



Doktori értekezés

- Bartos Hunor -

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Pécs, 2023

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Kémia Doktori Iskola

Basfia succiniciproducens növekedése és metabolit
termelése különböző szubsztrátok felhasználása mellett

Bartos Hunor

Témavezető:

Dr. Miklóssy Ildikó, Dr. Bodor Zsolt

Doktori Iskola vezető:

Dr. Felinger Attila

Pécs, 2023

Köszönetnyilvánítás

Megragadom a pillanatot, hogy köszönetet mondjak tanárainknak és segítőknek. Elsősorban köszönettel tartozom Prof. Dr. Kilar Ferencnek, hogy lehetővé tette a doktori képzést és szakmailag támogatott. Megilleti a köszönet Prof. Dr. Felinger Attilát és a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Kémiai Doktori Iskoláját, hogy hozzájárultak a doktori fokozat megszerzéséhez. Témavezetőim Dr. Miklóssy Ildikó és Dr. Bodor Zsolt vezettek a biokémia és bioinformatika rögzös útján, időt és energiát nem sajnálva segítettek a felkészülésben. Prof. Dr. Lányi Szabolcs hasznos meglátásaival irányvonalakat adott.

Külön köszönet illeti Dr. Albert Csillát akinek köszönhetően új ismereteket szereztem a nagy teljesítményű folyadékromatográfiás elválasztásban és ezen eredményekkel dolgozatomat egy magasabb szintre emelhettem. Köszönöm Dr. Orbán Csongornak a segítséget a bioreaktorok világában való eligazodásért.

Munkatársaimnak köszönöm a beszélgetéseket, amelyek révén folytonos késztetést és biztatást éreztem a munka teljesítésében.

Végül, de nem utolsósorban Feleségemnek és családomnak köszönöm az állandó és kitartó hozzáállást amelyet úgy a nehézségekben mint az öröm pillanataiban vállaltak.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	4
Rövidítés és fogalommagyarázat	6
Ábrák jegyzéke	7
Táblázatok jegyzéke	9
Összefoglalás	10
1. Bevezetés: a kutatás jelentősége és kérdésköre	13
2. Irodalmi áttekintés	14
2.1. Műanyagok problematikája	14
2.2. Borostyánkősav mint megoldás	17
2.2.1. Borostyánkősav kémiai szintézise	18
2.2.2. Borostyánkősav bioszintézise	18
2.2.3. Borostyánkősav előállítása bioreaktor rendszerekben	20
2.2.3.1. Szakaszos üzemelésű (batch) bioreaktoros borostyánkősav termelés	20
2.2.3.2. Rátáplálásos (fed-batch) üzemelésű bioreaktoros borostyánkősav bioszintézis	21
2.2.3.3. Folytonos üzemű bioreaktorok borostyánkősav előállítására	21
2.2.3.4. Borostyánkősav bioszintézise megújuló energiaforrásokból	22
2.2.4. A borostyánkősav tisztítása	23
2.2.5. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfiai eljárások a borostyánkősav és szubsztrátok minőségi és mennyiségi azonosításában	24
2.3. Basfia succiniciproducens baktériumtörzs	26
2.3.1. Basfia succiniciproducens kapnofil tulajdonsága	28
2.4. A rendszerbiológia, mint új tudományterület	29
2.4.1. Kényszer-alapú metabolikus modellezés: Cobra TOOLBOX	30
2.4.2. Metabolit termelés előrejelzése in silico módszerekkel	31
2.4.3. Anyagcsere mérnökség alkalmazása	32
3. Célkitűzések	35
4. Anyagok és módszerek	36
4.1. Metabolikus termelőkéesség modellezése	36
4.1.1. In silico gén elimináció	38
4.1.2. A bővített modellel történő elemzések saját kísérletekből származó paraméterekkel	39
4.2. A kutatásban használt baktériumtörzs - Basfia succiniciproducens	40
4.2.1. Mikrolemezen végzett laboratóriumi elemzések	41
4.2.2. Nagyobb térfogatban végzett lombikos kísérletek	43
4.2.3. Bioreaktorban végzett fermentációk	43
4.3. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfiai mintaelemzés	45
5. Eredmények és értékelésük	47
5.1. Metabolikus modell bővítése és a metabolitok termelésének előrejelzése	48
5.1.1. Elméleti maximális céltermék meghatározása	49
5.1.2. A Basfia succiniciproducens baktériumtörzs in silico metabolikus	

optimalizálása	50
5.2. Különböző szubsztrátok hozzáférhetőségének elemzése, a tápoldatok és szubsztrátok biomasszára, valamint metabolit termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata különböző körülményeken	51
5.2.1. A <i>Basfia succiniciproducens</i> baktériumtörzs szubsztrát profiljának meghatározása	52
5.2.2. Minimál és komplex tápoldatok összehasonlítása <i>Basfia succiniciproducens</i> biomassza termelésének szempontjából	56
5.2.2.1. Mikrolemezes kísérletek TSB tápoldatban	56
5.2.2.2. Mikrolemezes kísérletek BHI tápoldatban	58
5.2.2.3. Mikrolemezes kísérletek minimál (M9) tápoldatban	58
5.2.3. <i>Basfia succiniciproducens</i> biomassza termelése glükóz, glicerin és xilóz szénforrásokon	61
5.2.3.1. Lombikos kísérletek TSB tápoldat felhasználásával	61
5.2.3.2. Lombikos kísérletek BHI tápoldat felhasználásával	62
5.2.3.3. Lombikos kísérletek minimál (M9) tápoldat felhasználásával	63
5.3. A fermentációs körülmények hatása a <i>Basfia succiniciproducens</i> biomassza és céltermék képződésére	65
5.3.1. Bioreaktoros fermentáció glükóz szubsztrát felhasználásával	67
5.3.2. Bioreaktoros fermentáció glicerin szubsztrát felhasználásával	68
5.3.3. Bioreaktoros fermentáció xilóz szubsztrát felhasználásával	69
5.4. A bővített in silico metabolikus modellel történő elemzések kísérleti adatok alapján	70
6. Következtetések és eredmények tovább fejleszthetősége	74
7. Megbeszélés	80
8. Tézispontok	83
9. Szakirodalmi jegyzék	86
10. Publikációs jegyzék	95
Melléklet	97

Rövidítés és fogalommagyarázat

gCDM	gramm száraz sejttömeg (Cell Dry Mass)
FBA	tömegegyensúly elemzés (Flux Balance Analysis)
Δpfl	génkiütés: piruvát-formiát-liáz
Δldh	génkiütés: laktát-dehidrogenáz
TSB	tripton szója leves (Tryptic Soy Broth)
M9	minimál tápoldat (Mineral 9 medium)
BHI	agy-szív infúzió (Brain Heart Infusion)
rpm	fordulatszám (revolutions/minute)
OD ₆₀₀	optikai denzitás 600 nm-en
M	molaritás (mol/dm ³)
RID	törésmutató detektor (Refractive Index Detector)
DAD	diódasoros detektor (Diode Array Detector)
vvm	térfogatáram (vessel volume per minute)
BS	borostyánkősav (Succinic Acid)
RT	retenciós idő (Retention Time)
g/g	gramm termék gramm szubsztrátra vonatkoztatott hozama
mol/mol	mol termék mol szubsztrátra vonatkoztatott hozama

Ábrák jegyzéke

1. **Ábra** Régiók és országok százalékos részvétele a világ műanyaggyártásában - világviszonylat 2020 - (Maicai és mtsai. 2020)
2. **Ábra** Ipari és nem-ipari felhasználási területek műanyagok igénye világszinten (Wang és mtsai. 2019)
3. **Ábra** Műanyag hulladék keletkezése és kezelése (Geyer, Jambeck, és Law 2017)
4. **Ábra** Borostyánkősav széles spektrumú felhasználása (Hema N. 2018)
5. **Ábra** A borostyánkősav tisztításában alkalmazott eljárások lépései kiinduló savas és semleges kémhatású tápoldatok esetében (Litsanov és mtsai. 2014)
6. **Ábra** Biokémiai reakciók hálózatának fizikai, kémiai és biológiai korlátai és ezek lehetséges állapotai (Becker és mtsai. 2007)
7. **Ábra** Biológiai kutatások szemléletei (Palsson 2000)
8. **Ábra** Lehetséges viselkedési "formák" korlátok közé szorítása (Palsson 2000)
9. **Ábra** *Yarrowia lipolytica* borostyánkősav termelésének fokozása különböző metabolikus útvonalak gátlásával, valamint felerősítésével (Qinglin és mtsai. 2018)
10. **Ábra** A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs elérhető metabolikus modelljének részlete, szubsztrátok felvétele, valamint ezek metabolizmusa
11. **Ábra** Génkiütés folyamata. A piruvát hangyasav, valamint tejsav irányába történő reakcióegyenletek eliminálása (Sinkler és mtsai. 2019)
12. **Ábra** Felhasznált szubsztrátokra (glükóz, xilóz, glicerin) összeállított standardok kalibrációs egyenesei
13. **Ábra** Képződött szerves savakra (borostyánkősav, hangyasav, ecetsav, tejsav) összeállított standardok kalibrációs egyenesei
14. **Ábra** A *Basfia succiniciproducens* növekedési sebessége (biomassza) és a termelt metabolitjai (borostyánkősav, ecetsav, hangyasav) a vizsgálati szubsztrátok (glükóz, xilóz és glicerin) esetén (*in silico* predikciók).
15. **Ábra** Borostyánkősav képződési sebesség tömegegyensúly elemzésekkel (FBA), valamint a céltermék elméleti maximumának meghatározása *in silico* predikciókkal
16. **Ábra** *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs számítógépes modelljének elemzése.
17. **Ábra** A baktériumtörzs mikrolemezes populációdinamikája TSB tápoldatban
18. **Ábra** A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs növekedés dinamikája mikrolemezes előkísérletekben BHI tápoldatban
19. **Ábra** A baktériumtörzs populációdinamikája M9 tápoldatban mikrolemezen

- 20.Ábra** A baktériumtörzs fajlagos növekedési sebessége mikrolemezen végzett kísérletben TSB tápoldaton különböző koncentrációjú szubsztrátok esetén
- 21.Ábra** A baktériumtörzs növekedés dinamikája mikrolemezen BHI tápoldatban
- 22.Ábra** Különböző szubsztrát és élesztőkivonat koncentrációk hatása a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs populációdinamikájára mikrolemezes laborkísérletekben
- 23.Ábra** A vizsgált törzs populációdinamikája TSB tápoldatban 20 g/L szubsztrátkoncentrációval lombik térfogatban
- 24.Ábra** A törzs növekedés dinamikája lombikban, BHI tápoldatban 20 g/L szubsztrátkoncentrációt alkalmazva
- 25.Ábra** Populációdinamikai eredmények M9 tápoldatban lombik térfogatban 20 g/L szubsztrátkoncentrációban
- 26.Ábra** Fermentációkból származó minták kromatogramjai 1260 Infinity folyadékromatográffal (A - glükóz, B - xilóz, C - glicerin)
- 27.Ábra** A *Basfia succiniciproducens* metabolikus profilja és populációdinamikája M9 tápoldatban bioreaktorban
- 28.Ábra** A *Basfia succiniciproducens* szubsztrát felhasználási sebességének és a borostyánkősav képződési sebességének (szakirodalmi adatokkal végzett *in silico* predikciók és saját laboratóriumi adatok hasonlítása) grafikus ábrázolása
- 29.Ábra** *Basfia succiniciproducens* szubsztrát felhasználási sebességeinek és a borostyánkősav képződési sebességeinek (mérési adatokból vonatkoztatott paraméterekre elvégzett *in silico* predikciók, és laboratóriumi adatok hasonlítása) grafikus ábrázolása
- 30.Ábra** Szénre vonatkoztatott hozam a három felhasznált szubsztrát esetén. *In silico* és laborkísérletek eredményei
- 31.Ábra** A kutatás folyamatának sematikus összefoglalója

Táblázatok jegyzéke

- 1.Táblázat** Borostyánkősav bioszintézisében érintett nagyvállalatok (Saxena és mtsai. 2017)
- 2.Táblázat** Fermentációs stratégiák a borostyánkősav bioszintézisének fejlesztéséhez *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzsben (D' Ambrosio és mtsai. , 2021)
- 3.Táblázat** Szakirodalomból és laboratóriumi méréseimből származó szubsztrátok felhasználási sebességei
- 4.Táblázat** Kutatómunka során használt tápoldatok összetétele
- 5.Táblázat** A felhasznált szubsztrátokon képződött maximális biomassza koncentrációja TSB tápoldatban

Összefoglalás

Jelenkori életünk elképzelhetetlen műanyagok nélkül. A széles körben elterjedt műanyagok problematikája viszont nemcsak az előállítás, hanem a felhasználást követően a lebomlás vagy újrahasznosítás során is jelentkezik. A vegyipar által szintetizált polimerek jelen pillanatban még javarészt fosszilis energiahordozókra alapulnak, valamint a hulladék kezelése révén is jelentős mennyiségű nem megújuló energiaforrást használunk fel. Mindezt számításba véve nyilvánvalóvá válik, hogy olyan módszerek kifejlesztésére és gyakorlatba ültetésére van szükség, úgy a műanyagok előállításával, mint a termékek élelciklusával kapcsolatban, amelyek ezen fent említett negatív környezeti hatásokat csökkentik.

A közelmúltban a biotechnológia és a nagy áteresztőképességű technológiák rohamos fejlődésével olyan új irányvonalakat ismerhettünk meg, melyekkel az előbbiekben felsorakoztatott problematikák orvosolhatók és a vegyipart tehermentesíthetik.

A borostyánkősav egy ilyen, alternatív alapmolekula, melyet bioszintetikus úton gyártanak különféle mikroorganizmusokat felhasználva. Az iparban már alkalmazott természetes termelő törzsek az *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens*, *Saccharomyces cerevisiae*, illetve az anyagcsere mérnökséggel tervezett *Escherichia coli* is.

Jelen értekezésben a *Basfia succiniciproducens* törzset és a hozzá tartozó számítógépes (*in silico*) metabolikus modellt felhasználva különféle elemzéseket és vizsgálatokat végeztem a törzs szaporodását és metabolikus termelőképességét illetően. A kutatásomat két nagy fázisra bonthatom: első lépésben az *in silico* metabolikus modell bővítésére, és az ezzel való elemzésekre fektettem a hangsúlyt, míg második lépésben laboratóriumi körülmények között vizsgáltam a törzs metabolikus termelőképességét, egészen a borostyánkősav termelési technológiát megalapozó bioreaktorban végzett kísérletekig. Gyakorlati kísérletek során széles szubsztrát spektrumot vizsgáltam mikrolemezes kísérletekben. Ezt követően nagyobb térfogatban (lombikban) elemeztem a törzset. Végül bioreaktorban, szabályozott körülményen adatokat gyűjtöttem a törzs metabolikus profilját illetően. Az innen származó adatokat pedig, visszacsatolásként egy újabb számítógépes predikció (előrejelzés) végrehajtására használtam fel. Az *in silico* elemzéseimből kiderül, hogy a modell kibővítésével a két újonnan integrált szubsztrát esetében - xilóz és glicerín - is elvégezhető mennyiségi előrejelzések a borostyánkősav hozamára vonatkozóan. Laborkísérleteim rámutattak arra, hogy a vizsgált baktériumtörzs

széles spektrumú szubsztrát hasznosító képességgel rendelkezik, valamint az alkalmazott gázkeverék jótékony hatással van a törzs biomassza és borostyánkősav mennyiségére.

Kutatómunkám során a szakirodalomból rendelkezésre álló *in silico* modellbe (Kim és mtsai. 2007) sikeresen integráltam a kutatás szempontjából fontos szubsztrátokat (glicerin és xilóz), valamint ezek metabolikus útvonalait. Jelen információink alapján, ezidáig a metabolikus modell glükóz szénforrásra volt elérhető. Az így bővített modellel változó bemeneti szubsztrát felhasználási sebesség (glükóz=7,7 mM gCDM⁻¹h⁻¹, glicerin=15,4 mM gCDM⁻¹h⁻¹ és xilóz=9,24 mM gCDM⁻¹h⁻¹) mellett számítógépes elemzések sorát végeztem el, ahol a biomasszára különböző növekedési sebességeket (glükóz=0,3 h⁻¹, glicerin=0,448 h⁻¹ és xilóz=0,26 h⁻¹), míg a borostyánkősavat tekintve hasonló kimeneti paramétereket predikáltam glükóz és xilóz esetén, rendre 5,57 mM gCDM⁻¹h⁻¹ és 5,79 mM gCDM⁻¹h⁻¹ értékkel. Glicerin, mint bemeneti szubsztrát alkalmazásával jelentősen kisebb borostyánkősav képződési sebesség (4,52 mM gCDM⁻¹h⁻¹) mutatkozik. Számítógépes predikciók eredményeit látva elmondhatom, hogy a hangyasav képződési sebessége volt a legmagasabb mindhárom szubsztrát (glükóz, glicerin és xilóz) esetében, rendre 6,88 mM gCDM⁻¹h⁻¹, 6,49 mM gCDM⁻¹h⁻¹ és 6,97 mM gCDM⁻¹h⁻¹. Az *in silico* elemzésekhez kötődően elmondható, hogyha a valóságban is fixálható lenne a biomassza növekedési sebessége ($\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$) akkor a biomassza növekedési sebességéért felelős szén fluxusokat a céltermék (borostyánkősav) irányába lehetne eltolni. Így az előbbieken tárgyalt borostyánkősav képződési sebességek a következő értékekre emelhetők, a szubsztrátok szerint: glükóz és xilóz = 12,06 mM gCDM⁻¹h⁻¹ és glicerin = 11,72 mM gCDM⁻¹h⁻¹.

A laborkísérletek eredményei alapján elmondhatom, hogy a kutatásom előkísérletében felhasznált szubsztrátok (arabinóz, fruktóz, glicerin, glükóz, inulin, laktóz, maltóz, maltodextrin, mannóz, xilóz) egy kivételével (inulin) alkalmas a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs nevelésére, úgy 5 g/L, mint 20 g/L szubsztrátkoncentráció esetén. A bakteriális sejtnövekedés exponenciális szakaszát a komplex tápoldatok esetén 2-4 óra között figyeltem meg, míg a minimál tápoldat alkalmazásával 4-6 óra ez az idő. Kutatásomban történt előkísérletek alapján elmondhatom, hogy az előbbieken tárgyalt szénforrások közül a legnagyobb biomassza koncentrációt a xilóz, mannóz és maltóz szubsztráton kaptam. A komplex TSB tápoldat esetén nem tapasztaltam jelentős növekedési sebesség különbséget az 5 g/L és 20 g/L koncentrációk között, míg BHI tápoldatban a 20 g/L szubsztrátkoncentráció bizonyult előnyösebbnek. M9 tápoldatban a vizsgált 5-70 g/L szubsztrátkoncentrációs intervallumban az 50 g/L bizonyult inhibíciós határértéknek.

A lombikban elvégzett kísérletekben azt láttam, hogy a TSB tápoldatban a glükóz és xilóz szénforrásokon hasonló (nagy meredekségű) fajlagos növekedési sebességek voltak jellemzők, míg a glicerinnel dúsított tápoldatban gyengébb növekedést tapasztaltam. BHI tápoldatban a fent említett mindhárom szénforrás esetében nagy fajlagos növekedési sebességet figyeltem meg. A minimál tápoldatban (M9) mindhárom szubsztrát esetében megfigyeltem 0-4 órás adaptációs szakaszt, amit egy enyhe meredekséggel jellemezhető 8 órás exponenciális szakasz követ.

Bioreaktorban elvégzett kísérletek során a glükóz szénforrással gazdagított minimál tápoldatban az anaerob körülmény (kizárólag CO₂ adagolás) mutatkozott előnyösebbnek a képződött biomassza koncentrációját illetően. A mikroaerob körülmény (CO₂/LEV adagolás) a glicerín és xilóz szénforrások alkalmazásánál hasznosabbnak bizonyult. Borostyánkősav hozamának szempontjából a glükóz és glicerín szénforrások esetén a mikroaerob körülmény, míg xilóz esetén az anaerob körülmény mutatkozott hasznosnak.

1. Bevezetés: a kutatás jelentősége és kérdésköre

Mindennapi életünkben a műanyagoknak központi szerepük van. A csomagolásoktól kezdve, a különféle iparokban előállított és használt polimerek az emberiség elengedhetetlen anyagai. Az így előállított műanyagok nagy része a kémiai iparból származik, melynek jelentős az ökológiai lábnyoma (Geyer, Jambeck, és Law 2017). Ennek okán szükségessé válik, hogy olyan módszerek és előállítási protokollok kerüljenek a gyakorlati alkalmazásokba, ahol megújuló energiaforrások használhatók a különféle polimerek előállítására. Mindemellett a magas borostyánkősav hozammal rendelkező baktériumtörzsek számítógépes modelljeinek vizsgálata, az ezekkel történő szimulációk és a laboratóriumban elvégzett kísérletek közötti összefüggések elemzése szükségszerűvé válik. Ugyanakkor értékes kísérleti adatok származhatnak eddig nem vizsgált ipari melléktermékek összetételében megtalálható egyszerű szénforrások (fruktóz, laktóz, xilóz) *Basfia succiniciproducens* törzsre tenyésztésére való hatásából.

A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs és az általa szintetizált borostyánkősav lehet az előzőekben felvázolt problematikák egy alternatív megoldása. A borostyánkősavat a világon számos nagyvállalat gyártja (BASF, BioAmber, Royal DSM, Reverdia, Succinity) különféle mikroorganizmusokat és szénforrásokat felhasználva (Saxena és mtsai. 2017). A borostyánkősav 2021-es globális piaci értéke több mint 158 millió dollár volt (Hariz és mtsai. 2023).

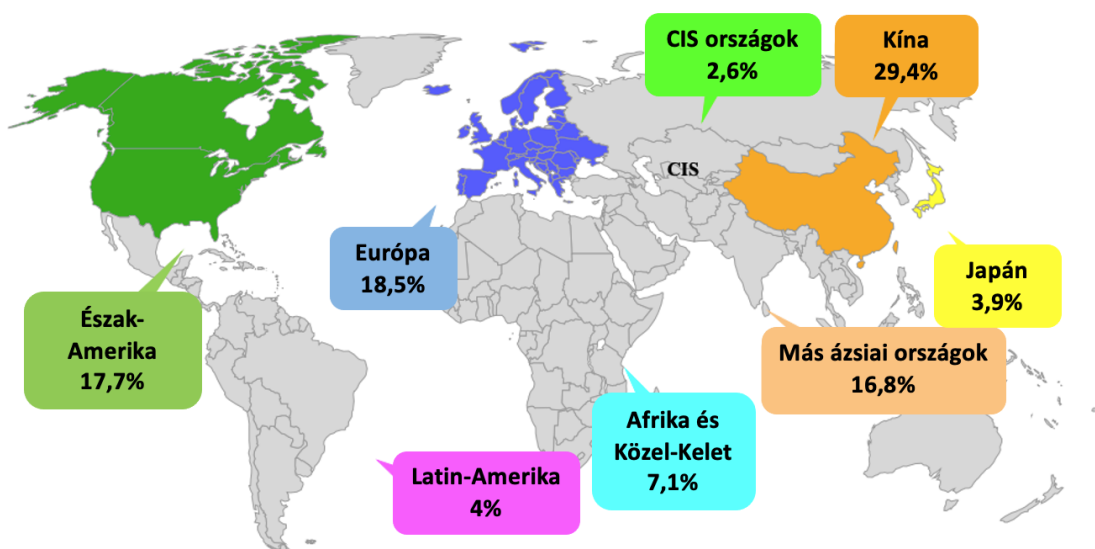
Jelen PhD értekezés irányvonalát az alábbiakban felsorakoztatott kérdéskörök adják:

1. A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzsre specializált *in silico* modell bővítése alkalmas lehet glükóz mellett xilóz és glicerin alapú borostyánkősav termelés predikciójára.
2. A kutatás központját képező baktériumtörzs a korábban leírtnál szélesebb spektrumú szubsztrát hasznosító képességgel rendelkezik és minimál tápoldat felhasználásával is megfelelő sejtnövekedést mutat
3. A fermentációs folyamatban alkalmazott gázkeverék hatással van a *Basfia succiniciproducens* sejtkoncentráció képződésére és céltermék előállítására.
4. Egyszerű *in silico* metabolikus modellek, kísérleti adatokkal alátámasztva, felhasználhatók alapszintű termelési előrejelzések meghatározására.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Műanyagok problematikája

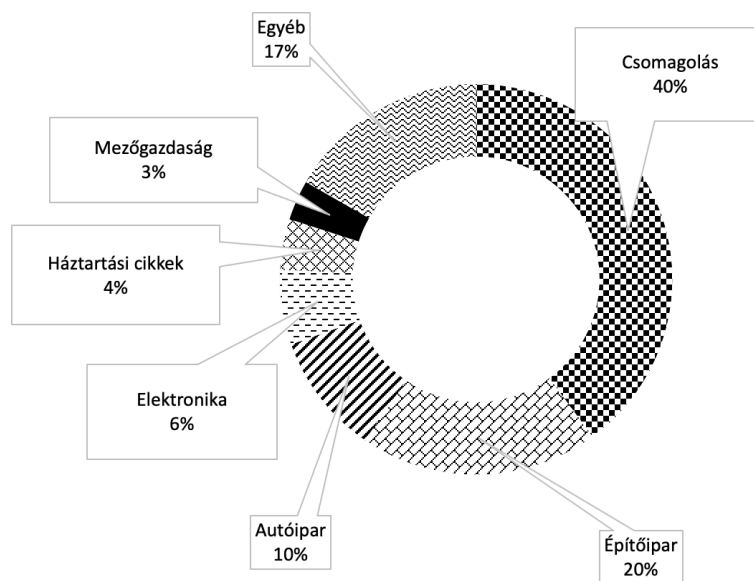
Mai világunk elképzelhetetlen a műanyagok vagy szerves polimerek használata nélkül. Nagy és széleskörű gyártásának valamint felhasználásának története egészen az 1950-es évekre nyúlik vissza. Már a huszadik század elején megjelentek az első szintetikus műanyagok, mint például a bakelit, viszont a széleskörű használat csak a második világháború után terjedt el. Legnagyobb felhasználási területe a csomagolóiparban van. Ennek eredményeképpen a közepes és nagy gazdasággal rendelkező országok településeiről származó szilárd hulladék százalékos aránya 1960-tól 2005-ig 1%-ról 10%-ra emelkedett. A műanyagok előállításához használt monomerek, például az etilén vagy propilén nagyrészt fosszilis energiahordozókból származik (Geyer, Jambeck, és Law 2017). Az 1950-es évektől 2018-ig 2 millió tonnáról 359 millió tonnára emelkedett az előállított műanyag mennyisége, ami közel 180-szoros növekedést jelent. Vezető gyártó ország Kína, közel 30%-os részesedéssel a globális előállításban, melyet Európa, Észak-Amerika és más ázsiai országok követnek (1.Ábra).



