, gyakorta sós mocsarakban és tengerparti homokban is megtalálható [21]. Fehér színű micéliumot képez és jellemzően aszexuális módon, konídiospórák segítségével szaporodik [22]. Spórái fahéjra emlékeztető színárnyalatot vesznek fel (**2. ábra**).



2. ábra *A. terreus* fénymikroszkópos felvétele folyékony tápközegben (balra), és növekvő telepe szilárd táptalajon (jobbra).

2.3 Itakonsav bioszintézise *A. terreus* fonalas gombában

2.3.1 Bioszintézis D-glükózból kiindulva



3. ábra Itakonsav bioszintézis vázlatos rajza *A. terreus* fonalas gombában, D-glükóz szénforrásból kiindulva.

Kinoshita feljegyzéseiben szerepel először az itakonsav fonalas gomba általi termelődése. Kinoshita feltételezése szerint a betáplált glükóz piruváttá alakul, majd valamilyen úton, később a piruvátból keletkezik az

itakonsav [14]. Bentley és Thiessen radioaktív izotópos kísérleteik alapján be is bizonyították, hogy az itakonsav valóban a glikolízis és citromsav-ciklus reakciói során keletkezik, de egy további enzim, a cisz-akonitát dekarboxiláz katalitikus hatása is szükséges az itakonsav szintéziséhez [23].

A glükóz tehát a citoplazmába transzportálódva belép a glikolízisbe (Embden–Meyerhof–Parnas útvonal) és a folyamat végére 1 mol glükóz, 2 mol piruváttá bomlik. Ezt követően, elméletben kettéválaszthatjuk a két piruvát sorsát. Az egyik molekula a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex oxidatív dekarboxilezése révén acetil-CoA-vá alakul, miközben egy mol CO₂ felszabadul [24]. Az acetil-CoA pedig a citromsav-cikluson belül, citrát-szintáz enzim katalizálta oxálacetát addíciójával citráttá alakul. Következő lépésben, az akonitáz enzim segítségével vízkilépéssel kialakul a cisz-akonitát intermedier [24].

Mi történik közben az elméletben elválasztott másik piruváttal? Az *A. niger* általi citromsav túltermelés vizsgálatakor Cleland és Johnson megállapította, hogy *A. niger* esetében a citoszólban is jelenlévő piruvát-karboxiláz enzim CO₂ megkötésével oxálacetátot generál [25]. Így tulajdonképpen a mitokondriumban acetil-CoA képződésekor elveszített CO₂ itt „visszanyerhető”. A két kutatóról elnevezett, anaplerotikus reakció elemi fontosságú, hiszen e nélkül nem lehetne elérni igazán magas hozamkonstansokat. A képződött oxálacetát pedig a citoszólban is jelenlévő malát-dehidrogenáz enzim működése által maláttá alakul, így tulajdonképpen a malát tekinthető a glikolízis végtermékének [26].

Hasonló séma lejátszódását Bonnarne és munkatársai is igazolták *A. terreus* itakonsav túltermelése során [27].

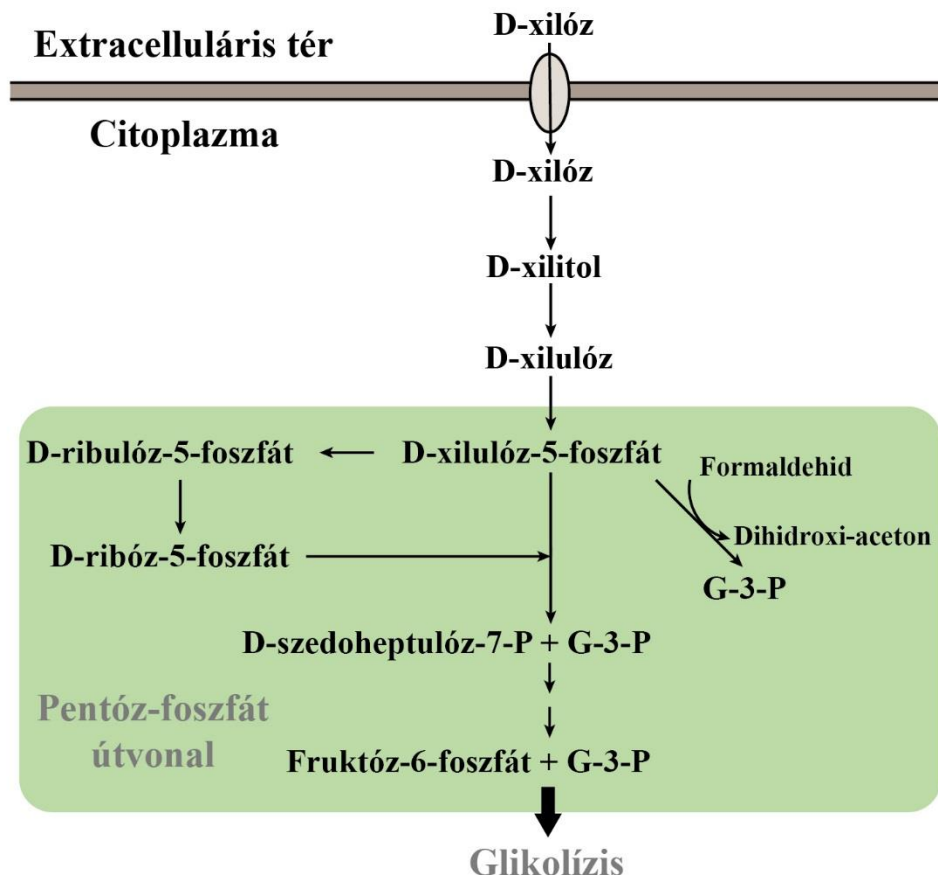
A citromsav-ciklusban keletkezett *cisz*-akonitát és a citoszólban képződött malát vélhetően egy mitokondriális antiporter segítségével „helyet cserél”, bár a pontos mechanizmus egyelőre még feltáratlan [28, 29]. A citoszólba kijutott *cisz*-akonitát, a *cisz*-akonitát-dekarboxiláz enzim katalizálásával dekarboxileződik, itakonát és széndioxid termékeket eredményezve [23]. Az itt felszabaduló CO₂ fixálódása már nem egyértelmű. Elméleti lehetőség adott mindkét felszabaduló CO₂ molekula visszanyerésére, viszont a citoszólban esetlegesen fellépő NADH kofaktor hiány megakaszthatja az oxálacetát további konverzióját malát irányába. [15]. Az itakonsav szintézis lezárásaként egy feltételezett itakonát transzporter teszi lehetővé a végtermék extracelluláris térbe való juttatását [28]. Fontos megjegyezni, hogy mind a piruvát-karboxiláz, mind a *cisz*-akonitát-dekarboxiláz aktivitása a citoszólban lokalizálódik *A. terreus*-ban [29].

2.3.2 Bioszintézis D-xilózból kiindulva

A D-xilóz nem csak szénhidrátkémiaiilag eltérő a D-glükóztól, de eltérő biokémiai útvonalon is hasznosul [30]. A citoplazmába transzportálódott D-xilóz molekula először oxido-reduktív reakciókon esik át xilulóz-5-foszfát képződése közben [30]. A xilulóz-5-foszfát bekapcsolódik a pentóz-foszfát útvonal reakcióiba, majd a későbbiek során keletkezett termékek beléphetnek a glikolízisbe [31].

Baktériumokkal ellentétben, az *Aspergillus* fajok a xilózt két lépésben metabolizálják xilulózzá. Először a NADPH függő xilóz redukáz segítségével D-xilitol keletkezik, majd a NAD⁺ dependens xilitol-dehidrogenáz katalizálta oxidáció következtében D-xilulóz terméket kapunk [32]. Ez a két lépés könnyen kofaktor egyensúly eltolódást eredményezhet, főként, ha a sejtek oxigénellátottsága valamilyen oknál fogva limitálódik [32]. A következő lépésben xilulokináz foszforilálja a xilulózt, D-xilulóz-5-foszfátot eredményezve. A xilulóz-5-foszfát pedig beléphet a pentóz-foszfát útvonal reakcióiba [33]. A D-xilulóz-5-foszfát molekulák egy része ribulóz-foszfát-3 epimeráz enzim katalizálta epimerizációs reakcióban D-ribulóz-5-foszfáttá alakul, amelyből egy további enzim katalizálta izomerizációs reakcióban D-ribóz-5-foszfát képződik. Ezt követően a D-ribóz-5-foszfát és a D-xilulóz-5-foszfát beléphet a transzaldoláz, és transzketoláz enzimek katalizálta reakciókba, végül fruktóz-6-foszfátot és gliceraldehid-3-foszfátot eredményezve [33, 34]. Ezek a termékek pedig egyben a glikolízis köztesei is, így a

metabolizmus további lépései itakonsav irányába, az előző fejezetben tárgyaltaknak megfelelően alakulnak.



4. ábra D-xilóz metabolizmus vázlatos rajza *A. terreus* fonalas gombában. G-3-P: gliceraldehid-3-foszfát.

Megjegyzendő, hogy xilulóz-5-foszfátból leágazva egy további transzketoláz enzim által egy alternatív útvonal is létrejöhet. A dihidroxi-aceton-szintáz a xilulóz-5-foszfátot és formaldehidet gliceraldehid-3-foszfáttá és dihidroxi-acetonná konvertálja [33].

2.4 Az *A. terreus* itakonsav túltermelő táptalajainak tápanyag összetételi követelményei

2.4.1 Szénforrás

Az *A. terreus* számos szénforráson képes növekedni és jelentős hányadukat képes itakonsavvá konvertálni [35-37]. Korai kutatások kimutatták, hogy legnagyobb hozamkonstanssal szacharózon és D-glükózon képes termelni, majd egy nagyobb eséssel a D-xilóz következik [38]. Nem meglepő módon az első ipari jelentések is szacharózt, vagy glükózt javasolnak fermentációs szénforrásnak [39, 40].

A magas hozamok és a megfelelő produktivitási ráta elérése érdekében tehát kulcsfontosságú a gyorsan hasznosuló szénforrások használata. Ezek közül is kiemelkedik a glükóz és a szacharóz. A betáplált szénforrás kiindulási koncentrációja is szignifikáns faktor. Glükóz esetében jellemzően 100 g/l fölötti érték [15]. Ennek oka, hogy a kezdeti kiindulási glükóz koncentráció és a hozam között nem állítható fel egyenes arányosság. 100 g/l fölött jelentősen megemelkednek a hozamok, valamint a 80% fölötti moláris konverziók csak ebben az esetben érhetőek el [41]. A jelenség hátterében állhat a piruvát-karboxiláz működésének stimulálása magasabb szénforrás koncentrációk esetén [42]. Másik lehetséges ok egy, az *A. niger*-hez hasonló alacsony affinitású glükóz-transzporter jelenléte, amely csak magas glükóz koncentrációk esetén aktív, de ekkor valószínűleg elárasztja a sejteket glükózzal [43].

A szacharóz glükopiranozból és fruktopiranozból álló diszacharid. Az *Aspergillus* fajok is rendelkeznek a hidrolíziséhez szükséges β -D-

fruktofuranozid-fruktohidroláz enzimmel [33], továbbá a szerves savas fermentációk jellemzően igen alacsony kémhatáson zajlanak, így gyakran a szacharóz enzim nélküli hidrolízise is bekövetkezik. A szacharózt alkotó mindkét monomer azonnal be tud kapcsolódni a glikolízisbe, ezért a glükózra leírtak gyakorlatilag rá is érvényesek.

Analitikai tisztaságú szénhidrátok használata ipari léptékben azonban közel sem lenne költséghatékony. Itakonsavas fermentációknál többnyire a cukorgyártásból visszamaradó melaszt alkalmazzák, amely még a fermentációs folyamat előtt több kezelésem is átesik [44]. A melasz fő szénhidrát komponense pedig a szacharóz.

Az itakonsavas kutatások mai trendjét figyelembe véve a legnagyobb érdeklődést az alternatív fermentációs szénforrások felkutatása váltja ki. Ezekkel a szénforrásokkal szemben állított alapvető kritériumok: a fermentációs felhasználásuk lehetőleg ne legyen kompetitív az élelmiszeripari felhasználásukkal, nagy mennyiségben legyenek elérhetőek, olcsók és megújulóak legyenek [45]. Egyes esetekben különböző, már a piac által visszautasított zöldségek és gyümölcsök hidrolizátumait vizsgálták [46, 47], mint fermentációs szénforrásokat. Másrésztől egyéb mezőgazdasági és erdészeti hulladékok biomasszájának hidrolizátumait is tanulmányozták [48]. Az elmúlt években leginkább a növényi hidrolizátumokat utánozva monoszacharidok megfelelő arányú keverékét használták, ezzel modellezve a fermentációk viselkedését [37, 49].

2.4.2 Nitrogénforrás, foszfát tartalom, és egyéb sók

Szénforrástól függetlenül, az *A. terreus* itakonsav fermentációihoz, általában szervesetlen sók formájában biztosítják a nitrogénforrást. Többségében ez alatt különböző ammóniumsókat kell érteni, leggyakrabban ammónium-nitrátot [2, 50, 51]. Ebben az esetben a betáplált só mindkét ionját, tehát az ammónium- és a nitrátiont is képes a gomba nitrogénforrásként hasznosítani. Második leggyakrabban alkalmazott só az ammónium-szulfát [52, 53]. Ezeket a sókat jellemzően 1,5-3 g/l tartományban alkalmazzák. Komplex szénforrások, melaszok használatakor azonban előfordul, hogy nem adagolnak külön nitrogénforrást a táptalajhoz [44].

Az *A. terreus* itakonsav túltermelő táptalajainak szükséges foszfát koncentrációja szülte talán a legtöbb kérdést és ellentmondást az elmúlt években. Régebbi források egyértelműen a foszfát limitáció mellett foglalnak állást [53-55], ami 0,1 g/l körüli KH_2PO_4 koncentrációt jelent. Egy 2014-ben közölt mikrotiter plate-s kísérleteken alapuló publikáció, az itakonsav hozamának növekedését a KH_2PO_4 koncentráció 0,1 g/l-ről 0,8 g/l-re való emelésével hozta összefüggésbe [8]. 2014 és 2018 között a kutatók egy része ezzel az új optimalizált értékkel dolgozott [49, 56, 57]. Ezzel ellentétben, a legfrissebb tanulmányok ismét a foszfát koncentráció minimalizálása mellett tették le voksukat [58, 59].

További, szinte minden *A. terreus* táptalajban megtalálható só a MgSO_4 . 0,5-3 g/l koncentrációban szokták bemérni a magnézium-szulfát szárított, vagy éppen kristályvizes sóját. A magnéziumionok

elengedhetetlenek a megfelelő DNS szintézishez, valamint rengeteg enzim kofaktorai is egyben.

Egészen az 1990-es évekig kevés feljegyzés említi meg a kalcium-sók használatát. 1995-ben viszont Gyamerah bemutatja, hogy CaSO_4 só, vagy azzal egyenértékű hevített gipsz hozzáadásával mind a hozam, mind a produktivitás ötszörösére emelkedik [10]. Ezenfelül feljegyzi, hogy CaSO_4 hozzáadása nélkül a tenyészet hatalmas, 0,5-2 mm átmérőjű pelleteket képez, amelyek a termelés csökkenését eredményezik [10]. Nem sokkal később Welter doktori értekezésében dokumentálja, hogy minimális kalcium-só jelentében a tenyészet fonalas morfológiát vesz fel, amíg 10 g/l-re emelt a CaCl_2 koncentráció az apró pelletek képződését indukálta [60]. A mai táptalajokban 5 g/l körüli értéket használnak [51].

2.4.3 Nyomelemek

Leggyakoribb, hozzáadott nyomelemek a cink-, réz- és vasionok. Korai feljegyzések ugyan megemlítik, hogy 15 mg/l fölötti Fe^{2+} jelenléte kifejezetten negatívan hat az itakonsav termelődésére [40, 61], viszont vas hiányában az akonitáz enzim elvesztheti aktivitását [62]. Ennek függvényében, vas hozzáadása a táptalajhoz szükséges, de mindenképpen limitálni kell annak koncentrációját.

A legfontosabb nyomelem, amelyől elkerülhetetlenül szót kell ejtenünk, az a mangán. Az *A. niger* citromsav túltermelése során már több mint fél évszázada leírták a mangán ionok jelenlétének káros hatásait [63], ezzel szemben az itakonsavnál sokáig célzott kutatás nem tárta fel a mangánionok lehetséges szerepét. Végül 2015-ben egyértelműen

beigazolódott, hogy az *A. terreus* itakonsav túltermelése során éppen annyira káros a mangánionok jelenléte, mint *A. niger* citromsav termeltetése során [41]. Már 5 µg/l Mn(II)-ion jelenléte szignifikánsan csökkenti az itakonsav hozamát, valamint ekkor a gomba morfológiája is megváltozik. Teljes mangán limitáció (< 3 µg/l) esetén az *A. terreus* apró, duzzadt hifákból álló pelleteket alkot, amíg ennél magasabb mangán koncentrációnál klasszikus fonalas gomba morfológiát mutat, hosszú vékony hifákkal [41]. Az apró, pelletes morfológia alapvetően kedvezőbb reológiai tulajdonságokat kölcsönöz a fermentlének, így megkönnyítve a kevertetés és levegőztetés folyamatát [64].

Láthatjuk tehát, hogy rendkívül alacsony koncentrációban jelenlévő mangán is képes megakasztani az itakonsav túltermelés folyamatát, ezért jelenleg is számos tanulmány célpontja a „mangán hatás” enyhítése vagy kikerülése.

2.5 Az *A. terreus* itakonsav fermentációinak technológiai paraméterei

2.5.1 Bioreaktorok

Ipari léptékben, az 1940-es évektől kezdve napjainkig kevert tankreaktorok (Stirred Tank Reactor, vagy STR) segítségével termeltetik az itakonsavat [15]. Laboratóriumi körülmények között több, egyéb típusú reaktort is kipróbáltak (**1. táblázat**). Sok kutató immobilizált *A. terreus* sejtekkel ismételt batch fermentációkat végzett el, de ezeknek hozama és itakonsav titere rendre elmaradt a várakozásoktól [45]. Sokáig kecsegtető megoldásnak tűnt az air lift bioreaktorok használata. Ennél a kialakításnál ugyanis nincs keverőelem, maguk a befúvónyílásokból kilépő, és a reaktoron végighaladó buborékok, illetve a torlók oldják meg a kevertetést.

Hatalmas előnye, hogy nem igényel tömszelencét, így csökken a befertőződés esélye, valamint a kevertetés energiája is részben megtakarítható [65]. Okabe és munkatársai kiszámították, hogy air lift reaktor esetén kevesebb energiabefektetéssel magasabb produktivítás érhető el, STR reaktorhoz viszonyítva [1]. Későbbiek során, azonban mégis a kevert tankreaktorok maradtak az itakonsav, szinte kizárólagos előállító eszközei, precíz szabályozhatóságuknak köszönhetően (**1. táblázat**).

1. táblázat *A. terreus* itakonsavas fermentációja különböző bioreaktorokban.*immobilizált sejtes fermentáció.

Reaktor típusa	Fermentáció típusa	Térfogat (l)	Szénforrás	Moláris hozam ($Y_{p/s}$)	Maximális IA mennyiség (g/l)	Átlagos produktivitás (g/l×h)	Forrás
STR	batch	N/A	Szacharóz	0,64	24	0,14	[39]
STR	batch	2270	D-glükóz	0,83	33	0,55	[40]
STR	batch	2	melasz	1,49	85	1,18	[44]
STR	batch	4	Szacharóz	1,52	79,5	0,43	[54]
STR	batch	20	melasz	1,48	36,38	N/A	[66]
STR	batch	3	D-glükóz	0,87	32	0,71	[52]
STR	folytonos	3	D-glükóz	0,36	13	0,32	[52]
STR	batch	14	D-xilóz	0,52	30	0,20	[55]
Porózus lemezes	*im. sejtes batch	1,5	D-glükóz	0,67	24,50	0,17	[67]
Porózus lemezes	*im. sejtes folyt.	1,5	D-glükóz	0,50	18,20	0,73	[67]
air lift	batch	3	D-glükóz	0,67	63	0,66	[68]
air lift	batch	3	kukorica lekvár	0,80	58	0,40	[69]
STR	batch	15	D-glükóz	0,85	85	0,51	[51]
STR	fed-batch	15	D-glükóz	0,78	150	0,64	[56]

A laboratóriumi fermentorok többségének fala boroszilikát üvegből készül, amíg a fedelek és egyéb alkatrészek (mint például a keverőelem, levegő befúvatók, hőcserélők, mintavevők stb.) jellemzően rozsdamentes acélból. A kisüzemi és nagyobb, termelői fermentoroknak értelemszerűen már a fala is rozsdamentes acél [70]. A rozsdamentes acél megnevezés króm tartalmú acélötvözetekre utal. Az ötvözőelemek összetétele és aránya alapján különböző kristályszerkezet lesz jellemző rájuk, ezáltal több csoportra oszthatjuk őket. Vegyiparban és gyógyszeriparban túlnyomóan ausztenites szerkezetű rozsdamentes acélt használnak, azon belül is az 1.4435 EN számú (316L amerikai szabvány jelölés szerint) acélt [70]. 15% fölötti króm tartalmuknak, illetve a molibdén és nikkel ötvözőknek köszönhetően fokozottan korrózióállóak. 2%-os mangán tartalom pedig jelentősen növeli az acél szilárdságát, hőállóságát [71].

2. táblázat Az EN 1.4435 acél elemi összetétele [72].

Elemi összetétel (%)							
C	Mn	Si	Cr	Ni	P	S	Mo
0,03	2	1	16-18	10-14	0,045	0,03	2-3

A bioreaktoroknak extrém körülményekkel is meg kell birkózniuk a fermentációs iparban. Sterilizési művelet során magas hőmérséklettel (120-130°C) és túlnyomással. A szerves savak túltermeltetése eleve alacsony pH értéken zajlik, de itt maga a keletkező termék is savas karakterű. Ezen körülmények között előfordulhat, hogy fémionok oldódnak be a fermentlébe mind üvegfelületről, mind fémfelületről [73]. Williamson és munkatársai vízzel feltöltött, üvegfalú laboratóriumi

fermentor sterilizációkor többek között mangánionok beoldódását is észlelték, amelyek bizonyítottan a fermentor fém alkatrészeiből oldódtak ki [74]. Ugyanezzel a reaktorról végzett 16 napos kultiváció során enyhe, de folyamatos mangánkioldódást tapasztaltak [74]. Ugyan csak néhány $\mu\text{g/l}$ -nyi mangán oldódott be, de korábban láthattuk, hogy ez a csekély mennyiség is a szerves savas fermentáció hozamának csökkenéséhez vezethet.

2.5.2 Kevertetés, levegőztetés

Itakonsav túltermeltetés során a folyamatos és bőséges oxigénellátás biztosítása alapvető kritérium, ennek hiányába nem lehet elérni magas titereket [4]. Már nagyon korai feljegyzések is megemlítik, hogy bármilyen ingadozás a levegőellátásban a hozam csökkenéséhez vezet [40, 61].

