



**PANNON EGYETEM**

**VEGYÉSZMÉRNÖKI- ÉS ANYAGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

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

**DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS**

**Készítette:**

**Hülberné Beyer Éva Anna  
Okleveles biomérnök**

**Témavezetők:**

**Bélafiné Dr. Bakó Katalin  
Egyetemi tanár**

**és**

**Dr. Nemestóthy Nándor  
Egyetemi tanár**



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

**Veszprém  
2024**

## BEVEZETÉS

A vegyipar a környezetszennyezéshez nagymértékben hozzájáruló iparág, azonban minden más technológia számára nélkülözhetetlen alapanyagokat szolgáltat. A nagyléptékű vegyipari folyamatok jelenlegi biotechnológiai alternatívái nem versenyképesek, amíg él a lehetőség a kőolaj alapú gazdaságra. A jövő biotechnológiájának kulcsa lehet azonban, ha sikerül olyan folyamatos üzemű fermentációkat kidolgozni, melyekben minimalizált a vízvesztés, az energia- és az alapanyag-felhasználás.

A membrános szeparációs eljárások integrációja ígéretes fejlesztési utat kínál. A szerves savak előállításában kiemelt jelentőséggel bír a bipoláris elektrodialízis, amellyel megvalósítható a termék kinyerése vizes oldatából, segédanyagok nélkül.

Az integrált fermentáció-bipoláris elektrodialízis koncepcióban egy folyamatos fermentáció mellett, ahol a termék mellett az elfolyóban tápanyagok maradnak, a termék szeparációja membránművelettel megvalósul, és a visszamaradó oldat visszavezetésre kerül megfelelő kezelés után a betáplált folyadékáramban.

Ennek fényében célom volt megalapozni az itakonsav folyamatos fermentációval történő előállítását. Az itakonsav kisméretű, kettős kötéseket tartalmazó molekula, amely összetett kémiai szintézisek prekursora, és amelyet az *Aspergillus terreus* gomba egyszerű cukrokból technológiai szempontból releváns koncentrációban képes előállítani.

A fermentációs folyamat három fő területét céloztam meg: (1) az oltóanyag befolyását a folyamat lefutására; (2) a folyamatos fermentáció megvalósításának lehetőségeit; illetve (3) a fénynek mint környezeti paraméternek a hatását az *Aspergillus terreus* fejlődésére és a fermentáció folyamatára.

## KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

A kísérletek során változatos tenyésztési és fermentációs eljárásokat alkalmaztam olyan elrendezésben, hogy a vizsgált paraméter hatása mérhető legyen.

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

A folyamatos fermentáció megalapozására félfolyamatos fermentációs kísérleteket végeztem, ahol a szénforrásként alkalmazott glükóz betáplálási stratégiáit elemeztem. Erre a célra Sartorius Biostat asztali fermentorokat alkalmaztam, amelyek beépített mérőelektródokkal és adatgyűjtővel rendelkeznek.

Folyamatos fermentációt valósítottam meg kis hígítási sebességgel, az elérhető itakonsav elfolyó-koncentráció maximalizálása céljából. Az elfolyó anyagáramot – az itakonsav elektrodialízissel történő kinyerése után – visszavezettem a folyamatos fermentációba, ezáltal megvalósult a visszamaradt glükóz recirkulációja. Ezzel elsők között vizsgáltam, hogy az integrált fermentáció-elektrodialízis rendszer megvalósítható-e itakonsav termelés esetén.

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

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### *Oltóanyag előállítása*

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

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

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

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

### *Félfolyamatos és folyamatos fermentációs kísérletek*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

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

## ELŐADÁS ÉS POSZTER

- Hülber-Beyer, É.**, Nemestóthy, N. & Bélafi-Bakó, K. (2021) Production of itaconic acid by continuous fermentation – bipolar membrane electro dialysis integrated system. *Interdisciplinary Doctoral Conference*, 2021. november 12-13. Pécs, Magyarország. (poszter)
- Hülber-Beyer, É.**, Bélafi-Bakó, K. & Nemestóthy, N. (2022) Influence of light on the itaconic acid producer *Aspergillus terreus*. *48th International conference of SSCHE, 2022. május 23-26.* Szlovákia, Tatranske Mateliare. (előadás)