1.Ábra Régiók és országok százalékos részvétele a világ műanyaggyártásában - világviszonylat 2020 - (Maicai és mtsai. 2020)

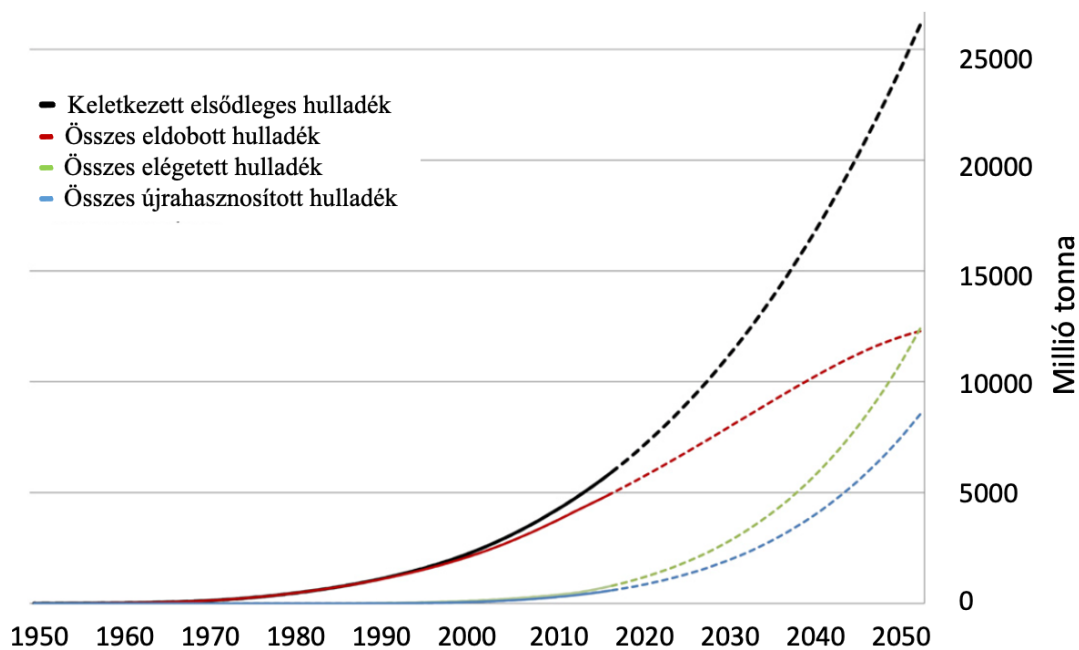
A BPF (British Plastics Federation) adatai alapján az éves kőolaj 4%-a direkt úton a műanyaggyártáshoz használódik fel. Mivel az előállításnak is megvannak a maga költségei,

így a gyártáshoz elhasznált kőolajból származó energia is az előbb említett mértékre rúghat. Tömegükből adódóan a műanyagok szállításánál jelentősen kevesebb fosszilis energiahordozó használódik el. Egy másik szempont, hogy a forgalomba hozott műanyagok szerény becslések alapján is 40%-a egyszer használatos, eldobható alkalmazású. Infrastrukturális célokra, hosszú időintervallumra gyártott műanyagok mennyisége 20-25% közé tehető. A fennmaradó mennyiséget az olyan tartós felhasználói alkalmazások teszik ki, mint az elektronikai cikkekben fellelhető műanyagok, bútorzatok és az autógyártásban használt anyagok (**2.Ábra**).



2.Ábra Ipari és nem-ipari felhasználási területek műanyagok igénye világszinten (Wang és mtsai. 2019)

A különféle ipari és nem-ipari piaci szegmensek műanyag igényét megfigyelve elmondhatjuk, hogy legnagyobb részt az egyszer használatos, eldobható műanyagok teszik ki. Ennek következtében a termelődött hulladék mértéke is meredeken emelkedő tendenciát mutat. Az évek során látott hulladék keletkezési sebességet ismerve 2050-ig a **3.Ábra** szerint fog növekedni a hulladék mennyisége. Ez alapján 9000 millió tonna műanyag lesz újrahasznosítva, míg az elégetett és hulladéklerakókba került műanyag mennyisége 12000-12000 millió tonnára rúg.

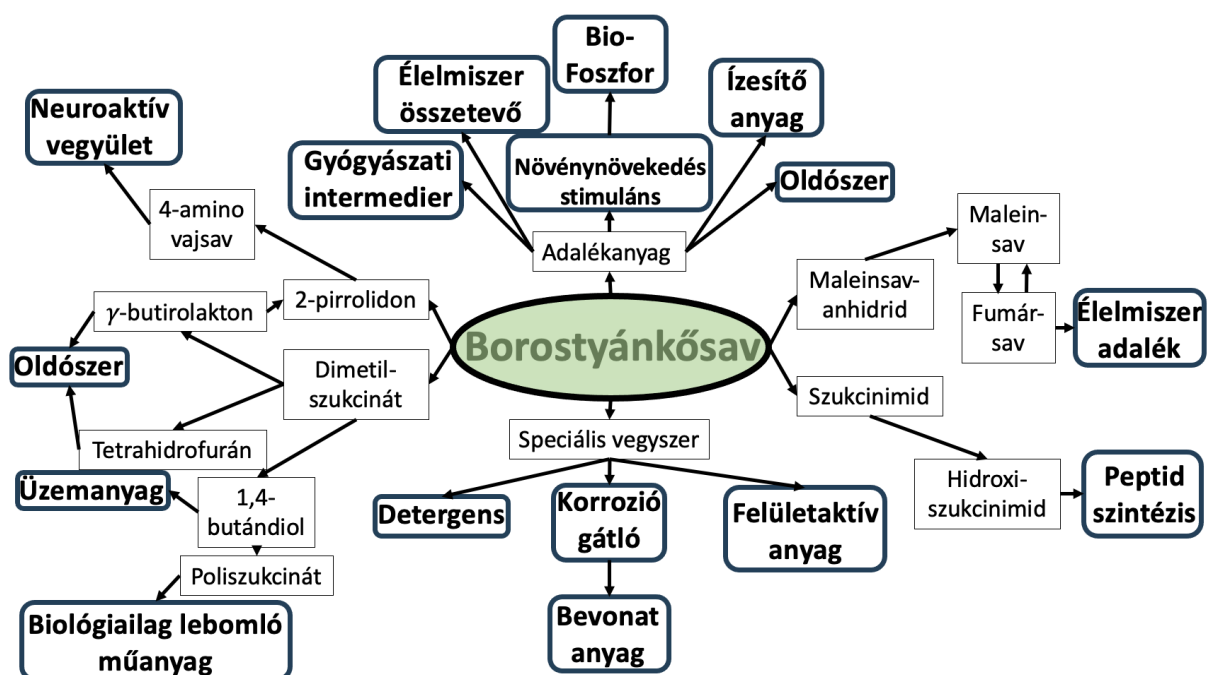


3.Ábra Műanyag hulladék keletkezése és kezelése (Geyer, Jambeck, és Law 2017)

A műanyagok nagyipari gyártásának múltja rövid, így a környezetre tapasztalt káros hatásuk még nem teljesen ismert. Annyi bizonyos, hogy a műanyagok javarésze biológiailag nem lebomló ezért rendkívül hosszú ideig fennmaradnak a környezetben. Ennek okán a napjainkban gyártott polimerek évtizedekig, évszázadokig vagy akár évezredekig is fellelhetők maradnak a természetben. Mivel a műanyagok szerkezetük alapján meghatározott/meghatározatlan ideig az ökoszisztémában maradnak, ezek lebomlását több fizikai tényező befolyásolja (ultraibolya sugárzás, hőmérséklet, oxigén stb.). A műanyagok biológiai lebomlásának feltétele olyan mikroorganizmusokat igényel, melyek ebben a folyamatban bio-katalizátor szerepet vállalnak. Mindemellett a degradáció mértéke jelentősen függ a hulladék lokalizációjától is, hogy az a szeméttelpre, a szárazföldi vagy a tengeri környezetbe kerül. Következésképp jelentős mennyiségű műanyag halmozódik fel a környezetben, mely úgy szemétfeldolgozási mint környezeti károsodásokat eredményez (Hopewell, Dvorak, és Kosior 2009).

2.2. Borostyánkősav mint megoldás

A borostyánkősavat, más nevén szukcinsavat vagy butándisavat Georgius Agricola 1546-ban borostyánból tisztította (Vilela és mtsai. 2014). Jóval később, a 18. században szenteltek nagyobb figyelmet neki amikor megállapították, hogy a borostyánkősavnak és sóinak funkcionális szerepe van az emberi fejlődésben. 1858-ban Pasteur volt az aki gyógyászati alkalmazásokban hasznosnak minősítette a borostyánkősavat. Nem sokkal később 1886-ban a modernkori bakteriológia úttörőjének számító és Nobel-díjas Robert Koch saját magán bizonyította a borostyánkősav pozitív élettani hatásait (Harry-O'kuru, Gordon, és Klockkenga 2015). A későbbiekben mikrobiális fermentációval állították elő és a mezőgazdaságban, élelmiszer-, valamint gyógyszeriparban használták. Napjainkban a kereskedelemben fellelhető borostyánkősav nagy része a kémiai iparból származik, olyan nyersanyagokból mint az LPG (liquefied petroleum gas - propán, bután), propilén és a kőolaj. A borostyánkősav több vegyi anyag fontos prekuzora, ezek a következők lehetnek: adipinsav, 1,4-butándiol, tetrahydrofuran vagy gamma-butirolakton (Hyohak és Sang Yup 2006). A borostyánkősav egy olyan alapmolekula, amely előállítható fermentációval, különböző megújuló energiahordozókból. A borostyánkősavnak és sójának számos felhasználási területe van, például használják monomérként a kozmetikai iparban, valamint olyan oldószerekben, ahol azt megelőzően kőolaj alapú vegyi anyagokat használtak (Scholten, Renz, és Thomas 2009).



4.Ábra Borostyánkősav széles spektrumú felhasználása (Hema N. 2018)

A borostyánkősav az adipinsav, 1,4-butándiol (1,4BDO), tetrahidrofurán, maleinsav és egyéb anyagok gyártásának prekursoraként gyakran előforduló vegyület (Pu és mtsai. 2009). Az ipar területén a fent említett szerves vegyületek közül a legnagyobb piaccal az 1,4-butándiol rendelkezik, mely közel 2 millió tonna éves igényt mutat (Anthony és mtsai. 2016).

2.2.1. Borostyánkősav kémiai szintézise

Különböző katalizátorok felhasználásával, kémiai szintézissel borostyánkősav szintetizálható maleinsav, maleinsav anhidrid és fumársav katalitikus hidrogénezésével. Giulio és társai fém katalizátorokat használtak és az így kialakított fém-karbonilcsoport kémiai formula hozzájárult a katalitikus hidrogénezéshez. Az így alkalmazott fémek közül a következőket említhetjük: vas, kobalt, ruténium, ozmium és irídium. Az felsorolt fémek közül a vas és a kobalt bizonyult alkalmasnak, mivel a többi három kémiai elem magas beszerzési ára nem tette lehetővé a folyamatban való használatukat (Giulio és Piero 1958). Napjainkban a maleinsav borostyánkősavvá történő hidrogénezését nemesfém-mentes megoldással valósítják meg. A módszer előnye a teljes aktivitás és szelektivitás, amely megközelíti a hagyományos módszereket (Zhao és mtsai. 2022). A kémiai szintézisek körülményeinél észrevehető, hogy az ilyen típusú hidrogénezések létrejöttéhez akár több száz fok (250 °C) és óriási nyomás (200 atm) szükségeltetik (Heisig és mtsai. 2020). Ezek a folyamatok viszont drágák és káros hatással vannak a környezetre (Stylianou és mtsai. 2020). A fermentációk révén bioszintetizált borostyánkősavat nagyrészt az élelmiszeriparban használják, míg a kémiai szintézisből előállítottat minden egyéb más alkalmazásra értékesítene (Goldberg és Rokem 2009).

2.2.2. Borostyánkősav bioszintézise

A borostyánkősav bioszintézisére különböző bendőből izolált anaerob, valamint fakultatív anaerob baktériumot használnak. Több mint 200 baktériumfaj él a kérődzők bendőjében (Matthews és mtsai. 2019). A probiotikus tulajdonságokkal rendelkező mikroorganizmusok képesek borostyánkősavvá fermentálni a rendelkezésre álló különböző szénforrásokat. A kérődző állatok bendőjében fellelhető redukáló állapot hatására, a borostyánkősav propionsavvá alakul, ezért mennyiségi kimutatása nehézkes. Mégis azon baktériumok, melyek potenciállal bírnak a borostyánkősav bioszintézisében, széles

spektrumú kutatási vizsgálatok tárgyát képezik. Több borostyánkősav szintetizáló mikroorganizmust írtak már le, ilyenek: *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens*, *Clostridium thermosuccinogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, valamint rekombináns *Escherichia coli* (Joeri, Marjan, és Soetaert 2010). Ezen törzsek magas hozammal termelnek borostyánkősavat és elenyésző mennyiségű mellékterméket. Ezeket a mikroorganizmusokat különböző nagyüzemi vállalatok használják a világ több országában (**1.Táblázat**), különféle szubsztrátok felhasználása mellett.

1.Táblázat Borostyánkősav bioszintézisében érintett nagyvállalatok (Saxena és mtsai. 2017)

Vállalat	Felhasznált organizmus	Szubsztrát	Kapacitás	Ország	Forgalomba hozatal éve
BASF - CCM (Purac)	<i>Basfia succiniciproducens</i>	Glicerin/ Glükóz	Kereskedelmi mennyiség	Spanyolország	2010
BioAmber - DNP Green Technology	<i>Escherichia coli</i>	Gabona alapú glükóz	2000 t/év	Franciaország	2010-2011
Royal DSM NV - Roquette	<i>Escherichia coli</i>	Glükóz/ keményítő	10000-20000 t/év	Franciaország	2011
Reverdia	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Keményítő	10000 t/év	Olaszország	2012
BioEnergy International - Myriant	<i>Escherichia coli</i>	Keményítő	15000 t/év	USA	2013
Succinity GmbH	<i>Basfia succiniciproducens</i>	Nincs adat	10000 t/év	Spanyolország	2013

2.2.3. Borostyánkősav előállítása bioreaktor rendszerekben

A biotechnológiában nélkülözhetetlen az olyan szabályozott és kontrollált rendszerek alkalmazása, mint a bioreaktorok. Érzékeny mikroorganizmusok használata egy-egy adott termék előállítására gyorsan termék vagy pH inhibíciót okozhat, mely a technológiai folyamat hatásfokának meredek csökkenéséhez vezethet. A bioreaktoroknál alkalmazott konstans hőmérséklet, pH, valamint oldott gázok koncentrációja a folyamat stabilitásával a termelni kívánt anyag hozamának növeléséhez járul hozzá. Borostyánkősav bioszintézisére különféle bioreaktorokat használnak (Ferone és mtsai. 2019), melyek alkalmazásáról alább részletesebb információkat mutatok be.

2.2.3.1. Szakaszos üzemelésű (batch) bioreaktoros borostyánkősav termelés

Legegyszerűbb módja a borostyánkősav bioreaktoros termelésének a szakaszos üzemelésű fermentáció. A sejtnevelés és termékképzés egy mechanikailag kevert edényben történik kiegészítve különféle gázfázis ellátással, valamint hűtő/fűtő köpennyel. Kezdeti szubsztrátkoncentrációként 20-100 g/L-ről indítják a folyamatot és 37-39 °C hőmérsékleten, valamint közel semleges kémhatást használva (pH=6,8-7,2), ezen fenti paraméterek mikroorganizmus specifikusak (Samuelov és mtsai. 1991). Élesztőgombák esetén a kémhatás alacsonyabb értéket képvisel (Xiao és mtsai. 2014; Yuzbashev és mtsai. 2010). Általában anaerob körülmények szükségesek a borostyánkősav bioszintéziséhez, ezt oxigénmentes nitrogénnel vagy CO₂ alkalmazásával érik el. Egyes szubsztrátok előkezelést igényelnek, mint őrlés, savas/lúgos kezelés, szűrés (Wan és mtsai. 2008; Gunnarsson, Karakashev, és Angelidaki 2014). A fermentáció időigénye a felhasznált organizmustól függ, ennek átlaga 48-100 óra. Nghiem és mtsai. szakaszos üzemelésű bioreaktorban *Anaerobiospirillum succiniciproducens* baktériumtörzset használtak, és 50 g/L kezdeti glükóz koncentrációval 0,98 mol/mol borostyánkősav hozamot értek el (Nghiem és mtsai. 1997). Húsz évvel később Ferone és kutatócsoportja lignocellulóz alapú szubsztrátokat (glükóz-mannóz-arabinóz-xilóz) felhasználva, és a tápoldatot MgCO₃-al kiegészítve *Actinobacillus succinogenes* baktériumtörzsszel 0,22 g/g borostyánkősav hozamot valósított meg (Ferone és mtsai. 2017). 2015-ben az Északi-tenger dániai partjairól begyűjtött mikroalga hidrolizátumot felhasználva 50 g/L kezdő szubsztrátkoncentrációval és MgCO₃-al, Merlin és csapata 0,7 g/g hozammal sikerült borostyánkősavat szintetizáljon ugyancsak *Actinobacillus succinogenes* baktériumtörzsszel (Merlin és mtsai. 2015).

2.2.3.2. Rátáplálásos (fed-batch) üzemelésű bioreaktoros borostyánkősav bioszintézis

Rátáplálásos működésű bioreaktorokat használnak, amikor a magas kezdeti szubsztrátkoncentráció esetlegesen inhibíciós hatással lehet az alkalmazandó mikroorganizmusra. A fermentáció során alacsonyan tartott szubsztrátkoncentráció (10-15 g/L) hozzájárulhat a borostyánkősav hozamának növeléséhez. A szakaszos üzemelésű bioreaktorokkal megegyező kiindulási szubsztrátkoncentrációval, Bretz és Kabasci 1,22 mol/mol hozamot produkáltak fed-batch fermentációval, (40 g/L glükóz rátáplálással) *Anaerobiospirillum succiniciproducens* baktériumtörzsszel (Bretz és Kabasci 2012). Yu-Peng és munkatársai *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593 baktériumtörzset használva a glükóz koncentrációját 10-15 g/L koncentrációban szabályozva, 60,2 g/L koncentrációban és 0,75 g/g hozamban borostyánkősavat termeltek (Yu-Peng és mtsai. 2008). Yan és kutatócsoportja a szennyvíztisztításból ismeretes és nagy hatékonyságnak örvendő töltött ágyas reaktorokat (fixált töltettel rendelkező bioreaktorok) használta, ahol négy egymást követő rátáplálási ciklussal 98,7 g/L borostyánkősav koncentrációt sikerült megvalósítani, 0,89 g/g hozammal (Yan és mtsai. 2014). Ugyancsak fixált töltetű bioreaktort használva Chong és csapata *Yarrowia lipolytica* szukcinát dehidrogenáz génjének eliminált mutáns törzsével, 100 g/L glicerin szubsztrát alkalmazásával 198,2 g/L borostyánkősav koncentrációt ért el, mely az addig tartott legmagasabb megvalósított céltermék koncentrációt jelentette (Chong és mtsai. 2017).

2.2.3.3. Folytonos üzemű bioreaktorok borostyánkősav előállítására

A szakaszos, valamint rátáplálásos bioreaktorokkal szemben a folytonos üzemelésű rendszerek több előnnyel is rendelkeznek. Elsősorban a folytonos üzemelés mellett, egy inokulum elegendő egy hosszú időn át tartó fermentációra. Másodikként említhető az ugyancsak folytonos működésből származó jóval kevesebb sterilizálási idő. Nem utolsósorban, a megfelelő hígítási sebességgel megelőzhető a szubsztrát és termék inhibíció, mely az általános termelékenység növekedéséhez járulhat hozzá. A két leggyakrabban alkalmazott folytonos üzemelésű bioreaktor technológia az immobilizált sejtes és sejt visszanyeréses módszer. E technológiák kifejlesztésének mozgatórugója a céltermék hozamának növelése. Ilyen folytonos üzemelésű bioreaktorban *Actinobacillus succinogenes* törzset használva 60 g/L glükóz szubsztráttal, 0,02 h⁻¹ hígítási sebességgel 0,75 mol/mol hozamot számítottak (Bradfield és Nicol 2016b). Ugyancsak az előzőekben említett

baktériumtörzset és kukoricakeményítőt felhasználva 0,9 g/g hozamot produkáltak 0,054 h⁻¹ hígítási sebességgel (Maharaj, Bradfield, és Nicol 2014). Megfigyelték, hogy a borostyánkősav hozama (biomasszára vonatkoztatva) a tápoldatban, a fermentáció során emelkedő céltermék koncentrációjával csökkent, melyből arra következtettek, hogy a biofilm minőségi átalakuláson ment át. Ennek az átalakulásnak köszönhetően a megváltozott paraméterek, olyan hatással voltak a törzsre, mely a borostyánkősav szintézisének csökkenéséhez vezetett. Ferone és munkatársai folytonos üzemelésű rendszerben 0,54 h⁻¹ hígítási sebességgel glükóz (50 g/L koncentrációban) szubsztráton 0,98 g/g hozammal termeltek borostyánkősavat *Actinobacillus succinogenes* baktériumtörzsből (Ferone és mtsai. 2018).

2.2.3.4. Borostyánkősav bioszintézise megújuló energiaforrásokból

Több kutatás is alátámasztja, hogy az üzemi hulladékok és melléktermékek (sajtgyártásból származó savó, biodízel gyártásából származó glicerín, cukornád melasz, gabona őrléséből származó melléktermékek), a lignocellulóz alapú anyagok (cukornád rostos maradványa, kukoricarost és kukoricacsutka, pamut gyártásból származó szerves, rostos hulladék) és a mikroalga hidrolizátumok hozzájárulnak a borostyánkősav előállítás költségeinek csökkentéséhez. A glicerín a biodízel gyártásából származó olcsó és bőséges szénforrás (Y. Liu és mtsai. 2010). Nyers glicerín (50 g/L) felhasználásával 26,7 g/L koncentrációban termeltek borostyánkősavat 0,4 mol/mol hozammal (Anestis és mtsai. 2011). Chen és kutatócsoportja *Actinobacillus succinogenes* baktériumtörzset felhasználva 0,67 mol/mol hozamban termelt borostyánkősavat, kukorica hidrolizátumot felhasználva. Ennek előkezeléséhez kénsavat használtak, melyet CaCO₃-al semlegesítettek és a tápoldat furfurol tartalmát, mely a mikrobiális közösség inhibíciójához járul hozzá, aktív szén felhasználásával távolították el (K.-Q. Chen és mtsai. 2011). Du és csapata a gabona őrléséből származó terméshéjat és gombatörzseket felhasználva első lépésben amilolitikus és proteolitikus enzimeket termeltek, amit majd a gabonaipari melléktermékek keményítőjének és különböző fehérjéinek hidrolízisére használtak fel. Az így kialakított glükózban és szabad-nitrogénben gazdag tápoldatot *Actinobacillus succinogenes* törzsszel beoltva, a fermentáció 64 g/L koncentrációjú borostyánkősavat eredményezett (Du és mtsai. 2008). Két másik tanulmányban olvashatunk azokról a fermentációkról, ahol szubsztrátként hidrolizált mikroalgát alkalmaztak, ennek fő szénhidrát komponensei a glükóz és mannitol. Génszerkesztett *E. coli* és vad típusú *Actinobacillus succinogenes* törzseket felhasználva

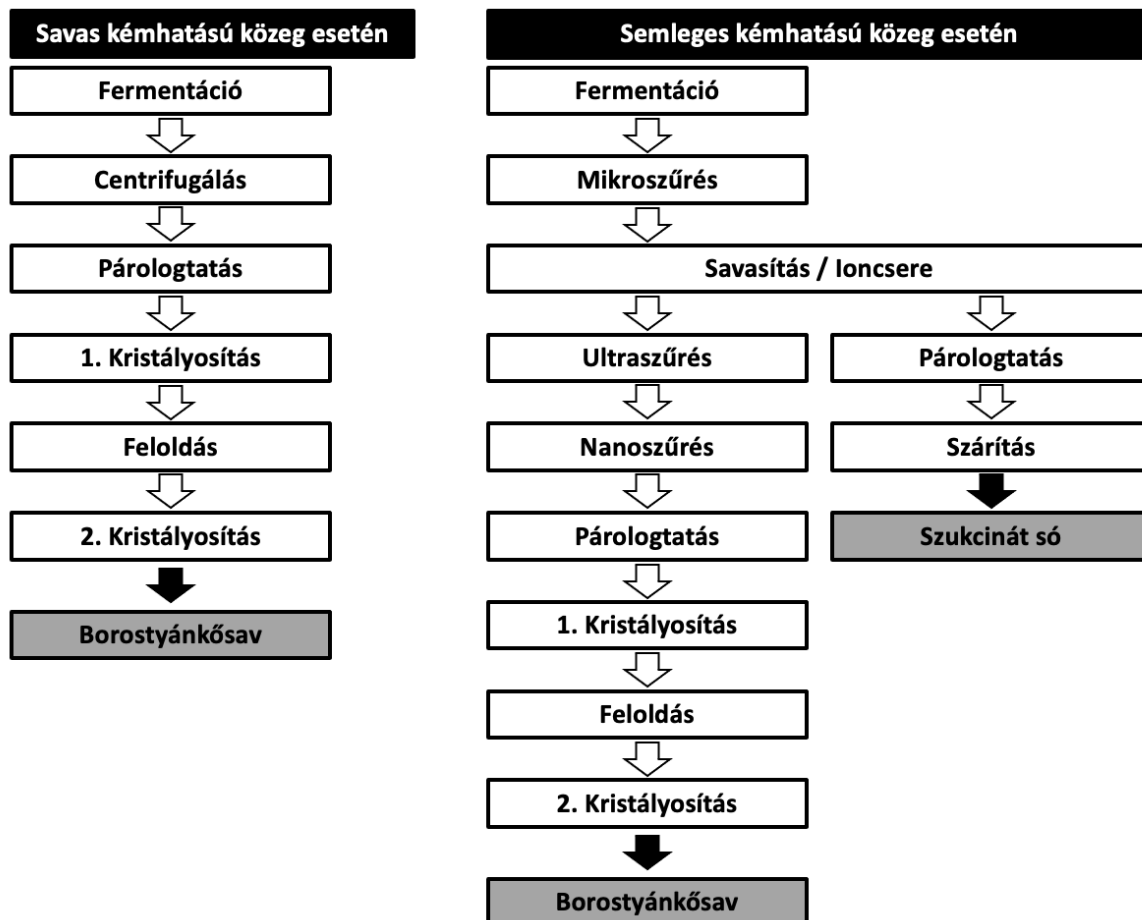
rendre 17,4 g/L és 24,4 g/L borostyánkősav koncentrációt sikerült elérni (Bai és mtsai. 2015; Merlin és mtsai. 2015).

2.2.4. A borostyánkősav tisztítása

Az optimális fermentációs körülmények, valamint a hatékony mikroorganizmusok kiválasztása mellett egy fontos kérdés a borostyánkősav bioszintézisében a tisztítási folyamat. Az előbbieken említett kérdés fontosságát akkor értjük meg amikor látjuk, hogy a borostyánkősav előállítás teljes költségének több mint 60%-át a tisztítás adja (Bechthold és mtsai. 2008). Első lépésben centrifugálással vagy szűréssel távolítják el a tápoldattól a folyamat során keletkezett biomasszát. Az így elválasztott biomassza újrahasznosítható, és egy következő biotechnológiai folyamatban akár terméké alakítható. Ezt követően, a sejtmentes közegtől az ott maradt sejttörmelék, fehérjéket és egyéb polimereket ultraszűréssel távolítják el (Gerigk és mtsai. 2002; Maass és mtsai. 2002). A borostyánkősav visszanyerésére számos módszer létezik: kicsapás, elektrodialízis, szorpció és ioncserélők használata (Kurzrock és Weuster-Botz 2010; Cheng, Zhao, Zeng, Wu, és mtsai. 2012).