Gyamerah rázatott lombikos kísérletei során megállapította, hogy a rázatás 1 perces megállítása még nem okoz termelés-csökkenést, viszont 3 perces leállítás már több mint 10%-al redukálja az itakonsav végső koncentrációját, 5 perces leállítás pedig közel negyedével csökkenti azt [75]. 5 perces leállítás után hozzávetőlegesen 24 órára megszűnik az itakonsav termelődése, és csak ezt követően kezd el újra itakonsavat kiválasztani a gomba. 10 perces leállítás pedig 48 órás intervallumra hosszabbítja meg ezt a jelenséget [75].

Park és munkatársai többek között a keverő kerületi sebességét és az oldott oxigénszintet változtatva tanulmányozták az itakonsav termelődését [76]. Kísérleteik során megállapították, hogy legalább 94,2

cm/s-re kell emelni a sebességet a megfelelő hozam eléréséhez, viszont további emelés nem eredményez magasabb hozamot, sőt az itakonsav végső koncentrációja csökken. Ekkor feltételezhetően a túl magas fordulatszám akkora nyíróerőt fejt ki, ami már károsítja a sejteket. Oldott oxigénszint tekintetében pedig hiába emelték meg a szintet 20%-ról 40-, illetve 60%-ra, az itakonsav hozama nem emelkedett 20%-os szinthez képest [76].

Ugyanez a kutatócsoport air lift reaktorok esetében is vizsgálta a levegőztetés hatását. A befúvók elé fémszitákat szereltek, amelyek tovább aprózták a buborékokat a fermentáléban, így a $k_L a$ az eredeti 130 h^{-1} értékről 2430 h^{-1} -ra nőtt, amely az itakonsav végső koncentrációjának csak minimális növekedését vonta maga után, viszont a produktivitást megduplázta [68]. Ennél a típusú reaktornál is megállapítják, hogy az oldott oxigénszintet érdemes 20% fölött tartani, de 40% fölé nem érdemes emelni, mivel nem eredményezi az itakonsav hozamának további növekedését [77, 78].

Tanszékünk egy korábbi kutatás keretében direkt összefüggést talált az oldott oxigénszint és az itakonsav túltermelés között. Már 2%-os oldott oxigénszint elegendő a maximális biomassza képződéshez, viszont 30%-os szint tartása szükséges a 80% fölötti moláris konverzió eléréséhez [79]. Az oldott oxigénszint további emelése 40%-ra nem eredményezett további javulást. Ezekben a kísérletekben sikerült bebizonyítani a cianid-rezisztens alternatív oxidáz (AOX) szerepét az *A. terreus* itakonsav túltermelése során. Ezen alternatív légzési útvonal működése közben nem alakul ki proton gradiens, így ATP sem keletkezik, indukálódásához magas

oxigéntenzió szükséges [80]. 30% fölötti oldott oxigénszintnél a légzési hányados közel felét a cianid-rezisztens légzés tette ki [79]. Az alternatív oxidáz tekintetében ismét párhuzamra lelünk az *A. terreus* itakonsav termelése, és az *A. niger* citromsav termelése között, ugyanis az utóbbinál is elengedhetetlen annak működése a magas hozamok elérése érdekében [81].

Láthatjuk, hogy az oxigénellátás folyamatosságának szükségessége megkérdőjelezhetetlen, viszont az oldott oxigénszintet csak addig érdemes növelni, amíg aktiválódik az alternatív oxidáz. Az alternatív oxidáz feltételezhetően a szerves savak túltermelésénél jellemző, túlpörgetett metabolizmus során keletkező nagy mennyiségű redukált kofaktor regenerálásban veszi ki szerepét [81].

2.5.3 Kémhatás

Larsen és Eimhjellen korai megfigyelése alapján az *A. terreus* itakonsavas fermentációit alacsony kiindulási pH-ról érdemes indítani. Hipotézisük szerint csak savas közegben alakulnak az itakonsav bioszintéziséhez szükséges enzimek. Amennyiben 2,1-es pH értéken csíráztatták a gomba spóráit, képes volt itakonsavat termelni, még akkor is ha később 6,0-s pH értékű táptalajba mosták át, viszont ezt fordítva elvégezve egyáltalán nem termelődött itakonsav [35]. Ennek megfelelően, bár változó pH értékekről (2,0-5,0), de minden esetben savas tartományból indulnak a fermentációk [44, 50, 53]. Ennél alacsonyabb kiindulási érték már a csírázási folyamat elhúzódáshoz vezet, ami késlelteti az itakonsav megjelenését a fermentáléban [82].

Az esetek többségében egyáltalán nem alkalmaztak pH szabályozást, csak a kiindulási tartományt állították be. Csírázás közben az első 20-30 órában rendre 2,0-ig csökken a pH érték annak ellenére, hogy általában ekkor még nem termelődik itakonsav. Ennek oka a sejtek általi intenzív ammóniumion felvétel [82]. A savtermelődés beindulásakor rendre 1,8 körüli értékre csökken a pH és jellemzően a fermentáció végéig ezen az értéken marad, majd végül enyhe növekedés tapasztalható [83].

Ezzel szemben, egy korai szabadalom megemlíti, hogy a termelődött itakonsav semlegesítése növeli a kihozatalt, de csak akkor, ha előbb hagyjuk természetesen csökkenni a pH-t, majd a CaCO_3 vagy KOH adagolását csak akkor kezdjük el, ha már az itakonsav termelődés beindult [84]. Ezt a direktívát folytatva Hevekerl és munkatársai a pH egyszeri, impulzusszerű megemelésével és folyamatos szabályozásával is kísérleteztek [82]. Már az egyszeri pH állítás is 80 g/l-ről 110 g/l-re emelte az itakonsav végső koncentrációját. Azonban, amennyiben fermentáció kezdetétől fogva 3,0-án tartották a pH értéket, nagyon gyenge itakonsav termelődést tapasztaltak. Az optimumot végül úgy érték el, hogy hagyták a pH-t 2 napig természetesen zuhanni, majd attól a ponttól fogva 3,0-án tartották, ammónium-hidroxid adagolásával, így 146 g/l végső titert értek el [82]. Hipotézisük szerint 3,0-s pH értéken már nem csak itakonsav lesz jelen a fermentáléban, hanem az egyszeresen deprotonált itakonát is, amely nem képes átdiffundálni a sejtmembránon. Egyes elméletek szerint a teljesen protonált szerves savak ezzel szemben képesek bejutni a citoszólba, ahol egyből deprotonálódnak, a sejtnek pedig a protonokat

hatalmas koncentrációval szemben kell kipumpálnia magából, amely energetikailag jelentősen leterheli [48].

Röviden összefoglalva, sikeres itakonsavas fermentációt csak alacsony pH-ról indulva lehet elérni (3,0 körüli kiinduló érték). Általánosságban nincs pH szabályozás a fermentációk során, de láthattuk, hogy precízen megválasztott stratégia emelheti az itakonsav végső titerét, viszont a szabályozást semmiképp sem érdemes elkezdeni amíg 20-40 g/l itakonsav nem jelenik meg a fermentáléban [56, 84].

3. Anyagok és módszerek

3.1 Alkalmazott törzs és törzsfenntartás

Kísérleteink során *Aspergillus terreus* NRRL 1960 (CBS 116.46, ATCC 10020) vad típusú, természetes itakonsav túltermelő törzset alkalmaztunk, amelyet Peter J. Punt professzor laboratóriumából (Microbiology & Systems Biology, TNO, Zeist, Hollandia) kaptunk [41]. Félévente a -80°C-on 50% (v/v) glicerinben és 50% (v/v) spóramosóban (9 g/l NaCl, és 20 csepp/l Tween 80) tárolt spóraszuszpenzióból frissítettük törzsünket, amelyről 5-6 hónapon keresztül vegetatív átoltásokat végeztünk. A törzset CSL+Glü komplex táptalajon (**3. táblázat**) tartottuk fent, átoltást követően 5-7 napra mikrobiológiai inkubátorba helyeztük, ahol 37°C-on inkubáltuk a megfelelő spórázottsági szint eléréséig. A kinőtt telepeket tartalmazó Petri-csészéket inkubálást követően Parafilm-mel lezárva 4°C-os hűtőszobában tároltuk. Az így tárolt telepek legalább havonta átoltásra kerültek.

3. táblázat *A. terreus* CSL+ Glü fenntartó táptalaj összetétele. A D-glükóz előre sterilizált oldat formájában, a többi komponens sterilizése után került hozzáadásra lamináris áramlású steril fülkében.

Komponens	Koncentráció (g/l)
D-glükóz	20
kukoricalekvár	20
NaCl	20
Agar	20
pH= 5	

3.2 Mangán limitált környezet létrehozása

A pozitív töltésű fémionok, kiváltképp a mangánionok eltávolítása végett a desztillált vizet, illetve a tömény cukoroldatokat Dowex 50-W-X8 (100/200) kationcserélő gyantával töltött üvegoszlopon (440x45 mm) keresztül vezettük át, majd később a többi komponenst ezekben az ioncserén átesett vízben/oldatokban oldottuk fel.

A sterilizésre és tárolásra használt Schott-üvegeket, illetve a rázatott lombikos fermentációk során használt Erlenmeyer-lombikokat 0,1 M koncentrációjú HCl oldattal megtöltöttünk, majd 3-4 órán keresztül állni hagytuk. Ezt követően, az előzőleg mangánmentesített vízzel kiöblítettük őket, így kimosva az esetlegesen üveg falára kitapadt fémionokat.

A mangán gradiens hatásának tanulmányozásakor a végső Mn(II) koncentrációt előre sterilizált MnCl₂ törzsoldat adagolásával állítottuk be.

3.3 Fermentációk

3.3.1 Termelői táptalaj

Kontroll termelői táptalajként Kuenz és munkatársai által, 2012-ben optimalizált itakonsav túltermelő táptalajt alkalmaztuk [51]. Ettől a recepttől való eltérést az adott kísérletekben külön-külön jelölni fogom.

4. táblázat *A. terreus* itakonsav túltermelő táptalajának összetétele [51].

Komponens	Koncentráció (g/l)
KH_2PO_4	0,1
NH_4NO_3	3
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	5
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	$1,67 \times 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	8×10^{-3}
$\text{CuSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	15×10^{-3}
pH= 3,00	

Vas-, cink- és réz nyomelem törzsoldatokat külön-külön sterilre szűrtük, majd megfelelő mennyiségben a már lesterilezett táptalajhoz adagoltuk.

Szénforrások kezdeti koncentrációja kísérletenként eltérő volt:

- D-glükóz: 10-120 g/l
- D-xilóz : 10-110 g/l
- D-fruktóz: 50-120 g/l
- L-arabinóz: 50-120 g/l

A szénforrásokat is külön sterilizáltuk a nyomelemektől és a sóoldattól, majd sterilizálás után mértük őket össze lamináris áramlású steril fülkében. A D-glükóz oldatot autoklávban sterilizáltuk, a többi szénforrást sterilre szűrtük.

A vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest) szereztük be. Az ettől eltérő esetek külön jelölésre kerülnek.

3.3.2 Rázott lombikos fermentációk

Spóraszuszpenzió készítéséhez CSL+Glü agaron 3-4 napig növesztettük a tenyészeteket, megfelelő spórázottsági szint eléréséig. Az agarok felületéről spóramosó oldattal (9 g/l NaCl, és 20 csepp/l Tween 80) feldörzsöltük a spórákat, majd fénymikroszkóp és Bürker-kamra segítségével leszámoltuk a szuszpenzió spóra koncentrációját. A lombikok leoltása ezzel a spóraszuszpenzióval történt. A fermentációk kiindulási spórakoncentrációját minden esetben 1×10^6 spóra/ml értékre állítottuk be. A szuszpenziókat maximum három hétig használtuk közben $+4^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

A rázatott lombikos fermentációkhoz 500 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikokat használtunk (VWR International Kft. Debrecen), 100 ml

munkatérfogattal. A tenyésztéseket Infors AG CH-4103 (Infors AG, Bottmingen, Svájc) horizontális rázógéppel végeztük el. Minden esetben 300 rpm-en, és 33 °C-on inkubáltuk a tenyészeteket. A kezdeti pH értéket 3,0-ra állítottuk, amelyet későbbiekben, a fermentáció során nem szabályoztuk. A mintavételezést lamináris áramlású steril fülkében vittük véghez. Mintavételezés közben a lombikokat folyamatosan kézzel ráztuk az esetleges itakonsav termelés kiesés elkerülése végett [75]. A lombikok tömegét táramérleggen lemértük a mintavétel után, és közvetlen a következő mintavételezési pont előtt, a tapasztalt párolgást megfelelő mennyiségű steril mangánmentes vízzel korrigáltuk.

3.4 Analitikai módszerek

3.4.1 Mintaelőkészítés

Az Eppendorf-csövekben levett mintákban a gomba micéliumot a felülúszótól laboratóriumi centrifuga segítségével választottuk el. A felülúszót óvatosan, pipettával távolítottuk el műszeres analitikai vizsgálatokhoz. Amennyiben a felülúszót zavarosnak találtuk, a műveletet többször megismételtük. A mintákat későbbi elemzésig -20°C-os fagyasztóban tároltuk, majd mérések előtt kiolvasztottuk és a fermentációval megegyező hőmérsékletűre visszamelegítettük, homogenizáltuk.

3.4.2 Szénforrások és az itakonsav koncentrációjának meghatározása

A betáplált szénforrásokat és a termelődő itakonsav pontos koncentrációját törésmutató detektorral felszerelt nagynyomású

folyadékromatográffal (HPLC-RI) határoztuk meg. A mérésekhez Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) és Gilson 305 (Gilson, Middleton, USA) típusú készülékeket használtunk. Az elválasztáshoz Bio-Rad Aminex HPX-87H⁺ kationcserélő kolonnát alkalmaztunk. A méréseket izokratikus elúcióval végeztük, melyekhez 10 mM-os koncentrációjú H₂SO₄ oldat szolgált eluensként. Az eluens áramlási sebességét 0,5 ml/perc értéken tartottuk, a kolonna és a detektor hőmérsékletét 55°C-on. Amennyiben nem xilitol volt a kiindulási szénforrás és mint megjelenő melléktermékként kellett meghatározni annak koncentrációját, akkor Saracep CAR-Ca kationcserélő kolonnát alkalmaztunk a HPLC készülékben, desztillált vízzel eluálva, 0,5 ml/perc áramlási sebességgel. Minden egyéb paraméter megegyezik a korábbi kolonnával leírtakéval.

3.4.3 Mangán- és rézionok koncentrációjának meghatározása

A mangán- és rézionok koncentrációjának meghatározásához induktív csatolású plazma tömegspektrométert (ICP-QMS, Thermo Fischer Scientific, Bréma, Németország) használtunk, melynek vezérlését PlasmaLab szoftver biztosította. Szállítógázként 7 %(v/v) hidrogén és 93 %(v/v) hélium elegyet használtunk, amit 6 ml/perc áramlási sebességgel áramoltattunk a készülékben. Mangán- és réz kalibrációs görbék mono elemi referencia oldattal készültek (1000 mg/l, Scharlab, Sentmenat, Spanyolország). Belső standardként ródiomot adagoltunk minden mintába, illetve a kalibráló sorozatokba, melynek beállított koncentrációja így 20 µg/l volt. Az elválasztás mangán esetében 55; réznél 65; és ródiumnál pedig 103 m/z értéken történt.

3.4.4 Száraz sejttömeg meghatározás

Azokban a fermentációkban, ahol itakonsav termelődését tapasztaltuk, ott közvetlen a szénforrás kimerülése után került meghatározásra a fungális biomassza száraz sejttömege (DCW). A fermentlevekből 5-5 ml mintát vettünk, melyeket vákuum segítségével, előre lemért tömegű szűrőpapíron szűrtük át, majd ioncserélt vízzel alaposan átmostuk. Ezt követően 70°C-on szárítószekrényben tömegállandóságig szárítottuk, majd tömegét analitikai mérleggel mértük.

3.4.5 Morfológia vizsgálata

A tenyészetek morfológiai vizsgálatához 10 %(v/v)-os laktofenolos (Fluka Chemie, Buch, Svájc) festést alkalmaztunk. A festett mintákat AxioCam MRc5 kamerával felszerelt Zeiss Axio Imager (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) mikroszkóppal fényképeztük. A felvételek AxioVision AC elemző szoftverrel lettek kiértékelve.

3.5 Számítások

Itakonsav specifikus moláris hozama:

$$Y_{(p/s)} = \frac{n_{itakonsav}}{n_{felhasznált\ szénforrás}} \quad (1)$$

Biomassza eredő hozama:

$$Y_{(x/s)} = \frac{m_{biomassza}}{m_{felhasznált\ szénforrás}} \quad (2)$$

Biomassza specifikus hozama:

$$Y'_{(x/s)} = \frac{m_{biomassza}}{m_{felhasznált\ szénforrás} - m_{itakonsav} - m_{széndioxid}^1} \quad (3)$$

Egységnyi biomasszára levetített hozam:

$$Y_{(p/x)} = \frac{m_{itakonsav}}{m_{biomassza}} \quad (4)$$

Itakonsav átlagos produktivitása:

$$J_{(p/s)} = \frac{c_{itakonsav}}{t_{fermentáció\ hossza}} \quad (5)$$

¹ Az itakonsav bioszintézisének utolsó lépése során, a cisz-akonitáz-dekarboxiláz katalizálta reakció során vélhetően felszabaduló CO₂ (számított érték).

3.6 Reprodukivitás

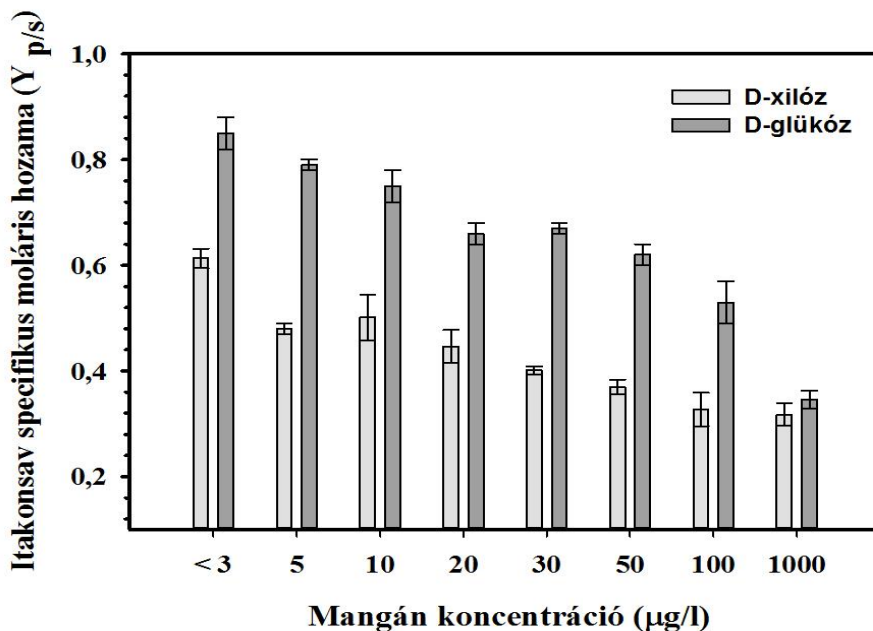
A rázatott lombikos fermentációk eredményei 3-5 független biológiai kísérlet átlagából származnak. A kapott eredményeket Sigmaplot szoftver (Jandel Scientific, San Jose, USA) segítségével értékeltük ki és ábrázoltuk. A kísérletek során standard eltéréseket (SD) állapítottunk meg, amelyek szintén ábrázolásra kerültek. A vizsgált csoportok közötti eltérés megállapításhoz ANOVA analízist alkalmaztunk Holm-Sidak teszttel. Szignifikancia kritériumként $p < 0,05$ értéket állítottunk be.

4. Eredmények

4.1 Itakonsav túltermelésének vizsgálata D-xilóz szénforráson

4.1.1 Itakonsav fermentációk mangán érzékenységek vizsgálata

Kutatócsoportunk korábban bebizonyította, hogy az *A. terreus* itakonsav túltermelésének stimulálásához közel teljes mangán limitációra van szükség D-glükóz szénforráson [41]. Ezért szeretnénk volna tesztelni, hogy egy teljesen eltérő biokémiai útvonalon hasznosuló szénforrás mangánérzékenysége mennyiben tér el ettől.



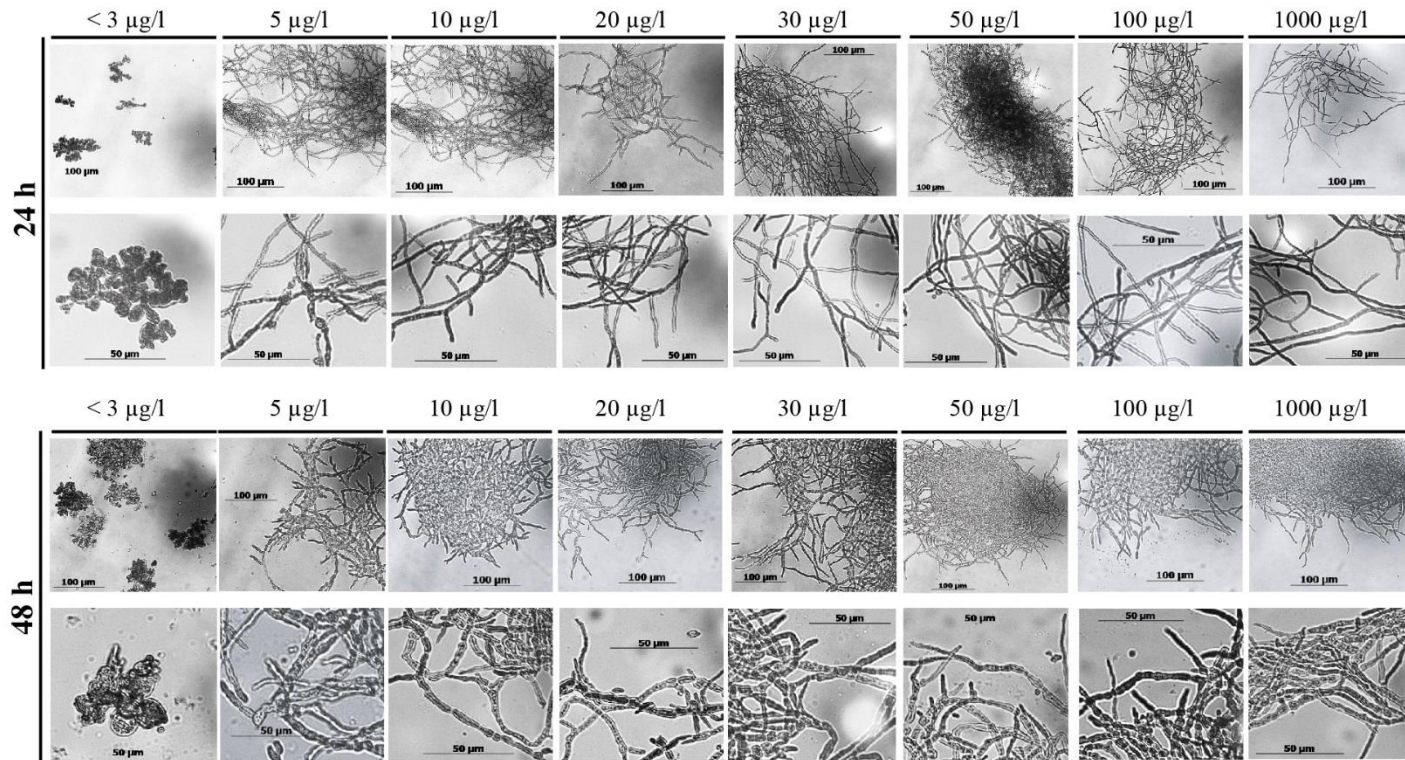
5. ábra Az *A. terreus* süllyesztett fermentációinak specifikus moláris hozama xilóz- és glükóz szénforráson mangán gradiens függvényében. A fermentációk rázatott lombikokban játszódtak le. A xilóz kiindulási koncentrációja 50 g/l volt, a glükózé 120 g/l.