A szerves savak, mint a borostyánkősav, a tejsav vagy a citromsav a fermentációs közegből való eltávolításához kalcium-hidroxidot vagy kalcium-oxidot használnak. A kicsapást követően szűrik, tisztítják, koncentrálnak és kristályosítják (Berovic és Legisa 2007). Borostyánkősav esetén a fent említett anyagok mellett az ammóniát is felhasználják csapadékképzésre (Yedur, Berglund, és Dunuwila 2001). Mivel sok a folyamatba befektetett anyag (Ca(OH)_2 , CaO , NH_3) és nagy mennyiségű alacsony értékkel rendelkező mellékterméket keletkezik, valamint nagy sótartalmú szennyvíz is képződik a folyamat során kevésbé használják nagyüzemi termelésben (Hermann és Patel 2007). A kicsapás mellett az elektrodialízist is használják szerves savak kinyerésére, ezt is alkalmazzák a borostyánkősav elválasztásához (Glassner és Datta 1992). Itt azonban felmerülnek olyan problémák, mint az alacsony tisztítási hatékonyság, magas energiaigény és alacsony szelektivitás (McKinlay, Vieille, és Zeikus 2007). Az ioncserés tisztítás hátránya újból az elégtelen szelektivitás és kinyert borostyánkősav hozama, ezek miatt inkább mint kiegészítő módszerként használják más technikákkal kombinálva (Pai, Doherty, és Malone 2002). Az előzőekben taglalt módszereket vizsgálva nyilvánvalóvá válik, hogy egy effektív technikát kell kifejleszteni. Erre a kérdésre Camilo és csapata adott választ, amikor erős anioncserélő gyantát használtak, ami nem csak kinyerte (szorpció révén) a tápoldatból a borostyánkősavat de egyúttal katalizálta a szukcinát konverzióját dietil-szukcináttá (Camilo S. és mtsai. 2012).

A borostyánkősav tisztítása tehát relatív egyszerű, rövid módszerekkel megvalósítható. Ezen szerves sav protonált formája kisebb mértékű oldékonyságot mutat vizes rendszerekben, mint anionos formája. Ezek alapján két főbb tisztítási módszert mutatok be a **5.Ábrán**, melyben az egyik alacsony pH-n, míg a másik semleges közeli pH-n mutatja meg a borostyánkősav tisztításának lépéseit.



5.Ábra A borostyánkősav tisztításában alkalmazott eljárások lépései kiinduló savas és semleges kémhatású tápoldatok esetében (Litsanov és mtsai. 2014)

2.2.5. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfias eljárások a borostyánkősav és szubsztrátok minőségi és mennyiségi azonosításában

A szakirodalomban számos kutatást találhatunk, ahol nagy teljesítményű folyadékkromatográfias (HPLC) technikával borostyánkősavat analizálnak. Különböző folyadékkromatográfokat és széles spektrumú elválasztó oszlopokat felhasználva számos alkalmazást figyelhetünk meg. Az analízisre szánt minták előkészületek után kerülnek a berendezésbe. Mindenik módszerben megfigyelhető, hogy első lépésként a célterméket tartalmazó oldatot elválasztják a fermentáció során közegbe kerülő nagyeleemes részekről,

baktériumsejtektől és sejttörmeléktől. A metabolikus aktivitás leállításához centrifugálást alkalmaznak. A centrifugálást szűrés követi 0,22-0,45 µm nagyságú pórusátmérővel. A minták ezt követően a nagy teljesítményű folyadékkromatográf elválasztó oszlopára kerülnek. A módszer és az oszlop felépítéséből adódóan, különféle mozgó fázisokat használnak különböző térfogatáramban, eltérő koncentrációban. Xilóz és borostyánkősav detektálására, Bradfield és kutatócsoportja, Agilent 1260 Infinity Aminex HPX-87H ioncserés oszloppal szerelt HPLC-t használt. A kénsav mobil fázis 0,6 mL/perc térfogatáramban haladt át az oszlopon, 20 mM koncentrációban (Bradfield és Nicol 2016a). Leung és csapata BIO-RAD HPX-87H oszloppal szerelt HPLC-t használt. A pékiparból származó melléktermékeket felhasználva, a fermentáció után a szénforrások és termelődött metabolitok azonosítására rendre törésmutató (refraktív index) detektort (RID) és fotodiódásoros detektort (PDA) használtak. Az eluens kénsav oldat volt 0,6 mL/perc áramban de alacsonyabb, 5 mM koncentrációban. A mintákat 10 µL térfogatban injektálták a műszerbe, melynek oszlop és RID fenntartott hőmérséklete rendre 65 °C és 35 °C volt (Leung és mtsai. 2012). Minőségben eltérő eluenst használt Ergönül és munkatársa különféle szerves savak (borostyánkősav, citromsav, almasav és oxálsav) detektálására. Ebben a kutatásban Perkin Elmer Series 200 HPLC-t használtak és az UV detektorral 214 nm hullámhosszúságon mérték. A HPLC-ben Shodex RSpak KC-118 oszlop végezte az elválasztást, és az eluens 0,8 mL/perc térfogatáramú 0,1%-os foszforsav oldat volt. Az elválasztásra szánt minták térfogata 50 µL volt (Ergönül és Nergiz 2010). Liu és kutatótársai egy másik kutatásban, a Bradfield-ék analíziséhez hasonló oszlopot (Aminex HPX-87H) használtak ahhoz, hogy a cukornád fermentációjából keletkezett különféle szerves savakat (borostyánkősav, ecetsav és hangyasav) azonosíthassák. Az alkalmazott kénsav oldat koncentrációja 10 mM volt, és 0,5 mL/perc térfogatárammal haladt keresztül az elválasztó oszlopon, melynek hőmérsékletét 55 °C-on tartották. Erős anioncserélő gyantán (Dowex 1-X8) a mintákban fellelhető szerves savakat eltávolították. A cukornád összetételében résztvevő szénforrások azonosítására, Zorbax NH₂ oszlopot használtak, ahol a mobil fázis 1 mL/perc térfogatáramban acetonitril oldat (acetonitril:víz=75:25) volt (Y.-P. Liu és mtsai. 2008). Guettler a borostyánkősav minőségi és mennyiségi analízisét Waters model 600 HPLC-n végezte, melynek elválasztó oszlopa Bio-Rad HPX-87H volt. Eluensként 0,006 M-os koncentrációban kénsav oldatot használtak (Guettler, Rumler, és Jain 1999). A HPLC-t gyors szűrővizsgálatok validálására is használják. Ennek alapján Agarwal és munkatársai két különféle módszert ellenőriztek. Első, egy vékonyréteg kromatográfia volt, míg a második a fluoreszcens gyűrű módszere. Mindkét módszer lényege, hogy csökkentse a borostyánkősav drága, idő-, és szakember igényes

körülményeit. A vizsgálatok során Shimpack SCR-101H oszlopot használtak, melyhez UV-Vis detektort kapcsolnak. Az áramló mobil fázis pH=2,1 értékű savasított (perklórsav) HPLC tisztaságú, szűrt víz volt. A borostyánkősav elválasztására Bio-Rad Aminex HPX-87H oszlopot alkalmaztak RID detektorral ellátva. Az alkalmazott eluens 0,6 mL térfogatáramban és 5 mM-os koncentrációban haladt keresztül a rendszeren (Agarwal, Isar, és Saxena 2005).

2.3. *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs

A *Pasteurellaceae* családjába tartozó *Basfia succiniciproducens* egy gram-negatív, fakultatív anaerob baktériumtörzs, amelyet marhabendő normál flórájából izoláltak (Kuhnert és mtsai. 2010). Egyéb *Pasteurellaceae* törzsekkel szemben a *Basfia succiniciproducens* genetikai hasonlóságot mutat a *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E baktériumtörzshöz. E baktérium 37 °C-on 24 órás inkubálást követően 0,1-0,5 mm átmérőjű, szürkés fénylő telepeket mutat. Az optikai denzitás (OD₆₀₀) és a száraz sejtömeg (gCDM) közti összefüggést Becker és kutatócsoportja állította fel a következők szerint (Becker és mtsai. 2013), a baktériumtörzsrre specifikusan:

$$\text{gCDM [g/L]} = 0.331 \times \text{OD}_{600}$$

melyet a későbbiekben a kutatásom során használtam.

Az említett baktériumtörzs glükóz szubsztrát felhasználásával, anaerob körülmények mellett borostyánkősavat szintetizál. Szerves savtermelés mellett, más szubsztrátok hasznosítására is alkalmas, ilyenek például: dextrin, maltóz, D-fruktóz. A D-arabinóz, cellobióz, D-szorbitol szénforrás esetén biomasszát igen, de borostyánkősav termelést nem figyeltek meg (Becker és mtsai. 2013; Kuhnert és mtsai. 2010). A törzssel történő bioszintetikus borostyánkősav termelést több kutatócsoport is vizsgálta, ahol különböző szénforrásokkal más-más specifikációjú folyamatban elemezték annak produktivitását, ezek paramétereit a **2.Táblázat**ban mutatok be.

2. Táblázat Fermentációs stratégiák a borostyánkősav bioszintézisének fejlesztéséhez *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzsben (D'ambrosio, Alfano, és Cimini 2021)

Törzs	Szénforrás	Folyamat	BS (g/L)	Hozam	Forrás
DD1	glükóz 20 g/L	szakaszos üzemelés, 0,3 L, pH=6,5, 39 °C, 500 rpm, 0,25 vvm CO ₂	12,3	0,93 mol/mol	(Scholten és Dägele 2008)
DD1	nyers glicerin 5,1 g/L	folyamatos üzemelés, 0,3 L, pH=6,5, 500 rpm, 0,1 l/perc, D=0,018	5,21	0,8 mol/mol	(Scholten, Renz, és Thomas 2009)
DD1	glükóz 50 g/L	30 mL szérum flaska, 0,8 bar CO ₂ túlnyomás	20	0,62 mol/mol	(Becker és mtsai. 2013)
JF4016	SSL	rátáplálásos, 0,5 L, pH=6,7, 0,1 vvm CO ₂	45	0,66 g/g	(Maria és mtsai. 2016)
BPP7	<i>Populus nigra</i> (fekete nyár)	szakaszos üzemelés 2,4 L, pH=6,5, 0,5 vvm	15-18	0,75 g/g	(Anna és mtsai. 2018)
DSM 22022	SSL (spent sulfite liquor)	folyamatos üzemelés, 1 L, 37 °C, 250 rpm	16-22	0,4-0,55 g/g	(Dimitrios és mtsai. 2018)
DSM 22022	glükóz 15 g/L xilóz 2 g/L	szakaszos üzemelés, 1,5 L, recirkulált biogázzal	4	0,31 mol/mol	(Mahsa és mtsai. 2019)
JF4016	glükóz 25,4-75,9 g/L	szakaszos 0,5 K, pH=6,7, 0,5 vvm	26,8	0,57-0,84 mol/mol	(Stylianou és mtsai. 2020)

2.3.1. *Basfia succiniciproducens* kapnofil tulajdonsága

Kapnofileknek nevezzük azokat a mikroorganizmusok, amelyek anyagcserefolyamataik során a CO₂ metabolizálására is alkalmasak. Ezeket a mikroorganizmusokat emlősök emésztőcsatornájából, kérődzők bendőjéből, növényekből és szennyvizekből izolálták. Az itt élő mikroorganizmusok anyagcsereje adaptálódott az anaerob körülményekhez (Santillan és mtsai. 2015). A kérődzők bendője olyan mikroorganizmusok élettere, amelynek köszönhetően a gazdaállat képes cellulóz, hemicellulóz, keményítő, szénhidrátok, fehérjék és zsírok megemésztésére. A szénforrások (cellulóz, hemicellulóz) glükóz formájában hasznosulnak olyan, különböző illékony zsírsavakká (VFA - volatile fatty acids), mint például ecetsav, propionsav, valamint vajsav. Ezek a VFA-k a bendő falán keresztül felszívódnak és a tej-, valamint energiatermelésre használódnak. Mindezek mellett a bendőben a fő alkotó gáz a CO₂. Itt a kapnofil baktériumok fontos szerepet töltenek be a fermentációs profil szabályozásában (Hong és mtsai. 2004). A CO₂ jelenléte jelentősen befolyásolja a borostyánkősav bioszintézisét, mely nemcsak a gázfázisban hozzáadott formában jelenthet előnyt, de egyéb karbonátok formájában is. Következésképpen magas borostyánkősav hozam elérése érdekében vagy gázfázisú CO₂ vagy karbonátban rejlő szén-dioxid szükséges. Amikor CO₂ vagy egyéb karbonát vízben oldódik hidrogén-karbonátokat (HCO₃⁻) és karbonátiót (CO₃⁻) eredményez. A szén-dioxid, bikarbonátok és karbonátiók aránya a tápoldatban a pH függvénye lesz (Cheng, Zhao, Zeng, és Zhang 2012). Samuelov és kutatócsoportja glükóz fermentációját vizsgálta *Anaerobiospirillum succiniciproducens* törzsben széndioxid hatására különféle koncentrációkban, MgCO₃ formájában. Eredményeik alapján ha a CO₂-HCO₃⁻ moláris aránya 0,5-1 között volt a rendelkezésre álló szénforrás (glükóz és karbonátok) 15%-a hasznosult biomassza és 65%-a borostyánkősav formájában. Amint tizedére csökkent a fent említett arány (moláris arány = 0,065), a rendelkezésre álló szénforrás csupán 8%-a alakult sejttömeggé, emellett megközelítőleg a szénforrás 50%-a tejsavvá alakult és csak 30%-a borostyánkősavvá (Samuelov és mtsai. 1991).

2.4. A rendszerbiológia, mint új tudományterület

A rendszerbiológia megértéséhez egyféle gondolatmenet váltásra van szükség, arra, hogy a biológiai rendszerek tekintetében nézőpontunkat áthelyezzük a partikuláris vizsgálódásról a holisztikus világlátásra. Azáltal, hogy értjük a különböző gének és fehérjék működési elvét, még nem alakul ki egy mindent átfogó, értelmező kép a rendszer szerkezetét és dinamikáját illetően. Mivel egy biológiai rendszer nem csupán gének és fehérjék halmaza, egyszerű diagramok leírásával nem érthető meg annak működése. Voltaképp e diagramok lesznek azok a fontos lépések, amelyek - egy analóg példa révén - első körben egy statikus "úthálózat" hasonlíthatnak. Az így kialakult "úthálózatban" jelentkező mintázatok és a benne résztvevő elemek fogják a rendszer egészét leírni.

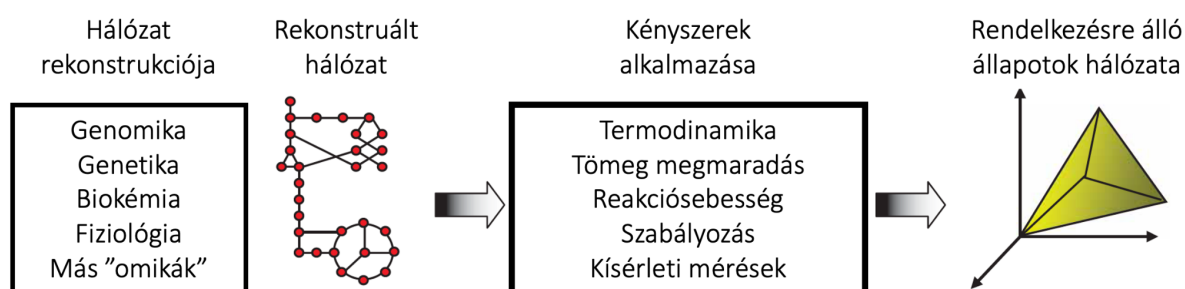
Egy biológiai szerveződés rendszerszintű megértéséhez négy kulcsfontosságú paramétert kell figyelembe venni:

- a rendszer struktúrája
- a rendszer dinamikája
- kontroll lehetősége
- tervezés potenciálja.

Hagyományosan egy biokémiai rendszer hálózatának kiépítéséhez laborban végzett kutatások sorozatára volt szükség, melyet szervesen átkarol a széleskörű szakirodalmi informálódás. Az így kialakult adatbázisok hasznos forrásai voltak az aktuális tudományterületnek, de még így is számos hálózati struktúra megértése egy jelenkori probléma tárgyát képezi. Az újabb kutatásoknak köszönhetően koexpresszióval, olyan ismeretlen gének juttathatók kifejezésre már ismert génekkel, melyek működése ezidáig tisztázatlan volt. Ez a technológia betekintést nyújtott a gének egymás közötti korrelációjáról is. Microarray technikáknak köszönhetően az mRNS-ből származó információkból következtetni lehet a transzkripciós szabályozásokra. Ezt követően a poszttranszkripciós és poszttranszlációs génszabályozás mechanizmusáról nyert információk egy széles spektrumú adatbázisba kell, hogy integrálódjanak. Csak ezután lehet megkísérelni a rendszer hálózati szerkezetének kiépítését. A fent leírt módszerek sorozatából generált adatbázis elemeit, olyan döntésre képes algoritmusokkal kell párosítani/kombinálni, melyek csökkentik a hálózatban fellelhető rendezetlenségeket, hogy így ez egy megbízhatóan működő modellt adjon (Kitano 2002).

2.4.1. Kényszer-alapú metabolikus modellezés: Cobra TOOLBOX

A rendszerbiológia gyors fejlődésének köszönhetően számos biológiai rendszert sikerült *in silico* modellek segítségével leírni. Ezek a modellek a későbbiekben alkalmasak lettek, hogy a sejt működéséről mennyiségi és reprodukciós predikciókat adjanak. A genomléptékű rekonstrukciók, olyan biokémiai reakciók listája, melyek a sejt bizonyos részei (részletes megismerés után az egész metabolizmus) és a hozzá kötődő releváns fehérjéket, transzkriptumokat és géneket tartalmazzák (Becker és mtsai. 2007). A tömegegyensúly elemzés (FBA -Flux Balance Analysis) a biokémiai hálózatok tanulmányozására használt eszköz. Ezek a hálózatok tartalmazzák az összes ismert metabolikus reakciókat, valamint az ezeket kódoló géneket. Az FBA-nak köszönhetően a metabolitok áramlását egy ilyen biokémiai hálózatban elemezhetjük, melyből az adott mikroorganizmus növekedési üteméről vagy a technológiailag fontos metabolitok képződési sebességéről predikciókat kaphatunk. Ennek alapja, hogy a biokémiai hálózatban megjelenő reakciókat sztöchiometriai együtthatók jellemezzék. A későbbiekben ezen sztöchiometriai együtthatók szabják meg a metabolitok fluxusát a biokémiai hálózatban. Ezek az együtthatók korlátozzák (kényszerek) a metabolitok áramlását a biokémiai hálózaton belül. A kényszereket két részre csoportosíthatjuk: egyenletek, melyek a be- és kimeneti reakcióegyenleteket egyensúlyozzák, valamint egyenlőtlenségek, melyek a rendszer határait szabják meg (6.Ábra). Minden reakció kaphat egy felső vagy alsó határértéket, amely megszabja az adott reakcióegyenlet megengedett fluxusának minimumát vagy maximumát. Az előbbieken említett egyensúlyi paraméterek (egyenletek) és határértékek meghatározzák (egyenlőtlenségek) a rendszer fluxus eloszlását (Palsson 2000, Alan 2005).

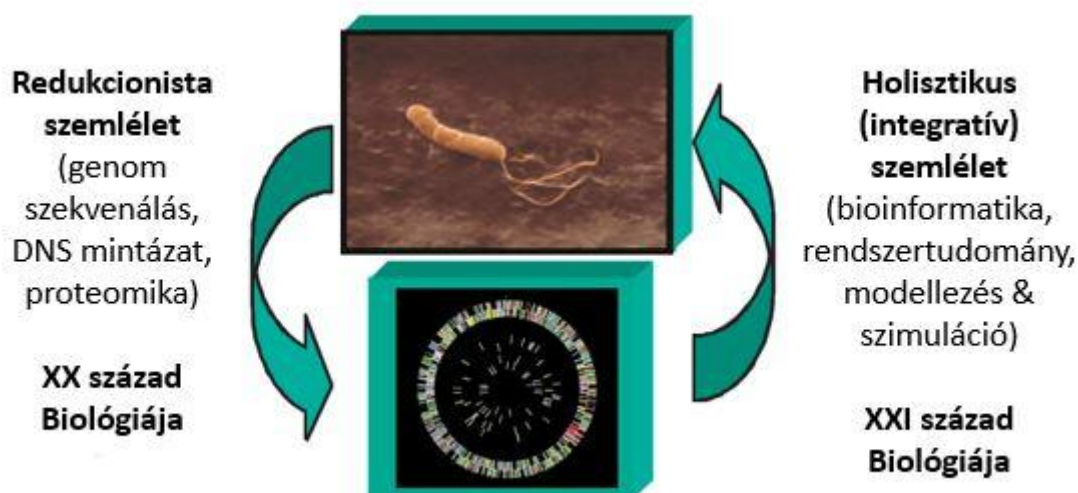


6.Ábra Biokémiai reakciók hálózatának fizikai, kémiai és biológiai korlátai és ezek lehetséges állapotai (Becker és mtsai. 2007)

2.4.2. Metabolit termelés előrejelzése *in silico* módszerekkel

A huszadik század második feléig a biológiát, mint tudományt, a redukcionista szemléleti mód jellemezte. Ez abban állt, hogy minél több információt gyűjtsenek egy adott sejt összetevőiről, valamint annak funkciójáról. Később az "omikák" (genomika, proteomika, metabolomika, stb.) fejlődésével hatalmas adatbázisok jöttek létre, és állnak rendelkezésünkre. Az egyik meghatározó adatszolgáltató technológia a szekvenálás, minek köszönhetően teljes genomra vonatkozó adatok birtokába jutottunk (Palsson 2000). Továbbá, a gének expressziós mintázatának és proteomikai technológiáknak köszönhetően, lehetőség nyílik meghatározni, hogy egy adott sejt vagy organizmus, adott körülmények között milyen géneket fejez ki. Ezt a megközelítést (redukcionista szemlélet) a **7.Ábra** bal oldalán láthatjuk.

Nyilvánvalóvá vált, hogy a rendszerek működésének megértése egy új szemléletet kíván, ami a holisztikus szemlélet megjelenését eredményezte. Ez a nézőpont a bioinformatikára, valamint a rendszervizsgálatra támaszkodik, amit az **7.Ábra** szemléltet.



7.Ábra Biológiai kutatások szemléletei. A biológia mint tudomány a redukcionista megközelítést alkalmazta, ahol egy élő rendszer egyes összetevőit külön-külön vizsgálta. Egyértelmű tehát, hogy a folyamatot meg kell fordítani és az integratív (holisztikus) nézetet kell előnyben részesíteni és megvizsgálni azt, hogy ezek a rendszerösszetevők miképpen lépnek egymással kölcsönhatásba és alkotnak rendszert (Palsson 2000)

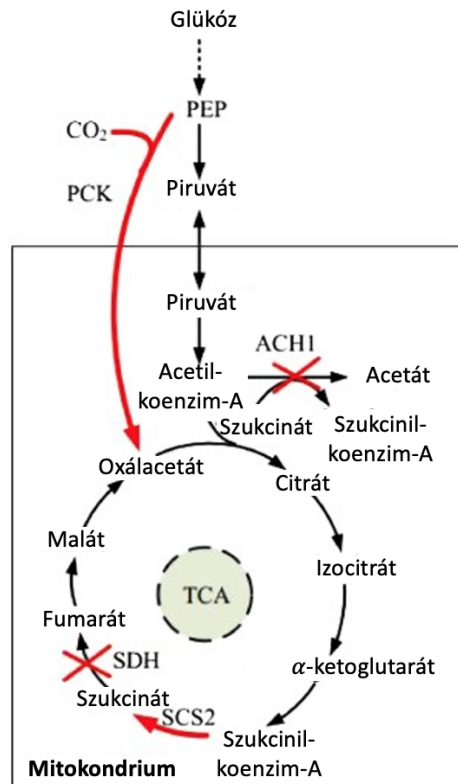
A matematikai modellezés olyan alap törvényszerűségekre épül, mint a termodinamikai egyenletek, kémiai potenciál, valamint az elektrokémia. Ezek mindenike egyenként mérhető, ezáltal a biológiai jelenségek kvantifikálhatók. Annak ellenére, hogy hatalmas mennyiségű bioinformatikai adathalmazok tulajdonában vagyunk, nehéz olyan modelleket alkotni, amelyek tökéletesen leírják egy sejt valóságos működését.

gátlása, vagy az anaplerotikus és katalaplerotikus enzimek fokozott expressziója. Ezen technikák gyakorlatba ültetésével, glicerint felhasználásával akár 0,8 mol/mol hozamot is sikerült elérni (Liang és mtsai. 2011; Blankschien, Clomburg, és Gonzalez 2010). Az anaerob körülmények hatása, valamint a szubsztrát kevésbé hatékony felhasználása megnehezíti a borostyánkősav bioszintetikus úton történő termelését. Így *in silico* modellek felhasználásával kimutatták, hogy az aerob körülmények jóval kedvezőbbek a borostyánkősav termelésre, hiszen ennek bioszintézise kapcsolatban áll a biomassza mennyiségével (Steinsiek és mtsai. 2011; Z. Chen és mtsai. 2010).

Lee és kutatócsoportja *Mannheimia succiniciproducens* baktériumtörzssel 22,5 g/L glükóz koncentrációról indulva szakaszos fermentációban 0,7 mol/mol borostyánkősav, 0,65 mol/mol ecetsav, 0,71 mol/mol hangyasav és 0,3 mol/mol tejsav hozamot eredményezett. A melléktermékek képződésének meggátlására fokozatosan eliminálták az ecetsav, hangyasav, tejsav enzimeinek génjeit. Első körben az *ldhA* majd a *pflB* génkiütést valósították meg, amely rendre 0,8 mol/mol és 0,9 mol/mol borostyánkősav hozamra emelkedett. A *pflB* gén eliminációjának eredményeképpen a hangyasav képződése teljesen megszűnt, de az ecetsav bioszintézise bizonyos koncentrációban megmaradt. Ez arra enged következtetni, hogy más metabolikus útvonalak is aktívak az ecetsav szintézisében (Lee, Song, és Lee 2006).

Az *E. coli* mellett még a *Corynebacterium glutamicum* az a baktériumtörzs melyet intenzíven vizsgáltak. Ám ezen törzsek szenzitivitást mutatnak, úgy a keletkező termékek koncentrációjára, mint a tápoldat kémhatására vonatkozóan. Utóbbi fenntartásához felhasznált anyagok megnehezítik a feldolgozási technológiákat, és így az előállítási költségeket emelik. Egyes törzsek pedig potenciálisan patogének, így megnehezítik az iparban történő felhasználás lehetőségét (Yikuli és mtsai. 2013). A negatív tulajdonságaiknak köszönhetően a tudományos közösség a fejlettebb szerveződésű élesztőgombákat vette alapjául kutatásaiknak, amelyek jobban tűrik a környezeti perturbációkat (Ito, Hirasawa, és Shimizu 2014). Qinglin és mtsai a fentiek nyomán *Yarrowia lipolytica* élesztőgombát használt borostyánkősav szintézisre. A kutatás során a vad törzset alapul véve három mutáns törzset használtak. Az első mutánsban inaktiválták a szukcinát-dehidrogenázt, a második törzsben az acetil-koenzim-A hidroláz génjét inaktiválták, míg az utolsóban túlexpresszálták a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombából származó exogén foszfoenolpiruvát-karboxikinázt és az endogén szukcinil-koenzim-A szintáz béta alegységét (9.Ábra). Ennek eredményeképpen míg a vad törzsben 0,01 mol/mol hozammal keletkezett borostyánkősav, addig a mutáns törzsek borostyánkősav koncentrációja folyamatosan emelkedett. A szukcinát-dehidrogenáz enzimjének eliminálásával a borostyánkősav hozama

0,375 mol/mol-ra emelkedett. Második mutáns törzs (inaktivált acetil-koenzim-A hidroláz) már jóval nagyobb 0,45 mol/mol hozamban mutatott borostyánkősavat. A harmadik mutáns törzsben (túlexpresszált foszfoenolpiruvát-karboxikináz és szukcinil-koenzim-A szintáz enzimek) 0,86 mol/mol hozamú borostyánkősav termelést eredményezett (Qinglin és mtsai. 2018).



9.Ábra *Yarrowia lipolytica* borostyánkősav termelésének fokozása különböző metabolikus útvonalak gátlásával, valamint felerősítésével. (PEP - foszfoenol-piruvát, PCK - foszfoenolpiruvát-karboxikináz, ACH1 - Acetil-koenzim-A hidroláz, SCS2 - szukcinil-koenzim-A szintáz béta alegység, SDH - szukcinát-dehidrogenáz) (Qinglin és mtsai. 2018)

3. Célkitűzések

A megújuló energiaforrások felhasználása révén, a fermentációs eljárásokkal bioszintetizált borostyánkősav alapul szolgál a különféle biopolimerek gyártására. A nagy áteresztőképességű technológiák fejlődésével lehetőségünk nyílik számítógépes elemzések és predikciók végrehajtására. Ismerve egy adott mikroorganizmus metabolikus hálózatának fő gerincvonalát, a vizsgálni kívánt paramétert különféle környezeti hatások mellett jellemezhetjük. Jelen dolgozat fő célja a különböző szénforrások és körülmények hatásának meghatározása a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs növekedésére és borostyánkősav termelőképességére. Az előbbieken említett cél megvalósításához és a kutatás kérdéskörének megválaszolására az alábbi lépéseket fogalmazhatjuk meg:

- az első felvetésre keresett válasz során a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzshöz tartozó már összeállított és szakirodalomban elérhető metabolikus modelljét bővítettem, a jelen értekezésben érdekelt további két szubsztrátra (glicerin és xilóz), valamint az így módosított modellel *in silico* elemzéseket (tömegegyensúly vizsgálat, elméleti maximum és gén deléció) végeztem, úgy szakirodalmi, mint saját mérésből számított paraméterekre
- a második feltételezés bizonyításához előbb kis (mikrolemezen) majd nagyobb térfogatban (lombikban) vizsgáltam a szubsztrátok hatását a törzs növekedésére, különböző koncentrációkban és tápoldatokban
- a harmadik kérdésre keresett válasz során, bioreaktorban elemeztem a baktériumtörzs növekedését, ahol mikroaerob és anaerob körülményeket biztosító gázfázisokat használtam
- a negyedik felvetés megválaszolására a laboratóriumi kísérletekből származó adatokat használtam fel egy újabb *in silico* elemzés elvégzésére, és az így kapott eredményeket felhasználva összehasonlítást végeztem a modell és a laboratóriumban zajlott folyamatok között

4. Anyagok és módszerek

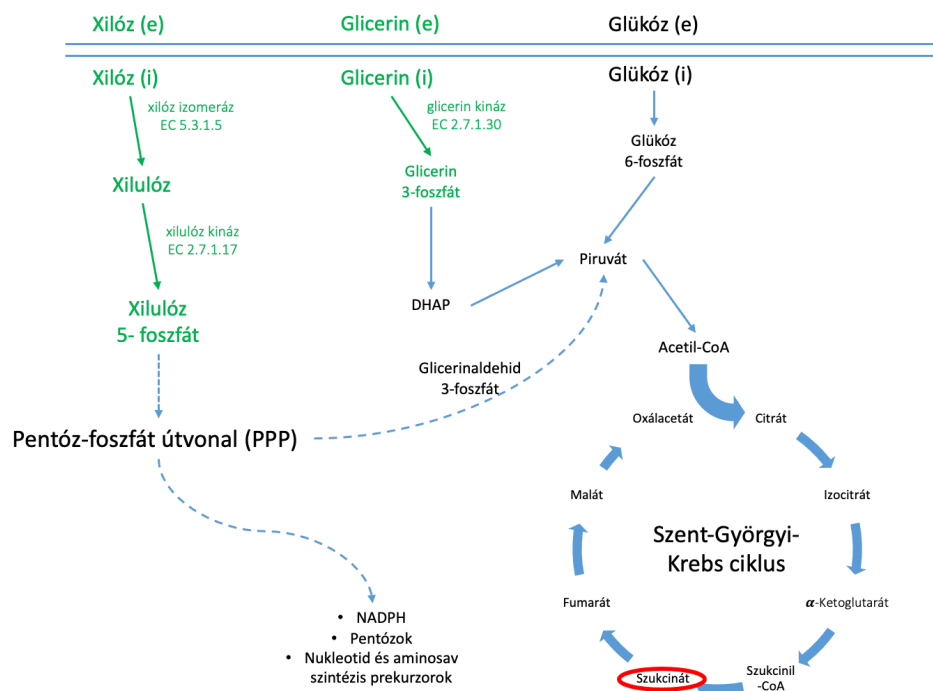
4.1. Metabolikus termelőképeség modellezése

A számítógépes elemzések során a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzshöz elérhető legfrissebb metabolikus modellt használtam (Kim és mtsai. 2007). Ez az alapnak tekinthető modell megközelítőleg 60 reakciót tartalmaz, a hozzá kapcsolódó metabolitokkal együtt. A céltermék bioszintézisének növeléséhez, valamint a szélesebb körű szubsztrát hasznosítás képességéhez, az alapmodellt első körben új felhasználandó komponensekkel (szubsztrátok), majd új reakciókkal (enzimek és ezek által katalizált metabolikus útvonalak) bővítettem. A xilóz és glicerin felhasználására alkalmas reakciókat és enzimeket szakirodalmi források és specifikus adatbázisok (KEGG, ECOCYC, BRENDA, PDB, NCBI) alapján lettek kiválasztva (Sinkler és mtsai. 2019):

- xilóz-izomeráz (EC 5.3.1.5)
- xilulóz-kináz (EC 2.7.1.17)
- glicerin-kináz (EC 2.7.1.30)

A felsorolt enzimek és azok reakciói, a már meglévő és működő modellhez kapcsolják az új bemeneti komponenseket, szubsztrátokat. A számítógépes modellben a két felhasználandó szubsztrátot (glicerin és xilóz) első lépésben az extracelluláris térből az intracelluláris kompartmentumba kell mozgatni. Ezt követően, a xilóz-izomeráz katalizálja az aldopentóz xilózból történő ketopentóz-xilulóz intramolekuláris konverziót. A xilulóz-kináz az előző lépésben keletkezett ketopentózt foszforilálja. A xilóz ebben a formájában már a pentóz-foszfát út aktív komponense lesz, és a rekonstruált modell központi útvonalában használódik fel.

A glicerint, mint felvehető szubsztrátot definiáltam és elérhetővé tettem, mivel az nem volt elérhető a modell számára. A glicerin-kináz a xilulóz-kinázhoz hasonlóan a foszforilálást katalizálta, amely lépés után a glicerin-3-foszfát és dihidroxiaceton-foszfát útvonalon keresztül jut el a piruvátig, ahol acetil-koenzim-A formában belép a Szent-Györgyi-Krebs ciklusba. A fent leírtakat, valamint a modell központi strukturális elemeit a **10.Ábra** mutatja.



10.Ábra A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs elérhető metabolikus modelljének részlete, szubsztrátok felvétele, valamint ezek metabolizmusa. Kék/fekete - a modell alapvető útvonalai és komponensei, zöld - újonnan, általunk integrált komponensek és reakciók (e - extracelluláris tér, i - intracelluláris tér, DHAP - dihidroxi-aceton-foszfát, Acetil-CoA- acetil-koenzim-A, szukcinil-CoA- szukcinil-koenzim-A, NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)

A számítógépes elemzéseket MATLAB (Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, Egyesült Államok) szoftverrel, és az ebbe integrált COBRA Toolbox és Gurobi Optimizer (Gurobi Inc., Ann Arbor, Michigan, Egyesült Államok) programcsomagokkal hajtottam végre. Szakirodalomból vett adatok alapján a glükóz felhasználási sebességét $7,7 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ értékre állítottam. A szénatomszám (glükóz - 6 C atom, glicerín - 3 C atom, xilóz - 5 C atom) megtartása érdekében, úgy számoltam ki a glicerín és xilóz felhasználási sebességét, hogy az megegyezzen a glükóz szénszámával. Így a glicerín és xilóz felhasználási sebessége a szimulációk során rendre $15,4$ és $9,24 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ érték volt. A kényszer alapú modellezés egyik fő alappillére a peremfeltételek teljesülése. Így például a biomassza képződésére szükséges komponensek (ATP mennyisége, szubsztrátfogyási sebesség, oxigén hiánya vagy jelenléte stb.) fluxusa lesz a meghatározó. Mivel a peremfeltételeken kívül eső komponensek felhasználhatósági intervalluma igen széles (reverzibilis komponensek esetén $-\infty \dots 0$, irreverzibilisek esetén $0 \dots \infty$), ezért szükséges a kényszerek, azaz az egyes komponensek felvételének határait megszabni.

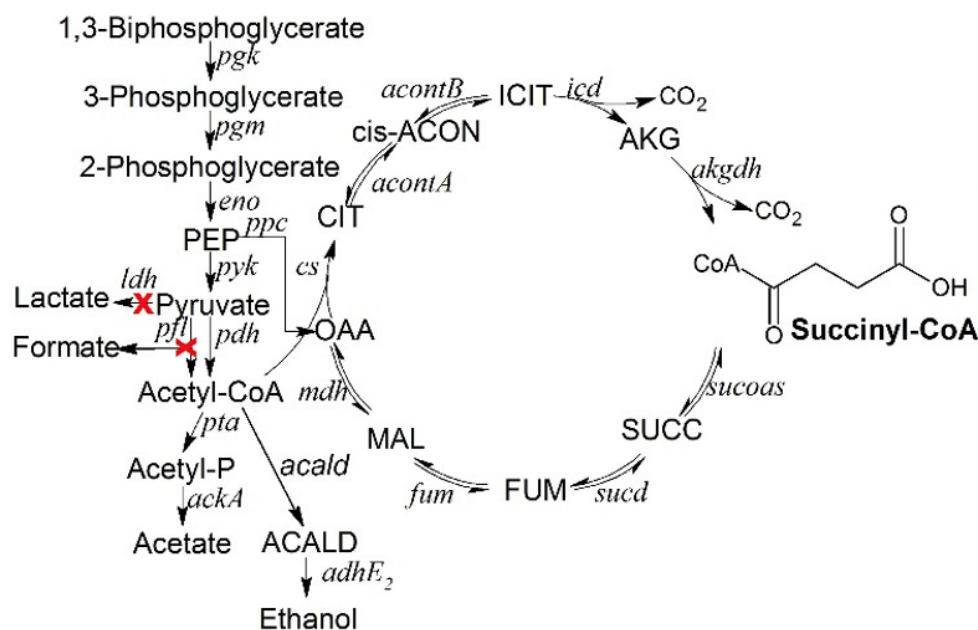
Két típusú szimulációt végeztem el. Első körben a szubsztrát, valamint az oxigén felhasználási sebességét szabtam meg. A szubsztrát felhasználási sebességet az előbbieken tárgyalt értékekre (glükóz, glicerin, xilóz = 7,7 - 15,4 - 9,24 mM gCDM⁻¹h⁻¹), míg az oxigén felhasználási sebességét nullára állítottam, ezáltal megteremtve a számítógépes modellben az anaerob körülményeket teljesítő feltételt. Második esetben elemeztem a maximális céltermék képződési sebességet, ami abban állt, hogy egy korlátolt biomassza növekedési sebesség (ennek értéke 0,1 h⁻¹ volt) mellett, mennyi az elérhető maximális céltermék képződési sebesség. Ebben az esetben is a fent megjelölt értékekre (glükóz, glicerin, xilóz = 7,7-15,4-9,24 mM gCDM⁻¹h⁻¹) végeztem a szimulációkat. Tömegegyensúly elemzést alkalmazva (FBA - Flux Balance Analysis) lineáris egyenletmegoldást végeztem a releváns biológiai célfüggvényre:

$$\begin{aligned} \max Z &= c^T v \\ \text{subject to } S v &= 0 \quad (1) \\ v_{lb} &< v < v_{ub} \end{aligned}$$

Ahol, a Z az adott céltermék képződési sebességének maximuma vagy minimuma (mi esetünkben maximuma), c^T jelöli az egyes vektorok súlyát, mutatva, hogy a v -vel jelölt reakciók milyen mértékben járulnak hozzá a céltermék képződéséhez kiszámításához. Az S a sztöchiometrikus mátrix, míg az v_{lb} és v_{ub} definiálják rendre a reakciók fluxusainak alsó és felső határait/korlátait.

4.1.1. *In silico* gén elimináció

A céltermékkel versengő metabolikus útvonalak gátlásával növelhető a borostyánkősav képződési sebessége. A borostyánkősav bioszintézisekor egyidőben hangyasav, ecetsav, tejsav is termelődik. Ezen termékek keletkezésére a felhasznált szénatomok fluxusát a céltermék képződésének növelésére használhatjuk fel. Az **11.Ábrán** megjelenített biokémiai hálózat részletén látható, hogy a szubsztrátokból keletkező tejsav és hangyasav útvonalainak eliminálásával a borostyánkősav képződési sebessége növelhető. A piruvát-formiát-liáz (E.C. 2.3.1.54), valamint a laktát-dehidrogenáz (E.C. 1.1.1.27) metabolikus útvonalak eliminálásával (rendre *Δpfl* és *Δldh*) racionálisan tervezhető a baktériumtörzs, így ennek tejsav és hangyasav képződési sebessége minimalizálható vagy teljesen leállítható.



11.Ábra Génkiütés folyamata. A piruvát hangyasav, valamint tejsav irányába történő reakcióegyenletek eliminálása, (*pgk* - foszfoglicerát-kináz, *pgm* - foszfoglicerát-mutáz, *eno* - enoláz, *ppc* - foszfoenolpiruvát-karboxiláz, *pyk* - piruvát-kináz, *ldh* - laktát-dehidrogenáz, *pfl* - piruvát-formiát liáz, *pdh* - piruvát-dehidrogenáz, *pta* - foszfát-acetiltransferáz, *ackA* - acetát-kináz, *acald* - acetaldehid-dehidrogenáz, *adhE₂* - alkohol-dehidrogenáz, *cs* - citrát-szintáz, *acont* - akonitáz, *icd* - izocitrát-dehidrogenáz, *akgdh* - alfa ketoglutarát-dehidrogenáz, *sucoas* - szukcinil-koenzim-A-szintetáz, *sucd* - szukcinát-dehidrogenáz, *fum* - fumaráz, *mdh* - malát-dehidrogenáz, PEP - foszfoenolpiruvát, acetyl-CoA - acetil-koenzim-A, acetyl-P - acetil-foszfát, ACALD - acetaldehid, OAA - oxálacetát, MAL - malát, FUM - fumarát, SUCC - szukcinát, succinyl-CoA - szukcinil-koenzim-A, AKG - alfa-ketoglutarát, ICIT - izocitrát, cis-ACON - cisz-akonitát, CIT - citrát) (Sinkler és mtsai. 2019)

4.1.2. A bővített modellel történő elemzések saját kísérletekből származó paraméterekkel

Az *in silico* és laborban végzett kísérletek minél pontosabb összehasonlítása érdekében, egy második számítógépes predikciót is elvégeztem a rendelkezésre álló modellel (glükóz, glicerin és xilóz felhasználási sebessége rendre 7,89-22,7-12,2 mM gCDM⁻¹h⁻¹, oxigén felvételi sebesség 0 mM gCDM⁻¹h⁻¹). Ebben az esetben a laborban elvégzett, kontrollált körülményekből (bioreaktorban elvégzett kísérletek) származó számított értékeket használtam fel az *in silico* elemzés során. A bioreaktorban elvégzett kísérletek során, a fermentáció során felhasznált szubsztrátok koncentrációja, valamint a képződött

sejtnövekedés adatait felhasználva meghatároztam azokat a szubsztrát felhasználási értékeket, amelyekkel a modellt újból elemzésnek vettem alá. Így a modell számára megalkottam a bemeneti paramétereket (szubsztrát felhasználási sebesség), felhasználva a baktériumtörzs fermentáció során exponenciális szakaszban mért szubsztrát fogyási sebességét és sejtnövekedés sebességét. A **3.Táblázat** a szakirodalmi forrásokból származó adatokat és a saját kutatásból (laboratóriumi mérések) származtatott szubsztrát felhasználási sebességeket tartalmazza.

3.Táblázat Szakirodalomból és laboratóriumi méréseimből származó szubsztrátok felhasználási sebességek

	Szakirodalomból származó szubsztrát felhasználási sebesség értékek (Becker és mtsai. 2013)	Méréseimből származtatott szubsztrát felhasználási sebesség értékek
Glükóz felhasználási sebessége (mM gCDM ⁻¹ h ⁻¹)	7,7	7,89
Glicerín felhasználási sebessége (mM gCDM ⁻¹ h ⁻¹)	15,4	22,7
Xilóz felhasználási sebessége (mM gCDM ⁻¹ h ⁻¹)	9,24	12,22

4.2. A kutatásban használt baktériumtörzs - *Basfia succiniciproducens*

A kutatásban felhasznált törzset (*Basfia succiniciproducens* - DSMZ - 22022) a németországi Leibniz Intézet DSMZ - Német Mikroorganizmus és Sejtkultúrák Gyűjteményétől vásároltuk (Leibniz Institute, DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Németország). A liofilizált terméket steril TSB (Tryptone Soy Broth - Tripton Szója Leves) tápoldatban rehidratáltam a következő összetételű tápoldatban: 17 g/L kazein pepton, 3 g/L szója pepton, 2,5 g/L D-glükóz, 5 g/L NaCl, 2.5 g/L K₂HPO₄, melynek kémhatását 7-es értékre állítottam (a vegyszereket a VWR és Sigma-Aldrich gyártóktól vásároltuk és használtam, lsd. **Melléklet I.** pontja). A fent leírt tápoldatban a baktériumkultúrát 130 rpm fordulatszámon 37 °C-on inkubáltam, és rázóinkubátorban neveltem (Sartorius CERTOMAT®BS-T, Göttingen,

Németország) 100 mL tápoldatot tartalmazó 250 mL-es Simax lombikokba (Kavalier, Sázava, Csehország). Az így előnevelt sejteket a növekedés exponenciális szakaszában centrifugáltam Beckman Coulter Allegra® 64R berendezéssel (Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) 3500 rpm fordulatszámon 10 percig, majd glicerinnel keverve 1:5 glicerín-sejtszuszpenzió arányban -80 °C-on felhasználásig tároltam.

4.2.1. Mikrolemezen végzett laboratóriumi elemzések

A mikrolemezes kísérleteket Fluostar Optima mikrolemez olvasó berendezést (FluoStar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) használva, a lehetséges fermentációs körülmények, tápanyagok minőségi és mennyiségi vizsgálatában kaptak szerepet. A kísérlet során tíz különböző, potenciálisan alkalmazható szubsztrátot vizsgáltam, melyek a következők: arabinóz, fruktóz, glicerín, glükóz, inulin, laktóz, maltodextrin, maltóz, mannóz és xilóz. A növekedéshez optimális koncentráció érték meghatározásához ezen szénforrásokat különböző koncentrációban (5-10-15-20-25-30-50-70 g/L) vizsgáltam. A sejteket 8 órán át 5 mL 5 g/L koncentrációjú glükóz szénforrást tartalmazó TSB tápoldatban előneveltem, 37 °C-on 130 rpm-en, aminek következtében elértem a beoltáshoz kívánt sejttömeget. A kísérletek során három különböző tápoldatot (TSB, BHI, M9) vizsgáltam, melyek összetételét a **4. Táblázat**ban részletezem. Ezt követően a vizsgálandó koncentrációk esetében azonos, 0,5-0,6 kezdeti optikai denzitására (OD_{595}) állítottam a kultúrákat Camspec M330 típusú (Spectronic Camspec Ltd., Garforth, Leeds, Egyesült Királyság) spektrofotométerrel. A kísérletsorokat párhuzamosan, háromszoros ismétlésben végeztem. A mikrolemezes kísérletek során alkalmazott fontosabb körülmények a következők: optikai denzitás mérés 595 nm hullámhosszon 30 percenként, mely előtt 90 másodpercig 150 rpm fordulatszámon való rázatás volt beállítva az optikai denzitás mérés pontosságának biztosítása céljából, 200 µL hasznos térfogatban, 37 °C állandó hőmérsékleten.

4. Táblázat Kutatómunka során használt tápoldatok összetétele

- TSB tápoldat - Trypton szója leves szubsztrát nélkül (/L)	- M9 tápoldat - Minimál tápoldat (/L)	- BHI tápoldat - Agy-szív infúzió tápoldat (/L)
<ul style="list-style-type: none"> • kazein pepton: 17 g • szója pepton: 3 g <ul style="list-style-type: none"> • NaCl: 5 g • K₂HPO₄: 2,5 g 	<ul style="list-style-type: none"> • "5XM9" sók: 200 mL • nyomelemek: 1 mL <ul style="list-style-type: none"> • CaCl₂: 1 mL • MgSO₄: 1 mL <ul style="list-style-type: none"> • YE: 0.1-1 g • vasat tartalmazó oldat: 1 mL 	<ul style="list-style-type: none"> • borjú agy infúzió: 7,7 g • marha-szív infúzió: 9,8 g • proteóz pepton: 10 g <ul style="list-style-type: none"> • dextróz: 2 g • NaCl: 5 g • Na₂HPO₄: 2,5 g
<ul style="list-style-type: none"> • glükóz: 5-10-15-20-25 g 	glükóz: 5-15-20-30-50-70 g	<ul style="list-style-type: none"> • glükóz: 5 g - 20 g
<ul style="list-style-type: none"> • glicerín: 5-10-15-20-25 g 	<ul style="list-style-type: none"> • glicerín: 5-15-20-30-50-70 g 	<ul style="list-style-type: none"> • glicerín: 5 g - 20 g
<ul style="list-style-type: none"> • xilóz: 5-10-15-20-25 g 	<ul style="list-style-type: none"> • xilóz: 5-15-20-30-50-70 g 	<ul style="list-style-type: none"> • xilóz: 5 g - 20 g
<ul style="list-style-type: none"> • arabinóz, fruktóz, inulin, laktóz, maltóz, maltodextrin, mannóz: 5-20 g 	<ul style="list-style-type: none"> • arabinóz, fruktóz, inulin, laktóz, maltóz, maltodextrin, mannóz: 5-20 g 	<ul style="list-style-type: none"> • arabinóz, fruktóz, inulin, laktóz, maltóz, maltodextrin, mannóz: 5-20 g

Az "5XM9" sók összetétele a következő: 42,5 g/L Na₂HPO₄*2H₂O, 15 g/L KH₂PO₄, 5 g/L NH₄Cl és 2,5 g/L NaCl. Ezen oldat kémhatását 7 értékre állítottam 4 M koncentrációjú NaOH-al. Ezt követően 121 °C-on 20 percig autoklávoztam és szobahőmérsékleten tároltam.

A nyomelem koncentrátum elkészítéséhez 100 mg/L MnCl₂*4H₂O, 170 mg/L ZnCl₂, 43 mg CuCl₂*2H₂O, 60 mg/L CoCl₂*6H₂O és 60 mg/L Na₂MoO₄*2H₂O anyagokat mértem össze. Az így kapott elegyet 0,22 µm-es membránszűrőn szűrtem és sötétben, szobahőmérsékleten tároltam felhasználásig.

A CaCl₂, valamint MgSO₄ oldatokból rendre 100 mM-os és 1 M-os koncentrációjú elegyet készítettem, melyeket autoklávozás után szobahőmérsékleten tároltam. A vasat tartalmazó oldathoz 13,5 g/L FeCl₃*6H₂O-ot oldottam fel 100 mM-os citromsavban, majd membránszűrés után szobahőmérsékleten tároltam.

4.2.2. Nagyobb térfogatban végzett lombikos kísérletek

A törzsről alkotott kép felbontásának növeléséhez léptéknövelést alkalmaztam. A mikrolemezes elemzések során kiválasztott kedvező feltételek (szubsztrát és élesztőkivonat koncentráció) alapul szolgáltak a lombikokban elvégzett elemzéseimhez. Így a három vizsgált tápoldat megegyezett a mikrolemezes körülmények között vizsgáltakhoz, viszont a felhasznált szubsztrátok típusa és koncentrációja változott. A különböző tápoldatok esetén elvégzett kísérletek alapján a 20 g/L kezdeti szubsztrát koncentráció bizonyult a leghasznosabbnak. A lombikban elvégzett kísérleteket is előnevelések előzték meg, melyek hasonlóak voltak a mikrolemezes vizsgálatokhoz. A -80 °C-on tárolt baktérium sejteket 5 mL 5 g/L glükóz szénforrást tartalmazó TSB tápoldatban neveltem 8 órán át 37 °C-on, majd a közegetől centrifugálással elválasztott sejteket, szubsztrátot nem tartalmazó TSB tápoldattal reszuszpendáltam. Az így kapott koncentrált baktérium szuszpenzióval 0,3-as kezdeti optikai denzitást (OD_{600}) állítottam Camspec M330 típusú (Spectronic Camspec Ltd., Garforth, Leeds, Egyesült Királyság) spektrofotométerrel minden lombikban elvégzett kísérletnek, amelyeket háromszoros ismétlésben végeztem. A 300 mL össtérfogatú Simax lombikokba (Kavalier, Sázava, Csehország), 200 mL tápoldatot mértem majd 37 °C-on neveltem 180 rpm fordulatszámra állított rázóinkubátorban (Sartorius CERTOMAT®BS-T, Göttingen, Németország).