E célból rázatott lombikokban mangán gradienst vettünk fel. A xilózt glükóz kontrollokkal állítottuk szembe (**5. ábra**).

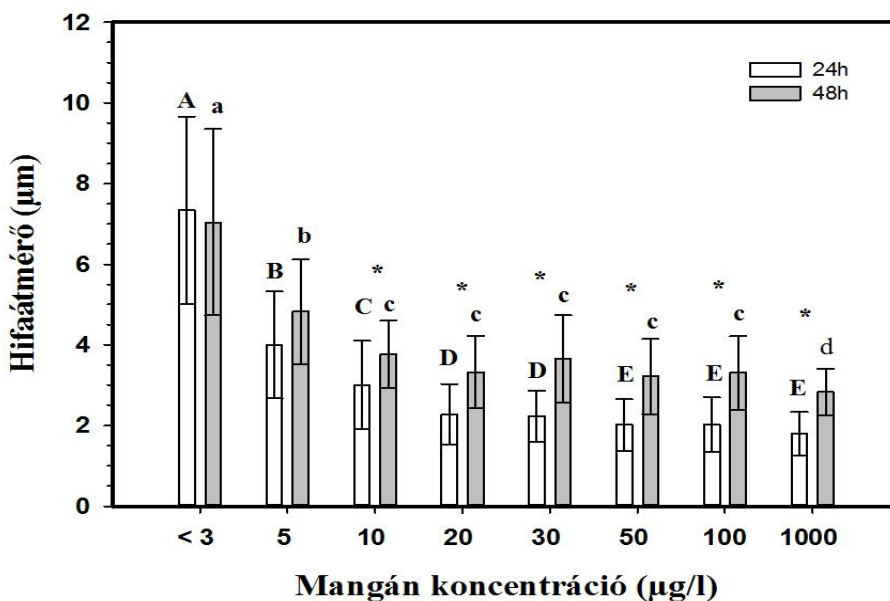
A legmagasabb hozamokat mindkét szénforrás esetében teljes mangán limitáció mellett értük el ($< 3 \mu\text{g/l}$), és már $5 \mu\text{g/l}$ mangán jelenléte csökkentette a specifikus moláris hozamokat. D-xilóz esetében statisztikailag 3 csoportot állíthatunk fel. A legjobb moláris hozamot teljes mangán limitáció mellett érjük el (0,61), majd rögtön szignifikáns esés mutatkozik $5 \mu\text{g/l}$ mangán jelenlétben, ám egészen $30 \mu\text{g/l}$ koncentrációig nem detektálunk további romlást. Ezt követően $50 \mu\text{g/l}$ Mn(II) hozzáadásával ismét szignifikánsan romlik az itakonsav hozama, amely már vizsgált tartományon belül ($1000 \mu\text{g/l}$ mangán koncentrációig) nem mutat további csökkenést.

A teljes mangán limitációhoz képest D-glükóz esetében is romlik az itakonsav specifikus moláris hozama 0,85-ös értékről 0,80-ra, viszont a szórásokat is figyelembe véve itt még nem jegyezhetünk fel statisztikailag szignifikáns csökkenést. Ezzel szemben $10 \mu\text{g/l}$ mangán koncentráció mellett szignifikánsan romlik a hozam, amely teljes mértékben megerősíti kutatócsoportunk korábbi eredményeit, miszerint a jelenlegi táptalajon, magas kiindulási D-glükóz szénforráson, $>5 \mu\text{g/l}$ mangán koncentráció esetén már nem maximalizálhatók az itakonsav hozamok [41]. $100 \mu\text{g/l}$ mangán koncentráció a fermentációban pedig a xilóz esetében 50%-os visszaesést, még a glükóz esetében 40%-os hozam visszaesést eredményezett. Elmondható tehát, hogy jelen körülmények között a teljes mangánlimitáció beállítása szükséges a hozamok maximalizálása érdekében mind glükóz, mind xilóz szénforráson.

Az *A. terreus* itakonsav termelékenységének romlását a növekvő mangán koncentráció hatására a fungális morfológia is jól visszatükrözi (**6. ábra**). Teljes mangánlimitáció mellett lekerekedett, duzzadt hifákat látunk, már-már élesztőkre emlékeztető morfológiával. Ezzel szemben 5 $\mu\text{g/l}$ mangán koncentrációnál többségbe kerülnek a fonalas gombákra jellemző hosszú hifák, viszont központi duzzadt sejtek továbbra is fellelhetők, majd 10 $\mu\text{g/l}$ koncentrációtól kezdve teljesen eltűnnek. A hifaátmérőket számszerűen lemérve is visszakapjuk ezt az eredményt (**7. ábra**), 3-5-10 $\mu\text{g/l}$ mangán koncentrációk rendre statisztikailag szignifikánsan eltérő csoportokat adnak, amíg 10-100 $\mu\text{g/l}$ közötti koncentrációknál nincs szignifikáns eltérés a hifaátmérőkben. A két legkisebb mangán koncentráció esetében a 24. és 48. óra között nem történt szignifikáns változás a hifaátmérők tekintetében, amíg az összes többi koncentrációnál a hifák enyhe vastagodását figyelhetjük meg a vizsgált 24 óra alatt.



6. ábra *A. terreus* NRRL 1960 tenyészetek mikroszkopikus felvétele 50 g/l D-xilóz kiindulási szénforrás mellett, rázatott lombikban. A fotók az inokulálást követő 24. és 48. órában készültek.

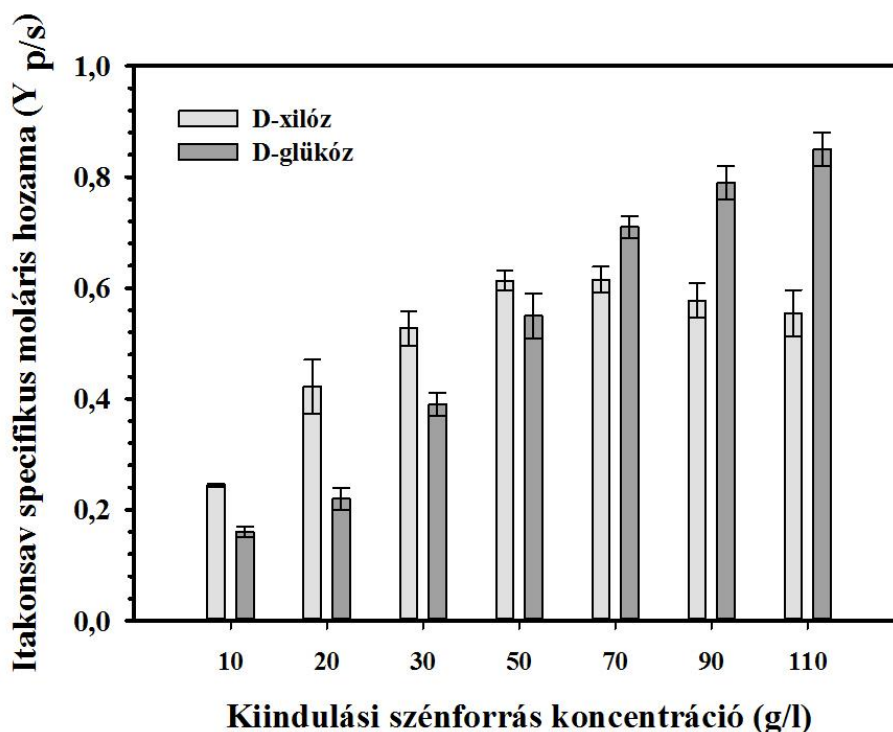


7. ábra *A. terreus* NRRL hifaátmérői 50 g/l kiindulási D-xilóz szénforrás esetén, különböző mangán koncentrációknál. Fehér oszlopok: 24 órával inokulálást követően, szürke oszlopok: 48 órával az inokulálást követően. A nagybetűk (A-E) szignifikáns eltérést jelölnek a hifaátmérőkben az eltérő mangán koncentrációjú tenyészeteknél 24 órás korban, a kisbetűk (a-d) pedig 48 órás korban. A csillaggal jelölt fermentációknál szignifikánsan változtak a hifaátmérők 24 és 48 óras kor között.

4.1.2 Kezdeti szénforrás koncentráció hatásának vizsgálata

Miután feltártuk a xilóz alapú itakonsav fermentációk mangán érzékenységét a következő felmerülő kérdés a kiindulási szénforrás koncentráció hatásának vizsgálata volt. D-glükóz esetében ugyanis 100 g/l fölötti kiindulási koncentráció alkalmazásakor meredeken megugrik az itakonsav specifikus moláris hozama az alacsonyabb kiindulási koncentrációkkal szemben. Ezért a két szénforrást rázatott lombikos

kísérletben ismét összehasonlítottuk egymással, arra a kérdésre választ keresve, hogy D-xilóz alkalmazása esetén is sikerül-e a hozamok növelése magasabb kiindulási szénforrás koncentráció mellett.



8. ábra Az itakonsav specifikus moláris hozama eltérő kiindulási koncentrációjú D-xilóz és D-glükóz alapú fermentációkban. Az összes fermentáció mangán limitált körülmények között zajlott le (< 3 $\mu\text{g/l}$).

Eleinte a kiindulási szénforrás koncentráció növelésével a xilóz alapú fermentációk moláris hozama is emelkedik, a glükóznál megfigyelteknek hasonlóan. Viszont markáns különbség, hogy 5 % (w/v)-nál tetőzik az elérhető moláris hozam xilózon (0,63), és a kiindulási szénforrás koncentráció további növelésével együtt nem emelkedik tovább.

Tehát a glükóz szénforrás esetén jelentkező, robbanásszerű hozam emelkedés magasabb kiindulási koncentrációknál nem áll fenn a xilóz alapú fermentációk esetében. Pusztán a biokémiai útvonalakat figyelembe véve mind glükóz, mind xilóz szénforráson az elérhető maximális hozam 72 gramm itakonsav 100 gramm szénforrásból kiindulva [57], amely moláris hozamokra átfordítva glükóznál 1,0; xilóznál pedig 0,83-as értéknek felel meg. Amíg glükóz szénforráson sikerült 0,86-os moláris hozamot elérni, addig xilózon kevésbé közelítettük meg annak maximumát (0,63) az általunk vélt legjobb fermentációs beállításon. A szénforrások teljes kimerüléséig monitoroztuk a fermentációkat, és ezt követően állítottuk le őket. Felmerül tehát a kérdés, hogy mi történik a felhasznált, de nem itakonsavvá alakult xilózzal. Jelenlegi ismereteink alapján, az itakonsav bioszintézis utolsó reakciója, azaz a cisz-akonitát dekarboxileződése során felszabaduló CO₂ visszaforgása a folyamatba már nem egyértelmű [15], így nettó veszteségként könyveljük el. További CO₂ veszteséggel számolhatunk a légzésből fakadóan. Erőteljes szén-dioxid produktivitási rátára számíthatunk a fermentáció kezdeti szakaszában, vagyis a biomassza képződésekor, majd a termelési fázisban ez a ráta csökken [85]. Azonban az elméleti síkon kivont CO₂ után is jelentős szakadék mutatkozik a betáplált szénforrás és a keletkezett itakonsav között (**5. táblázat**). Ezért a következő feladatunk annak feltérképezése volt, hogy vajon keletkezik számottevő mennyiségben egy, vagy több melléktermék, amik eddigi analitikai módszereink során rejtve maradtak. Először a xilitol tartalmat ellenőriztük le, ami xilóz alapú fermentációk jellemző mellékterméke [32].

5. táblázat Az *A. terreus* NRRL 1960 rázatott lombikos fermentációi eltérő kiindulási D-xilóz koncentrációk mellett. 1-es indexű oszlopok: mért értékek. 2-es indexű oszlopok: kalkulált értékek. A fermentációkat a szénforrás kimerüléséig futtattuk, majd ezt követően határoztuk meg a biomassza tömegét.

A panel

Kiindulási D-xilóz (g/l)	Maximális Itakonsav (g/l) ¹	Végső DCW (g/l) ¹	Xilitol (g/l) ¹	α- ketoglutarát (g/l) ¹	CO ₂ CAD reakcióból (g/l) ²	Itakonsav moláris hozama (Y _{p/s}) ²	Biomassza eredő hozama (Y _{x/s}) ²	Biomassza specifikus hozama (Y ² _{x/s}) ²
9,79 ± 0,71	2,08 ± 0,17	3,17 ± 0,1	-	-	0,7	0,24	0,32	0,45
20,15 ± 2,49	7,33 ± 0,85	3,85 ± 0,3	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02	2,48	0,42	0,19	0,37
31,81 ± 1,99	14,57 ± 1,77	4,67 ± 0,4	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,08	4,93	0,53	0,14	0,38
51,65 ± 1,26	27,45 ± 1,32	4,93 ± 0,4	0,05 ± 0,01	0,32 ± 0,14	9,28	0,63	0,1	0,34
69,97 ± 0,26	37,29 ± 1,32	7,46 ± 0,9	0,10 ± 0,01	0,49 ± 0,12	12,62	0,62	0,1	0,37
91,28 ± 1,04	45,71 ± 2,85	8,01 ± 0,2	0,21 ± 0,02	0,73 ± 0,10	15,46	0,58	0,09	0,27
110,46 ± 0,74	53,97 ± 2,68	8,49 ± 0,6	0,37 ± 0,02	1,15 ± 0,14	18,25	0,55	0,08	0,23

B Panel

Kiindulási D-xilóz (g/l)	Maximális Itakonsav (g/l)	Végső DCW (g/l)	Itakonsav moláris hozama ($Y_{p/s}$)	Biomassza eredő hozama ($Y_{x/s}$)	Fermentáció hossza (h)	Szénforrás felvételi ráta (g/l×h)	Átlagos produktivitás (g/l×h)
9,79 ± 0,71	2,08 ± 0,17	3,17 ± 0,1	0,24	0,32	72	0,14	0,03
20,15 ± 2,49	7,33 ± 0,85	3,85 ± 0,3	0,42	0,19	96	0,21	0,08
31,81 ± 1,99	14,57 ± 1,77	4,67 ± 0,4	0,53	0,14	96	0,33	0,15
51,65 ± 1,26	27,45 ± 1,32	4,93 ± 0,4	0,63	0,1	120	0,43	0,23
69,97 ± 0,26	37,29 ± 1,32	7,46 ± 0,9	0,62	0,1	120	0,58	0,31
91,28 ± 1,04	45,71 ± 2,85	8,01 ± 0,2	0,58	0,09	144	0,63	0,32
110,46 ± 0,74	53,97 ± 2,68	8,49 ± 0,6	0,55	0,08	168	0,66	0,32

Méréseink során viszont elenyésző mennyiségű xilitolt tudtunk kimutatni a fermentlében. A xilitol mellett még megvizsgáltuk az itakonsav fermentációk egyéb gyakori melléktermékeit, amelyek tipikusan citromsav-ciklus köztesei, mint például a malát, szukcinát, vagy az α -ketoglutarát [37]. Ezek közül α -ketoglutarátot tudtunk kimutatni. A kiindulási xilóz koncentráció gradiens irányának megfelelően az α -ketoglutarát koncentrációja is folyamatosan növekszik, ám ez még 110 g/l kiindulási koncentrációnál is csupán 1,15 g/l értéket adott (**5. táblázat**).

Mivel sem a felszabaduló CO₂, sem a detektált melléktermékek mennyisége nem tudott kielégítő választ adni, hogy mivé alakult a betáplált szénforrás, hipotézisünk szerint a „hiányzó” mennyiség biomassza képződésre fordítódott.

4.2 Stratégiák a mangán inhibíció kivédésére

Xilózzal és glükózzal végzett fermentációink során megkérdőjelezhetetlenül bebizonyosodott, hogy a „mangán hatás” mindkét szénforráson fennáll a jelenlegi táptalajon. Azaz, ha legalább 5 $\mu\text{g/l}$ Mn(II)-ion van a fermentlében, akkor a fungális morfológia fonalassá válik és az itakonsav hozama szignifikánsan csökken, lehetetlenné téve az elméleti maximális hozamok megközelítését. Tekintve, hogy a két szénforrás eltérő biokémiai útvonalon hasznosul, feltételezhető, hogy a jelenség szénforrástól független.

A mangánmentesítés és a mangánmentes környezet fenntartása azonban igen nehéz feladat. Hatványozottan igaz, ha rázatott lombikból fermentorba lépünk át. Ezért égetően szükségessé válik olyan új stratégiák

kidolgozása, amelyek képesek elnyomni, vagy legalább enyhíteni a mangán jelenlétében tapasztalt, fermentációs szempontból vett negatív hatásokat. Doktori ösztöndíjam alatt végzett kutatások során fiziológiai megközelítést alkalmaztam, tehát a fermentációs táptalaj komponensek változtatásával, majd annak hatásainak megfigyelésével próbáltam megtalálni a megfelelő irányvonalat.

4.2.1 Foszfát koncentráció hatása

Egyik legkézenfekvőbb választás a foszfát koncentráció változtatása volt. Dolgozatom elején már utaltam rá, hogy jelenlegi *A. terreus* általi itakonsav túltermelés kutatása során az egyik legellentmondásosabb kérdés a foszfát limitáció szükségessége a fermentáció során. Optimális kiindulási xilóz koncentráció (50 g/l) és mangánmentes körülmények (< 3 µg/l) mellett foszfát gradienst vettünk fel KH_2PO_4 koncentráció változtatásával (táptalaj többi összetevőjét lásd anyagok és módszerek).

Pusztán a hozamokat tekintve, elsőre nem vehetünk észre hatalmas eltéréseket (**6. táblázat**), azonban foszfát a koncentráció emelésével enyhén, de tendenciózusan csökken az itakonsav specifikus moláris hozama. Statisztikailag egy nagy blokkot különíthetünk el, amiből mindkét irányba egy-egy vizsgált koncentráció lóg ki. 0,04 g/l KH_2PO_4 beállítás mellett kaptuk a legmagasabb hozamot, majd 0,06 és 0,4 g/l közötti koncentráció tartományban nem jegyezhetünk fel szignifikáns eltérést, ellenben 0,8 g/l mellett tapasztaljuk -ANOVA próba által megerősítve- a legrosszabb hozamot, ismét szignifikáns eltérést eredményezve.

6. táblázat Foszfát gradiens hatása D-xilóz alapú itakonsav fermentációnál, optimalizált kiindulási xilóz koncentrációval (50 g/l) és teljes mangán limitáció mellett. A kontroll érték 0,1 g/l KH_2PO_4 koncentráció volt. A fermentációk rázatott lombikban játszódtak le.

KH_2PO_4 koncentráció (g/l)	Itakonsav moláris hozama ($Y_{p/s}$)	Végső DCW (g/l)	Fermentáció hossza (h)	Szénforrás felvételi ráta (g/l×h)	Átlagos produktivitás (g/l×h)
0,04	0,61 ± 0,01	5,52 ± 0,17	168	0,32	0,18
0,06	0,57 ± 0,01	5,35 ± 0,35	144	0,37	0,19
0,08	0,59 ± 0,01	5,07 ± 0,15	120	0,43	0,24
0,1	0,58 ± 0,02	5,06 ± 0,38	120	0,46	0,23
0,2	0,54 ± 0,01	6,50 ± 0,54	96	0,54	0,27
0,4	0,55 ± 0,01	7,21 ± 0,16	96	0,59	0,28
0,8	0,53 ± 0,01	8,57 ± 1,10	96	0,53	0,26

Már szabad szemmel is jól látható eltérés a tenyészetek biomassza koncentrációja volt. Nem meglepő módon a foszfát gradienssel nő a DCW értéke, azonban statisztikailag szignifikáns eltérésről csak a legmagasabb vizsgált foszfát koncentráció esetén beszélhetünk.

A foszfát koncentráció emelése a fermentáció felgyorsulását is maga után vonja. Gyakorlatilag lineárisan emelkedik a xilóz felvételi rátája a foszfát gradiens növekedésével, amellyel párhuzamba lehet állítani a produktivitást. A kilógó adatnak ismét 0,8 g/l koncentráció mutatkozik, ekkor megtörik a gyorsulás üteme. A foszfát tartalom tehát meghatározza a szénforrás kimerülésének gyorsaságát, ezáltal a (batch) fermentáció

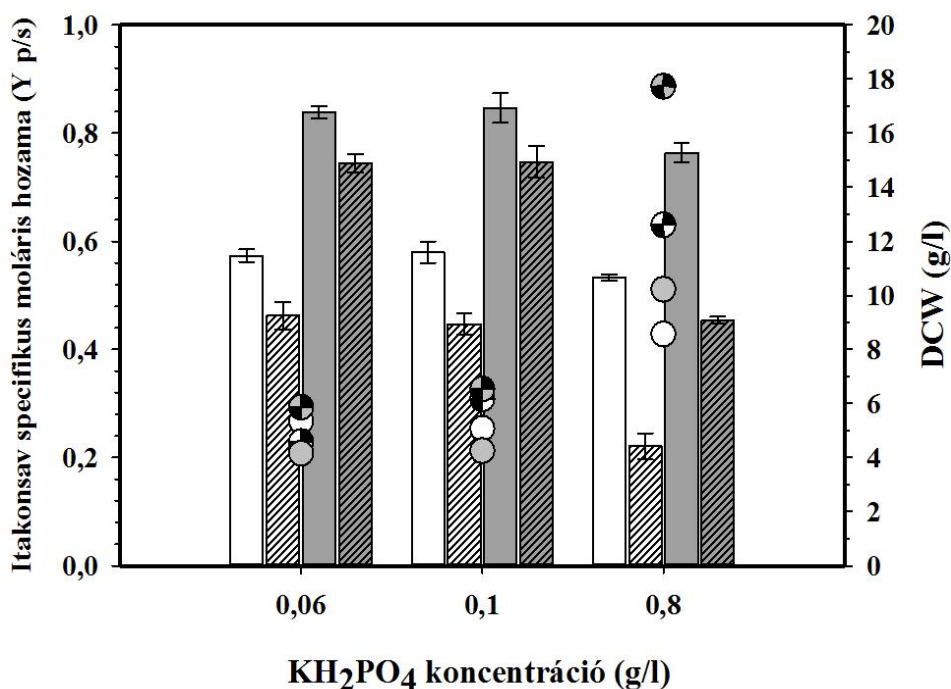
hosszát. A kontrollként használt 0,1 g/l koncentrációnál ez 120 órát vesz igénybe, 0,2-0,8 g/l közé emelve a KH_2PO_4 koncentrációt 96 órára rövidül a fermentáció hossza, viszont 0,04 g/l esetén 168 órára nyúlik el ez az időtartam. Annak ellenére, hogy 0,04 g/l-nél kaptuk a legmagasabb hozamot, a fermentáció jelentős meghosszabbodása miatt nem javasolt további kísérletekben dolgozni vele. Kontrollként ezentúl is a Kuenz által beállított 0,1 g/l értéket használjuk [51]. A csökkentett foszfát tartalom hatását 0,06 g/l koncentrációnál vizsgáljuk, az emelt foszfát hatását pedig a szignifikánsan eltérő eredményeket kiváltó 0,8 g/l KH_2PO_4 koncentrációnál, amely érték egybeesik az akkori szakirodalmi adatok új, optimalizált foszfát koncentrációjával [8].