4.2.3. Bioreaktorban végzett fermentációk

A lombikban elvégzett kísérleteket követően, a fermentációs folyamatokat nagyobb térfogatban, és jobban kontrollálható körülmények között vizsgáltam. A megválasztott kísérlet alapját az előkísérletek képezték, ebben a fázisban a bioreaktorban elvégzett (Sartorius Biostat®A Plus, Göttingen, Németország) kísérleteket glükóz, glicerin és xilóz szénforrásra végeztem. Az előnevelés hasonló volt, mint a mikrolemezes vagy lombikos kísérleteknél. A sejteket 37 °C-on, 130 rpm-es fordulatszámra rázatva neveltem elő 5 mL tápoldatban. Az így kapott folyadékkultúrákból a sejteket 10 percen keresztül Beckman Coulter Allegra® 64R (Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) centrifugával 3500 rpm-en választottam el. Centrifugálás után szubsztrátmentes tápoldattal szuszpendáltam a pelletet, majd megtörtént a bioreaktorok inokulálása. A bioreaktor össtérfogatának (1500 mL) kétharmadát kihasználva (1000 mL tápoldat), a kezdeti optikai denzitást 600 nm-en 0,3 értékre Camspec M330 típusú (Spectronic Camspec Ltd., Garforth, Leeds, Egyesült Királyság) spektrofotométerrel állítottam be. A kezdeti szubsztrát

koncentráció értéke 20 g/L volt, illetve a kémhatást 7-es értékre állítottam és szabályozását szoftveres vezérléssel (BioPAT®MFCs, Sartorius, Göttingen, Németország) végeztem, 1 M-os NaOH-ot és 1 M-os HCl-ot használva. A reaktor szintű fermentációk során két különböző körülményt vizsgáltam, egyik reaktort mikroaerob módon (60/60 mL/perc széndioxid/levegő (CO₂/LEV) keveréke), míg a másikat anaerob körülmények között üzemeltem, minek biztosításához a légtérbe 60 mL/perc térfogatárammal szén-dioxidot (CO₂) juttattam. A tápoldat elsavasodásának, és az ezt követő nagy mennyiségű NaOH médiumba kerülésének megakadályozása érdekében a gázfázist reaktorok légtérébe vezettem. Erre azért is volt szükség, hogy megvizsgáljam a sejtek kapnofil tulajdonságát, valamint a redukáló közeg hatását a céltermék mennyiségére vonatkozóan. A szén-dioxid térfogatáramát szakirodalmi adatokra alapoztam. A fermentáció folyamán két óránként vettem mintát (5 mL) a reaktortérből 12 órán keresztül, majd rögzítettem az optikai denzitás változását, valamint az összegyűlt adatokból növekedési sebességeket számítottam.

A lombikban és bioreaktorban elvégzett mintavételek során az optikai denzitás meghatározásakor megfelelő hígítást alkalmaztam annak érdekében, hogy a spektrofotométer megbízható mérési tartományában vizsgáljam az adott mintát. Így kétszeres (500 µL sejtmentes tápoldat + 500 µL sejtet tartalmazó minta), ötszörös (800 µL sejtmentes tápoldat + 200 µL sejtet tartalmazó minta), tízszeres (900 µL sejtmentes tápoldat + 100 µL sejtet tartalmazó minta) és hússzoros (950 µL sejtmentes tápoldat + 50 µL sejtet tartalmazó minta) hígításokat is összeállítottam azért, hogy a spektrofotométer OD₆₀₀=1,5 felső mérési határa alatt maradhassak és így pontos mérési eredményt kaphassak.

Úgy a mikrolemezen és a lombikban, mint a bioreaktorban történt sejtnevelések során a fajlagos növekedési sebességet az alábbi lineáris differenciálegyenlettel **(1)** határoztam meg:

$$\mu x = dx / dt \text{ (1)}$$

ahol, μx jelöli a baktérium fajlagos növekedési sebességét, dx a baktériumok koncentrációját az idő (dt) függvényében.

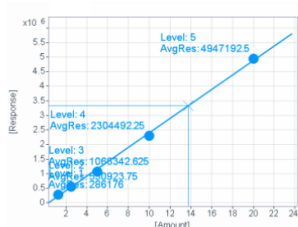
Ugyancsak mindhárom (mikrolemezen, lombikban és bioreaktorban) körülmény esetében, az optikai denzitás és sejtek koncentrációja közötti összefüggést, Becker és kutatócsoportja állította fel, *Basfia succiniciproducens* baktériumra specifikusan:

$$\text{gCDM [g/L]} = 0.331 \times \text{OD}_{600} \text{ (Becker és mtsai. 2013)}$$

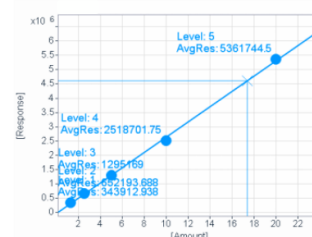
4.3. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás mintaelemzés

A fermentáció során gyűjtött mintákat 1260 Infinity (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok) automata, nagy teljesítményű folyadékkromatográfon analizáltam. A mintavételezést követően a mintákat 14000 rpm fordulatszámom 10 percen keresztül centrifugáltam a sejtörmelék eltávolítása érdekében Hettich Mikro 220 (Hettich MNC, Westphalia, Kirchlengern, Németország) berendezéssel, majd a felülúszót az analízis pillanatáig 0,45 µm pórusátmérőjű szűrőn szűrve eppendorf tubusokban -20 °C-on tároltam. A mintákban fellelhető komponensek elválasztásához Coregel 87H3 oszlopot használtam, melynek működési hőmérséklete 50 °C volt. A mintában fellelhető szénhidrátok és szerves savak detektálására rendre RID (Refractive Index Detector) és DAD (Diode Array Detector) detektorokat alkalmaztam. Mozgófázisként 0,004 M kénsav oldatot, 0,6 mL/perc térfogatáramban használtam. Az analízishez a szénhidrátok esetében 20 g/L-es, míg a szerves savak esetében 50 mM-os koncentrációjú oldatokat készítettem, ultratiszta vizet használva, melyekből hígítással öt pontos kalibrációs egyenest (**12.Ábra** és **13.Ábra**) vettem fel. Az oszlopra történő injektálást követően kromatográfiás csúcsokat kaptam, az így generált kromatogramokat (**26.Ábra**) retenciós idő alapján értékeltem a standard kalibrációs egyeneséhez viszonyítva.

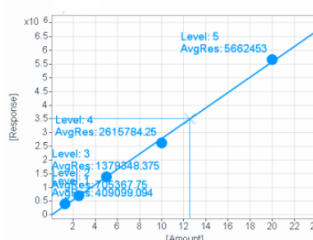
Compound: glükóz
 Signal: RID1A
 Exp. RT: 9.193
 Corr. Coeff.: 0.999080
 Residual: 89309.08532
 Formula: $y = ax + b$
 a: 247489.42387
 b: -72514.67500
 c: 0.00000
 d: 0.00000



Compound: glicerín
 Signal: RID1A
 Exp. RT: 13.505
 Corr. Coeff.: 0.999499
 Residual: 70891.09746
 Formula: $y = ax + b$
 a: 266378.34894
 b: -25073.19107
 c: 0.00000
 d: 0.00000



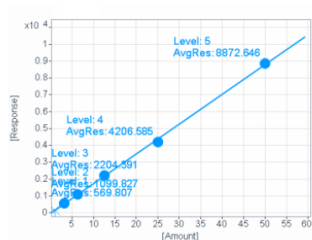
Compound: xilóz
 Signal: RID1A
 Exp. RT: 9.895
 Corr. Coeff.: 0.999079
 Residual: 100910.46012
 Formula: $y = ax + b$
 a: 279626.08224
 b: -10576.36964
 c: 0.00000
 d: 0.00000



12.Ábra Felhasznált szubsztrátokra (glükóz, xilóz, glicerín) összeállított standardok kalibrációs egyenesei (Retenciós idők: $RT_{\text{glükóz}}=9,2$ perc; $RT_{\text{xilóz}}=9,8$ perc; $RT_{\text{glicerín}}=13,5$ perc). Coregel 87H3 oszlop, szénforrás koncentrációk: 20-10-5-2,5-1,25 g/L, RI detektor

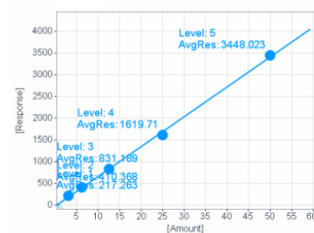
Compound: borostyánkősav
Signal: DAD1A
Exp. RT: 12.148
Corr. Coeff.: 0.999623
Residual: 101.74846

Formula: $y = ax + b$
a: 176.26879
b: -20.46388
c: 0.00000
d: 0.00000



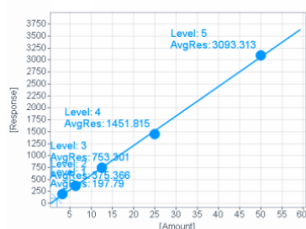
Compound: hangyasav
Signal: DAD1B
Exp. RT: 14.083
Corr. Coeff.: 0.999514
Residual: 44.94562

Formula: $y = ax + b$
a: 68.60377
b: -19.90647
c: 0.00000
d: 0.00000



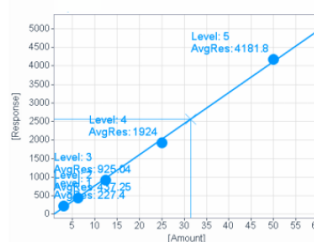
Compound: ecetsav
Signal: DAD1B
Exp. RT: 15.319
Corr. Coeff.: 0.999492
Residual: 41.19133

Formula: $y = ax + b$
a: 61.46253
b: -13.76607
c: 0.00000
d: 0.00000



Compound: tejsav
Signal: DAD1B
Exp. RT: 12.848
Corr. Coeff.: 0.999065
Residual: 76.16510

Formula: $y = ax + b$
a: 83.77717
b: -70.07057
c: 0.00000
d: 0.00000



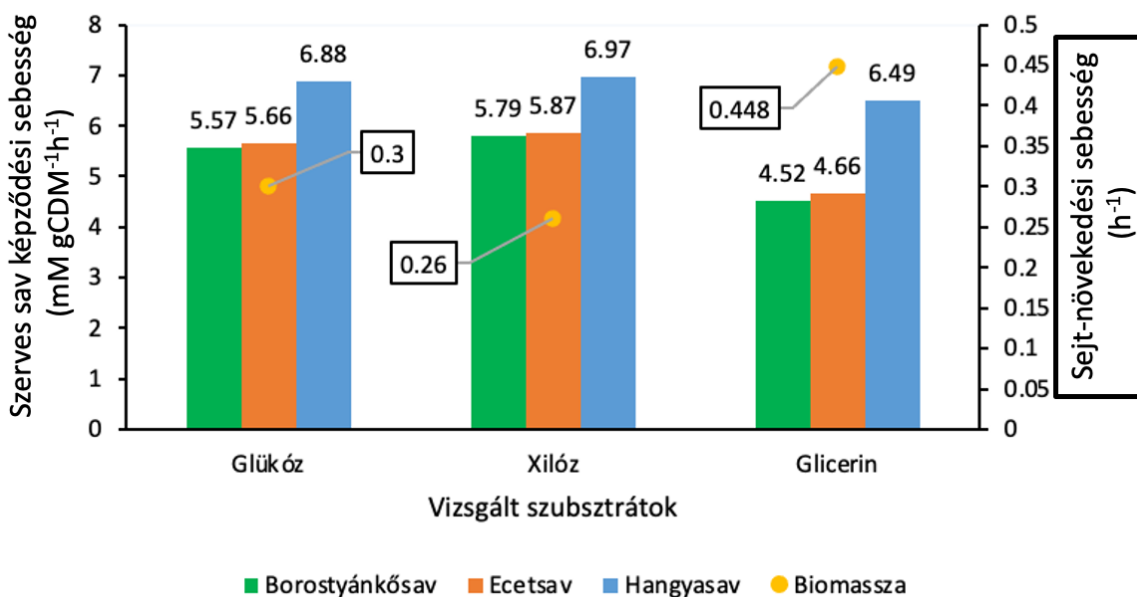
13.Ábra Képződött szerves savakra (borostyánkősav, hangyasav, ecetsav, tejsav) összeállított standardok kalibrációs egyenesei (Retenciós idők: $RT_{\text{borostyánkősav}}=12,1$ perc; $RT_{\text{hangyasav}}=14,08$ perc; $RT_{\text{ecetsav}}=15,3$ perc; $RT_{\text{tejsav}}=12,8$ perc). Coregel 87H3 oszlop, detektálási hullámhossz: 210 nm, szerves sav koncentrációk: 50-25-12,5-6,25-3,125 mM, DA detektor

5. Eredmények és értékelésük

Jelen PhD dolgozatomban a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs növekedésére és borostyánkősav termelésére kerestem kerestem válaszokat. A baktériumtörzs részletes megismerésének érdekében a számítógépes elemzéseken kezdve, a laborban megvalósított gyakorlati kísérleteken át, befejezve az így kapott eredmények tárgyalásán, a dolgozat kérdéskörére argumentumokat gyűjtöttem. A szakirodalomban elérhető metabolikus modellt első körben kibővítettem a tudomány és számomra is releváns paraméterekkel. Ezzel *in silico* elemzéseket hajtottam végre a borostyánkősav hozamára vonatkozóan. Számítógépes elemzéseimet gyakorlati kutatások követték. A törzs széles spektrumú szubsztrát hasznosító képességét mikrolemezen elemzetem. Ezt követően a törzs minimál médiumban történő viabilitásáról alkottam képet. Bioreaktorban, szabályozott körülményen végzett kísérleteim, és az innen származó eredmények, a sejtnövekedési ütem és a borostyánkősav, valamint egyéb szerves savak hozamáról adtak új információkat. Az innen származó eredményekből generált paraméterekkel az *in silico* modellt újból elemzésnek vettem alá. Annak érdekében, hogy a hozzáadott értékkel rendelkező célterméket (borostyánkősav) minél nagyobb hozamban termelhessek, a kutatásban szereplő megújuló szubsztrátokat (glükóz, glicerin és xilóz) minimál tápoldattal (M9) társítottam. Ez a kombináció szem előtt tartja a költséghatékonyságot. Míg a jelen kutatásban megjelenített *in silico* és laboratóriumi szintű kísérletek, illetve azok eredményei átfogó képet adnak a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs szubsztrát hasznosíthatóságáról, a szakirodalomban jelentős mennyiségű információt találhatunk ezen szubsztrátok eredetére (valóban megújuló szénforrások). Ahhoz, hogy megérthessük a céltermék bioszintézisét a fent meghatározott szubsztrátok esetén, növekedés dinamikai elemzéseket végeztem, valamint a szerves savak (borostyánkősav, tejsav, hangyasav, ecetsav) termelését vizsgálatam felhasználva a rendelkezésre álló metabolikus modellt, valamint a laborban elvégzett gyakorlati kísérleteket.

5.1. Metabolikus modell bővítése és a metabolitok termelésének előrejelzése

A kényszer alapú modellezés és predikciók vizsgálata során a szimulációimat specifikus körülményeken végeztem. Szakirodalmi adatok alapján, olyan szubsztrát felhasználási sebességekkel számoltam, mely az anaerob körülményeken legközelebb állt a gyakorlati kísérletekhez. Olyan értékre állítottam be a glükóz felhasználási sebességét, hogy a biomassa növekedési sebessége $0,3 \text{ h}^{-1}$ legyen. A glükóz kezdeti felhasználási sebessége ez alapján lett meghatározva. Az általam hozzáadott, más szubsztrátokhoz tartozó reakcióegyenletek felhasználási sebességeit az előbbiekben tárgyalt glükóz értékéhez viszonyítottam. A biomassa növekedési sebesség mellett a predikciók során, egyéb más metabolitok is képződtek: borostyánkősav, ecetsav és hangyasav. Ezeknek képződési sebességét “ $\text{mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ ” mértékegységben kaptam meg. Három szubsztrát esetén (14.Ábra) különböző biomassa növekedési sebességet, valamint eltérő metabolit képződési sebességet kaptam.



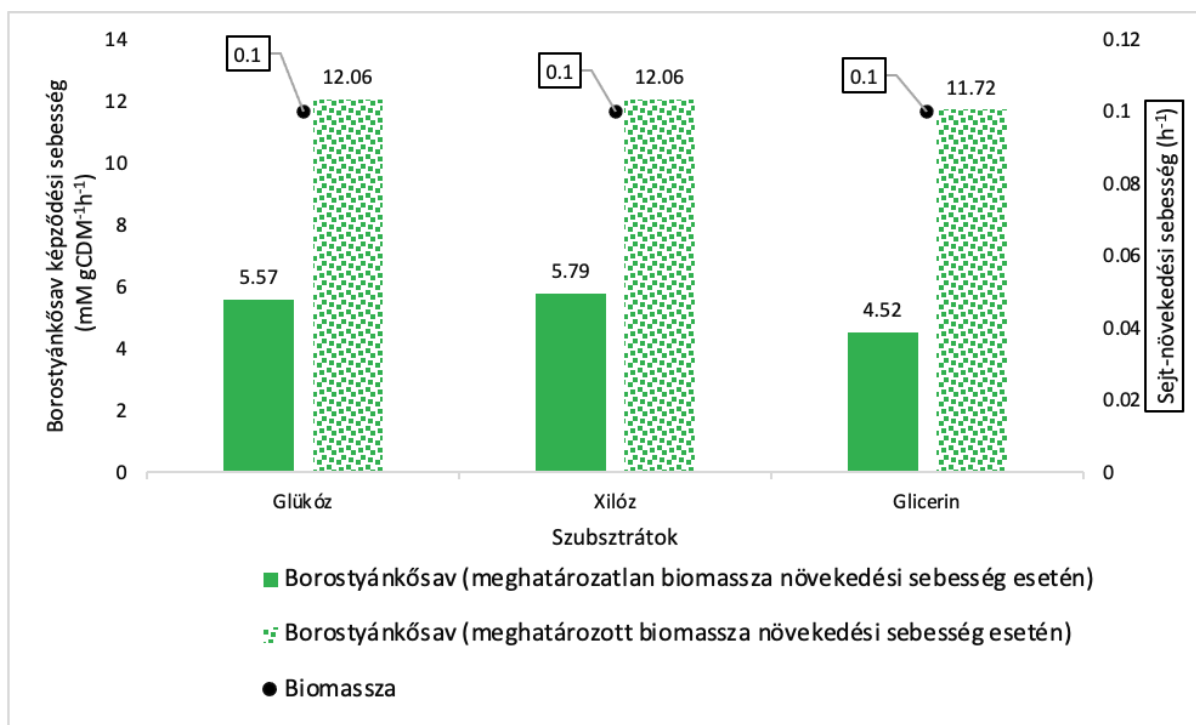
14.Ábra A *Basfia succiniciproducens* növekedési sebessége (biomassa) és a termelt metabolitjai (borostyánkősav, ecetsav, hangyasav) a vizsgálati szubsztrátok (glükóz, xilóz és glicerín) esetén (*in silico* predikciók). Anyagok felhasználási sebessége: glükóz: $7,7 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$, glicerín $15,4 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$, xilóz: $9,24 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$, oxigén: $0 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$

Míg a glükóz esetén a szakirodalomból származó felhasználási sebesség értékekkel végeztem a predikciókat, látható, hogy a biomassa képződés mellett, egyéb metabolitok is

termelődtek. A $0,3 \text{ h}^{-1}$ növekedési sebességgel bíró biomassza esetében glükóz szubsztráton a hangyasav képződési sebessége volt a legnagyobb, $6,88 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ értékkel. Xilóz és glicerin felhasználási sebessége $9,24 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ és $15,4 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ volt. A biomassza növekedési üteme, rendre $0,26 \text{ h}^{-1}$ és $0,448 \text{ h}^{-1}$ értékű volt. A két szubsztrátra végzett szimuláció esetén korlátolt biomassza növekedési sebesség mellett keletkező metabolitok a borostyánkősav, az ecetsav és a hangyasav volt. Mindhárom szubsztrátot vizsgálva a hangyasav képződési sebessége a legtöbb, míg xilóz esetén ennek értéke $6,97 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$, addig glicerin esetén $6,49 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ volt. Mindhárom szubsztrát esetén a szerves savak képződési sebessége közül a borostyánkősav volt a legkisebb, de mértéke megközelítőleg azonos volt az ecetsav képződési sebességével. Tömegegyensúly vizsgálat esetén a xilóz, mint alkalmazott szubsztrát emelkedett ki a legjobban $5,79 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ borostyánkősav képződési sebességgel, normál körülményen (nem korlátolt biomassza növekedési sebességgel). A glükóz esetén tapasztalt borostyánkősav képződési sebesség közel állt a xilóznál számított értékhez, $3,8\%$ -os különbséget mutatva, míg a glicerin közel 22% -al kevesebb képződési sebességet eredményezett.

5.1.1. Elméleti maximális céltermék meghatározása

Borostyánkősav képződésének tekintetében tömegegyensúly elemzés, valamint a céltermékek elméleti maximumának kiszámításánál jelentős különbséget tapasztaltam. A biomassza növekedési sebességének egy minimum értéket vettem alapul ($\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$), mely elvárt az *in silico* predikciók elvégzéséhez (15.Ábra). Mindhárom szubsztrát esetén több mint kétszeres borostyánkősav képződési sebességet számítottam. Korlátolt biomassza képződési sebesség mellett ($\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$), glükóz és xilóz esetén hasonló, $12,06 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$, míg a glicerin esetén valamivel kevesebb $11,72 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ volt a borostyánkősav képződési sebesség. Abban az esetben, amikor a biomasszára alkalmazott kényszereket minimálisra ($\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$) állítottam be, növekedett borostyánkősav képződési sebességeket tapasztaltam. Ez annak köszönhető, hogy a biomassza irányába korlátolt mennyiségű szén fluxus áramlik így megnyílik a lehetőség arra, hogy a fennmaradó szén fluxusa a szerves savak képződésének irányába tolódjon el.

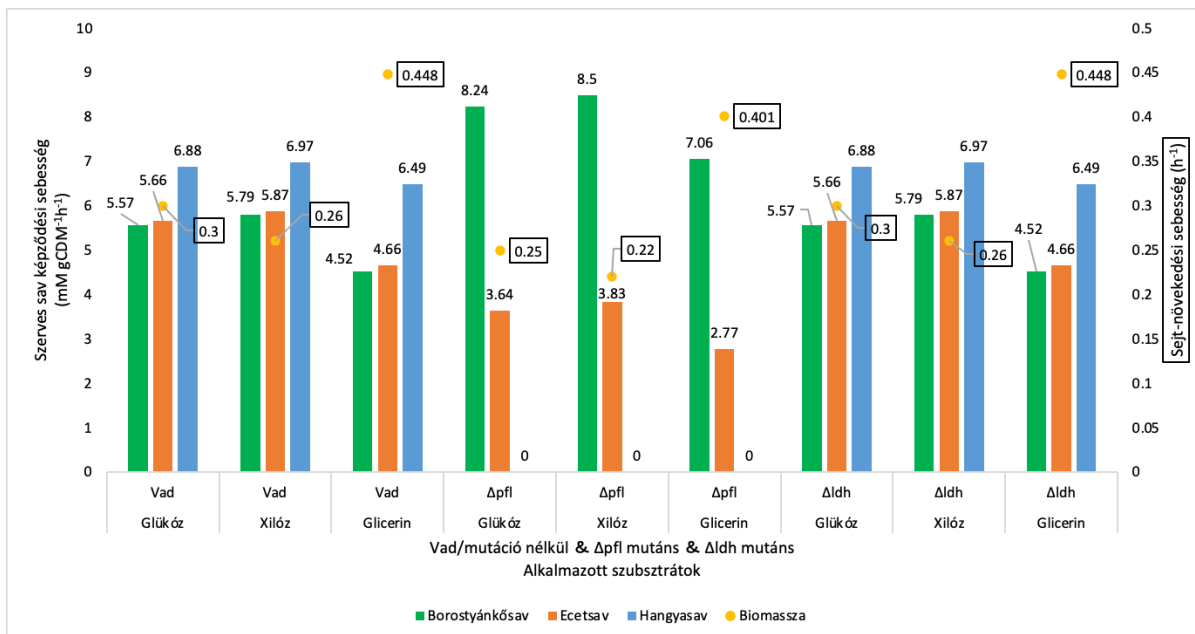


15.Ábra Borostyánkősav képződési sebesség tömeggyensúly elemzésekkel (FBA), valamint a céltermék elméleti maximumának meghatározása *in silico* predikciókkal

5.1.2. A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs *in silico* metabolikus optimalizálása

A következő lépésben a vizsgált baktériumtörzs metabolikus modelljét felhasználva *in silico* gén deléciókat végeztem. Amint azt a *Anyagok és módszerek* rész *In silico* gén elimináció alfejezetében taglaltam, egyes metabolikus útvonalak gátlásával bizonyos szerves savak képződési sebessége növelhető. Két különböző génkiütési szimulációt is elvégeztem a számítógépes elemzések során. Első lépésben a piruvát-formiát-liáz génjéhez tartozó metabolikus egyenletet (*Δpfl*) távolítottam el a modelltől, és így elemeztem a biomassza növekedési sebességét, valamint a keletkező céltermék képződési sebességét. Második esetben a laktát-dehidrogenáz génjének egyenletét (*Δldh*) távolítottam el a rekonstrukcióból. Jelentős változást a *Δpfl* gén kiütésekor értem el. Mindhárom szubsztrát esetén a hangyasav irányába történő szén fluxusának megszűnése a biomassza és a céltermék irányába tolódik el, ennek eredményeképpen megnövekedett értékeket kaptam. A piruvát-formiát-liáz génjének eliminálásakor a biomassza növekedési sebességére vonatkozóan mindhárom alkalmazott szubsztrát esetében csökkenést figyelhetünk. A legkisebb biomassza képződési sebesség csökkenést a glicerín esetében észlelünk, ennek értéke 10,5%, melyet a xilóz 15,4%-al és a

glükóz 16,7%-al követ. Így a Δpfl esetében a glükóz és xilóz szubsztrátok alkalmazásakor a borostyánkősav képződési sebessége rendre 67,59%-al és 68,1%-al emelkedik az alapállapothoz (vad típus - mutáció nélkül) viszonyítva. A glicerín esetében kevesebb, viszont jelentős növekedés tapasztalható, a céltermék képződési sebessége 64%-al nőtt (16.Ábra).



16.Ábra *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs számítógépes modelljének elemzése. Három körülmény (vad típus - mutáció nélkül, Δpfl - piruvát-formiát-liáz reakcióegyenletét nem tartalmazó modell, Δldh - laktát-dehidrogenáz reakcióegyenletét nem tartalmazó modell) és három különböző szubsztrátra (rendre glükóz, xilóz és glicerín)

5.2. Különböző szubsztrátok hozzáférhetőségének elemzése, a tápoldatok és szubsztrátok biomasszára, valamint metabolit termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata különböző körülményeken

Az *in silico* és a valóság minél megfelelőbb kapcsolatának leírásához laboratóriumban végeztem kísérleteket. Léptéknövelés elvét követve kísérleteket végeztem előbb mikrolemezen, majd lombikban nagyobb térfogatban, kontrollálatlan körülményeken, végül nagy térfogatban és kontrollált körülményeken, különböző tápoldatokban változó szubsztrát-koncentrációval. Vizsgálatom tárgya az elért biomassza koncentrációja, a fogyott szubsztrát mennyisége és a képződött termék koncentrációjában. A különböző szubsztrátok felhasználása és hatása a képződött biomasszára, valamint a termék-képződésre, olyan

paraméterekkel szolgálnak, amelyek segítségével leírható a számítógépes modell predikciója, valamint a valóság kapcsolata.