5.2.1.1 Foszfát hatása mangán limitáció mellett, illetve mangán jelenlétében

Kiválasztott foszfát koncentrációk hatását megvizsgáltuk D-xilóz (50 g/l kiindulási koncentrációval), illetve D-glükóz (120 g/l kiindulási koncentrációval) szénforráson. A rázatásokat parallel elvégeztük teljes mangán limitáció mellett (1,5 $\mu\text{g/l}$), és 10 $\mu\text{g/l}$ mangán koncentráció jelenlétében egyaránt, mivel a kontroll foszfát értéken ennyi mangán mellett már mindkét szénforrás esetében szignifikánsan romlik a hozam (**5. ábra**).

Nagyon hasonló mintázatot adnak a tenyészetek, különböző foszfát koncentrációk mellett a két szénforráson (**9. ábra**). Mind xilóz, mind glükóz esetében nincs szignifikáns különbség, a hozamokat tekintve 0,06 g/l és 0,1 g/l KH_2PO_4 beállításoknál, beleértve a mangán limitált és 10 $\mu\text{g/l}$ mangánnal rendelkező tenyészeteket (limitált tenyészetet-limitálttal

összehasonlítva, és mangános tenyészetet mangánossal összehasonlítva). Azonban, 0,8 g/l foszfát koncentráció mellett már szignifikánsan csökken az itakonsav moláris hozama, mindkét szénforráson, mindkét mangán koncentrációt figyelembe véve, hozzátevé, hogy mangán limitáció mellett a jelenség jóval enyhébb.



9. ábra *A. terreus* NRRL 1960 itakonsav- (oszlopok) és biomassza (körök) termelődése különböző foszfát koncentrációk mellett. Fehér oszlopok és körök: D-xilóz szénforráson (50 g/l); szürke oszlopok és körök: D-glükóz szénforráson (120 g/l); sima oszlopok és üres körök: teljes mangán limitáció mellett; sraffozott oszlopok és homokórák körök: 10 µg/l mangán jelenlétében. A fermentációk rázott lombikokban játszódtak le.

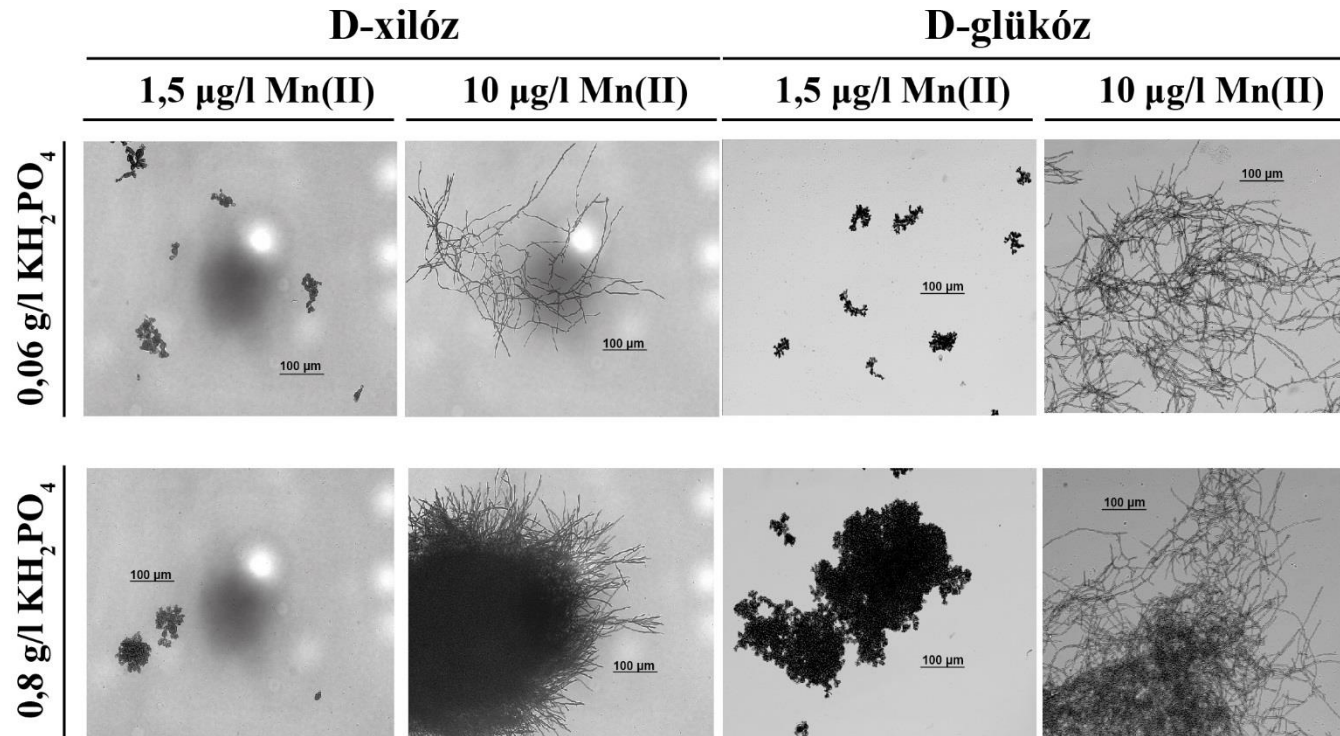
Továbbá, bármelyik foszfát koncentrációt is vizsgáljuk, minden esetben szignifikánsan romlik a hozam, ha nem limitáljuk a mangánt a rendszerben,

viszont a legdrámaibb hozam csökkenés emelt foszfát koncentrációnál következik be (0,8 g/l).

A foszfát koncentráció változtatására, a biomassza gyarapodása ellentétes módon reagál, mint az itakonsav hozamok esetében (**9. ábra**). Tehát, ahogy emeljük KH_2PO_4 koncentrációját (ami az itakonsav hozamának csökkenését vonja maga után), úgy növekszik a DCW értéke. Majdnem teljes mértékben követi a hozamoknál tapasztalt változásokat, mindkét szénforrás esetén: 0,06 és 0,1 g/l koncentrációnál nincs szignifikáns eltérés, függetlenül a mangántól, amíg 0,8 g/l mindkét csoportban szignifikánsan több biomassza termelődést eredményezett. Minimális különbség, hogy a xilózt tekintve 0,06 és 0,1 g/l KH_2PO_4 koncentrációnál nincs eltérés a mangán limitált, és mangánt feleslegben tartalmazó tenyészetek biomasszája között, csak a legmagasabb vizsgált foszfát koncentrációnál, ameddig glükóz szénforrásnál minden esetben szignifikánsan több DCW keletkezik a fermentáció során, ha nem limitáljuk teljes mértékben a mangán koncentrációját.

5.2.1.2 Foszfát hatása a gombamorfológiájára

A markáns biomassza képződés már szemmel is jól látható az emelt foszfát koncentráció mellett (főleg a mangánnal ellátott tenyészeteknél), ekkor a fermentlevek erőteljes sűrűsödési hajlamot mutatnak, szinte lekvárhoz hasonlóvá válnak. Felmerül a kérdés, hogy a különbséget csak az eltérő DCW értékek okozzák, vagy a gomba morfológiája is megváltozik a foszfát emelés hatására.



10. ábra *A. terreus* fonalas gomba morfológiai fénymikroszkópos felvételei alacsony (0,06 g/l) és emelt (0,8 g/l) KH₂PO₄ tartalom mellett rázatott lombikban, 24 órával a leoltást követően.

7. táblázat *A. terreus* tenyészetek átlagos pelletátmérői különböző foszfát és mangán tartalom mellett. Minden eredmény µm-ben megadva.

		1,5 µg/l Mn(II)			10 µg/l Mn(II)		
		KH ₂ PO ₄ koncentráció (g/l)					
Leoltástól eltelt idő		0,06	0,1	0,8	0,06	0,1	0,8
D-xilóz	24h	66 ± 43	33 ± 15	74 ± 5	172 ± 87	225 ± 76	325 ± 155
	48h	98 ± 44	63 ± 28	108 ± 57	313 ± 123	401 ± 83	>450
	72h	106 ± 41	76 ± 20	146 ± 38	412 ± 146	>450	>450
D-glükóz	24h	45 ± 10	29 ± 22	137 ± 81	390 ± 110	378 ± 89	346 ± 125
	48h	51 ± 14	62 ± 32	112 ± 54	>450	450	447 ± 70
	72h	78 ± 43	50 ± 24	137 ± 36	>450	>450	>450

Makromorfológiai szinten, alacsonyabb foszfát tartalom mellett (0,06 és 0,1 g/l) mangán limitáció alkalmazásakor duzzadt, nagyon apró, „élesztőszerű” képletekkel találkozhatunk (**10. ábra**). Ezzel szemben, amennyiben már az itakonsav hozamokat is befolyásoló mennyiségű mangán kerül a rendszerbe, xilóz szénforráson még inkább diszperz micélium megjelenésű a tenyészet, amíg glükóz szénforráson már „clump” [86] morfológia kialakulása figyelhető meg 24 órával a leoltást követően (**10. ábra**). A fermentáció előrehaladtával, mindkét szénforráson kiterjedt pelletekké [86] záródnak a fungális képletek (**7. táblázat**) mangán jelenlétében. Mangán limitációja mellett pedig a későbbiekben is

megmarad a már-már élesztőre emlékeztető morfológia, enyhe pelletátmérő növekedéssel, amelyet apró, vékony, központi magból kinövő hifák megjelenése miatt jegyezhetünk fel.

Amennyiben emelt foszfát tartalommal (0,8 g/l) indítottunk fermentációt, hasonló séma lejátszódását figyelhetjük meg, viszont már mangán limitáció esetén is átlagban nagyobb pelletek alakulnak ki a foszfát limitált tenyészetekhez képest (**7. táblázat**). Mangánnal ellátott tenyészeteket vizsgálva, kirajzolódik, hogy a foszfát koncentráció emelésével gyorsabban alakulnak ki a nagyobb átmérőjű pelletek D-xilóz szénforráson. Glükóz alapú, mangános fermentációk pelletátmérője nem mutat akkora különbséget az alacsonyabb és magasabb foszfát beállítások esetén, emlékezzünk rá, hogy a mangános tenyészetek jelentősen magasabb DCW értékekkel rendelkeznek (**9. ábra**), tehát jóval sűrűbb, tenyészetekkel állunk szemben!

8. táblázat *A. terreus* tenyészetek átlagos hifaátmérői különböző foszfát és mangán tartalom mellett. Minden eredmény μm -ben megadva.

		1,5 $\mu\text{g/l}$ Mn(II)			10 $\mu\text{g/l}$ Mn(II)		
		KH ₂ PO ₄ koncentráció (g/l)					
Leoltástól eltelt idő		0,06	0,1	0,8	0,06	0,1	0,8
D-xilóz	24h	9,36	9,71	9,73	3,57	2,12	2,45
	48h	8,26	10,90	9,07	4,52	2,63	3,75
	72h	11,43	12,28	17,10	3,11	2,72	4,59
D-glükóz	24h	7,65	10,32	10,62	2,33	3,20	3,07
	48h	6,81	8,10	5,70	3,56	2,57	3,94
	72h	5,79	7,70	7,14	2,63	4,18	3,25

A hifaátmérőket tanulmányozva a döntő különbséget a mangán koncentrációja határozza meg (**8. táblázat**). A mangán limitált tenyészeteknél jóval vastagabb hifákat mérhetünk, mint a mangánnal ellátott fermentációk estében. Mindkét szénforrást figyelembe véve, a mangán limitált tenyészeteknél nincs szignifikáns különbség, tehát amennyiben limitáljuk a mangán koncentrációját, akkor a foszfát koncentráció változtatása nincs hatással a hifaátmérő vastagságára. Ez a jelenség összhangban áll a moláris hozamok változásával, ahol mangán limitáció mellett elenyésző az itakonsav specifikus moláris hozamának változása (**9. ábra**). 10 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) koncentrációval a fermentlében ismét egyezést találunk a két szénforráson, viszont amíg ezúttal 0,1 és 0,8 g/l

KH_2PO_4 koncentrációnál ismételten nem jegyezhetünk fel szignifikáns eltérést, addig 0,06 g/l-nél már szignifikáns eltérés tapasztalható. D-xilóz alapú fermentációk esetében vastagabb hifákat mérhetünk a legkisebb foszfát koncentráció mellett, amíg D-glükóznál enyhén vékonyabb hifákat.

Eddigi tapasztalatainkat összefoglalva tehát, a foszfát szint emelése rontja az itakonsav hozamát (bár az alacsonyabb vizsgált értékek mellett ez a jelenség nem számottevő), egyértelműen elősegíti a biomassza képződését. Ezen felül nem képes enyhíteni a mangán befolyását a rendszerre. Sőt! Minél magasabb a foszfát koncentrációja, a mangán megjelenése a rendszerben, annál drasztikusabban rontja a hozamot. Bár a fermentáció felgyorsulása a folyamat lerövidülésével kecsegtet, ezzel szemben, az emelt foszfát koncentráció jelen táptalajt sokkal instabilabbá teszi.

4.2.2 Fermentációban található mangánionok ellensúlyozása rézionokkal

Az *A. niger* általi citromsav túltermeltetés tudományos háttere sokkal jobban körbejárt téma, mint *A. terreus* általi itakonsav túltermeltetés. Mégis, a biokémiai útvonalak, valamint a gyártási technológia hasonlóságának köszönhetően az egyik vagy másik témában felmerülő, felfedett jelenséget érdemes mankóként használni, és kipróbálni a másik témában is [15].

Eddigi kísérleteink során bebizonyosodott, hogy hiába két eltérő biokémiai útvonalon hasznosuló szénforrás (D-glükóz és D-xilóz), a tenyészetek ugyanolyan választ adtak a felállított mangán gradiensre, majd

a foszfát koncentráció változtatásra is hasonlóan reagáltak. A foszfát koncentráció módosításával nem sikerült enyhíteni a mangánionok által okozott hozam romlást. Sőt, annak emelése inkább negatív hatással volt a hozamokra.

Ha pusztán fiziológiai módszereket használunk, más táptalaj összetevőkhöz kell nyúlnunk, amelyek esetlegesen képesek lennének maszkírozni a mangánionok káros hatásait. Hockertz és munkatársai *A. niger*-rel folytatott vizsgálataik során figyeltek fel rá, hogy Cd(II)- Cu(II)- és Zn(II)-ionok adagolásával sikeresen csökkenthető a Mn(II)-ionok gomba általi felvétele, amíg Mg(II)- és Ca(II)-ionok egyáltalán nem fejtettek ki ilyen hatást [87]. Netik és munkatársai által végzett kísérletek pedig azt sugallják, hogy *A. niger* esetében a megtermelt citromsav visszavételéhez, sejten belüli importjához szükséges a mangánion szerves sav általi keláltsága, Cu(II)-ionok jelenléte pedig egyenesen akadályozza a citrát újbóli felvételét [88]. Mirminachi és munkatársai tovább vizsgáltak a jelenséget és megállapították, hogy igen alacsony mangán koncentráció mellett ($< 0,5 \mu\text{g/l}$) nem szükséges rézionok hozzáadása a fermentléhez ahhoz, hogy 80% fölötti moláris konverziót érjenek el citromsav túltermelésekor, viszont $0,5\text{-}2 \mu\text{g/l}$ Mn(II) jelenléténel kb. 1 mg/l Cu(II)-ion koncentráció képes antagonizálni a Mn(II) hatását, amíg $4 \mu\text{g/l}$ Mn(II) esetében már 4 mg/l -re emelve a Cu(II) koncentrációt sem nyerhető minden esetben 80% fölötti hozam [9]. Következő lépésben tehát szerettük volna megvizsgálni, hogy felállítható-e analógia az *A. niger* citromsav, és az *A. terreus* itakonsav túltermelése során, a fentebb leírt jelenségekre is.

5.2.2.1 *A. terreus* réz toleranciájának vizsgálata itakonsav túltermelő táptalajban

A kiindulási koncentrációkra adott itakonsav moláris hozamokat leszámítva, hasonlóan reagáltak az *A. terreus* fermentációk a táptalaj komponensek változtatására mindkét biokémiai útvonalon hasznosuló szénforrás esetében (D-glükóz és D-xilóz). Ezt az állítást azonban szeretnénk volna még jobban alátámasztani, ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük: D-glükóz és D-fruktóz szénforrással megfigyelve a glikolitikus útvonalat, és D-xilóz valamint L-arabinóz segítségével a pentóz-foszfát útvonalat. Minden szénforrás esetében azt az optimális kiindulási szénforrás koncentrációt alkalmaztuk, amivel a legmagasabb itakonsav moláris hozam érhető el. Ez D-glükóz és D-fruktóz esetében 120 g/l; D-xilóz esetében 50 g/l; L-arabinóz esetében pedig 80 g/l volt. A kísérletben résztvevő tenyészeteket két csoportra osztottuk mangán ellátottság szempontjából: egy itakonsav túltermelés szempontjából előnyös, de növekedés szempontjából hátrányos, 1,5 µg/l koncentrációt, valamint egy biomassza gyarapodáshoz megfelelő, viszont itakonsav túltermelés szempontjából erősen hátrányos, 300 µg/l koncentrációt állítottunk be.

Szakirodalmi adatok alapján egyértelmű volt, hogy emelnünk kell a rézionok koncentrációját a fermentációban. De meddig? Az *Aspergillus* fajok fémion toleranciája olykor meglehetősen magas [89], kíváncsiak voltunk a jelenlegi itakonsav termelő táptalajon milyen réz toleranciát mutat az *A. terreus* NRRL 1960, és hogy mutatkozik-e bármilyen különbség a glikolitikus útvonalon hasznosuló- és a pentóz-foszfát útvonalon hasznosuló szénforrások alkalmazásakor.

A 300 $\mu\text{g/l}$ mangán koncentrációval felvértezett tenyészetek 50 mg/l rézion koncentráció fölött mutattak esést a biomassza specifikus hozamában ($Y'_{x/s}$) az L-arabinóz kivételével, ahol 100 mg/l réz koncentráció fölött kezdett el csökkenni a biomassza specifikus hozama. A réz toleranciát tekintve különbségeket vehetünk észre a glikolítikus-, illetve a pentóz-foszfát útvonalon hasznosuló szénforrások között. Az előbbiek esetében még közel 1 g/l réz koncentrációnál állapíthatjuk meg a medián letális dózist (LD50), amíg utóbbiak esetén ez 0,75 g/l környéken van (**9. táblázat**).

9. táblázat Az *A. terreus* tenyészetek Cu(II)-ion toleranciája 1,5 µg/l és 300 µg/l Mn(II) koncentráció mellett. A lombikok frissen készített spóraszuszpenzióval inokuláltak. **A panel:** LD50 értékek különböző külső Mn(II) és Cu(II) koncentrációk függvényében. LD50 értékek annál a Cu(II) koncentrációnál kerültek meghatározásra, ahol a maximális specifikus növekedési ráta (3,3 mg/l Cu²⁺ koncentrációnál mért) lefeleződött. **B panel:** Az Cu²⁺ koncentráció ahol már a konidiospórák csírázása nem volt megfigyelhető.

A panel

	D-gükóz	D-fruktóz	D-xilóz	L-arabinóz
[300 µg/l Mn ²⁺]	981 mg/l	948 mg/l	752 mg/l	734 mg/l
[1,5 µg/l Mn ²⁺]	105 mg/l	102 mg/l	78 mg/l	48 mg/l

B panel

	D-gükóz	D-fruktóz	D-xilóz	L-arabinóz
[300 µg/l Mn ²⁺]	3 000 mg/l	3 000 mg/l	2 000 mg/l	2 000 mg/l
[1,5 µg/l Mn ²⁺]	250 mg/l	250 mg/l	100 mg/l	100 mg/l

A mangán koncentráció limitálásakor (1,5 µg/l) azonban a specifikus biomassza hozamának csökkenése már 75 mg/l réz koncentrációnál bekövetkezik a két hexóz szénforrás esetén, ugyanez az esés pentóz szénforrások esetében 25 mg/l réz koncentrációnál jelentkezik. A konidiospórák réz toleranciáját tekintve hasonló rajzolat olvasható ki: eltérő a glikolitikus és pentóz-foszfát útvonalon hasznosuló szénforrások esetében, valamint a réz toleranciát erőteljesen befolyásolja a mangánionok jelenléte vagy limitációja.

Eddigi eredményeink alapján tehát elmondható, hogy az *A. terreus* NRRL 1960 fonalas gomba törzs réz toleranciája igen magas folyékony tápközegben. Eltérő toleranciát mutat hexóz és pentóz szénforrásokon, valamint a mangánionok limitációja mindkét típusú szénforráson csökkenti azt.

5.2.2.2 *A. terreus* itakonsav termelésének vizsgálata réz gradiens mellett

Előző fejezetben láthattuk, hogy az *A. terreus* NRRL 1960 törzs réz toleranciája figyelemreméltó, viszont a pentózos fermentációk és a mangán limitált fermentációk vizsgálatakor szűkös keretek közé szorulunk. Mirminachi által elvégzett kísérletek azonban mintha azt sugallnák nekünk, hogy közel 1:1000-hez arány kell a rézionok javára, hogy sikeresen antagónizálható legyen a „mangán-hatás” az *A. niger* citromsavas fermentációi esetében [9]. Ezért kísérleteink során ezen arány fölé, egészen 400 mg/l értékre emeltük a Cu(II) koncentrációját.