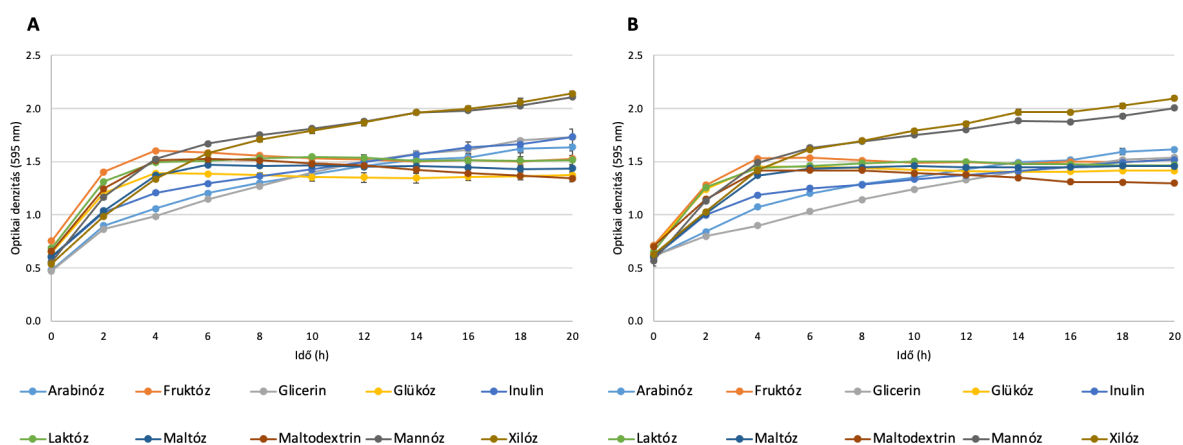
5.2.1. A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs szubsztrát profiljának meghatározása

Vizsgálatom következő lépése laboratóriumi körülmények között zajlott azért, hogy az alkalmazott szubsztrátok (arabinóz, fruktóz, glicerin, glükóz, inulin, laktóz, maltóz, maltodextrin, mannóz, xilóz) és azok koncentrációja, milyen hatással van a baktériumtörzs növekedési dinamikájára, különböző tápoldatok esetében. Továbbá az is érdekelt, hogy az esszenciális vitamin és aminosavakat tartalmazó élesztőkivonat, milyen mértékben járult hozzá a sejtnövekedési ütemhez. A kutatás ezen fázisa mikroaerob fermentációs körülményeknek felelt meg. Mivel a mikrolemez fizikai kialakításának köszönhetően 100 µL (200 µL ösztérfogat) sejt kultúrát tartalmazott egy zseb, korlátozódott a rázatás, és így az oxigén beoldódásának hatékonysága. Mikrolemezen végzett elemzés során nyolc különböző szubsztrát koncentrációt (5-10-15-20-25-30-50-70 g/L) vizsgáltam, illetve kétféle élesztőkivonat koncentrációt (0,1-1 g/L). A méréseket háromszoros ismétlésben végeztem, valamint számos körülményt vizsgáltam, hozzáátve a kontroll (sejtkultúra nélküli) vizsgálatokat is. Az alkalmazott szubsztrátok és élesztőkivonat mellett a tápoldat összetétele is fontos szerepet játszott a kutatásban. Minimál tápoldat esetén az *in silico* és laboratóriumi vizsgálatok összehasonlításának legegyszerűbb módja, ha olyan tápoldatot használunk a laborkísérletek során, melyek nem, vagy csak minimális mértékben térnek el a számítógépes elemzések körülményeitől. Az *in silico* predikciók a baktériumsejtek metabolikus útvonalainak reakcióit, az alkalmazott szubsztrátok felhasználási sebességeit és a képződött metabolitok képződését veszik figyelembe. Elméleti síkon, a minimál tápoldat használata a laborkísérletek során indokolt volt, és a tápoldat szubsztrátokon kívüli komponenseinek hatása minimális volt a sejtek aktivitására. Az inhibíciós koncentrációkat kizárva, valós időben keresve az optimálisat, a szubsztrátok, valamint az élesztőkivonat koncentrációjának hatását mikrolemez olvasó berendezéssel vizsgáltam. A baktériumról kapott részletesebb kép kialakításáért a minimál (M9) tápoldat mellett, az *Anyagok és módszerekben* leírt másik két komplex tápoldatot (TSB, BHI) is vizsgáltam.

A mikrolemez olvasó technológia nyújtotta előnyök felhasználásával a célzottan vizsgálni kívánt szubsztrátokon kívül további hét szénhidrátot is elemeztem. Ezt azért tartottam fontosnak, hogy minél szélesebb spektrumú leírást adhassak a baktériumtörzs

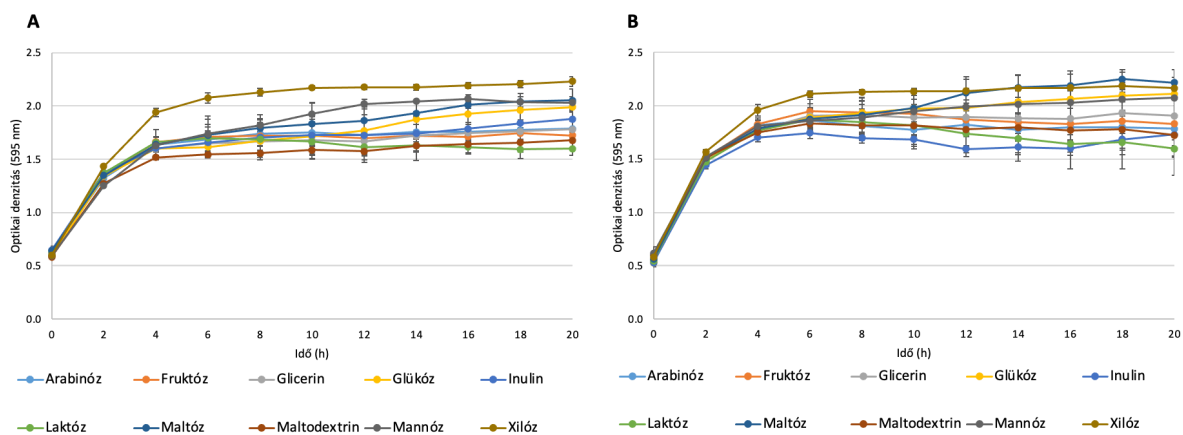
szénforrás preferenciáját illetően. Így mikrolemezen a három tápoldatban (TSB, BHI, M9), 5 g/L és 20 g/L koncentrációban elemeztem az előkísérletek során fent említett tíz szubsztrátot.

A megjelenített **17.Ábrán** látható, hogy koncentrációtól függetlenül az elemzés során a vizsgált szubsztrátok esetén, a baktériumtörzs hasonló növekedési dinamikát mutat. A fermentáció kezdetétől számított 4-6 óra elteltével az összes szubsztrát esetében a baktériumtörzs a sejtnövekedés exponenciális szakaszának maximumához ér. Az elemzés során mindkét alkalmazott szubsztrátkoncentráció esetében, a xilóz és mannóz szubsztrátok alkalmazásával az exponenciális növekedési szakaszt követően a baktériumsejtek egy lassan növekvő szaporulatot mutatnak. Ellenben a glicerín, arabinóz és inulin szénhidrátok esetében a fermentáció elejétől megfigyelhető egy alacsony meredekséggel jelentkező sejt szaporulat, mindkét szubsztrátkoncentráció alkalmazásakor. A baktériumtörzs az 5 g/L szubsztrátkoncentráció alkalmazásakor a legnagyobb sejt koncentrációt, a xilóz szubsztrát esetén érte el 0,7 g/L ($OD_{595}=2,141$), melyhez közeli értéket a mannóz szénhidrát esetében mértem 0,69 g/L ($OD_{595}=2,107$). A legkevesebbet a glükózra mértem, 0,46 g/L ($OD_{595}=1,391$), mely közeli értéket mutat a maltózra kapott biomassza koncentrációval 0,48 g/L ($OD_{595}=1,471$). A 20 g/L szubsztrátkoncentráció esetén, a xilóz és mannóz bizonyult hasznosnak, az elért biomassza koncentrációk rendre 0,69 g/L ($OD_{595}=2,095$) és 0,66 g/L ($OD_{595}=2,005$) voltak. A legkevesebb biomasszát eredményező szubsztrát ebben az esetben a maltodextrin volt 0,47 g/L ($OD_{595}=1,42$) értékkel, melyhez közeli értéket újból a glükóz mutatott 0,48 g/L ($OD_{595}=1,454$) koncentrációval. A kapott adatokat vizsgálva elmondhatjuk, hogy mind a tíz szubsztrát esetén úgy az 5 g/L mint a 20 g/L szubsztrátkoncentráció potenciálisan alkalmas tenyésztési körülmény.



17.Ábra A baktériumtörzs mikrolemezes populációdinamikája TSB tápoldatban. **A** - 5 g/L szubsztrátkoncentráció, **B** - 20 g/L szubsztrátkoncentráció (háromszoros ismétlésben, átlagok ábrázolva és szórások feltüntetve)

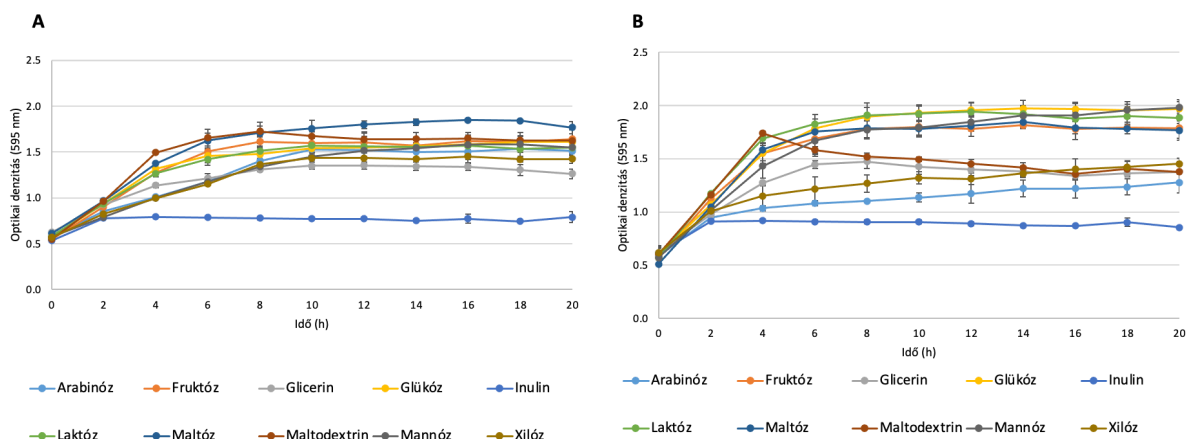
A rendelkezésre álló második komplex tápoldatot (BHI) vizsgálva megfigyelhetjük (18.Ábra), hogy átlagosan az összes szubsztrát esetében magasabb biomassza koncentrációt mértem, viszonyítva a TSB tápoldaton tapasztalt biomassza mennyiségekhez. A beoltást követően az összes szubsztrát esetén szaporodási fázis indul meg, amely megközelítőleg a negyedik óráig tart, mindkét alkalmazott szubsztrátkoncentráció esetén. Ezt követően stacioner fázis veszi kezdetét, mely megfigyelhető az elemzés végéig. Az 5 g/L szubsztrátkoncentrációjú elemzések során a legnagyobb biomassza koncentrációt a xilózt tartalmazó BHI tápoldatban tapasztaltam, 0,73 g/L ($OD_{595}=2,23$) értékkel. A xilóz szubsztráton elért biomassza koncentrációt szorosan követik a mannóz és maltóz szubsztrátok, amelyeken rendre 0,68 g/L ($OD_{595}=2,066$) és 0,67 g/L ($OD_{595}=2,052$) értéket számoltam. A legkevesebb biomasszát képző szubsztrátok a maltodextrin és a laktóz szubsztrátok voltak, ezek esetében rendre 0,55 g/L ($OD_{595}=1,675$) és 0,56 g/L ($OD_{595}=1,699$) biomassza koncentrációkat számoltam. A nagyobb szubsztrátkoncentráció (20 g/L) alkalmazásakor maltóz szénforrás esetén 0,74 g/L ($OD_{595}=2,25$) biomassza koncentrációt kaptam. Ezt követte a xilózon és glükózon képződött sejtek koncentrációja, ahol rendre 0,72 g/L ($OD_{595}=2,19$) és 0,69 g/L ($OD_{595}=2,11$) maximális biomassza koncentrációkat számítottam. A BHI tápoldat inulin szubsztráttal volt az a körülmény, ahol a legkevesebb sejtkoncentrációt mértem, 0,57 g/L ($OD_{595}=1,75$) maximális biomassza koncentráció értékkel.



18.Ábra A *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs növekedés dinamikája mikrolemezes előkísérletekben BHI tápoldatban. **A** - 5 g/L szubsztrátkoncentráció, **B** - 20 g/L szubsztrátkoncentráció (háromszoros ismétlésben, átlagok ábrázolva és szórások feltüntetve)

Az előkísérletek utolsó része a komplex, komponensekben gazdag tápoldatokhoz viszonyítva egy költséghatékonyabb, egyszerűbb közegben ment végbe, M9 tápoldatban (19.Ábra). Az 5 g/L koncentrációban rendelkezésre álló szubsztrátok esetén egy rövid adaptációs fázist figyelhetünk meg. Mivel az előnevelést TSB tápoldatban végeztem a

baktériumsejtek a komponensekben gazdagabb tápoldathoz adaptálódtak, ezzel magyarázható a kezdeti adaptációs szakasz, M9 tápoldat esetén. Egy szénforrás kivételével (inulin) a többi szubsztrát egy alacsonyabb meredekségű exponenciális szakaszba lép a fermentáció második órájában, és ez a negyedik-hatodik fermentációs óra magasságában áll le, ekkor lépnek be a baktériumsejtek a stacioner állapotba. A maximális biomassa koncentráció a maltózt tartalmazó M9 tápoldatban figyelhető 0,61 g/L ($OD_{595}=1,847$) értékkel, amelyet a fermentáció tizenhatodik órájában mértem. A legkisebb maximális sejtkoncentrációt az inulint tartalmazó tápoldat mutatta 0,26 g/L ($OD_{595}=0,792$) értékkel. A maradék nyolc szubsztrát a fent leírt két szénforrás növekedési görbéi között helyezkednek el. A nagyobb, 20 g/L szubsztrátkoncentráció alkalmazásakor elmarad az 5 g/L koncentráció esetében tapasztalt kezdeti szaporodási “megtorpanás” (adaptációs szakasz). Vizsgálva a növekedési görbéket, megfigyelhetjük, hogy a beoltást követően meredek exponenciális fázis indul meg az összes szubsztrát esetén, amely a kísérlet negyedik órájában stacioner fázisba lép át. A maltodextrin esetén az exponenciális szakasz végével a sejtek a deklinációs szakaszba érnek, mely a fermentáció végéig tart. A fermentációt a maradék szubsztrátok esetén a növekedés stacioner fázisa követi végig. A nagyobb szubsztrátkoncentráció (20 g/L) öt szubsztrát esetén mutatott jelentősebb biomassa képződést. Glükóz, mannóz, laktóz, maltóz és fruktóz szubsztrátok alkalmazásával magasabb biomassa koncentrációt tapasztaltam, rendre 0,65 g/L ($OD_{595}=1,97$), 0,65 g/L ($OD_{595}=1,98$), 0,64 g/L ($OD_{595}=1,94$), 0,61 g/L ($OD_{595}=1,85$) és 0,59 g/L ($OD_{595}=1,81$) értékekkel. Az inulin bizonyult a legnehezebben hozzáférhető szénforrásnak, az alkalmazott 20 g/L koncentráció ellenére itt is minimális koncentrációjú 0,3 g/L ($OD_{595}=0,92$) sejtet produkált. A maradék négy szubsztrát (arabinóz, glicerin, maltodextrin és xilóz) esetében megfigyelhető, hogy mindenik szubsztrát felhasználódik.



19.Ábra A baktériumtörzs populációdinamikája M9 tápoldatban mikrolemezen. A - 5 g/L szubsztrátkoncentráció, B - 20 g/L szubsztrátkoncentráció (háromszoros ismétlésben, átlagok ábrázolva és szórások feltüntetve)

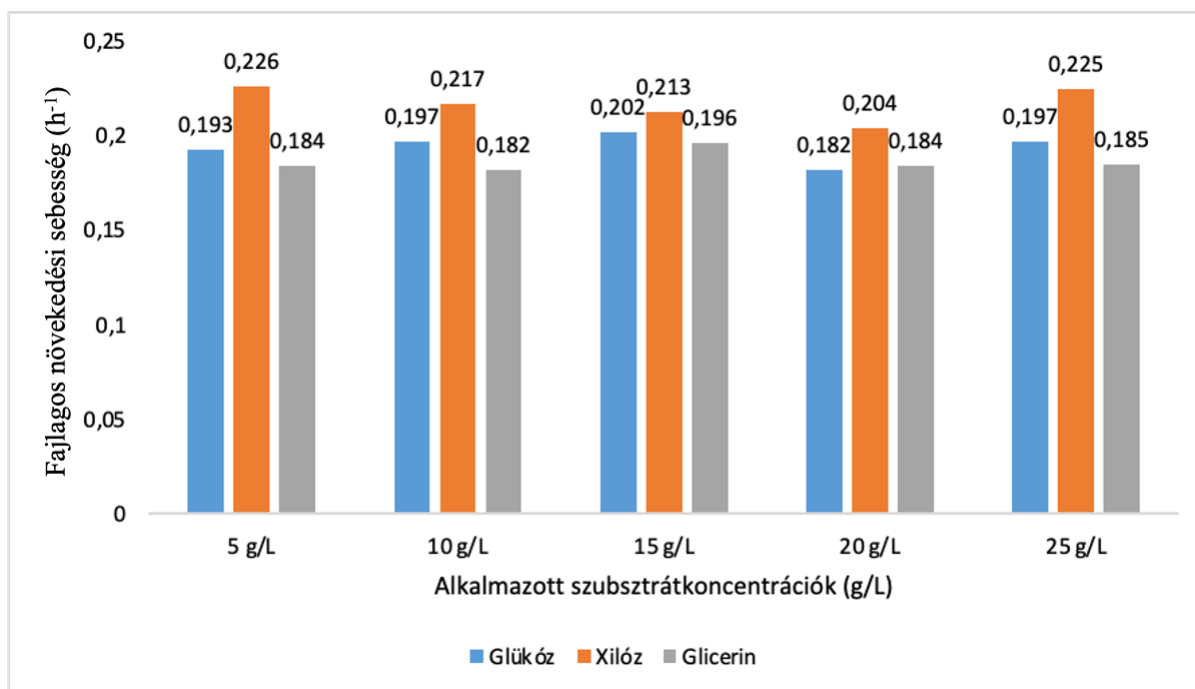
5.2.2. Minimál és komplex tápoldatok összehasonlítása *Basfia succiniciproducens* biomassza termelésének szempontjából

5.2.2.1. Mikrolemezes kísérletek TSB tápoldatban

Mikrolemezes vizsgálataim során a törzsgyűjtemény (DSMZ) által javasolt organizmus-specifikus tápoldatot (TSB) is elemeztem. Ez a médium alapállapotban a szénforrásokon kívül tartalmaz növényi és állati eredetű emésztett fehérjéket, mely szerves nitrogénforrás a baktériumtörzs számára. A pepton mellett két szervetlen só is tartalmaz, mely specifikus metabolikus útvonalak enzimeinek nátrium, kálium, klór és foszfor forrásokat biztosít. A három szubsztrát esetén öt különféle koncentrációt vizsgáltam: 5-10-15-20-25 g/L. A populációdinamikát növekedési sebességekben kifejezve és a három alkalmazott szubsztrát esetén a **20.Ábrán** mutatom be.

Az ábrázolt eredmények láttán szükséges leszögezni, hogy a számított értékek a baktérium növekedésének exponenciális szakaszaira értendőek. Mindhárom alkalmazott szubsztrát koncentrációt figyelembe véve látható, hogy a növekedési sebességek nem mutatnak jelentős különbséget. A xilózt tartalmazó tápoldat minden egyes szubsztrát közül kiemelkedik, míg a glükóz és glicerín kisebb növekedési sebességet mutat az felhasznált szubsztrát koncentrációkon. Ha százalékban fejezzük ki az szubsztrátonként a legnagyobb és legkisebb növekedési sebesség különbségét a következőket kapjuk: glükóz 9,9%, xilóz 9,7% és glicerín 7,14%. Ezek a számított értékek azt mutatják, hogy a glükóz alkalmazásakor nagyobb különbség volt a növekedési sebességek tekintetében, amely alapján a törzs

érzékenységet mutat ezen szubsztrát alkalmazott koncentrációjára. Hasonlóan a xilóz is, amely alacsonyabb eltérést mutat. Viszont a glicerín esetében számított érték azt mutatja, hogy a törzs erre a szubsztrátra mutat a legkisebb érzékenységet.



20.Ábra A baktériumtörzs fajlagos növekedési sebessége mikrolemezen végzett kísérletben TSB tápoldaton különböző koncentrációjú szubsztrátok esetén

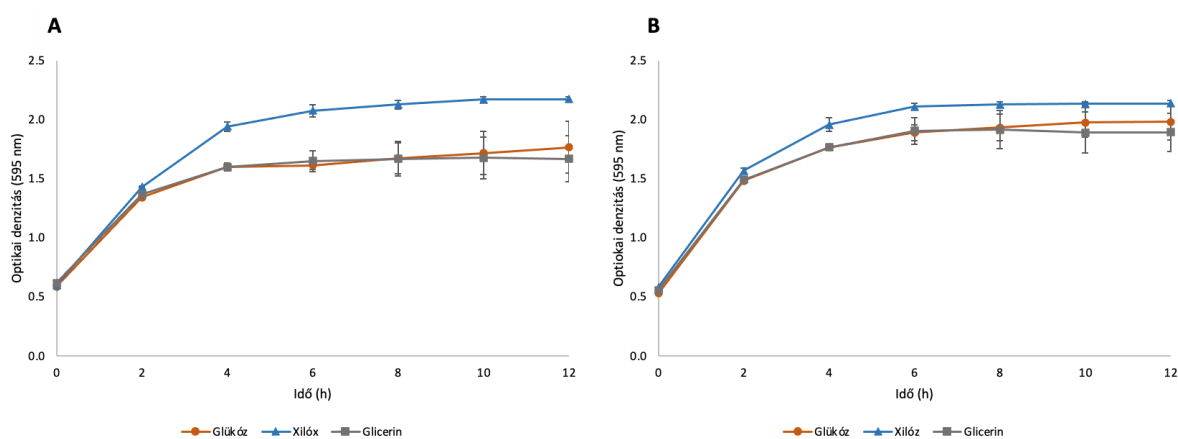
A **5.Táblázat** mutatja a mikrolemezen végzett kísérletekben elért maximális sejtkoncentrációt. A fermentáció során az elért legmagasabb sejtek átlagolt koncentrációja a xilóz szubsztráton volt mérhető, $0,77 \pm 0,023$ g/L. A sorban következő szubsztrátok a glicerín és glükóz volt mikrolemez körülményeken, rendre $0,6 \pm 0,044$ g/L és $0,47 \pm 0,019$ g/L biomassza koncentrációval. Megfigyelhető, hogy az alkalmazott szubsztrátok koncentrációjának változása minimálisan hatott a baktériumtörzs maximálisan elért sejtkoncentrációjára.

5.Táblázat A felhasznált szubsztrátokon képződött maximális biomassza koncentrációja TSB tápoldatban

Maximális biomassza koncentráció (g/L)	5 g/L (szubsztrát-koncentráció)	10 g/L (szubsztrát-koncentráció)	15 g/L (szubsztrát-koncentráció)	20 g/L (szubsztrát-koncentráció)	25 g/L (szubsztrát-koncentráció)
Glükóz	0,47	0,46	0,47	0,48	0,51
Xilóz	0,8	0,79	0,79	0,77	0,74
Glicerín	0,67	0,59	0,63	0,6	0,55

5.2.2.2. Mikrolemezes kísérletek BHI tápoldatban

Szakirodalmi hivatkozások alapján a BHI tápoldatot vizsgáltam, két különböző koncentrációban (5-20 g/L). Megfigyelhető (**21.Ábra**), hogy a baktériumsejtek növekedése az 5 g/L szubsztrát koncentráció mellett egy hosszabb elnyúlású exponenciális fázist mutatnak, míg a 20 g/L koncentráció esetén a szaporodási görbe meredeksége nagyobb. A nagyobb szénforrást tartalmazó tápoldatban gyorsabb ütemű növekedéssel rendelkeznek a baktériumsejtek. Mindkét körülményen megfigyelhető, hogy a xilóz az a szubsztrát ahol a sejtek magasabb sejtkoncentrációt produkálnak. A xilóz esetén 5 g/L és 20 g/L szubsztrát koncentrációval az elért maximális biomassza koncentrációja hasonló, rendre 0,718 g/L ($OD_{595}=2,17$), melyet a fermentáció tizedik órájában ért el, és 0,7 g/L ($OD_{595}=2,14$), melyet a mérés utolsó, tizenkettedik órájában mértem. A glükóznál és glicerinnél valamivel kevesebb, 23%-al kisebb biomassza koncentrációt számítottam 5 g/L szubsztrát koncentráció esetén. A 20 g/L koncentrációt vizsgálva láthatjuk, hogy a xilóz és a másik két szubsztrát (glükóz, glicerín) közötti eltérés kisebb, a xilóz esetén elért sejtsűrűség 10%-al mutat nagyobb értékeket. A két szubsztrát koncentráció alkalmazásakor, mindhárom szubsztrát esetében elmondható, hogy a beoltástól számított négy óra után a törzs eléri az exponenciális növekedési szakasz végét, elindul a stacioner állapot, mely a fermentációs vizsgálat végéig tart.

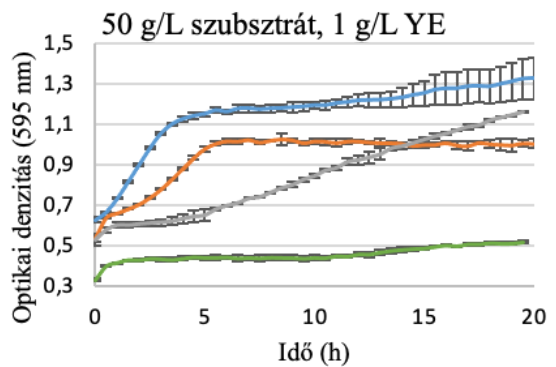
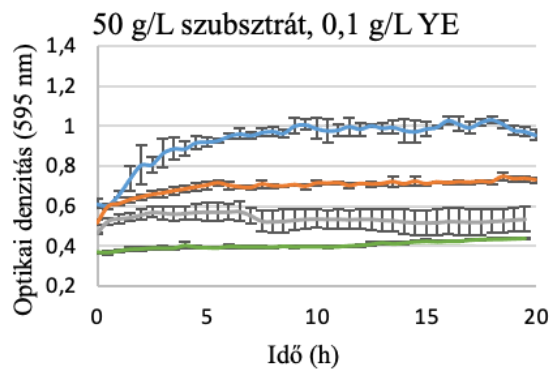
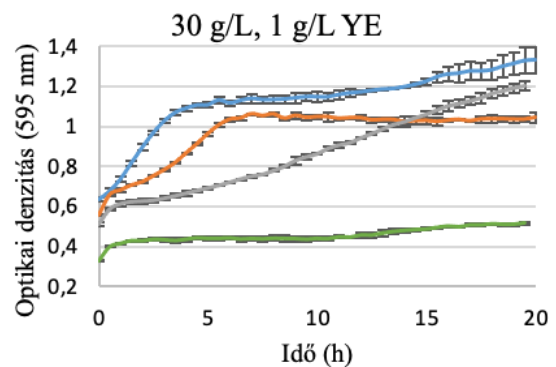
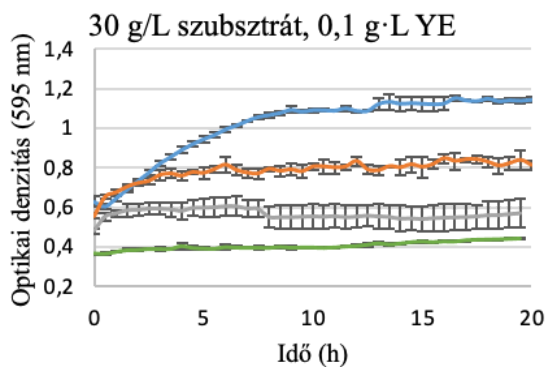
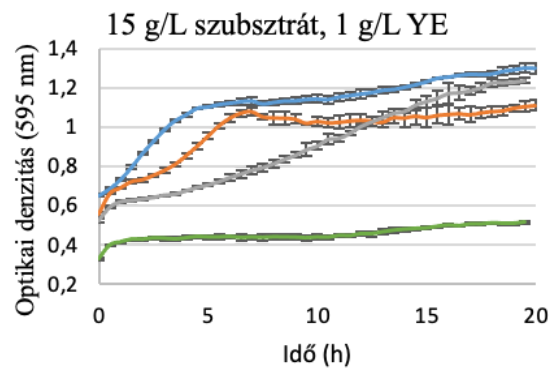
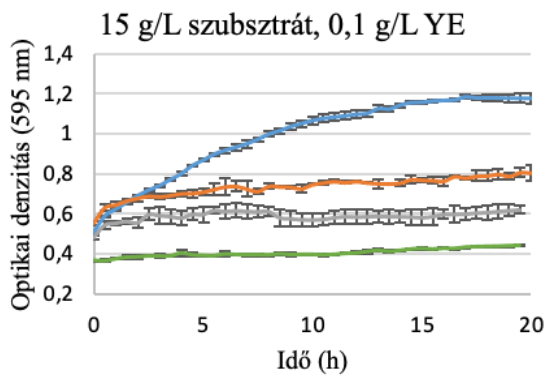
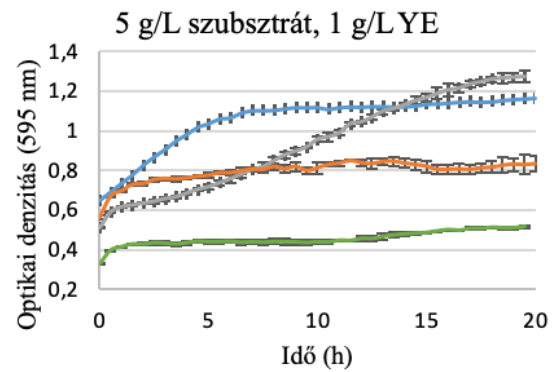
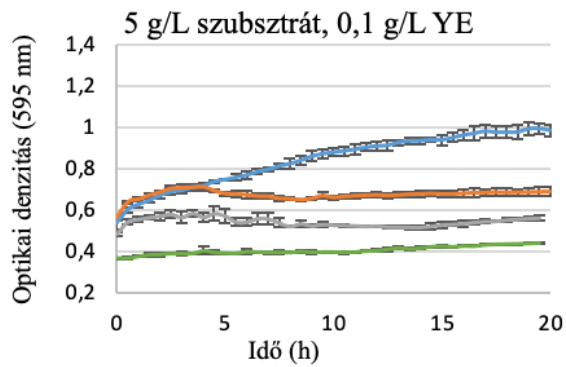


21.Ábra A baktériumtörzs növekedés dinamikája mikrolemezen BHI tápoldatban. A - 5 g/L szubsztrát koncentráció, B - 20 g/L szubsztrát koncentráció. ● - glükóz, ▲ - xilóz, ■ - glicerín. A *Basfia succiniciproducens* sejtsűrűségének változása 595 nm-en

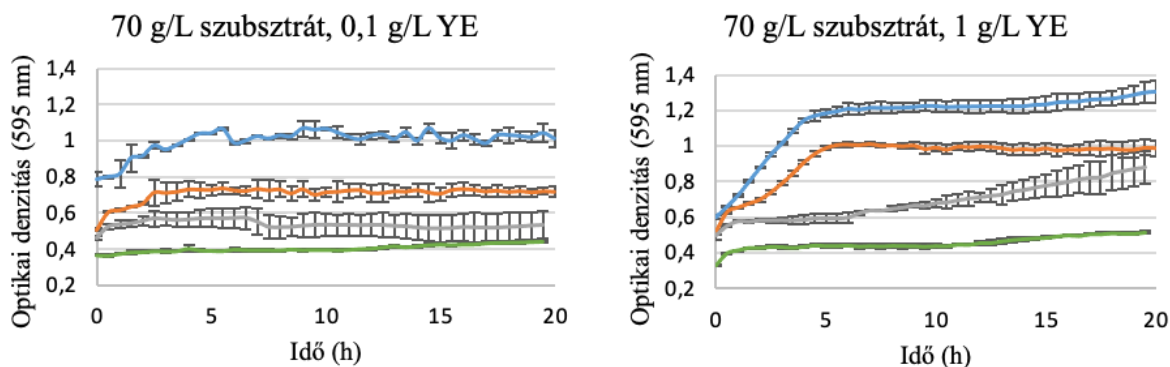
5.2.2.3. Mikrolemezes kísérletek minimál (M9) tápoldatban

A két komplex (TSB, BHI) tápoldat után, egy költségkímélőbb médiumot (M9) is vizsgáltam annak érdekében, hogy a különböző szubsztrátok (glükóz, xilóz, glicerín),

azoknak különböző koncentrációi (5-15-30-50-70 g/L), valamint a tápoldathoz adagolt, vitamin és esszenciális aminosavakat tartalmazó élesztőkivonat két különböző koncentrációja (0,1-1 g/L) milyen hatással van a baktériumtörzs növekedésére. A **22.Ábrán** megfigyelhető, hogy a törzs a magas szubsztrátkoncentráción (70 g/L) is életképes. Ha az elért maximális sejtsűrűséget, valamint az adaptációs időt vesszük alapul, a szubsztrátok közül a xilóz emelkedik ki a legjobban. A xilózhoz hasonlítva, a glükóz és glicerín esetén megfigyelhető, hogy a sejtek adaptációs ideje hosszabb. A xilóz esetében tapasztaltam a mikrolemezes elemzések során a legnagyobb sejtsűrűséget a széles spektrumon mozgó szubsztrátokon és szubsztrátkoncentrációkon, így a 30 g/L-es szubsztrátkoncentráció kiegészítve 1 g/L koncentrációjú élesztőkivonattal 1,33 g/L biomassa koncentrációt eredményezett. Az összes vizsgált körülményt figyelembe véve a xilóz mutatkozik a leghatékonyabb szubsztrátnak mikrolemezen, hasonlítva a többi szénforráshoz. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a biomassa képződését az élesztőkivonat koncentrációja határozza meg jelentősen mindhárom szubsztrát esetén, nem az alkalmazott szubsztrát koncentrációja. Az összes vizsgált körülmény esetén a sejtsűrűséget figyelembe véve elmondhatjuk, hogy az 1 g/L koncentrációban alkalmazott élesztőkivonat kedvezőbb körülményeket teremtett a törzs populációdinamikájára, mint a 0,1 g/L élesztőkivonat koncentráció. Míg a xilóz és glükóz esetén a sejtsűrűség növekedés rendre 11-44%-al és 22-42%-al emelkedett addig, a glicerín esetében jóval nagyobb hatása volt az élesztőkivonatnak a sejtek növekedésére, az itt tapasztalt sejtkoncentráció gyarapodás több esetben is megduplázódik (93%-126%). A glicerín esetében 0,1 g/L koncentrációban alkalmazott élesztőkivonat mellett az összes kipróbált körülményen egy jóval mérsékeltebb sejtnövekedést tapasztaltam, de annak ellenére, hogy nehezen metabolizálható szubsztrátról beszélünk, mégis sikerült a törzsnek adaptálódni és szaporodni. Tehát glicerín tekintetében az élesztőkivonat koncentrációjának hatása a törzs viabilitására nézve esszenciális. A glicerín szubsztráton tapasztalt mérési eredményeket elemezve láthatjuk, hogy az 1 g/L koncentrációban élesztőkivonatot tartalmazó mérések esetén az 50 g/L szubsztrát koncentráció egy a növekedés tekintetében tapasztalt kritikus inhibíciós koncentráció.



22.Ábra Különböző szubsztrát és élesztőkivonat koncentrációk hatása a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs populációdinamikájára mikrolemezes laborkísérletekben



22.Ábra Különböző szubsztrát és élesztőkivonat koncentrációk hatása a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs populációdinamikájára mikrolemezes laborkísérletekben. Magyarázat: zöld vonal - kontroll (baktériumsejt mentes), szürke vonal - glicerín, narancssárga vonal - glükóz, kék vonal - xilóz (Bartos és mtsai. 2021)

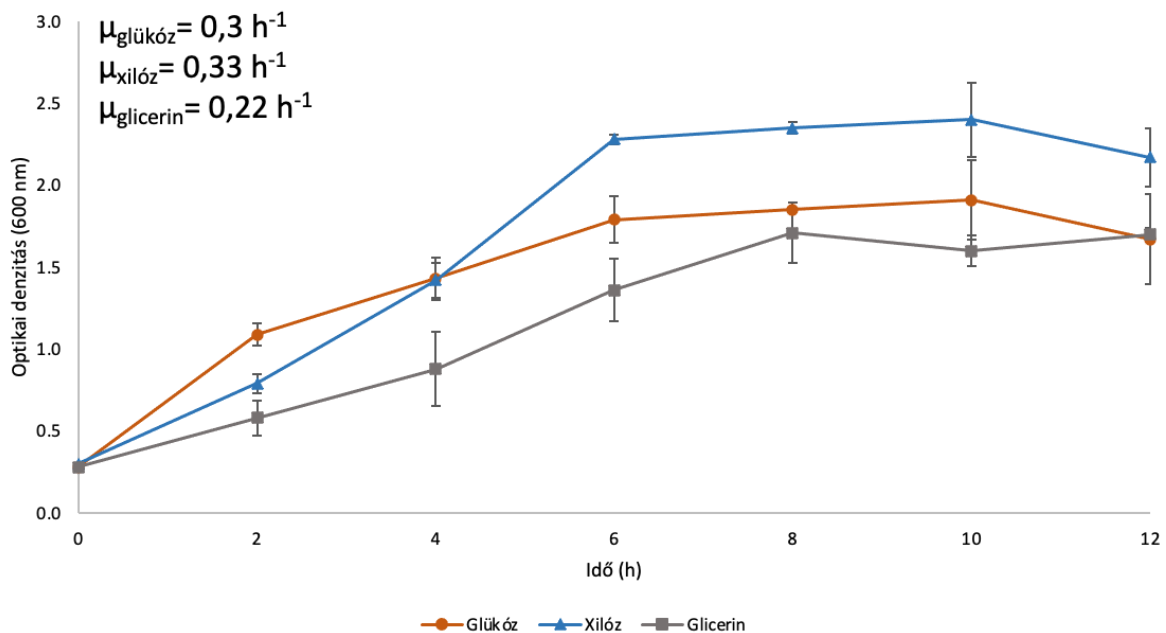
5.2.3. *Basfia succiniciproducens* biomassza termelése glükóz, glicerín és xilóz szénforrásokon

A következő lépésben léptéket növeltem a részletesebben megismert körülmények eredményei után, és nagyobb térfogatban vizsgáltam a törzs növekedés dinamikáját. A lombikban elvégzett kísérleteket a két komplex (TSB, BHI), illetve a minimál (M9) tápoldatra vizsgáltam. A törzs növekedési sebességét illetően a mikrolemezen végzett kísérletek, és a szabályozott bioreaktoros kísérletek végrehajtása között szükségesnek láttam egy köztes állapotot is megvizsgálni. A mikrolemezen végzett kísérletek a különféle szubsztrátok alkalmazhatóságáról nyújtanak információkat, de elemeztem a törzset lombikban karakterisztikailag egy, a bioreaktoros kísérletekhez hasonló térfogatban. Így nagyobb térfogatban a fent említett tápoldatokban, és egy kiválasztott szubsztrátkoncentrációban történt a vizsgálat a három szénforrásra (glükóz, glicerín és xilóz).

5.2.3.1. Lombikos kísérletek TSB tápoldat felhasználásával

Elsőként a fentiekben már tárgyalt komplex közeget, a TSB tápoldatot nagyobb térfogatban vizsgáltam. A vizsgálatok során 20 g/L koncentrációban vizsgáltam a szubsztrátok hatását a baktériumtörzs növekedési sebességére vonatkozóan. A kísérlet eredményeit a **23.Ábrán** figyelhetjük meg.

A nagyobb térfogatban vizsgált elemzések során kiderült, hogy mindhárom szubsztrát esetén magasabb növekedési sebességet mutatott a törzs a mikrolemezes populációdinamikához képest. Míg a xilóz újból kiemelkedett a többi szubsztrát közül, a glükóz és glicerín esetében is növekedést láthatunk. Mindhárom szubsztrát esetén a törzs az inokulálást követően emelkedő növekedési ütemet (exponenciális szakasz) mutat, mely a xilóz és glükóz esetén hat, míg glicerín esetén nyolc óra után áll le, és lép be a stacioner szakaszba. A baktériumtörzs a legnagyobb sejtsűrűséget a xilóz ($OD_{600}=2,4$) esetén ért el, ezt követően a glükózra ($OD_{600}=1,91$), majd végül a glicerínen ($OD_{600}=1,71$). A növekedési sebességeket megfigyelve láthatjuk, hogy a xilóz esetén tapasztalt sejtszaporulat $0,33\text{ h}^{-1}$ értékkel vezeti a sort, a glükóz közel hozzá $0,3\text{ h}^{-1}$ -es értékkel, míg a glicerín $0,22\text{ h}^{-1}$ értékkel zár.

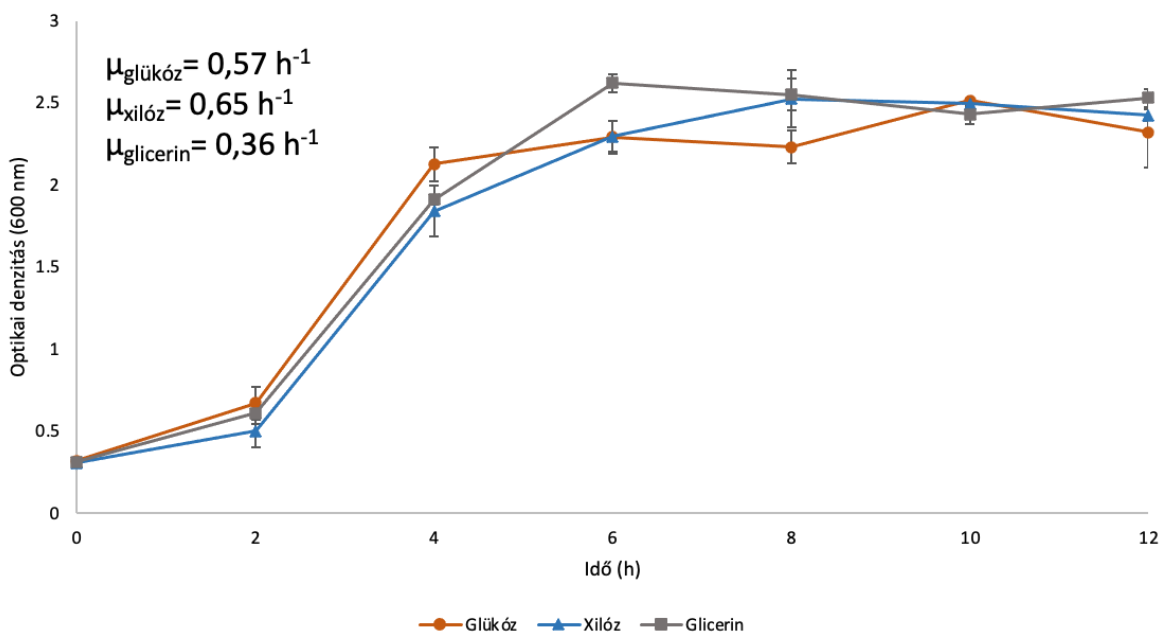


23.Ábra A vizsgált törzs populációdinamikája TSB tápoldatban 20 g/L szubsztrátkoncentrációval lombik térfogatban. Magyarázat: $\mu_{\text{glükóz}}$ - glükóz szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség, $\mu_{\text{xilóz}}$ - xilóz szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség, $\mu_{\text{glicerín}}$ - glicerín szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség

5.2.3.2. Lombikos kísérletek BHI tápoldat felhasználásával

A TSB komplex tápoldat után a másik komplex tápoldatot (BHI) vizsgáltam a fent tárgyalt szubsztrátok hozzáadagolásával. Mivel a mikrolemezen végzett vizsgálatok során az 5-20 g/L koncentrációk közül az utóbbi bizonyult hasznosabbnak ezért a lombik kísérletekhez is ezt a koncentrációt használtam. A **24.Ábra** mutatja a BHI tápoldat esetén tapasztalt populációdinamikai változásokat, a három vizsgált szubsztrátra.

A BHI tápoldatban egy dinamikusabb sejtnövekedést figyelhetünk meg, a TSB közeghez viszonyítva. A beoltást követően a baktériumsejtek adaptációs fázisba lépnek, majd ezt követően indul meg mindhárom szubsztrát esetében az exponenciális növekedési fázis, mely a xilóz és glükóz esetén két óra hosszúságot vesz fel, míg a glicerín esetén hosszabb időintervallumot figyelhetünk meg (kb. 4 óra). Az exponenciális fázist követően a törzs stationer fázisba kerül az elemzés során, az összes vizsgált szubsztrát esetén. A mikrolemezes vizsgálatokhoz viszonyítva megfigyelhetjük, hogy úgy növekedési sebesség, mint elért maximális sejtkoncentráció függvényében a lombik kísérletek kedvezőbb eredményeket mutattak. A növekedés ütemét figyelve láthatjuk, hogy újból a xilózt tartalmazó tápoldat esetén számíthatunk a leggyorsabb biomassza növekedési sebességre ($0,65 \text{ h}^{-1}$). A glükózt tartalmazó tápoldat esetén mért növekedési sebesség $0,57 \text{ h}^{-1}$, mely közel hasonló a xilóznál számítottéhoz. A glicerint tartalmazó tápoldatban számított növekedési sebesség értéke a közeg komplexitását figyelembe véve alacsony értéket ad ($0,36 \text{ h}^{-1}$), mely az exponenciális fázis elhúzódásával magyarázható.



24.Ábra A törzs növekedés dinamikája lombikban, BHI tápoldatban 20 g/L szubsztrátkoncentrációt alkalmazva. Magyarázat: $\mu_{\text{glükóz}}$ - glükóz szénforráson számított fajlagos növekedési sebessége, $\mu_{\text{xilóz}}$ - xilóz szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség, $\mu_{\text{glicerín}}$ - glicerín szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség

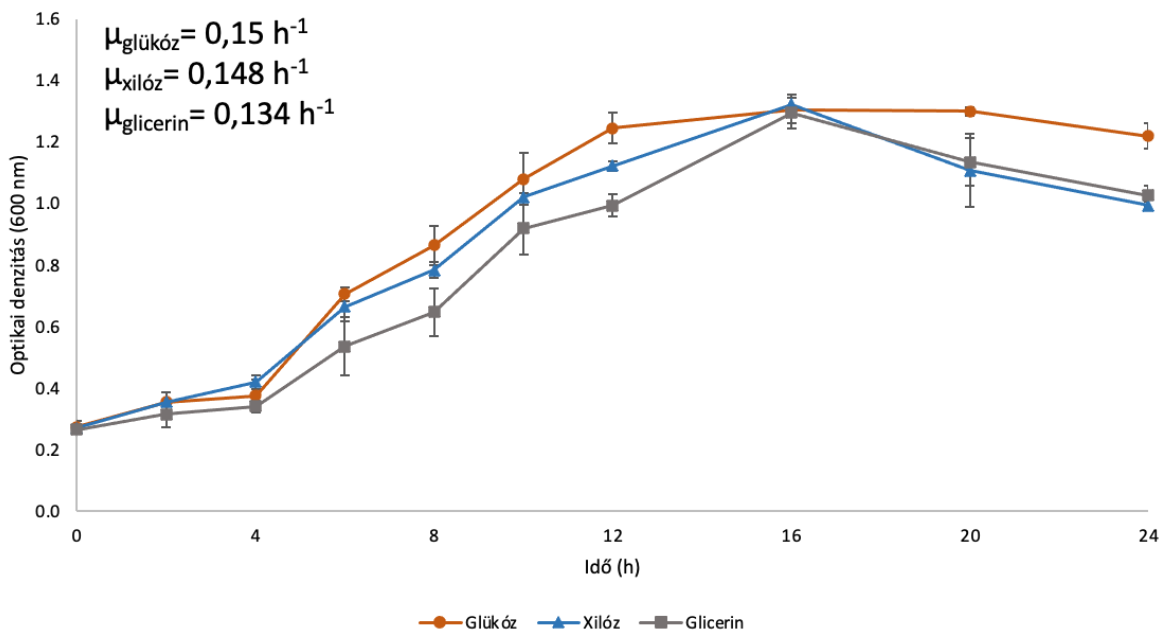
5.2.3.3. Lombikos kísérletek minimál (M9) tápoldat felhasználásával

A két komplex tápoldat vizsgálata után a mikrolemezes kísérletekhez hasonlóan a lombik kísérleteket minimál tápoldatra is elvégeztem. Az alkalmazott szubsztrátkoncentráció

ebben az esetben is 20 g/L volt. A minimál tápoldatban kapott populációdinamikai eredményeket a **25.Ábra** szemlélteti.

A két komplex tápoldat után egy komponensekben jóval szegényebb tápoldatot vizsgáltam. Jól megfigyelhető a baktériumsejtek növekedési dinamikájának visszaesése úgy a fajlagos növekedési sebesség, mint elért maximális sejtsűrűség (OD_{600}) tekintetében. Az inokulálást követően ebben a tápoldatban tapasztalható a leghosszabb adaptációs szakasz. Mindhárom szubsztrát esetében megközelítőleg négy órát tart az alkalmazkodási fázis. Ezt követően indul meg az exponenciális szakasz. Az elért maximális sejtkoncentráció a komplex tápoldatokhoz viszonyítva kevesebb. Glükóz szubsztrát esetén 46% és 92%-al nagyobb biomassza koncentrációt mértem, rendre a TSB és BHI tápoldatokban. A xilózt tartalmazó tápoldat esetén a TSB médiumban 84%-al több, míg BHI-ban 92%-al nagyobb biomassza koncentrációt számítottam. A glicerinnel tartalmazó M9-es tápoldat mutatott a legkisebb sejtkoncentrációt. TSB tápoldatban 42%-al több, és BHI tápoldatban több mint dupla koncentrációjú biomassza keletkezett.

Növekedési sebességeket vizsgálva elmondhatjuk, hogy a lombikban vizsgált populációdinamika legkisebb paramétereit kapjuk. A glükóz és xilóz szénforrást tartalmazó tápoldatok esetében számított növekedési sebességek minimális eltéréssel, rendre $0,15 \text{ h}^{-1}$ és $0,148 \text{ h}^{-1}$ értékeket adnak. A vizsgált körülményt a glicerinnel zárja $0,134 \text{ h}^{-1}$ növekedési sebességgel. A fermentáció során elért maximális biomassza koncentrációja a három szubsztrát esetén $0,42\text{-}0,43 \text{ g/L}$ között mozog.