Az általunk kontrollként alkalmazott, Kuenz által optimalizált táptalaj réz koncentrációja 3,3 mg/l volt [51]. Mangán limitált tenyészeteknél éppen ennél a koncentrációnál értünk el a legmagasabb moláris hozamokat (**10. táblázat**). A legjobb hozamot D-glükóz szénforráson mértük ($Y_{p/s}=0,83$) amelyet szorosán a másik glikolítikus szénforrás, a D-fruktóz követett ($Y_{p/s}=0,80$). Pentózok esetében nem sikerült elérni ilyen magas hozamokat, teljes összhangban a korábbi eredményeinkkel (**5. táblázat**), ahol az L-arabinóz még a D-xilóznál is rosszabb szénforrásnak bizonyul (csupán 0,32 moláris hozam érték kontroll réz koncentráció mellett).

10. táblázat Itakonsav specifikus moláris hozama ($Y_{p/s}$) egységnyi biomaszára levetített eredő itakonsav hozam ($Y_{p/x}$) és a biomasza hozama ($Y_{x/s}$) *A. terreus* NRRL 1960 törzs rázatott lombikos fermentációiban. A panel: mangán limitáció mellett (1,5 $\mu\text{g/l}$). B panel: 300 $\mu\text{g/l}$ mangán koncentráció mellett. N.n: nincs növekedés. N. IA: nincs itakonsav termelődés.

A panel

Cu^{2+} (mg/l)	1,5 $\mu\text{g/l Mn}^{2+}$											
	D-glükóz			D-fruktóz			D-xilóz			L-arabinóz		
	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$
0,01	0,12	0,64	3,60	0,10	0,57	3,40	0,10	0,46	3,0	0,10	0,24	3,20
1	0,14	0,70	3,80	0,12	0,77	3,60	0,12	0,56	3,80	0,11	0,32	3,30
3,3	0,16	0,83	3,90	0,15	0,80	3,80	0,15	0,58	4,90	0,14	0,32	4,20
10	0,15	0,80	3,90	0,15	0,77	3,80	0,15	0,45	4,40	0,13	0,32	4,80
25	0,15	0,81	3,80	0,15	0,76	3,80	0,11	0,41	4,80	0,11	0,29	5,0
50	0,15	0,79	3,50	0,14	0,76	3,50	0,08	0,38	7,10	0,05	0,30	7,90
75	0,11	0,81	4,40	0,12	0,78	4,30	0,04	N. IA	N. IA	0,04	N. IA	N. IA
100	0,05	0,78	8,00	0,04	0,74	8,20	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,
250	0,03	0,70	12,50	0,02	0,68	12,10	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,
300	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,
400	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,	N.n.,

10. táblázat B panel

Cu ²⁺ (mg/l)	300 µg/l Mn ²⁺											
	D-glükóz			D-fruktóz			D-xilóz			L-arabinóz		
	Y _{x/s}	Y _{p/s}	Y _{p/x}	Y _{x/s}	Y _{p/s}	Y _{p/x}	Y _{x/s}	Y _{p/s}	Y _{p/x}	Y _{x/s}	Y _{p/s}	Y _{p/x}
0,01	0,30	0,15	0,36	0,28	0,12	0,30	0,25	0,06	0,20	0,25	N. IA	N. IA
1	0,31	0,31	0,75	0,29	0,29	0,70	0,29	0,06	1,10	0,30	0,02	0,60
3,3	0,32	0,36	0,81	0,33	0,34	0,75	0,30	0,09	1,40	0,28	0,03	1,20
10	0,31	0,40	1,10	0,33	0,43	0,95	0,30	0,11	1,60	0,29	0,03	1,90
25	0,30	0,51	1,80	0,30	0,48	1,50	0,31	0,17	1,90	0,29	0,03	0,50
50	0,25	0,65	2,5	0,24	0,66	2,40	0,28	0,22	2,50	0,29	N. IA	N. IA
75	0,22	0,67	2,5	0,20	0,67	2,30	0,27	0,24	1,20	0,29	N. IA	N. IA
100	0,19	0,65	2,6	0,20	0,66	2,70	0,25	0,25	0,30	0,23	N. IA	N. IA
250	0,17	0,73	3,1	0,16	0,68	3,50	0,19	N. IA	N. IA	0,20	N. IA	N. IA
300	0,16	0,82	3,8	0,15	0,71	3,60	0,17	N. IA	N. IA	0,16	N. IA	N. IA
400	0,14	0,79	3,5	0,13	0,72	3,50	0,13	N. IA	N. IA	0,12	N. IA	N. IA

A hexóz alapú fermentációknál egészen 100 mg/l értékig emelve a Cu(II) szintet nem csökken szignifikánsan az itakonsav specifikus moláris hozama. Pentózok esetében viszont 75 mg/l koncentrációnál nem tudunk itakonsavat detektálni a fermentáléban, még a fermentáció 72. órájában sem, ezért leállítottuk a kísérletet.

Érdekesség, hogy minden szénforrás esetében nemcsak, hogy megfelelő növekedést produkáltak a tenyészetek a réz- és mangánionok együttes limitációjakor ($\text{Cu}^{2+} = 0,01 \text{ mg/l}$), hanem sikeresen termeltek itakonsavat, noha ezek a fermentációk, D-glükóz, és D-fruktóz esetében a leggyengébb moláris hozamokat eredményezték. Továbbá a réz limitációja a fermentációk elnyúlását eredményezi hexózokon. A fermentáció átlagos hossza D-glükóz szénforráson kontroll (3,3 mg/l) Cu(II) koncentráció mellett 160 óra, a szénforrás kimerülésig, amíg ugyanez átlagban 220-240 órát vesz igénybe a rézionok limitálásakor. Ez a jelenség nem következik be D-xilóz szénforráson. Közös jellemzőnek tekinthető, (mind glikolitikus, mind pentóz-foszfát útvonalon hasznosuló szénforrások esetében) a fermentáció meghosszabbodása abban az esetben, ha Cu(II) koncentrációt kontroll szint fölé emeljük.

5.2.2.3 Magas Mn(II) koncentráció antagonizálása Cu(II) gradienssel

Mn(II) koncentráció megemelésével (300 $\mu\text{g/l}$), minden alkalmazott szénforráson drasztikusan romlik az itakonsav moláris hozama (**10. táblázat**). A réz gradiens előrehaladtával azonban egyre javulnak az elért hozamok. D-glükóz esetében egészen visszaállítható a mangán limitált kontroll hozama, amíg D-fruktóz alapú tenyészeteknél a mangán

limitált kontroll hozamának közel 90%-a visszanyerhető. Vagyis glikolitikus szénforrásokon sikeresen ellensúlyozható rézionokkal a „mangán hatás”. Ugyanez nem mondható el a pentóz-foszfát útvonalon hasznosuló szénforrásokat vizsgálva. D-xilózon ugyan enyhe javulás érzékelhető a réz-koncentráció emelésének hatására, viszont a csupán az optimalizált fermentációs beállítás mintegy fele nyerhető vissza. 250 mg/l Cu^{2+} koncentráció fölött pedig megakad az itakonsav termelődése. Nem sikerült eredményesen itakonsavat termeltetni L-arabinóz szénforráson magas mangán koncentrációnál (300 $\mu\text{g/l}$). Alacsonyabb réz szinteknél is elvértve tapasztalunk itakonsav képződést, amíg 50 mg/l vagy a fölé emelve egyáltalán nem.

5.2.2.4 Mangán- és rézionok fermentációban való arányának hatása a fungális morfológiára

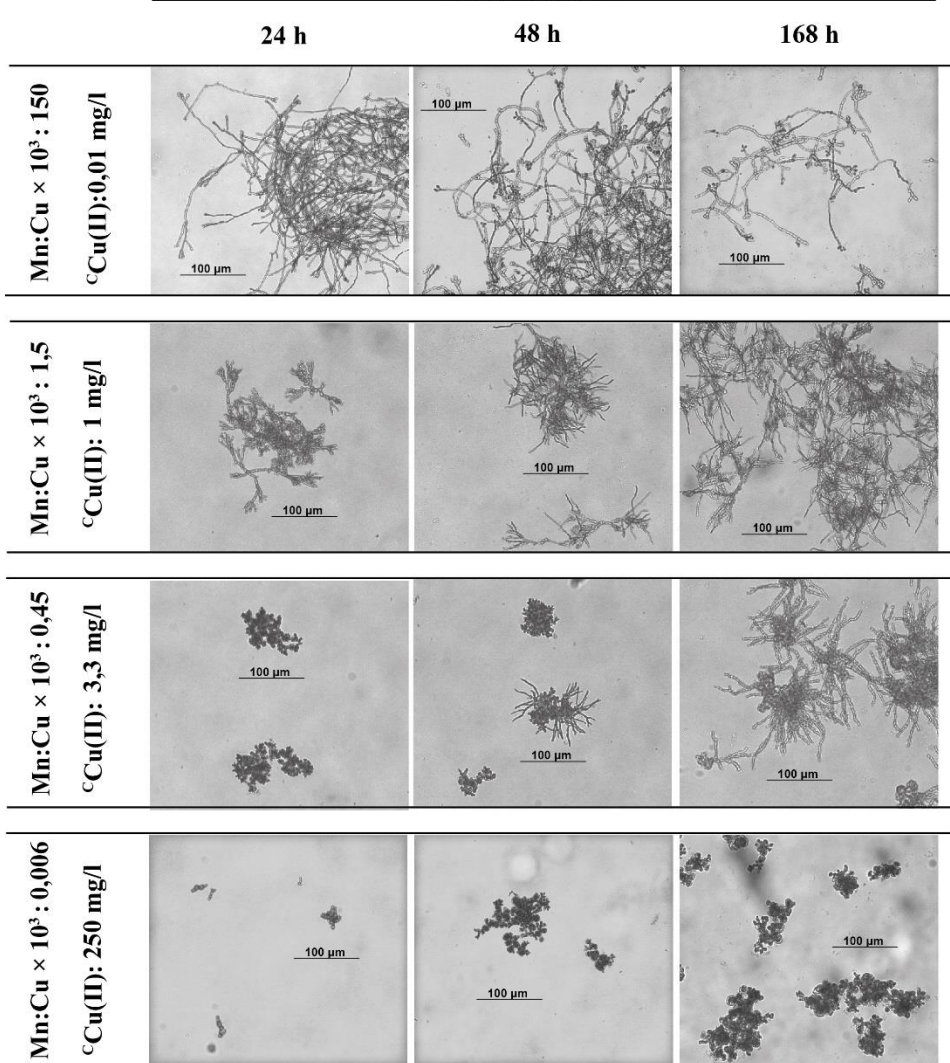
Korábbi kísérleteink során, szinte már indikátorként tudtuk használni a fermentációk 24. órájában nyert morfológiai képeket. Kontroll réz koncentrációnál (3,3 mg/l) ugyanis amikor limitáltuk a mangán koncentrációját (< 3 $\mu\text{g/l}$) a gomba morfológiája lekerekedett, duzzadt, már-már élesztő formára emlékeztető képleteket mutatott. Amennyiben 5 $\mu\text{g/l}$ -nél több Mn(II)-ion került a rendszerbe, akkor az *A. terreus* felvette a klasszikusnak mondható, fonalas gomba morfológiát, vagyis vékony, sűrűn elágazó, szinte a rendelkezésre álló teret teljesen betöltő hifa hálózatokat vehettünk észre. Mindkét morfológiai megjelenés D-xilózon és D-glükóz szénforráson egyaránt megfigyelhető volt (**6. ábra**). Ezért a táptalajok „mangánmentesítő” előkezelése után egyfajta verifikációként használtuk a mikroszkópos képeket, ezzel sokszor megelőzve az ICP-MS

további megerősítését a pontos koncentrációról. A két morfológiai megjelenést ezért egyfajta igen-nem kérdésre adott válaszként kezeltük: lekerekedett sejtek, tehát sikeres a mangán limitáció, vagy fonalas morfológia, tehát több mint 3 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) van a fermentlében.

Az előzőekben leírtak függvényében először némi bosszankodásra, majd meglepetésre adott okot, amikor mangán limitált tenyészeteknél Cu(II) gradienst vettünk fel (**11. ábra**). Látható, hogy ha a 3,3 mg/l kontroll szint alá visszük a Cu(II) koncentrációt a morfológia a fonalas megjelenés felé tolódik D-glükóz szénforráson. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy az *A. terreus* által mutatott morfológia nem pusztán egy adott ion (esetünkben a mangán) abszolút koncentrációjától függ, hanem a fermentlében lévő ionok, és egyéb táptalaj komponensek arányától. Ez a gondolatmenet teljesen beleillik Welter megfigyeléseibe [60], ahol a CaCl_2 koncentráció növelésével a morfológia fonalassá, pelletszerűre vált.

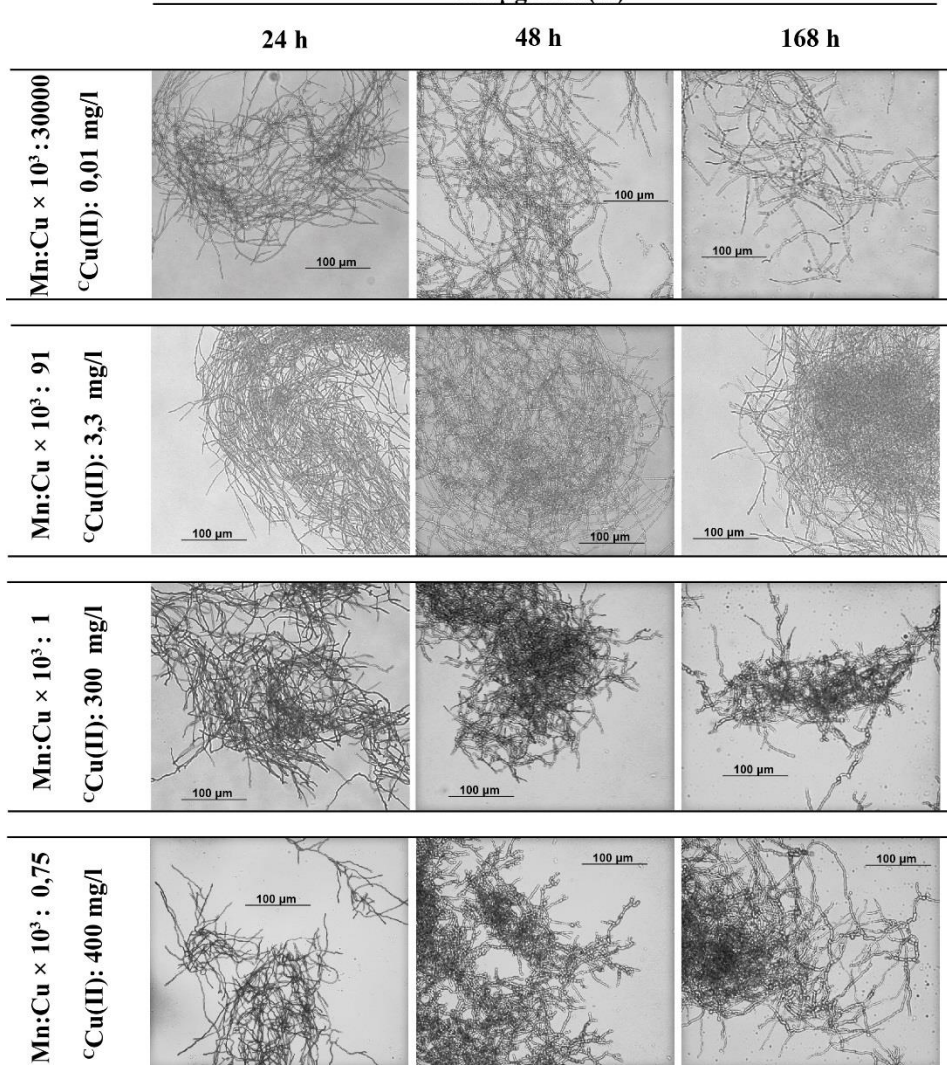
A fungális morfológia kvantitatívvá tételéhez ismét a hifaátmérő, illetve a pelletátmérő lemérését választottuk. A mangán limitált D-glükózon növekvő tenyészetek a legkisebb réz koncentrációnál (0,01 mg/l) alakultak ki a legkisebb átmérővel rendelkező hifák (**1. Függelék A panel**). A réz koncentráció emelésével egyre vastagodó hifafonalakkal találkozunk egészen 25 mg/l Cu(II) koncentrációig, ahol a tendencia megfordul, és réz koncentráció további növelése ismét vékonyodó hifákat eredményez.

1,5 µg/l Mn(II)



11. ábra *A. terreus* NRRL 1960 mangán limitált tenyészteteinek morfológiai képei, D-glükóz szénforráson, réz-gradiens függvényében a fermentáció kezdeti szakaszában, illetve a fermentáció végső szakaszában. A függőleges tengelyen a tenyésztetben lévő Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja, valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható.

300 µg/l Mn(II)



12. ábra *A. terreus* NRRL 1960 tenyészeinek morfológiai képei 300 µg/l mangán jelenlétében, D-glükóz szénforráson, réz-gradiens függvényében a fermentáció kezdeti szakaszában, illetve a fermentáció végső szakaszában. A függőleges tengelyen a tenyészetben lévő Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja, valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható.

Jelentős eltéréseket tapasztalhatunk a hifaátmérők között (**1. Függelék A panel**), és az is megfigyelhető, hogy a 80% fölötti itakonsav moláris konverziók, jellemzően a vastagabb hifaátmérőknél jelennek meg (**10. táblázat A panel**). Általánosságban az is elmondható, hogy a hifaátmérő értéke már a fermentáció első 24-48 órájában stabilizálódik.

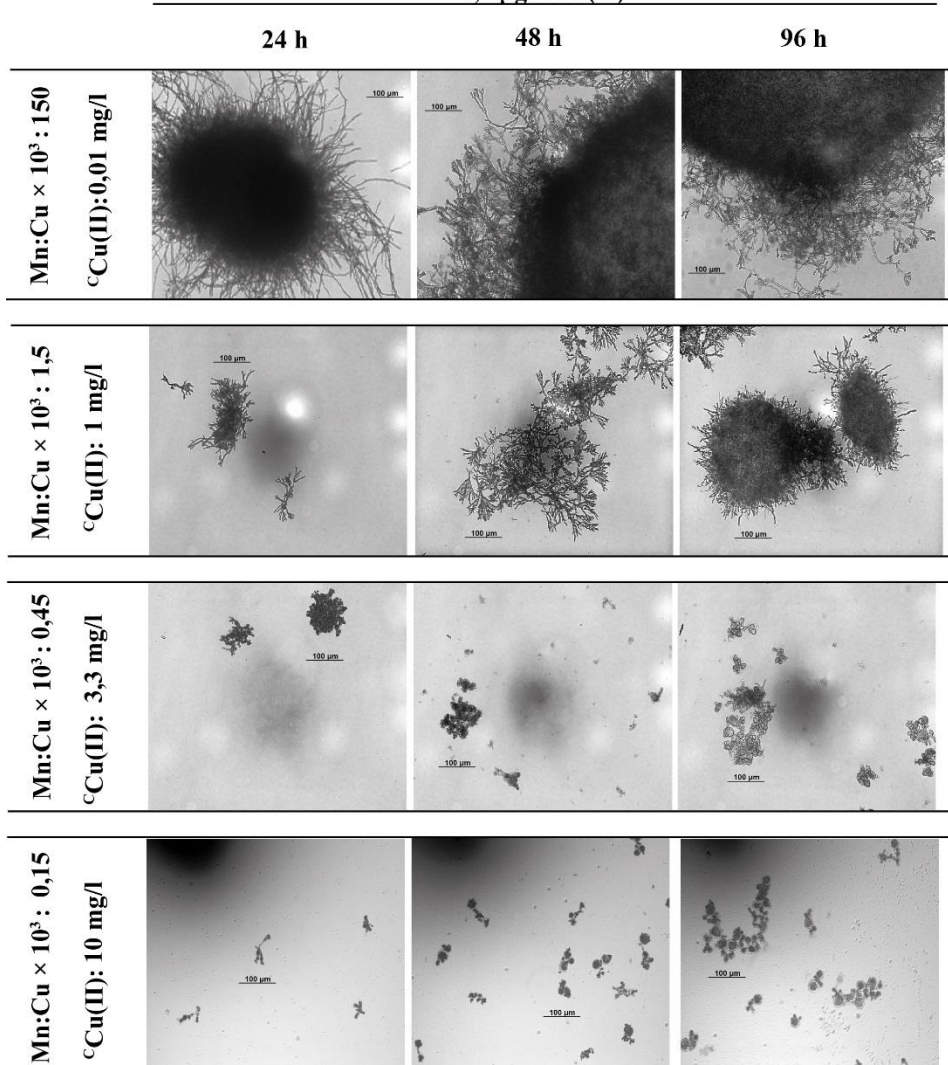
Amennyiben mangánnal látjuk el tenyészeteket, igen vékony, hajszálszerű hifákkal találkozunk D-glükóz szénforráson (**12. ábra** és **1. Függelék**), többségében 2,5 μm alatti hifaátmérőkkel. Azonban, ha a Cu(II) koncentrációját 100 mg/l vagy a fölé emeljük, a hifaátmérők növekedését tapasztalhatjuk, amely erőteljesebben jelentkezik a fermentáció későbbi szakaszaiban. A legmarkánsabb változás a 300 és 400 mg/l Cu^{2+} ellátottság esetén figyelhető meg, amely mérés nélkül, már a mikroszkópos felvételen is látszik (**12. ábra**). Bár első ránézésre tipikus fonalas morfológiát láthatunk, ám jobban megfigyelve, megvastagodott, göbös hifákat vehetünk szemügyre, amelyek megjelenése egyértelműen különbözik az alacsonyabb réz koncentrációval rendelkező „mangános” fermentációktól.

Az itt feljegyzett adatok tovább erősítik azt a megfigyelést, hogy az *A. terreus* süllyesztett fermentációnál a morfológiát a táptalaj komponensek egymáshoz viszonyított aránya és nem egy adott komponens abszolút koncentrációja határozza meg. A magas mangán koncentrációval rendelkező tenyészeteknél a hifaátmérő 2 μm körüli értéken maradt, amennyiben a Mn:Cu arány magasabb $1,2 \times 10^{-3}$ értéknél. Azonban, ha ez az érték 1×10^{-3} és $0,75 \times 10^{-3}$ között mozgott, akkor a hifák jelentős megvastagodását jegyezhetjük fel, amely egyben magával vonja az

itakonsav specifikus moláris hozamának jelentős növekedését is. Ezzel szemben a mangán limitált fermentációknál nem írható le ennyire egyértelmű összefüggés, viszont itt is leszögezhető, hogy $1,2 \times 10^{-3}$ arány fölé emelkedve az átlagos hifaátmérők egyre vékonyodnak, amely szinte már törvényszerűen lerontja az itakonsav termelődést.

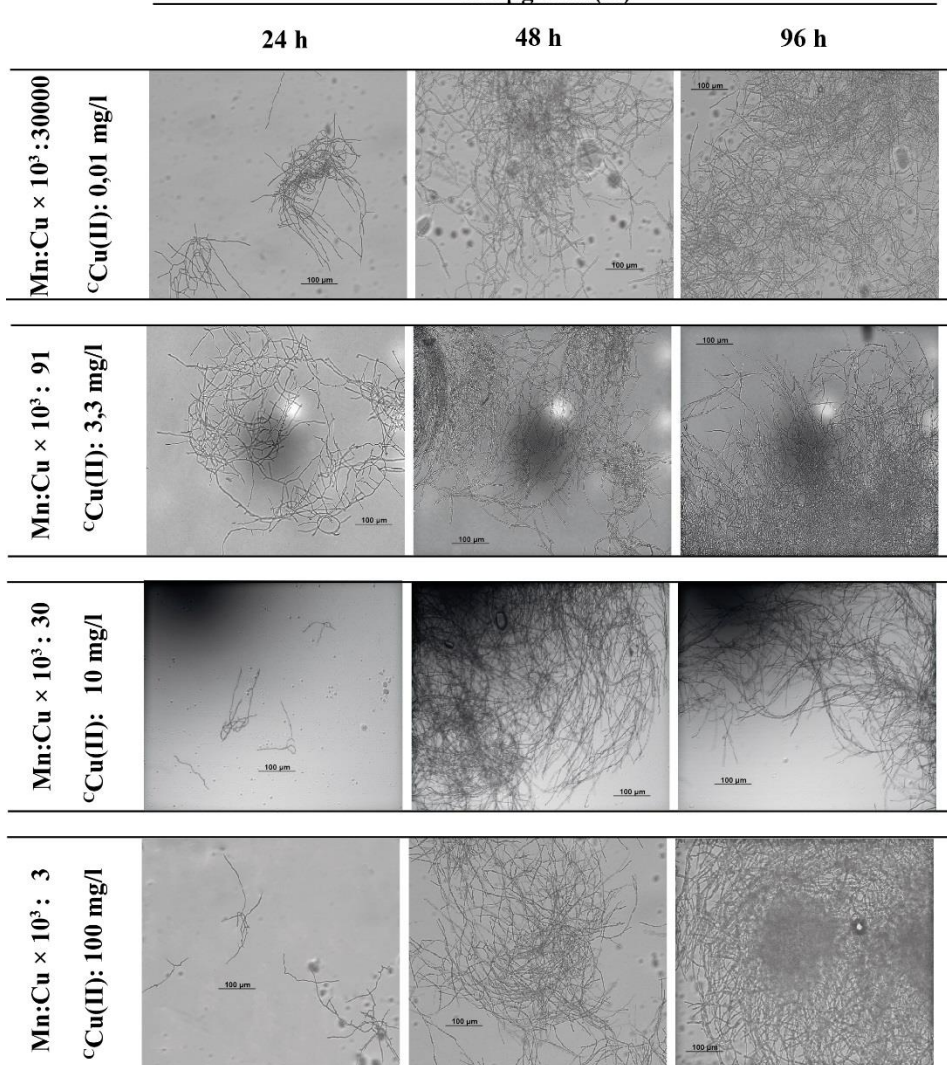
Makromorfológiai szinten magas mangán koncentráció mellett, alacsony réz ellátottság esetén laza hifahálózatokat fedezhetünk fel, amelyek a réz gradiens előrehaladtával „clump” jellegű morfológia irányába tolódnak el (**12. ábra**). Az átlagos pelletátmérők jellemzően 350 μm fölötti értékeket vesznek fel ebben a tartományban (**2. Függelék**). Amennyiben a Cu(II) koncentrációját 250 mg/l fölötti szintre emeljük, akkor az pelletátmérők átlaga 350 μm -ról 250 μm -re csökken. Mangán limitáció mellett pedig egyértelműen kirajzolódik a réz gradiens hatása, a pelletátmérők, konstans egyenletes csökkenést mutatnak (**2. Függelék és 11. ábra**).

1,5 µg/l Mn(II)



13. ábra *A. terreus* NRRL 1960 mangán limitált tenyészteteinek morfológiai képei, D-xilóz szénforráson, réz-gradiens függvényében a fermentáció kezdeti szakaszában, illetve a fermentáció végső szakaszában. A függőleges tengelyen a tenyésztetben lévő Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja, valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható.

300 $\mu\text{g/l}$ Mn(II)



14. ábra *A. terreus* NRRL 1960 tenyészeinek morfológiai képei 300 $\mu\text{g/l}$ mangán jelenlétében, D-xilóz szénforráson, réz-gradiens függvényében a fermentáció kezdeti szakaszában, illetve a fermentáció végső szakaszában. A függőleges tengelyen a tenyészetben lévő Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja, valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható.

Hasonló sémát figyelhetünk meg D-xilóz alapú fermentációknál is. Mangán ínség esetén alacsony réz koncentrációnál jelentősen megnövekednek a pelletátmérők, amíg a réz koncentráció emelkedésével vastag, itakonsav túltermelésnél jellemző „élesztőszerű” képletek megjelenése a jellemző, annyi kivétellel, hogy alacsony réz koncentrációknál a hifacsomók teljesen bezáródnak, kompakt pelleteket alkotva (**13. ábra**). A réz koncentráció emelése a pelletátmérők csökkenésével jár (**4. Függelék**), amely megegyezik D-glükóz szénforráson feljegyzettekkel. Magas mangán ellátottság esetén (300 µg/l), és alacsony réz koncentrációknál, ismét a 2 µm körüli vastagságú hifákkal találkozhatunk, amelyek a réz gradiens emelésére elkezdnek vastagodni (**3. Függelék**). A hifaátmérők vastagodása pedig ismét maga után vonja az itakonsav specifikus moláris hozamának emelkedését is (**10. táblázat**), viszont itt a glikolitikus útvonalon hasznosuló szénforrásokkal ellentétben nem sikerül visszaállítani az optimális fermentációs körülmények mellett nyert moláris konverziót.

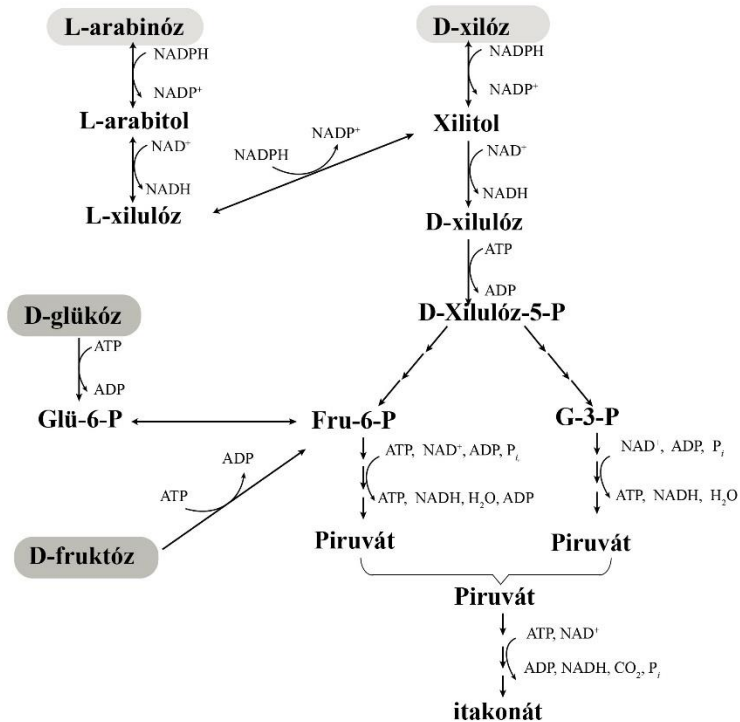
5. Eredmények értékelése

Kutatómunkám megkezdésekor még viszonylag kevés adat állt rendelkezésre arról hogy milyen összefüggések írhatók fel az *Aspergillus terreus* itakonsav túltermelése és a fermentlé mangánion tartalma között. Kutatócsoportunk korábbi eredményei D-glükóz szénforráson való viselkedést tárgyalták, ezért szerettük volna megvizsgálni a mangánionok hatását más szénforrásokon is. Kézenfekvő választás a D-xilóz, mivel eltérő biokémiai útvonalon hasznosul [32], valamint a növényi hidrolizátumok egyik fő alkotója [90], amivel modellezhetővé válik az alternatív szubsztrátumokon való fermentáció is.

Első ízben a két kritikus paraméternek ítélt beállítást próbáltuk ki D-xilóz szénforráson is, amelyek a Mn(II) koncentráció limitálása ($< 5 \mu\text{g/l}$) és a magas kiindulási szénforrás koncentráció alkalmazása ($> 100 \text{g/l}$) voltak. Várakozásaink egyrésztől megállták a helyüket, másrésztől megdőltek. A D-glükózhoz hasonlóan a legmagasabb specifikus moláris hozamokat a legkisebb mangán koncentráció mellett, vagyis a laboratóriumunkban megvalósítható, legerőteljesebb limitáció mellett ($1,5 \mu\text{g/l}$) értük el D-xilóz szénforráson is (**5. ábra**). Ezen megállapításunk arra enged következtetni, hogy a „mangán-hatás” szénforrás független az *A. terreus* süllyesztett-, itakonsav túltermelő fermentációi során. A jelenség háttérében valószínűsíthetően a fonalas morfológia kialakulása, a megemelkedett biomassza értékek állnak és ennek egyenes következménye, a reológiai viszonyok kedvezőtlené válása, amely erőteljesen megnehezíti az amúgy sem egyszerű, levegőztetés folyamatát [52, 68, 79].

A kiindulási xilóz koncentráció emelésével nem sikerült a glükóznál tapasztalt, robbanásszerű hozam emelkedést reprodukálni (**8. ábra**). Megjegyzendő, hogy a vizsgált legmagasabb kiindulási D-xilóz koncentrációnál (11 %w/v) mérhettük a legtöbb itakonsavat a fermentlében, viszont ez egyszerűen a több betáplált szubsztrátumnak köszönhető. Noha statisztikailag szignifikáns eltérést nem írhatunk le 5-7-9-11 %(w/v) D-xilóz tartalmú tenyészetek specifikus moláris hozamai között, ennek ellenére egy trendszerű csökkenést érzékelhetünk 7% kiindulási koncentráció fölé emelve a xilóz tartalmat. Ezért az optimális kiindulási D-xilóz koncentrációt 50 g/l-ben állapítottuk meg, ahol a legmagasabb specifikus moláris hozamokat mértük. Ennek függvényében úgy tűnik, hogy a glükóz koncentráció emelésére adott válasz inkább a glikolitikus útvonal sajátossága, mintsem az *A. terreus* itakonsav túltermelésére jellemző általános séma. *A. niger* esetében a D-glükóz koncentráció 10%(w/v) fölé emelése a piruvát-karboxiláz enzim-, másrészt a fruktóz-1,6-biszfoszfát képződését stimulálja, amely felszabadítja a túltermelő mechanizmust a citrát gátlása alól [91].

Az általunk beállított optimum mellett sem sikerült megközelíteni az elméleti maximális hozamot D-xilóz szénforráson. Pedig pusztán elméleti síkon mozogva -a biokémiai reakciókat figyelembe véve- azonos hozamokat kellene elérnünk glükóz- illetve xilóz alapú fermentációkban (**15. ábra**). Logikus volt feltételezni, hogy valamely melléktermék, vagy melléktermékek halmozódnak fel a fermentlében az itakonsav rovására, ám tovább vizsgálva a fermentlevet nem találtunk nagyobb mennyiségben semmilyen szennyezőt, amely magyarázhatta volna a hozamkiesést.



$D\text{-glükóz} + O_2 + ADP + P_i + 3 NAD^+ = ATP + 3 NADH + 2 H_2O + CO_2 + \text{itakonát}$
$D\text{-fruktóz} + O_2 + ADP + P_i + 3 NAD^+ = ATP + 3 NADH + 2 H_2O + CO_2 + \text{itakonát}$
$D\text{-xilóz} + NADPH + 3.5 NAD^+ + 0.83 P_i + 0.83 ADP =$ $0.83 \text{ itakonát} + NADP^+ + 3.5 NADH + 0.83 ATP + 0.83 H_2O + 0.83 CO_2$
$L\text{-arabinóz} + 2 NADPH + 4.5 NAD^+ + 0.83 P_i + 0.83 ADP =$ $0.83 \text{ itakonát} + 2 NADP^+ + 4.5 NADH + 0.83 ATP + 0.83 H_2O + 0.83 CO_2$

15. ábra Az itakonsav termelődés egyszerűsített sémája *A. terreus* fonalas gombában. Az ábra intermedierjei együtthatók nélkül kerültek feltüntetésre. A pontos mennyiségek az egyenletekben szerepelnek. Rövidítések: Glü-6-P: glükóz-6-foszfát; Fru-6-P: fruktóz-6-foszfát; D-xilulóz-5-P: D-xilulóz-5-foszfát; G-3-P: gliceraldehyd-3-foszfát.

Szakirodalmi adatok alapján, az *Aspergillus* nemzetségben a D-xilóz metabolikus fluxus szabályozásért nagy mértékben a NADPH-függő

xilóz reduktáz enzim a felelős, amely az útvonal első lépése [92]. Mivel csak nyomnyi mennyiségű xilitol intermediert sikerült kimutatnunk a fermentléből, feltételezhetjük, hogy valóban xilóz reduktáz katalizálta reakció a sebességmeghatározó lépés, amelyet sokkal inkább a NADPH hiány limitálhat. Korábban, az *A. nidulans*-ban leírt NADH-kináz enzim overexpressziója képes volt növelni a NADPH/NADH arányt, amely elősegítette a növekedést D-glükózon [93]. Számításaink szerint viszont ez nem állná meg a helyét xilózon való túltermeltetés esetében, hiszen felemésztené a citoszólban termelődött NADH több mint felét, így a sejtek még kevesebb energiához jutnának D-xilózon való növekedéskor. Singh és munkatársai *A. nidulans* esetében leírták, hogy amennyiben nitrát található a táptalajban, akkor mind a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz, illetve izocitrát-dehidrogenáz aktivitása megemelkedik számos szénforráson, beleérve a xilózt is [94]. Feltételezzük, hogy *A. terreus* esetében is hasonló jelenség játszódhat le. A NADPH nélkülözhetetlen az anabolikus felépítő folyamatokhoz, így amennyiben a xilóz reduktáz működése elvonja azt, csökkentheti a sejtek növekedéséhez szükséges metabolitok képződését is. Eredményeink azt sugallják, hogy úgy lehetne hatékonyan növelni az itakonsav specifikus moláris hozamának a mértékét D-xilóz szénforráson, ha egyben a biomassza eredő hozamát ($Y_{x/s}$) is növelnénk.

Fentebb leírtak alapján tehát olyan megoldás lendíthetne xilóz szénforráson való fermentációkon, amely növeli $Y_{(x/s)}$ értékét anélkül, hogy csökkenne az $Y_{(p/s)}$ érték. Az egyik lehetőség foszfoketoláz enzim overexpressziója. A foszfoketoláz enzim működését eredetileg

heterofermentatív tejsav baktériumoknál, illetve a D-xilóz fermentációjára képes élesztőknél írták le [95], a kétezres években kimutatták *A. nidulans*-ban is [96], ahol az enzim overexpressziója a biomassza eredő hozamát 0,19-ről 0,46-ra emelte [97]. A foszfoketoláz enzim a xilulóz-5-foszfátot rögtön gliceraldehid-3-foszfáttá és acetyl-foszfáttá hasítja. Ezzel a 2 ATP termelődésének lehetőségét biztosítja a sejtek a későbbiekben, szemben a kanonikus útvonallal, ahol 1 mol xilulóz-5-foszfát lebontásakor, mindössze 0,83 mol ATP szabadul fel. Természetesen a nyert 2 mol ATP fel is használandó a D-xilóz foszforilezésekor, illetve a piruvát-karboxiláz által katalizált reakcióban, teljesen egalizálva az ATP balansot. NADH mérleget tekintve pedig 1 mol keletkezik xilitol-xilulóz átalakulás során, és további 1 mol gliceraldehid-3-foszfát—1,3-biszfoszfo-glicerát átalakulás során. Azonban a citoszólban történő acetyl-CoA képződésének lehetősége acetyl-foszfátból, xilóz molekulánként eggyel kevesebb NADH képződését jelentené. Ne feledkezzünk meg róla, hogy a citoszólban rendelkezésre áll oxál-acetát is [25], így akár a pusztán citoszólikus itakonsav genézis is felsejlik, amelyet Hossain és mtsai. is evidenciába vettek, egy citoszólban lévő citrát-szintáz overexpressziója révén [98]. Amennyiben tehát az egész itakonsav bioszintézis a citoszólban játszódna le, az xilóz molekulánként 2 NADH és 0 ATP nyereséget eredményezne, végsősoron kevesebb energiát biztosítva a sejteknek, mint a kanonikus útvonal esetében. Pusztán az energia balansokat figyelembe véve nem kapunk rá magyarázatot, hogy a foszfo-ketoláz útvonal működése esetén, miért növekszik a biomassza eredő hozama, ezért azt feltételezzük, hogy a foszfo-ketoláz útvonal D-xilóz katabolizmusa esetén kikerülheti a pentóz-foszfát-útvonalat ezáltal intermediereket nyerve a felépítő folyamatokhoz.

Miután D-xilóz alapú fermentációink során kiderült, hogy a mangánionok jelenlétére adott „negatív válaszreakció” szénforrás független, megpróbáltuk, hogy pusztán a táptalaj komponensek változtatásával enyhíthető-e ez a jelenség. Elsősorban a foszfát- illetve réz tartalom hatását vizsgáltuk meg. A KH_2PO_4 koncentrációt 0,1 g/l-ről 0,8 g/l értékre emelve nem veszünk észre erőteljes változást az itakonsav hozamokban, teljes mangán limitáció mellett. Azonban, már 10 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) jelenléte képes megfelelni az itakonsav hozamot emelt foszfát szinten, amíg ez a jelenség nem következik be alacsonyabb foszfát tartalmak esetén. Ezzel szemben pont ellentétes hatást figyelhetünk meg a biomassza gyarapodását tekintve: másfélszeresére, kétszeresére emelkedik a DCW értéke (szénforrástól függően) a foszfát koncentráció emelésével. Ennek köszönhetően a fermentlé erőteljesen viszkózussá válik. Nem csupán a biomassza mennyiségére, de a tenyészet morfológiájára is hatással van a fermentlé foszfát koncentrációja [11]. Mangán limitáció esetén közel kétszer akkora átmérőjű pelletek formálódnak 0,8 g/l KH_2PO_4 koncentrációnál, mint 0,06-0,1 g/l esetében. Mangán hozzáadására pedig sokkal gyorsabban alakulnak ki nagyobb átmérőjű pelletek emelt foszfáton. Mangán és foszfát együttes limitációjakor pedig a fermentáció végéig, apró, élesztőszerű képletek maradnak, mind glükóz és xilóz szénforráson. Lejeune és Baron számításai alapján a gomba pellet középpontjába, a rendelkezésre álló oxigén közel teljes mértékben képes bediffundálni, ha a pelletátmérője 100-200 μm közé esik. 400 μm -nél már csak az oxigén 40%-a jut el a pellet középpontjába, 500 μm fölötti pelletátmérőnél pedig a közepén lévő sejtek egyáltalán nem jutnak oxigénhez [99]. Ezek alapján még mangán limitált tenyészeteknél végig ideális tartományban maradnak

a pelletátmérők (**7. táblázat**), amíg 10 µg/l Mn(II) jelenlétében csupán a fermentáció elején mondhatjuk el, amit a foszfát emelése tovább ront. Alacsonyabb oxigén ellátottság következtében pedig nem aktiválódik az alternatív oxidáz, amely működése szükséges az itakonsav túltermeléséhez [79]. A jelenséget az is jól alátámasztja, hogy irodalmi adatok alapján, microtiter plate alkalmazásával még jó itakonsav hozamokat eredményezett a foszfát koncentráció emelése [8], addig ugyanezt, 15 literes fermentorba átültetve, a pelletek túlzott növekedését eredményezte, így vissza kellett állítani a KH₂PO₄ koncentrációt az eredeti 0,1 g/l értékre [56]. A fermentorban feltételezhetően a mangán beoldódása lehetett az egyik faktor, amely a tenyészet túlzott növekedését okozta az itakonsav termelődés rovására.

A foszfát koncentráció emelése tehát nem enyhítette, hanem éppen hogy mélyítette az *A. terreus* itakonsav fermentációjának mangán érzékenységet. Ezzel szemben sikeresen elnyomtuk a „mangán hatást” rézionok koncentrációjának megemelésével, noha az *A. terreus* NRRL 1960 réz toleranciája erőteljes függést mutatott a szénforrástól és a Mn(II)-Cu(II) aránytól. A réz bár kisebb mennyiségben nélkülözhetetlen nyomelem, nagyobb mennyiségben toxicitást idéz elő, mivel lecserélheti az enzimek kofaktorát, ezzel működésképtelenné téve őket, illetve reaktív oxigéngyököket hozhat létre sejten belül [100]. Ennélfogva minden mikroorganizmusnak megfelelő apparátusa van a sejten belüli réz koncentráció szabályozására. A fonalas gombák esetében rézionok „kilökését”, azaz exportját a sejten kívülre, ATPáz enzimek látják el [101]. Ezen enzimek ATP felhasználásával képesek a többlet rezet eltávolítani, és

mivel sokkal erőteljesebb réz toleranciát észleltünk hexóz szénforrásokon (D-glükóz, D-fruktóz), mint pentózokon (D-xilóz, L-arabinóz), így feltételezzük, hogy a tolerancia a sejt általános ATP ellátottságától függ. A citromsav-ciklusig követve, ez 1,67 mol ATP/mol pentóz, illetve 2 mol ATP/mol hexóz [102]. Az egyik lehetséges magyarázat tehát, a kevesebb rendelkezésre álló ATP pentózon való fermentációkor. Egy másik lehetséges magyarázat, az eltérő NADPH redukáló erő. A fiziológias állapottól magasabb, sejten belüli réz koncentráció reaktív oxigéngyököket generál. Élesztők esetében kifejezetten a NADPH kofaktor igényű enzimek magasabb expressziós szintjét figyelték meg ebben az esetben, amelyek thioredoxin fehérjék regenerálásáért felelősek [103]. A rendelkezésre álló NADPH mennyisége pedig ismét csak alacsonyabb pentózokon fermentálva, L-arabinóz szénforrást használva pedig, még D-xilózhoz viszonyítva is kevesebb a sejt felhasználható NADPH mennyisége. Ez szintén magyarázatot adhat arra, hogy miért L-arabinóz szénforráson detektáltuk a legalacsonyabb réz toleranciát.

A Mn(II)- és Cu(II)-ionok koncentrációjának aránya egyértelmű hatással van az *A. terreus* NRRL 1960 fonalas gomba morfológiájára és ezáltal közvetve az itakonsav termelésére is. Kutatásaink bebizonyították, hogy több táptalaj komponens egymáshoz viszonyított aránya, és nem egyetlen komponens (például mangánionok) abszolút koncentrációja határozza meg a fungális morfológiát. Amennyiben limitáljuk a mangán koncentrációját a fermentáléban D-glükóz szénforráson, akkor 3,3-250 mg/l-es Cu(II) koncentráció tartományban az átlagos pelletátmérő értéke 60 μm vagy az alatti. Eközben az itakonsav specifikus moláris konverziója

is 80% körüli értéken mozog (ez alól egyedüli kivétel a 250 mg/l réz koncentrációnál mért 70% hozam, ami valószínűleg a növekvő toxicitásnak tudható be). Amennyiben csökkentjük a réz arányát a pelletek átmérője elkezd növekedni, a hifák pedig egyre vékonyabbak lesznek. 0,01 mg/l Cu(II) koncentráció esetén pedig hiába limitáljuk a mangán koncentrációját, a pelletek átmérője már a leoltást követő 24. órában átlagban nagyobb mint 350 μm , végül csupán 64 százalékos moláris konverziót eredményezve. Ezzel szemben magas mangán ellátottság esetén ($\text{Mn}^{2+} = 300 \mu\text{g/l}$), 0,01-250 mg/l Cu(II) koncentráció tartományban a pelletátmérők végig 350 μm -es méret fölé nőnek és az elért hozam nem elégti ki magas konverziójú szerves savas fermentáció fogalmát ($Y_{p/s} = 0,15-0,73$). 300-400 mg/l Cu(II)-iont adva a fermentléhez a pelletátmérők átlaga pedig 250 μm alatt marad a fermentáció végéig és a moláris konverziók rögtön 80%-ra ugranak fel. Xilóz szénforrás esetén is hasonló séma lejátszódását figyelhetjük meg: mangán limitáció esetén a pelletátmérők értéke 100 μm alatt marad, amíg az itakonsav hozama 38-56% között van. Itt a hozam esés jóval hamarabb fellép, feltételezhetően a pentóz szénforráson tapasztalt erősebb réz szenzitivitás miatt. A mangánnal dúsított xilóz alapú fermentációknál pedig végig 350 μm fölötti pelletek alakulnak ki a leoltást követő 48. órában, 30% alatti moláris konverziókat eredményezve, amelyek, bár javuló tendenciát mutatnak a réz gradiens emelésére, viszont a mangán limitált fermentációknál tapasztalt konverziókat nem sikerül visszaállítani, feltételezhetően a korábban részletezett, szénforrás függő réz toleranciának köszönhetően.

6. Összefoglalás

Doktori kutatómunkám során az *A. terreus* fonalas gomba itakonsav termelését tanulmányoztam különböző szénforrásokon. Kísérleteim során fiziológiai megközelítést alkalmaztam, próbáltam a táptalaj komponenseinek hatásait megfigyelni a fermentációk során. Az itakonsav termeltetésével foglalkozó publikációk meghatározó trendje volt az elmúlt évtizedben a megfelelő alternatív szénforrás felkutatása annak érdekében, hogy csökkenteni lehessen az itakonsav előállítás költségeit. A különböző növényi hidrolizátumok racionális alternatív szubsztrátnak tekinthetők. Ezért kutatásaim során kiemelt figyelmet szenteltem a D-xilóz alapú fermentációknak, hiszen a növényi hidrolizátumok egyik fő alkotó komponense. A xilóz alapú fermentációk tanulmányozásával jobban megérthetjük a tenyészet válaszreakcióit, amelyeket különböző hidrolizátumok fermentációja során adnak.

Kísérleteinket a D-glükóz és D-xilóz szénforrások párba állításával végeztük el, ezzel feltérképezve az *A. terreus* itakonsav termelését két eltérő biokémiai útvonalon (glikolízis vs. pentóz-foszfát-útvonal). A mangán érzékenység tekintetében azonos módon reagált a gomba mindkét szénforráson, már 5 $\mu\text{g/l}$ fölötti Mn(II) koncentráció szignifikánsan rontja a termelt itakonsav hozamát, vagyis az elért hozamok teljes mangán limitáció mellett ($\sim 1,5 \mu\text{g/l}$) maximalizálhatóak.

D-glükóz esetén a 80% fölötti moláris konverziók magas kiindulási szénforrás koncentráció ($> 100 \text{ g/l}$) mellett érhetőek el. D-xilózt alkalmazva már 50 g/l -nél tetőzött a hozam ($Y_{p/s}=0,61$), melyet a kiindulási

xilóz koncentráció további növelésével nem tudtunk tovább javítani. Mivel xilózon nem sikerült megközelíteni az elméleti maximális hozamokat, megvizsgáltuk a lehetőségét valamilyen melléktermék felhalmozódásának, ám nagyobb mennyiségben semmilyen mellékterméket sem sikerült kimutatni. Egységnyi biomassza kialakításhoz több szénforrásra van szükség xilóz alapú fermentációk esetében, mint a glükóz alapúaknál. Ezért a xilóz alapú itakonsavas fermentációk hozamát azzal lehetne növelni, ha közben biomassza eredő hozamát ($Y_{x/s}$) is képesek lennénk javítani.

Miután megállapítottuk, hogy mangánionok jelenléte mindkét szénforrás alkalmazásakor hasonló negatív hatást fejt ki, megkíséreltük úgy változtatni a táptalaj komponensek arányát, hogy képesek legyünk enyhíteni ezt a hatást. A foszfát koncentrációjának emelésével a mangán jelenlétének negatív hatása tovább erősödött. Bár teljes mangán limitációjánál nem okozott egyértelmű hozam csökkenést a foszfát koncentráció emelése, mind D-glükóz mind D-xilóz alapú fermentációkat figyelembe véve, 10 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) koncentráció mellett már drasztikusan csökkent az itakonsav hozama 0,8 g/l kiindulási KH_2PO_4 hozzáadásával: mindkét szénforrás esetén 40%-al rontva a moláris hozamot a foszfát limitált fermentációkhoz képest. Tehát a foszfát koncentrációját mindenképpen limitálni kell a táptalajban a sikeres itakonsav termelés érdekében.

A fermentlé Cu(II) koncentrációjának emelésével sikeresen ellensúlyoztuk a Mn(II)-ionok hatását D-glükóz és D-fruktóz szénforráson. Glükóz esetében teljes mértékben ($Y_{p/s}=0,82$), amíg fruktóz esetében 90%-ban ($Y_{p/s}=0,72$) sikerült visszaállítani a mangán limitált kontroll hozamát,

300 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) jelenlétben. Ekkor közel ezerszeres mennyiséget kellett adni rézionokból (300-400 mg/l) a mangánionokhoz képest. Ezzel szemben csak mérsékelten sikerült enyhíteni a mangánionok hozam-csökkentő hatását D-xilóz szénforráson: 3,3 mg/l Cu(II) koncentráció mellett elért 9%-os moláris konverziót csupán 25%-ra sikerült emelni 100 mg/l Cu(II) adagolásával, amíg a mangán limitált tenyészetek 58%-os moláris konverziót produkáltak. Az L-arabinóz a leggyengébb szénforrásnak bizonyult: még teljes mangán limitáció mellett is csak 32%-os moláris konverziót értünk, és 300 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) jelenlétben csak nyomnyi mennyiségben termelt a tenyészet itakonsavat, amin a réz adagolása nem segített. Kutatásaink során bebizonyítottuk, hogy *A. terreus* NRRL 1960 réz toleranciája szénforrás függő, sokkal ellenállóbb hexózokon, mint pentózok esetében. A jelenség hátterében feltételezhetően a sejtek gyéresebb ATP ellátottsága állhat pentózokon történő fermentáció során. A fonalas gombák alapvető réz detoxifikáló mechanizmusa során ATPáz enzimek, ATP felhasználásával távolítják el a citoplazmában felhalmozódó többlet rézet [101], így ez a mechanizmus jóval kisebb hatásfokú lehet pentózokon való növekedéskor.

A kiindulási szénforrás koncentráció változtatását leszámítva, bármelyik táptalaj komponens arányát változtattuk, szembetűnő, hogy az *A. terreus* itakonsav túltermelése erőteljesen függ a gomba morfológiájától. Teljes mangán limitáció alkalmazásakor (1,5 $\mu\text{g/l}$ Mn²⁺) a hifák lekerednek, megduzzadnak, 8-10 μm körüli átmérőket felvéve, amíg 5 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) koncentrációnál köztes morfológiát mutatnak a tenyészetek. 10 $\mu\text{g/l}$, vagy a fölötti Mn(II) koncentráció esetén 2 μm átmérőjű vékony,

hosszú hifák alakulnak ki. A KH_2PO_4 koncentráció megemelése 0,1 g/l értékről 0,8 g/l-re ugyan nem befolyásolja a hifaátmérőket, és nincs különösebb hatással a pelletátmérőkre mangán limitáció esetén, viszont elősegíti a nagyobb pelletek ($>450 \mu\text{m}$) kialakulását már 10 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) jelenlétben. Ezt a morfológiai jelenséget a hozamok változásai is hűen tükrözik.

Az optimális fermentációs körülmények mellett (foszfát és mangán limitáció), 3,3 mg/l Cu(II) hozzáadásával a pelletek átmérője átlagban 100 μm vagy az alatti, amíg a moláris konverziók 80% fölöttiek. Amennyiben 300 $\mu\text{g/l}$ Mn(II)-t adtunk a rendszerhez a pelletek ismét 350 μm fölöttiek, gyenge hozamokkal társulva. Ezzel szemben amikor a réz többlet adagolásával sikerült visszaállítani a kontroll moláris konverziót, a pelletek átmérője 200 μm körüli értéken marad a fermentáció végéig.

Az előbbieket összefoglalva: az igazán magas moláris konverziók eléréséhez kisebb átmérőjű pelletek (maximum 200-300 μm körüli), valamint lekerekedett, vastag hifaátmérőjű sejtek társultak. Ezzel szemben alacsony moláris konverzióknál rendre vékony, hosszú, elágazó hifákkal találkoztunk, hatalmas pelletekkel, vagy az egész fermentlevet behálózó micéliummal. A megfelelő morfológia és a megfelelő sejtömeg elősegíti, a kedvező reológiai fermentlé kialakulását [104], ami vélhetően erőteljes összefüggésben van a gomba (alternatív)légzésével. A kevésbé viszkózus fermentlé növeli az anyagátadási transzfer rátákat a fermentlében, a kisebb átmérőjű pelletek belsejébe pedig könnyebben bediffundál az oxigén, és az egyéb tápanyagok, elősegítve ezzel az itakonsav túltermeléshez szükséges „túlcsorduló” metabolizmust. Tehát az *A. terreus* fonalas gomba itakonsav

túltermelése erős összefüggést mutat a tenyészetek morfológiájával, és a sejtek általános energia (ATP) ellátottságával.

7. Summary

During my doctoral scholarship period, itaconic acid production of the filamentous fungus *Aspergillus terreus* was investigated by studying the interplay of different media components on various carbon sources. In the last decade, the research focus of this area fell on finding new alternative carbon sources, in order to reduce production cost. Hydrolyzed plant biomass can be one such alternative carbon source. Hence, D-xylose was thoroughly investigated as sole carbon source in our experiments, as D-xylose is one of the major component of plant hydrolysates. Understanding the behavior of cultures on D-xylose could help to create a model system for itaconic acid fermentations on plant biomass hydrolysates.

D-glucose and D-xylose based fermentations were ran simultaneously, in order to investigate two different biochemical catabolic routes (Embden-Meyerhof-Parnas vs. pentose-phosphate pathway). Regarding manganese(II) ion sensitivity, *A. terreus* reacted in the same way on both carbon sources. Increasing the Mn(II) concentration over 5 $\mu\text{g/l}$ resulted in significantly decreased specific molar itaconic acid yield. Thus molar yields are only able to reach their maximum at limiting manganese(II) ion concentrations ($\sim 1.5 \mu\text{g/l}$).

D-glucose based fermentations resulted in 80% or higher specific molar yields only if initial glucose concentration in the medium is higher than 100 g/l. By employing D-xylose as sole carbon source, the specific molar yield has reached the plateau at 50 g/l initial xylose concentration

($Y_{p/s}=0.61$). Additional increase in the initial xylose concentration did not elevate this yield. Since we failed to get close to the theoretical maximal yields on D-xylose, the possibility of byproduct formation was also investigated. However, we did not detect any byproduct in higher amounts in the fermentation broth. According to our hypothesis, the specific biomass yield is lower (i.e., formation of the same amount of biomass requires more carbon) on D-xylose compared to D-glucose. Thus, one possible way to enhance itaconic yield on xylose based fermentations is to enhance the specific biomass yield ($Y_{x/s}$).

Subsequently, we concluded that manganese(II) ions negatively influence itaconic acid production. To reduce this effect, variations of the growth medium components were analyzed. Increasing the phosphate concentration in the growth medium even strengthened the adverse effects of manganese(II) ions, though the phenomenon was less profound during manganese(II) limitation. In contrast, at 10 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) concentration increased phosphate levels resulted in a significant ($\sim 40\%$) drop of the molar yield on both carbon sources compared to the phosphate limiting conditions. We concluded that the phosphate content of the medium must be limiting in order to achieve high-yield itaconic acid fermentations.

We successfully antagonized manganese(II) ions by increasing the Cu(II) concentration in D-glucose and D-fructose containing media. In case of D-glucose, molar yield was fully restored ($Y_{p/s} = 0.82$), whereas 90% of the yield achieved under manganese limiting conditions ($Y_{p/s} = 0.72$) was recovered on D-fructose, in the presence of 300 $\mu\text{g/l}$ Mn(II). A Cu(II):Mn(II) ratio of 1000:1 (equivalent to 300-400 mg/l Cu^{2+}) was

required in the growth media to achieve this. However, this approach was less successful on D-xylose as sole carbon source, as we could increase the molar yield only to 25% with 100 mg/l Cu(II). Using L-arabinose resulted in the worst itaconic acid yields, as we obtained only 32% conversion under manganese limitation, and only negligible amounts of itaconic acid was formed in the presence of 300 µg/l Mn(II). We also demonstrated that the resistance of *A. terreus* NRRL 1960 against copper toxicity is carbon source dependent, and displays much higher values in hexose-containing media than on pentoses. The reason behind the phenomenon could be the more limited ATP supply on pentose growing cultures. Filamentous fungi mainly keep their copper homeostasis by ATPase enzymes, which remove the excessive copper ions from the cytoplasm by consuming ATP [101]. This mechanism may function less effectively on pentose carbon sources, than on hexoses.

High molar conversions of itaconic acid and fungal morphology showed strong correlation to each other. Globular, rounded, swollen cells were formed, with 8-10 µm hyphal diameters, in the case of manganese limitation (1.5 µg/l Mn²⁺), while semi-filamentous morphology was observed at 5 µg/l Mn(II). In the presence of 10 µg/l Mn(II), or above this concentration, the cultures formed thin, long hyphae of around 2 µm diameter. Increasing the KH₂PO₄ concentration from 0.1 g/l to 0.8 g/l did not influence hyphal diameters in general, furthermore, did not influence pellet diameters in the case of manganese limitation, whilst supported the formation of larger pellets (>450 µm) at the presence of 10 µg/l Mn(II). The molar yields always reflected morphology.

By using optimized growth media (phosphate and manganese limitation), small pellets of 100 μm (or even smaller) diameters formed at 3.3 mg/l initial Cu(II) concentration. These cultures usually perform >80% molar yields, while addition of 300 $\mu\text{g/l}$ Mn(II) to the media resulted in the formation of large (>350 μm) pellets that give lower itaconic acid yields. The addition of excess copper ions to the fermentation broth keeps pellet diameters below 200 μm , with fully recovered molar yields.

In conclusion, during high-yield itaconic acid fermentations, small pellets (up to 200-300 μm diameter), and globular cells with wide hyphae were observed. In contrast, fermentations with low itaconic acid molar yields showed thin and long hyphae, with huge pellets. The adequate morphology and biomass concentration assist the development of a favorable rheology in the fermented broth [104], which might correlate with the (alternative, cyanide-resistant) respiration of the fungus. Lower viscosity in the culture broth increases transport rates in the medium. Oxygen and other nutrients can easier reach the center of the small pellets, thereby supporting the overflow metabolism towards itaconic acid production. Hence, itaconic acid production by *A. terreus* shows strong dependence on the fungal morphology, and the energy level (ATP availability) of the cells.

8. Köszönetnyilvánítás

Kérem engedje meg az olvasó, hogy kicsit korábbra tekintsek vissza a múltba. Úgy érzem, hogy nem csupán az ötéves doktoranduszi munkámat zárom le ezen sorok megírásával, hanem a közel 2013-ig visszanyúló pályafutásomat a Debreceni Egyetem Biomérnöki Tanszékén. Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Karaffa Levente** tanszékvezető úrnak, és egyben a témavezetőmnek, valamint **Dr. Fekete Erzsébet** egyetemi docensnek, hogy már annak idején, alapszakos hallgató koromban bizalmat szavaztak nekem, és csatlakozhattam a tanszéken folyó kutatásokhoz szakdolgozóként. Később, a hallgatói ranglétrát végig járva; mesterszakos szakdolgozóként, majd PhD hallgatóként, gyakran kopogtatva az ajtajukon, útmutatásért a szakmai- és adminisztratív teendők labirintusához.

Szeretném megköszönni, szakdolgozóimnak, **Gédl Anettnek**, **Gyórfi Gabriellának**, **Bozsoky Dávidnak**, és **Járvás Tamásnak** akik sokszor a kísérletek mozgatórugói voltak, és nem egyszer merültünk el együtt a hétvégi mintavételezések varázslatos világában.

Köszönettel tartozom a Biomérnöki Tanszék több, jelenlegi és korábbi munkatársának: **Fekete Zoltán** tanszéki mérnöknek, **Dr. Ág Norbert**, **Dr. Molnár Ákos Péter**, és **Dr. Németh Zoltán** adjunktus uraknak, **Dr. Michel Flippi** tanársegéd úrnak, valamint **Dr. Mojtaba Asadollahinak**.

Köszönöm PhD hallgató sorstársaimnak, **Dr. Kulcsár Lászlónak**, **Rafael Díaz Guerreronak**, **Fejes Balázsnak**. Külön megköszönve

Márton Alexandrának, Pénzes Fruzsínának, Bíró Viviennek, és Dr. Kavalecz Napsugárnak. Ők mindig ott voltak, ha az a bizonyos kísérlet „nem úgy sikerült”.

Szoros együttműködés keretében sokat köszönhetek **Soós Áron** PhD hallgatónak, aki a számunkra már szinte megkerülhetetlen ICP-MS méréseket bonyolította le, valamint **Prof. Dr. Karaffa Erzsébet** egyetemi tanárnak (DE MTK Élelmiszertudományi Intézet) aki a mikroszkópozások, és morfológiai vizsgálatok alkalmával sietett rendre a segítségemre.

Külön köszönet illeti **Dr. Christian P. Kubicek** nyugalmazott professzor urat (Bécsi Műszaki Egyetem), aki rengeteget segített a konklúziók levonásakor, és a kéziratok megírásakor.

Szeretném megemlíteni **Prof. Dr. Somsák László** tanár urat (DE TTK Szerves Kémiai Tanszék), akivel ugyan eltérő a kutatási területünk, ennél fogva közösen nem is publikáltunk, de főleg a doktori pályám elején rengeteg hasznos szénhidrátkémiai tudást adott át, és végig bátorított engem.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, akik végig támogattak a nem éppen egyszerű úton, valamint feleségemnek aki rengetegszer végighallgatta a rögzös út buktatóinak élménybeszámolóját.

9. Irodalomjegyzék

1. Okabe, M., et al., *Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in Aspergillus terreus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **84**(4): p. 597-606.
2. Lockwood, L.B. and G.E. Ward, *Fermentation Process for Itaconic Acid*. Industrial & Engineering Chemistry, 1945. **37**(4): p. 405-406.
3. Cunha da Cruz, J., A. Machado de Castro, and E.F. Camporese Sérvulo, *World market and biotechnological production of itaconic acid*. 3 Biotech, 2018. **8**(3): p. 138.
4. Kuenz, A. and S. Krull, *Biotechnological production of itaconic acid—things you have to know*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018. **102**(9): p. 3901-3914.
5. Kocabas, A., Z.B. Ogel, and U. Bakir, *Xylanase and itaconic acid production by Aspergillus terreus NRRL 1960 within a biorefinery concept*. Annals of Microbiology, 2014. **64**(1): p. 75-84.
6. Tippkötter, N., et al., *Enzymatic hydrolysis of beech wood lignocellulose at high solid contents and its utilization as substrate for the production of biobutanol and dicarboxylic acids*. Bioresource Technology, 2014. **167**: p. 447-455.
7. Pedroso, G.B., et al., *Building block itaconic acid from left-over biomass*. Biomass Conversion and Biorefinery, 2017. **7**(1): p. 23-35.
8. Hevekerl, A., A. Kuenz, and K.-D. Vorlop, *Filamentous fungi in microtiter plates—an easy way to optimize itaconic acid production with Aspergillus terreus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**(16): p. 6983-6989.
9. Mirminachi, F., A. Zhang, and M. Roehr, *Citric acid fermentation and heavy metal ions—I. Effects of iron, manganese and copper*. Acta Biotechnologica, 2002. **22**(3-4): p. 363-373.
10. Gyamerah, M., *Factors affecting the growth form of Aspergillus terreus NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **44**(3-4): p. 356-361.
11. Gao, Q., J. Liu, and L. Liu, *Relationship between morphology and itaconic acid production by Aspergillus terreus*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014. **24**(2): p. 168-176.

12. Willke, T. and K.-D. Vorlop, *Biotechnological production of itaconic acid*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. **56**(3-4): p. 289-295.
13. Baup, S., *Ueber eine neue Pyrogen-Citronensäure, und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt*. Annalen der Pharmacie, 1837. **19**(1): p. 29-38.
14. Kinoshita, K., *Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz Aspergillus itaconicus*. Acta Phytochim, 1932. **5**: p. 271-287.
15. Karaffa, L. and C.P. Kubicek, *Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story?* Applied Microbiology and Biotechnology, 2019. **103**(7): p. 2889-2902.
16. Werpy, T., et al., *Top value added chemicals from biomass, Volume 1: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*. US Department of Energy. Pacific Northwest National Laboratory/US Department of Energy: Oak Ridge, TN, 2004.
17. Samson, R.A., et al., *Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus*. Studies in Mycology, 2014. **78**: p. 141-173.
18. Baker, S.E., *Aspergillus niger genomics: Past, present and into the future*. Medical Mycology, 2006. **44**(Supplement_1): p. S17-S21.
19. Bennett, S.E.B.J.W., *An overview of the genus Aspergillus*, in *The Aspergilli*. 2007, CRC Press. p. 23-34.
20. Blachowicz, A., et al., *Contributions of Spore Secondary Metabolites to UV-C Protection and Virulence Vary in Different Aspergillus fumigatus Strains*. mBio, 2020. **11**(1).
21. Arabatzis, M. and A. Velegriaki, *Sexual reproduction in the opportunistic human pathogen Aspergillus terreus*. Mycologia, 2013. **105**(1): p. 71-79.
22. Thom, C. and M.B. Church, *Aspergillus fumigatus, A. nidulans, A. terreus n. sp. and their allies*. American Journal of Botany, 1918. **5**(2): p. 84-104.
23. Bentley, R. and C.P. Thiessen, *Biosynthesis of itaconic acid in Aspergillus terreus III. The properties and reaction mechanism of cis-aconitic acid decarboxylase*. Journal of Biological Chemistry, 1957. **226**(2): p. 703-720.
24. Zhao, M., et al., *Itaconic acid production in microorganisms*. Biotechnology letters, 2018. **40**(3): p. 455-464.

25. Cleland, W. and M.J. Johnson, *Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by Aspergillus niger*. Journal of Biological Chemistry, 1954. **208**(2): p. 679-690.
26. Karaffa, L. and C.P. Kubicek, *Aspergillus niger citric acid accumulation: do we understand this well working black box?* Applied Microbiology and Biotechnology, 2003. **61**(3): p. 189-196.
27. Bonnarme, P., et al., *Itaconate biosynthesis in Aspergillus terreus*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**(12): p. 3573-3578.
28. Li, A., et al., *A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in Aspergillus*. Fungal Genetics and Biology, 2011. **48**(6): p. 602-611.
29. Jaklitsch, W.M., C.P. Kubicek, and M.C. Scrutton, *The subcellular organization of itaconate biosynthesis in Aspergillus terreus*. Microbiology, 1991. **137**(3): p. 533-539.
30. Witteveen, C., et al., *L-arabinose and D-xylose catabolism in Aspergillus niger*. Microbiology, 1989. **135**(8): p. 2163-2171.
31. Khosravi, C., et al., *Blocking hexose entry into glycolysis activates alternative metabolic conversion of these sugars and upregulates pentose metabolism in Aspergillus nidulans*. BMC genomics, 2018. **19**(1): p. 214.
32. Weyda, I., et al., *Point mutation of the xylose reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in Aspergillus carbonarius*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014. **41**(4): p. 733-739.
33. Aguilar-Pontes, M., et al., *The gold-standard genome of Aspergillus niger NRRL 3 enables a detailed view of the diversity of sugar catabolism in fungi*. Studies in Mycology, 2018. **91**: p. 61-78.
34. Wu, X., et al., *Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with Aspergillus terreus CICC40205 mutant*. Bioresource Technology, 2017. **241**: p. 25-34.
35. Larsen, H. and K. Eimhjellen, *The mechanism of itaconic acid formation by Aspergillus terreus. 1. The effect of acidity*. Biochemical Journal, 1955. **60**(1): p. 135.
36. Saha, B. and G. Kennedy, *Mannose and galactose as substrates for production of itaconic acid by Aspergillus terreus*. Letters in Applied Microbiology, 2017. **65**(6): p. 527-533.
37. Saha, B.C., et al., *Production of itaconic acid from pentose sugars by Aspergillus terreus*. Biotechnology Progress, 2017. **33**(4): p. 1059-1067.

38. Eimhjellen, K. and H. Larsen, *The mechanism of itaconic acid formation by Aspergillus terreus. 2. The effect of substrates and inhibitors.* Biochemical Journal, 1955. **60**(1): p. 139.
39. Kane JA, F.A., Amann PF, *Production of itaconic acid* US Patent, 1945. **2,385,283A**.
40. Pfeifer, V., C. Vojnovich, and E. Heger, *Itaconic acid by fermentation with Aspergillus terreus.* Industrial & Engineering Chemistry, 1952. **44**(12): p. 2975-2980.
41. Karaffa, L., et al., *A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by Aspergillus terreus.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. **99**(19): p. 7937-7944.
42. Peksel, A., et al., *¹³C-NMR analysis of glucose metabolism during citric acid production by Aspergillus niger.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **58**(2): p. 157-163.
43. Torres, N., et al., *Glucose transport by Aspergillus niger: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations.* Applied Microbiology and Biotechnology, 1996. **44**(6): p. 790-794.
44. Nubel, R.R., *EJ Process for producing itaconic acid* US Patent, 1962. **3,044,941**.
45. Bafana, R. and R.A. Pandey, *New approaches for itaconic acid production: bottlenecks and possible remedies.* Critical Reviews in Biotechnology, 2018. **38**(1): p. 68-82.
46. Bafana, R., S. Sivanesan, and R. Pandey, *Itaconic acid production by filamentous fungi in starch-rich industrial residues.* Indian Journal of Microbiology, 2017. **57**(3): p. 322-328.
47. Reddy, C. and R. Singh, *Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated Aspergillus terreus SKR10.* Bioresource Technology, 2002. **85**(1): p. 69-71.
48. Krull, S., et al., *Itaconic acid production from wheat chaff by Aspergillus terreus.* Process Biochemistry, 2017. **63**: p. 169-176.
49. Saha, B.C., et al., *Factors affecting production of itaconic acid from mixed sugars by Aspergillus terreus.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019. **187**(2): p. 449-460.
50. Horitsu, H., et al., *Production of itaconic acid by Aspergillus terreus immobilized in polyacrylamide gels.* European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1983. **18**(6): p. 358-360.

51. Kuenz, A., et al., *Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(5): p. 1209-1216.
52. Rychtera, M. and D.J. Wase, *The growth of Aspergillus terreus and the production of itaconic acid in batch and continuous cultures. The influence of pH*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1981. **31**(1): p. 509-521.
53. Petruccioli, M., V. Pulci, and F. Federici, *Itaconic acid production by Aspergillus terreus on raw starchy materials*. Letters in Applied Microbiology, 1999. **28**(4): p. 309-312.
54. Batti, A.M. and L.B. Schweiger, *Process for the production of itaconic acid*. US Patent, 1963. **3,078,217**(US Patent 3078217A. Washington DC: U.S. Patent Office.).
55. Kautola, H., et al., *Itaconic acid production by immobilized Aspergillus terreus from xylose and glucose*. Biotechnology Letters, 1985. **7**(3): p. 167-172.
56. Krull, S., et al., *Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of Aspergillus terreus to reach industrially relevant final titers*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017. **101**(10): p. 4063-4072.
57. Kreyenschulte, D., et al., *In situ reactive extraction of itaconic acid during fermentation of Aspergillus terreus*. Biochemical Engineering Journal, 2018: p. 133-141.
58. Saha, B.C. and G.J. Kennedy, *Phosphate limitation alleviates the inhibitory effect of manganese on itaconic acid production by Aspergillus terreus*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019. **18**: p. 101016.
59. Saha, B.C. and G.J. Kennedy, *Efficient itaconic acid production by Aspergillus terreus: Overcoming the strong inhibitory effect of manganese*. Biotechnology Progress, 2019: p. e2939.
60. Welter, K., *Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen*. 2000, PhD thesis, University of Braunschweig.
61. Nelson, G.E., et al., *Production of itaconic acid by Aspergillus terreus in 20-liter fermentors*. Industrial & Engineering Chemistry, 1952. **44**(5): p. 1166-1168.
62. Klement, T. and J. Büchs, *Itaconic acid—A biotechnological process in change*. Bioresource Technology, 2013. **135**: p. 422-431.

63. Clark, D., K. Ito, and H. Horitsu, *Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses*. Biotechnology and Bioengineering, 1966. **8**(4): p. 465-471.
64. Schweiger, L.B., *Production of citric acid by fermentation*. US Patent, 1958. **2,970,084**(US Patent US2970084A. Washington DC: U.S. Patent Office.).
65. Träger, M., et al., *Comparison of direct glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* and *Aspergillus niger* in a pilot scale airlift reactor*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992. **74**(5): p. 274-281.
66. Kobayashi, T., I. Nakamura, and M. Nakagawa, *Process for producing itaconic acid*. US Patent, 1975. **3,873,425**.
67. Ju, N. and S.S. Wang, *Continuous production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* immobilized in a porous disk bioreactor*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986. **23**(5): p. 311-314.
68. Okabe, M., N. Ohta, and Y.S. Park, *Itaconic acid production in an air-lift bioreactor using a modified draft tube*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993. **76**(2): p. 117-122.
69. Yahiro, K., et al., *Efficient itaconic acid production from raw corn starch*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997. **84**(4): p. 375-377.
70. Zhou, S., L.M. Lewis, and S.K. Singh, *EXTRACTABLES & LEACHABLES: Metal Leachables in Therapeutic Biologic Products: Origin, Impact and Detection*. American Pharmaceutical Review, 2010. **13**(4): p. 76.
71. Kim, B., S. Kim, and H. Kim, *Effects of Alloying Elements (Cr, Mn) on Corrosion Properties of the High-Strength Steel in 3.5% NaCl Solution*. Advances in Materials Science and Engineering, 2018. **2018**.
72. Shackelford, J., F and A. William, *The CRC Materials Science and Engineering Handbook*. 3rd Edition ed. 2001, Boca Raton: CRC Press LLC. Page 140.
73. Bohrer, D., et al., *Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilisation*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2003. **17**(2): p. 107-115.

74. Williamson, J., et al., *Scale-dependent manganese leaching from stainless steel impacts terminal galactosylation in monoclonal antibodies*. Biotechnology progress, 2018. **34**(5): p. 1290-1297.
75. Gyamerah, M., *Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by Aspergillus terreus NRRL 1960*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **44**(1-2): p. 20-26.
76. Park, Y.S., N. Ohta, and M. Okabe, *Effect of dissolved oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by Aspergillus terreus*. Biotechnology Letters, 1993. **15**(6): p. 583-586.
77. Park, Y.S., et al., *Itaconic acid production using an air-lift bioreactor in repeated batch culture of Aspergillus terreus*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994. **77**(3): p. 329-331.
78. Yahiro, K., et al., *Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by Aspergillus terreus*. Biotechnology Letters, 1997. **19**(7): p. 619-621.
79. Molnár, Á.P., et al., *High oxygen tension increases itaconic acid accumulation, glucose consumption, and the expression and activity of alternative oxidase in Aspergillus terreus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018. **102**(20): p. 8799-8808.
80. Young, L., et al., *The alternative oxidases: simple oxidoreductase proteins with complex functions*. Biochemical Society Transactions, 2013. **41**(5): p. 1305-1311.
81. Hattori, T., K. Kino, and K. Kirimura, *Regulation of alternative oxidase at the transcription stage in Aspergillus niger under the conditions of citric acid production*. Current Microbiology, 2009. **58**(4): p. 321-325.
82. Hevekerl, A., A. Kuenz, and K.-D. Vorlop, *Influence of the pH on the itaconic acid production with Aspergillus terreus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**(24): p. 10005-10012.
83. Riscaldati, E., et al., *Effect of pH and stirring rate on itaconate production by Aspergillus terreus*. Journal of Biotechnology, 2000. **83**(3): p. 219-230.
84. Batti, A.M., *Process for the production of itaconic acid*. US Patent, 1964. **3,162,582**, .
85. Nemestóthy, N., et al., *Carbohydrate to Itaconic Acid Conversion by Aspergillus terreus and the Evaluation of Process Monitoring Based on the Measurement of CO₂*. Waste and Biomass Valorization, 2020. **11**(3): p. 1069-1075.

86. Cox, P. and C. Thomas, *Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. **39**(9): p. 945-952.
87. Hockertz, S., J. Schmid, and G. Auling, *A specific transport system for manganese in the filamentous fungus Aspergillus niger*. Microbiology, 1987. **133**(12): p. 3513-3519.
88. Netik, A., et al., *Uptake and export of citric acid by Aspergillus niger is reciprocally regulated by manganese ions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1997. **1326**(2): p. 287-294.
89. Iskandar, N.L., N.A.I.M. Zainudin, and S.G. Tan, *Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem*. Journal of Environmental Sciences, 2011. **23**(5): p. 824-830.
90. Saha, B.C., *Hemicellulose bioconversion*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003. **30**(5): p. 279-291.
91. Kubicek, C., et al., *Regulation of lysine biosynthesis in the fungus Penicillium chrysogenum*, in *Amino Acids*. 1990, Springer. p. 1029-1034.
92. Prathumpai, W., et al., *Metabolic control analysis of xylose catabolism in Aspergillus*. Biotechnology Progress, 2003. **19**(4): p. 1136-1141.
93. Panagiotou, G., et al., *Overexpression of a novel endogenous NADH kinase in Aspergillus nidulans enhances growth*. Metabolic Engineering, 2009. **11**(1): p. 31-39.
94. Singh, M., N.S. Scrutton, and M.C. Scrutton, *NADPH Generation in Aspergillus nidulans: Is the Mannitol Cycle Involved?* Microbiology, 1988. **134**(3): p. 643-654.
95. Park, S.J., et al., *Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **68**(5): p. 567-79.
96. Panagiotou, G., et al., *Monitoring novel metabolic pathways using metabolomics and machine learning: induction of the phosphoketolase pathway in Aspergillus nidulans cultivations*. Metabolomics, 2007. **3**(4): p. 503-516.
97. Panagiotou, G., et al., *Systems analysis unfolds the relationship between the phosphoketolase pathway and growth in Aspergillus nidulans*. PloS One, 2008. **3**(12): p. e3847.

98. Hossain, A.H., et al., *Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories*, 2016. **15**(1): p. 130.
99. Lejeune, R. and G.V. Baron, *Simulation of growth of a filamentous fungus in 3 dimensions*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997. **53**(2): p. 139-150.
100. Smith, A.D., B.L. Logeman, and D.J. Thiele, *Copper Acquisition and Utilization in Fungi*. *Annual Review of Microbiology*, 2017. **71**(1): p. 597-623.
101. Wiemann, P., et al., *Aspergillus fumigatus Copper Export Machinery and Reactive Oxygen Intermediate Defense Counter Host Copper-Mediated Oxidative Antimicrobial Offense*. *Cell Reports*, 2017. **19**(10): p. 2174-2176.
102. Kolláth, I.S., et al., *Manganese Deficiency Is Required for High Itaconic Acid Production From D-Xylose in Aspergillus terreus*. *Frontiers in Microbiology*, 2019. **10**(1589).
103. Koerkamp, M.G., et al., *Dissection of Transient Oxidative Stress Response in Saccharomyces cerevisiae by Using DNA Microarrays*. *Molecular Biology of the Cell*, 2002. **13**(8): p. 2783-2794.
104. van Suijdam, J.C., N.W.F. Kossen, and P.G. Paul, *An inoculum technique for the production of fungal pellets*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1980. **10**(3): p. 211-221.

10. Fűggelék

1. Függelék D-glükóz alapú *A. terreus* NRRL 1960 tenyészetek hifaátmérőinek átlaga a fermentáció különböző időpontjaiban. **A panel:** mangánlimitált fermentációk, **B panel:** mangánnal dúsított fermentációk. Vízszintes tengelyen a Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható. N.n: nincs növekedés.

Függelék 1 A panel

	1,5 µg/l Mn ²⁺										
Cu ²⁺ (mg/l)	0,01	1	3,3	10	25	50	75	100	250	300	400
<i>Mn:Cu x</i> <i>10³</i>	150	1,5	0,45	0,15	0,06	0,03	0,02	0,015	0,006	0,005	0,00375
24 h	2,41	3,88	7,76	9,59	10,90	9,36	7,76	6,59	3,57	N.n.	N.n.
48 h	3,52	4,01	6,93	9,75	11,49	11,47	7,84	5,15	4,05	N.n.	N.n.
72 h	3,56	4,66	7,56	8,16	10,76	10,40	7,21	4,89	6,59	N.n.	N.n.
96 h	3,95	4,46	7,88	9,15	12,77	12,68	8,08	4,71	5,63	N.n.	N.n.
168 h	3,90	4,77	8,08	9,23	13,77	10,26	9,61	6,94	5,86	N.n.	N.n.

Függelék 1 B panel

	300 µg/l Mn²⁺										
Cu²⁺ (mg/l)	0,01	1	3,3	10	25	50	75	100	250	300	400
<i>Mn:Cu x</i> <i>10³</i>	<i>30000</i>	<i>300</i>	<i>91</i>	<i>30</i>	<i>12</i>	<i>6</i>	<i>4</i>	<i>3</i>	<i>1,2</i>	<i>1</i>	<i>0,75</i>
24 h	2,11	1,67	1,62	1,76	1,94	1,90	2,04	2,86	4,72	5,27	6,09
48 h	2,55	2,40	2,17	2,10	2,08	2,55	1,98	2,83	5,07	7,70	6,29
72 h	2,83	2,27	1,96	2,05	2,25	2,15	1,90	3,01	6,07	6,09	7,05
96 h	3,33	2,09	1,98	2,38	2,21	2,02	1,88	3,99	6,87	7,83	8,75
168 h	3,40	2,61	2,71	2,70	2,68	2,58	2,29	4,70	6,66	8,66	8,43

2. Függelék D-glükóz alapú *A. terreus* NRRL 1960 tenyészetek átlagos pelletátmérőinek átlaga a fermentáció különböző időpontjaiban. **A panel:** mangánlimitált fermentációk, **B panel:** mangánnal dúsított fermentációk. Vízszintes tengelyen a Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható. N.n: nincs növekedés

Függelék 2 A panel

Cu ²⁺ (mg/l)	1,5 µg/l Mn ²⁺										
	0,01	1	3,3	10	25	50	75	100	250	300	400
<i>Mn:Cu x 10³</i>	<i>150</i>	<i>1,5</i>	<i>0,45</i>	<i>0,15</i>	<i>0,06</i>	<i>0,03</i>	<i>0,02</i>	<i>0,015</i>	<i>0,006</i>	<i>0,005</i>	<i>0,00375</i>
24 h	250 ± 29	83 ± 13	63 ± 10	48 ± 10	46 ± 15	44 ± 10	20 ± 6	22 ± 8	20 ± 5	N.n.	N.n.
48 h	343 ± 37	86 ± 14	62 ± 15	50 ± 12	48 ± 11	40 ± 13	30 ± 10	28 ± 12	24 ± 6	N.n.	N.n.
72 h	328 ± 57	96 ± 18	68 ± 19	61 ± 21	49 ± 14	40 ± 17	37 ± 10	34 ± 10	28 ± 8	N.n.	N.n.
96 h	295 ± 48	98 ± 12	88 ± 22	65 ± 20	57 ± 13	52 ± 19	38 ± 9	37 ± 12	30 ± 9	N.n.	N.n.
168 h	233 ± 40	107 ± 11	95 ± 16	73 ± 18	67 ± 18	56 ± 16	44 ± 15	46 ± 11	35 ± 9	N.n.	N.n.

Függelék 2 B panel

	300 µg/l Mn²⁺										
Cu²⁺ (mg/l)	0,01	1	3,3	10	25	50	75	100	250	300	400
Mn:Cu x 10³	30000	300	91	30	12	6	4	3	1,2	1	0,75
24 h	275 ± 58	167 ± 99	208 ± 86	>350	294 ± 56	290 ± 64	284 ± 63	286 ± 56	342 ± 86	212 ± 125	250 ± 63
48 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	297 ± 77	233 ± 36
72 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	288 ± 57	250 ± 42
96 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	257 ± 58	235 ± 44
168 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	226 ± 54	233 ± 48

3. Függelék D-xilóz alapú *A. terreus* NRRL 1960 tenyészetek hifaátmérőinek átlaga a fermentáció különböző időpontjaiban. **A panel:** mangánlimitált fermentációk, **B panel:** mangánnal dúsított fermentációk. Vízszintes tengelyen a Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható. N.n: nincs növekedés

Függelék 3 A panel

	1,5 µg/l Mn ²⁺										
Cu ²⁺ (mg/l)	0,01	1	3,3	10	25	50	75	100	250	300	400
<i>Mn:Cu x</i> <i>10³</i>	150	1,5	0,45	0,15	0,06	0,03	0,02	0,015	0,006	0,005	0,00375
24 h	2,15	2,59	3,25	5,65	8,18	7,90	7,98	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
48 h	2,68	3,01	3,90	5,75	8,48	14,53	7,99	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
72 h	2,88	3,24	3,96	6,22	8,96	15,72	8,54	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
96 h	3,01	3,68	4,12	6,30	9,12	16,15	8,68	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
168 h	3,22	3,77	4,25	6,99	9,31	14,89	9,54	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.

Függelék 3 B panel

	300 µg/l Mn²⁺										
Cu²⁺ (mg/l)	0,01	1	3,3	10	25	50	75	100	250	300	400
Mn:Cu x 10³	30000	300	91	30	12	6	4	3	1,2	1	0,75
24 h	2,43	2,92	2,77	2,16	3,14	3,90	5,14	4,29	6,64	7,25	7,29
48 h	3,77	3,33	3,72	2,43	3,28	4,65	6,89	4,90	6,17	7,70	7,49
72 h	4,36	3,39	3,40	2,25	3,55	5,07	6,57	5,10	7,16	7,09	7,84
96 h	3,80	3,78	2,76	2,35	3,84	5,19	5,67	5,52	7,97	8,85	8,89
168 h	3,98	3,66	2,91	2,75	3,98	5,78	5,89	5,80	8,87	8,91	8,39

4. Függelék D-xilóz alapú *A. terreus* NRRL 1960 tenyészetek átlagos pelletátmérőinek átlaga a fermentáció különböző időpontjaiban. **A panel:** mangánlimitált fermentációk, **B panel:** mangánnal dúsított fermentációk. Vízszintes tengelyen a Cu(II)-ionok abszolút koncentrációja valamint a Mn(II)- és Cu(II)-ionok egymáshoz viszonyított aránya olvasható. N.n: nincs növekedés.

Függelék 4 A panel

	1,5 µg/l Mn ²⁺										
Cu ²⁺ (mg/l)	0,01	1	3,3	10	25	50	75	100	250	300	400
<i>Mn:Cu x</i> <i>10³</i>	150	1,5	0,45	0,15	0,06	0,03	0,02	0,015	0,006	0,005	0,00375
24 h	>350	240 ± 20	86 ± 20	68 ± 14	63 ± 17	64 ± 20	35 ± 10	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
48 h	>350	259 ± 34	92 ± 30	85 ± 10	78 ± 18	60 ± 18	40 ± 14	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
72 h	>350	265 ± 23	108 ± 25	78 ± 11	79 ± 24	69 ± 21	48 ± 11	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
96 h	>350	288 ± 38	106 ± 32	95 ± 18	87 ± 19	72 ± 16	48 ± 12	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.
168 h	>350	259 ± 35	125 ± 36	98 ± 23	100 ± 20	85 ± 21	49 ± 14	N.n.	N.n.	N.n.	N.n.

Függelék 4 B panel

	300 µg/l Mn²⁺										
Cu²⁺ (mg/l)	0.01	1	3.3	10	25	50	75	100	250	300	400
Mn:Cu x 10³	30000	300	91	30	12	6	4	3	1.2	1	0.75
24 h	258 ± 48	267 ± 99	298 ± 100	266 ± 68	312 ± 48	325 ± 49	301 ± 48	348 ± 65	350 ± 86	>350	>350
48 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350
72 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350
96 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350
168 h	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350	>350