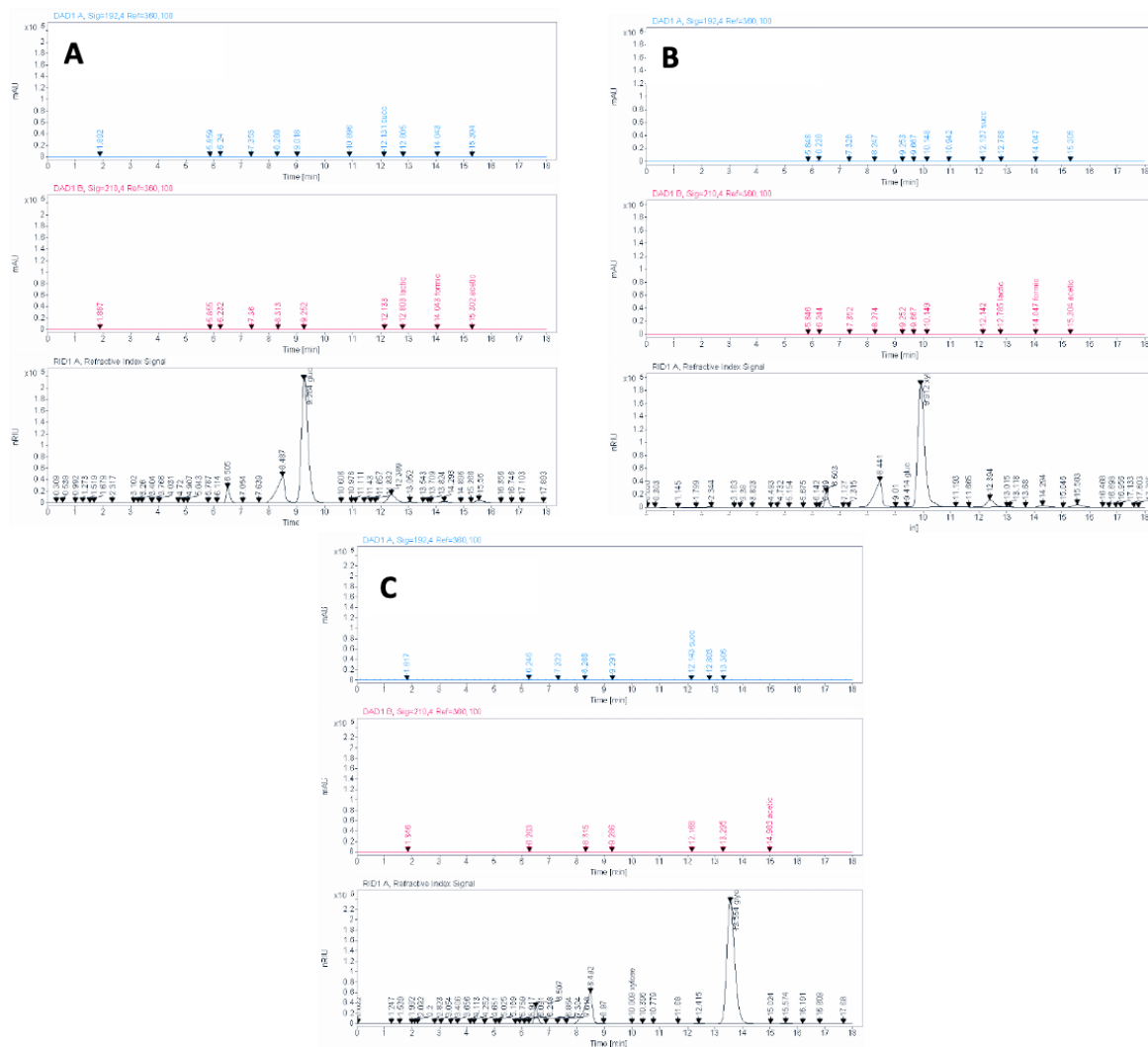
25.Ábra Populációdinamikai eredmények M9 tápoldatban, lombik térfogatban 20 g/L szubsztrátkoncentrációban. Magyarázat: $\mu_{\text{glükóz}}$ - glükóz szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség, $\mu_{\text{xilóz}}$ - xilóz szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség, $\mu_{\text{glicerín}}$ - glicerín szénforráson számított fajlagos növekedési sebesség

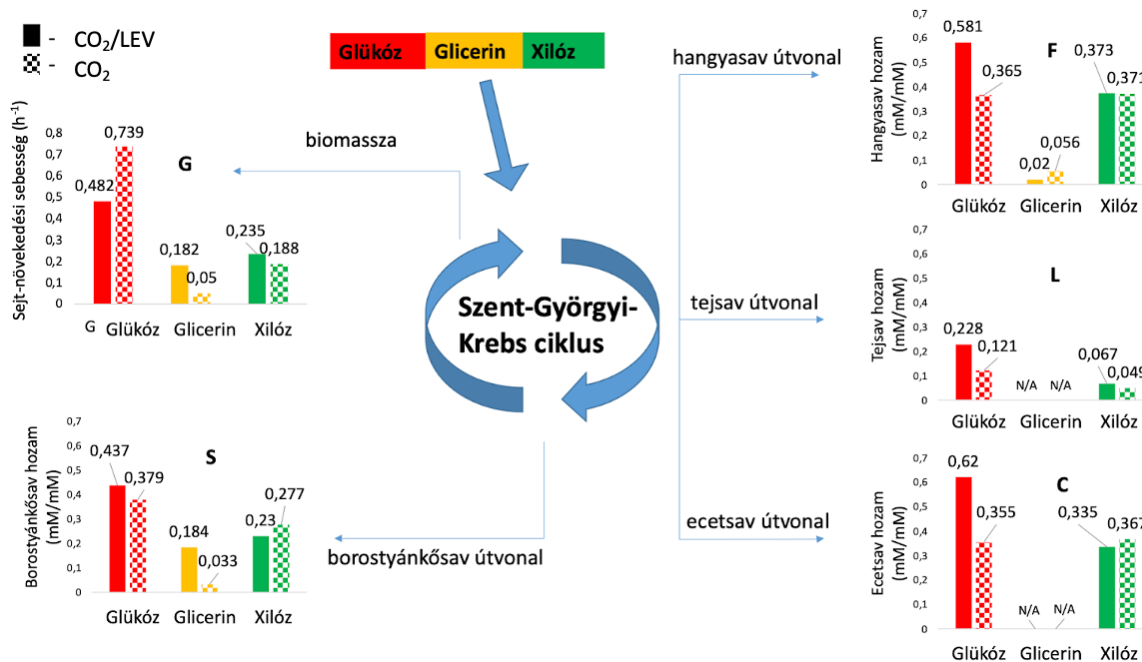
5.3. A fermentációs körülmények hatása a *Basfia succiniciproducens* biomassza és céltermék képződésére

A lombikban elvégzett kísérleteket szabályozott körülmények közötti elemzések követték. A bioreaktorok légterébe egyenletes térfogatáramba került a CO₂/LEV keverék és CO₂ (rendre 60/60 ml/perc és 60 ml/perc), így szabályozott körülmények között vizsgálatra került ezek hatása. A cél, a keletkezett biomassza koncentrációjának meghatározása, valamint a törzs metabolit profiljának elemzése, melynek meghatározását nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával valósítottam meg (**26.Ábra**).

A nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás adatokat kromatogramokból származtattuk, komponensenként és tápoldatonként a megfelelő kalibrációs görbék alapján.

Egy példát a mérések során kapott eredményre a **26.Ábra** mutatja.





27.Ábra A *Basfia succiniciproducens* metabolikus profilja és populációdinamikája M9 tápoldatban. CO₂/LEV keverék (60/60 ml/perc) és CO₂ (60 ml/perc). **G** - bakteriális növekedés exponenciális szakaszra számítva, a három szubsztrátra (glükóz, glicerín és xilóz) a két különböző körülményen (CO₂/LEV és CO₂), **S** - borostyánkősav és szubsztrát koncentrációjának aránya, **F** - hangyasav és szubsztrát koncentrációjának aránya, **L** - tejsav és szubsztrát koncentrációjának aránya, **C** - ecetsav és szubsztrát koncentrációjának aránya (Balázs és mtsai. 2023)

5.3.1. Bioreaktoros fermentáció glükóz szubsztrát felhasználásával

A glükóz szubsztráton tapasztalt növekedési sebességeket figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy az anaerob körülményen a legmagasabb növekedést (0,739 h⁻¹) észlelünk. A CO₂/LEV keveréket alkalmazva a törzs mérsékelt növekedést mutat, itt az elért maximális növekedés rátája 0,482 h⁻¹. Az elért maximális sejtkoncentráció hasonlóan változik mint a növekedési sebesség, így míg a mikroaerob körülményen 0,38 g/L biomassza termelődött a fermentáció hatodik órájában, addig az anaerob körülményen 0,54 g/L biomassza koncentrációt mértem, mely 42%-al több biomasszát jelent. A borostyánkősav koncentrációja a fermentációk során követi a biomassza fajlagos növekedési sebességének változását. Anaerob fermentáció során a kultúra maximálisan 2,6 g/L (22,2 mM) koncentrációjú borostyánkősavat szintetizál, mikroaerob körülmények alkalmazásával kevesebbet, 1,97 g/L (16,7 mM) koncentrációban. A szubsztrát fogyasztására vonatkoztatott termékképződés hozama anaerob és mikroaerob körülmények esetén rendre 0,437 mM/mM és 0,379 mM/mM a fermentáció egészére számítva. A többi szerves sav hozamát vizsgálva

elmondhatjuk, hogy mikroaerob körülményen mindhárom (hangyasav, ecetsav, tejsav) esetében nagyobb hozamot számítottam, mint anaerob körülményen. Így a hangyasav esetében 0,581 mM/mM és 0,365 mM/mM hozamot számíthatunk a fermentációra vonatkoztatva rendre mikroaerob és anaerob körülményeken. A tejsav tekintetében közel dupla mértékű hozamot figyelhetünk meg mikroaerob körülményeken. Anaerob fermentáció során 0,121 mM/mM hozamot számítottam, míg ez mikroaerob körülményen 0,228 mM/mM volt. Az ecetsavat illetően ugyancsak nagy különbséget vélhetünk felfedezni a mikroaerob körülményekre. Az anaerob körülmények esetén 0,62 mM/mM hozamot produkáló mikroaerob körülményekhez képest 0,355 mM/mM értékű hozamot számítottam (27.Ábra).

5.3.2. Bioreaktoros fermentáció glicerinnel történő felhasználásával

A glicerinnel, egy nehezen metabolizálható szubsztrátnak bizonyult a fermentáció során, úgy a fajlagos növekedési sebességeket, a maximális biomassza koncentrációt, illetve a termelődött szerves savak hozamát illetően is. A glicerinnel történő felhasználásával és a mikroaerob körülmények biztosításával, a törzs hatékonyságának bizonyult, az anaerob körülményekhez képest. Közel háromszoros fajlagos növekedési sebesség különbség van a mikroaerob és anaerob körülmények között. A törzs mikroaerob fermentációs körülményen 0,182 h⁻¹ fajlagos növekedési sebességet mutatott, ellenben az anaerob módon működő rendszer esetén csak 0,05 h⁻¹ sejtnövekedési ütemet számítottam. Ehhez a szubsztráthoz tartozó maximális sejtkoncentráció a mikroaerob körülményen működő reaktor esetében 0,46 g/L volt, míg anaerob módon 0,17 g/L értéket számítottam. A céltermék hozamát figyelembe véve láthatjuk, hogy itt is jelentős különbség van mikroaerob és anaerob módon üzemelt reaktorok esetében. A borostyánkősav hozamát illetően elmondható, hogy mikroaerob körülményen közel hatszoros mértékű hozamot számítottam viszonyítva az anaerob körülményekhez, így eredményül rendre, 0,184 mM/mM és 0,033 mM/mM értékű hozamot kaptam. A CO₂/AIR eleggyel ellátott bioreaktorban 0,79 g/L koncentrációjú borostyánkősavat mértem, ezzel ellentétben az anaerob körülményeken működő reaktorban elenyésző, 0,15 g/L koncentráció értéket számoltam, mely az egész kutatásban fellelhető minimum borostyánkősav koncentráció. A fennmaradó három szintetizálódó szerves sav közül csak a hangyasavra sikerült eredményeket kapni, a tejsav és ecetsav a fermentációt követő analízis során nem volt azonosítható. A hangyasav hozamát vizsgálva felfigyelhetünk arra, hogy az anaerob körülmények (0,056 mM/mM) hasznosabbnak bizonyulnak a mikroaerob körülményekhez

(0,02 mM/mM) viszonyítva, hiszen két és félszer nagyobb hozamot tapasztalhatunk (27.Ábra).

5.3.3. Bioreaktoros fermentáció xilóz szubsztrát felhasználásával

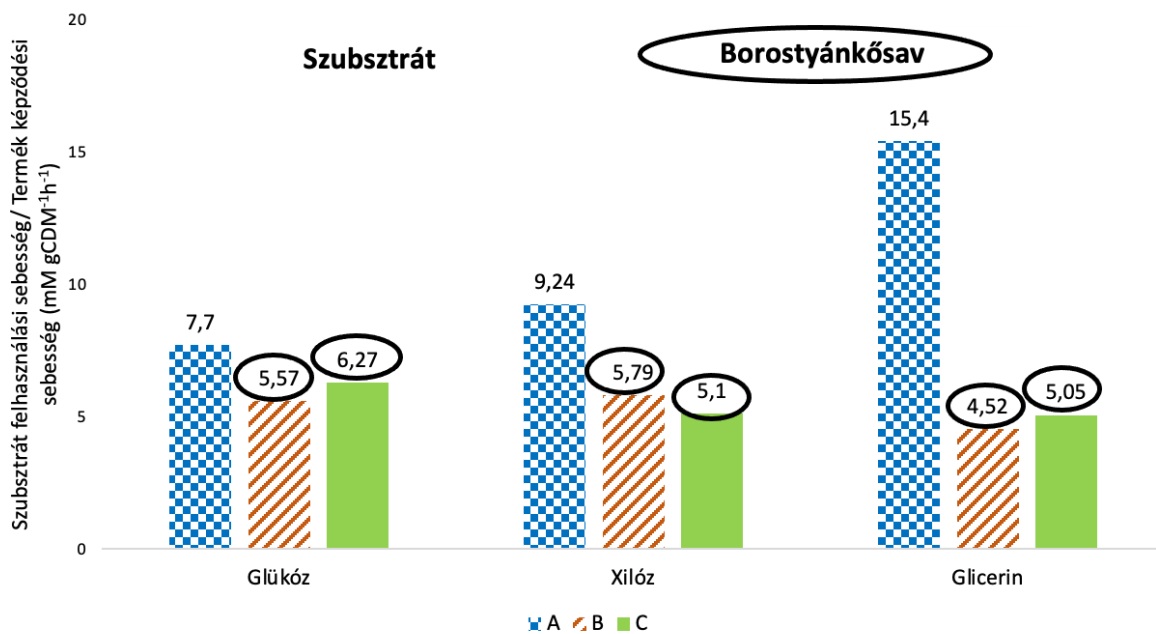
A harmadik és egyben utolsó vizsgált szubsztrát a xilóz volt. Ezt a szénforrást alkalmazva nagyobb fajlagos növekedési sebességet kaptam a mikroaerob ($0,235 \text{ h}^{-1}$) körülményekre mint az anaerobra ($0,188 \text{ h}^{-1}$), viszont az elért maximális sejtkoncentráció közel hasonló volt, rendre $0,72 \text{ g/L}$ és $0,71 \text{ g/L}$ értéket eredményezett. Úgy a CO_2/LEV keverékkel, mint kizárólag CO_2 gázfázissal átáramoltatott bioreaktorokban tapasztalt fermentáció tizedik órájában az előbb említett maximális sejtkoncentrációt tapasztaltam. A céltermék koncentrációját figyelembe véve fordított összefüggést figyelhetünk meg. Míg a folyadékkultúrában mikroaerob körülményen nagyobb fajlagos sejtnövekedési sebességet ért el a baktériumtörzs, addig a borostyánkősav koncentrációja alacsonyabb ($1,95 \text{ g/L}$) volt. Az anaerob körülményen, alacsonyabb biomassza koncentrációt mértem, és ezzel szemben magasabb ($2,13 \text{ g/L}$) céltermék koncentrációt detektáltam. A képződött borostyánkősav szubsztrátra vonatkoztatott hozama mikroaerob körülmények esetén $0,23 \text{ mM/mM}$ volt, míg anaerob környezetben megközelítőleg 20%-al magasabb volt ennek értéke $0,277 \text{ mM/mM}$. A szintetizálódott egyéb szerves savak viszonyát vizsgálva láthatjuk, hogy hangyasav és ecetsav megközelítőleg hasonló hozamban keletkezik, míg a tejsav hozama ezektől jóval alacsonyabb. A hangyasav hozamát elemezve láthatjuk, hogy úgy mikroaerob ($0,373 \text{ mM/mM}$), mint anaerob ($0,371 \text{ mM/mM}$) körülményen nincs jelentős eltérés. A legalacsonyabb hozammal a tejsav keletkezett, megközelítőleg 5,5-7-szer kisebb értékű hozamot számíthatunk a hangyasavhoz viszonyítva, így mikroaerob körülményen $0,067 \text{ mM/mM}$, míg anaerob környezetben $0,049 \text{ mM/mM}$ hozamot eredményezett. Az ecetsav hozama közel állt a hangyasav hozamához, ahol a mikroaerob és anaerob körülmények között közel 10%-os eltérést figyelhetünk meg. CO_2/LEV gázkeverékkel dúsított bioreaktorban történő fermentáció esetén $0,335 \text{ mM/mM}$, míg kizárólag CO_2 -al $0,367 \text{ mM/mM}$ hozamot számítottam (27.Ábra).

5.4. A bővített *in silico* metabolikus modellel történő elemzések kísérleti adatok alapján

A bioreaktoros laboratóriumi kísérletekből számított paraméterek újonnan alapnak számító információkkal szolgáltak egy második számítógépes modellezéshez. Így a modellt nem a szakirodalomból vett adatokkal vizsgáltam, hanem a saját kísérleteimből származó paraméterekkel. A kísérlet során mért optikai denzitás értékekből, és a fogyott szubsztrát mennyiségekből azokat a szubsztrát felhasználási sebességet számítottam, melyek aztán a modell beviteli értékei lettek. Mivel az *in silico* elemzéseket anaerob körülményen végeztem, így az anaerob laboratóriumi eredményeimből számoltam azokat a beviteli paramétereket, amelyekkel a modellt újból elemzésnek vetettem alá. A laboratóriumi kísérletekben, a kontrollált és anaerob bioreaktoros elemzések során a baktériumtörzs növekedésének exponenciális szakaszában számítottam a modell számára biztosított paramétereket. Az exponenciális növekedési szakaszban felhasznált szubsztrát koncentrációja a képződött biomassza koncentrációjára vonatkoztatva adta az adott szubsztrát felhasználási sebességét. Ugyanígy számítottam a keletkező céltermék képződési sebességét, a fermentáció exponenciális szakaszára, így vonatkoztatva a borostyánkősav koncentrációját a biomassza koncentrációjára. Az így számított adatokból összehasonlítást végezhetünk a szakirodalomból származó adatokból kapott predikciók, és a laboratóriumi kísérletekből kapott eredményekből.

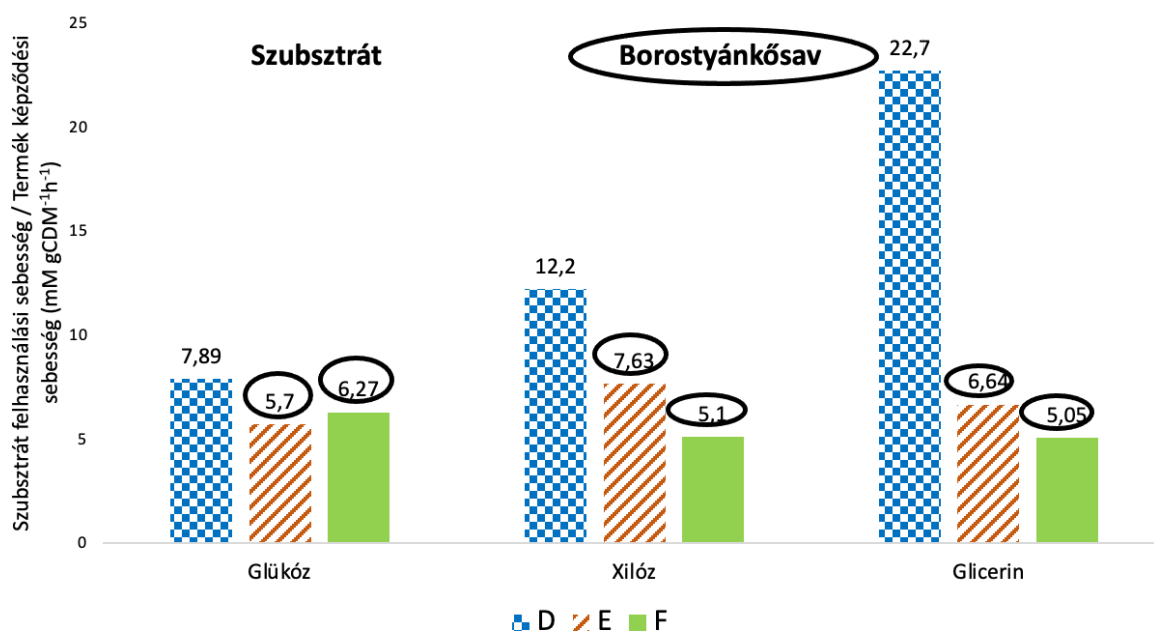
A **28.Ábrán** láthatjuk, hogy a szakirodalomból vett szubsztrát felhasználási sebességek (glükóz, xilóz, glicerin - 7,7-9,24-15,4 mM gCDM⁻¹h⁻¹) esetén a prediktált borostyánkősav képződési sebessége szubsztrátonként rendre 5,57-5,79-4,52 mM gCDM⁻¹h⁻¹. A **28.Ábra** csoportosan megjelenített utolsó oszlopai jelölik a saját fermentációból származó mérési eredményeimet, melyeket visszavonatkoztattam a modellben használatos mértékegységre, a termékképződési sebességre. Glükóz esetén megfigyelhető, hogy a szakirodalmi bemeneti adatra kapott számítógépes előrejelzés borostyánkősav képződési sebessége alacsonyabb, mint amit a laborkísérleteimből kaptam. Ennek magyarázata lehet, hogy a gyakorlati kísérletek esetén a tápoldat élesztőkivonatot is tartalmazott, mely növelte a biomassza koncentrációját, így az elért maximális borostyánkősav koncentrációjára is hatással lehetett. A szakirodalomból vett bemeneti paraméterekre elvégzett *in silico* elemzések alapján elmondható, hogy a rendelkezésre álló szén 72,3%-a borostyánkősavvá alakult. Az *in silico* elemzések alapján a xilóz szubsztrát esetén a felhasználható szén közel 63%-a fordult borostyánkősav képződésére. Glicerin szénforrás alkalmazásával számíthatunk




a legkisebb szubsztrát-termék átalakulásra, ennek mértéke 29,3%.



28.Ábra *Basfia succiniciproducens* szubsztrát felhasználási sebességének és a borostyánkősav képződési sebességének (szakirodalmi adatokkal végzett *in silico* predikciók és saját laboratóriumi adatok hasonlítása) grafikus ábrázolása. (A) - szakirodalomból származó szubsztrát felhasználási sebesség, (B) - szakirodalomból származó szubsztrát felhasználási sebességekre elvégzett számítógépes predikciók alapján kapott borostyánkősav képződési sebességek, (C) - saját laboratóriumi kísérletekből származó számított borostyánkősav képződési sebességek

A következő és egyben utolsó elemzésem során a számítógépes elemzéseimet a laboratóriumi kísérletekből származó, vonatkoztatott értékekre végeztem (**29.Ábra**). Az így kapott bemeneti paraméterekről elmondható, hogy mindhárom szénforrás esetén nagyobb értéket számítottam, mint a szakirodalom alapján használt értékek. Glükóz esetén 2,46%-al, xilóz esetén 32%-al, míg glicerín esetén 47%-al nagyobb szubsztrát felhasználási sebességet számítottam. Mivel az *in silico* elemzések lineáris matematikai egyenlet megoldásnak minősülnek, emiatt a szakirodalomhoz viszonyítottan növelt bemeneti szubsztrát felhasználási sebességekre arányosan nagyobb borostyánkősav képződési sebességeket kaptam. Így glükóz esetén 7,89 mM gCDM⁻¹h⁻¹ bemeneti értékre 5,7 mM gCDM⁻¹h⁻¹, xilóz esetén 12,2 mM gCDM⁻¹h⁻¹ szubsztrát felhasználási sebességre 7,63 mM gCDM⁻¹h⁻¹, míg a glicerín esetén 22,7 mM gCDM⁻¹h⁻¹ értékre 6,64 mM gCDM⁻¹h⁻¹ borostyánkősav képződési sebességet eredményezett a számítógépes predikció. *In silico* elemzésekre glükóz, xilóz és glicerín szénforrások esetén a szubsztrát-termék konverzió rendre 72,2%, 62,5% és 29,2% arányú volt a mérésekből származtatott paraméterekre elvégzett predikciókra.

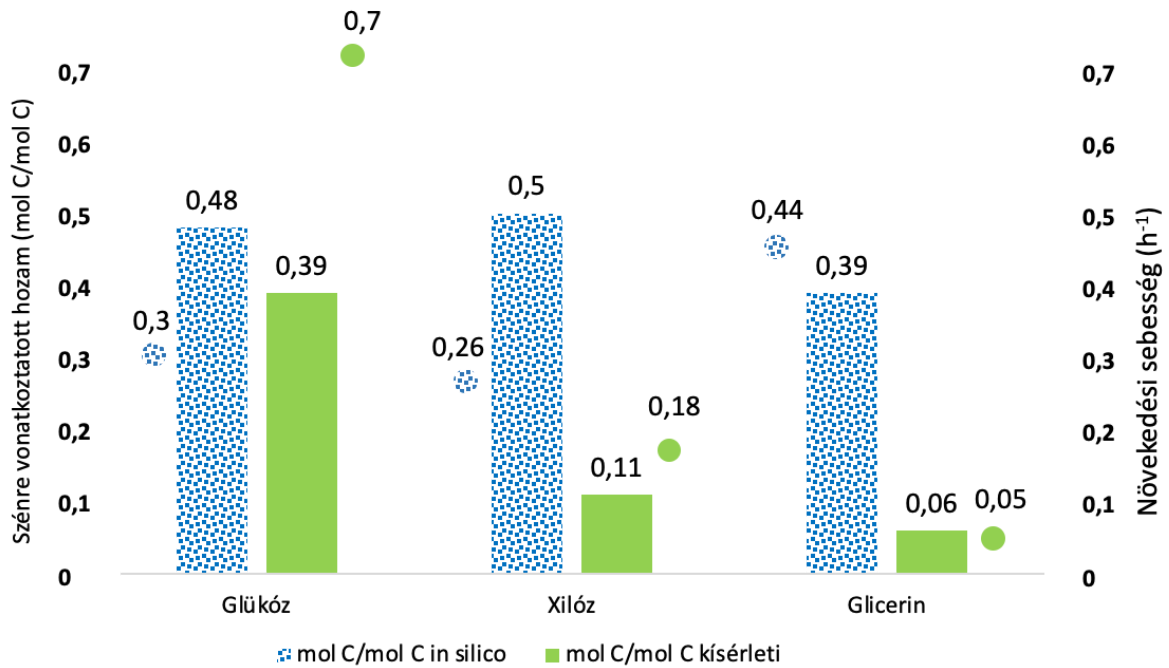


29.Ábra *Basfia succiniciproducens* szubsztrát felhasználási sebességeinek és a borostyánkősav képződési sebességeinek (mérési adatokból vonatkoztatott paraméterekre elvégzett *in silico* predikciók, és laboratóriumi adatok hasonlítása) grafikus ábrázolása.  (D) - méréseimből származtatott szubsztrátok felhasználási sebessége,  (E) - méréseimből származó szubsztrátok felhasználási sebességeire elvégzett számítógépes predikciók alapján kapott borostyánkősav képződési sebességek,  (F) - saját laboratóriumi kísérletekből származó számított borostyánkősav képződési sebességek

A **30.Ábra** a szubsztrát-termék átalakulást szemlélteti. Eredményeimet az elemzett három szénforrásra (glicerin, glükóz, xilóz), a két vizsgálati körülmény esetén taglalom. Az összehasonlításban a számítógépes predikciókat, valamint a laboratóriumban elvégzett kísérletekből származó eredményeket mutatom be. Az oszlopdiagramokon a biokonverziókat láthatjuk, míg a pont ábrázolások a növekedési sebességeket mutatják, rendre a számítógépes predikciókra és a laborkísérletekre. A számításaimat a szaporodás exponenciális szakaszára vonatkoztattam.

A kutatásban vizsgált három szubsztrátot elemezve, a következőket mondhatjuk el. Glükóz esetén a szénre vonatkoztatott hozamok közötti eltérés csupán 25%, a számítógépes predikciók és a gyakorlati kísérletek esetében. Az *in silico* elemzések esetén 0,48 mol C/mol C, míg a laboratóriumban elvégzett kísérletek esetén 0,39 mol C/mol C hozamot számítottam. Ellenben a laborkísérletek esetében több mint kétszeres fajlagos növekedési sebesség különbséget figyelhetünk meg, 0,3 h⁻¹ és 0,7 h⁻¹ értékben, rendre *in silico* és laborkísérletekre. Xilóz szubsztrát felhasználásával számítógépes predikciókkal 0,26 h⁻¹ növekedési sebesség mellett 0,5 mol C/ mol C hozamot számítottam, míg a kikísérletezett eredmények esetében

jóval alacsonyabban, $0,18 \text{ h}^{-1}$ sejtszaporodási sebességet és $0,11 \text{ mol C/mol C}$ hozamot. A laborkísérletek során a három vizsgált szénforrás közül a glicerin alkalmazásánál tapasztaltam a legkisebb sejtnövekedési sebességet és termék-szubsztrátra vonatkoztatott hozamot. Emellett a glicerin esetében volt a legnagyobb eltérés a számítógépes predikciók és gyakorlati kutatás között.



30.Ábra Szénre vonatkoztatott hozam a három felhasznált szubsztrát esetén. *In silico* és laborkísérletek eredményei

6. Következtetések és eredmények tovább fejleszthetősége

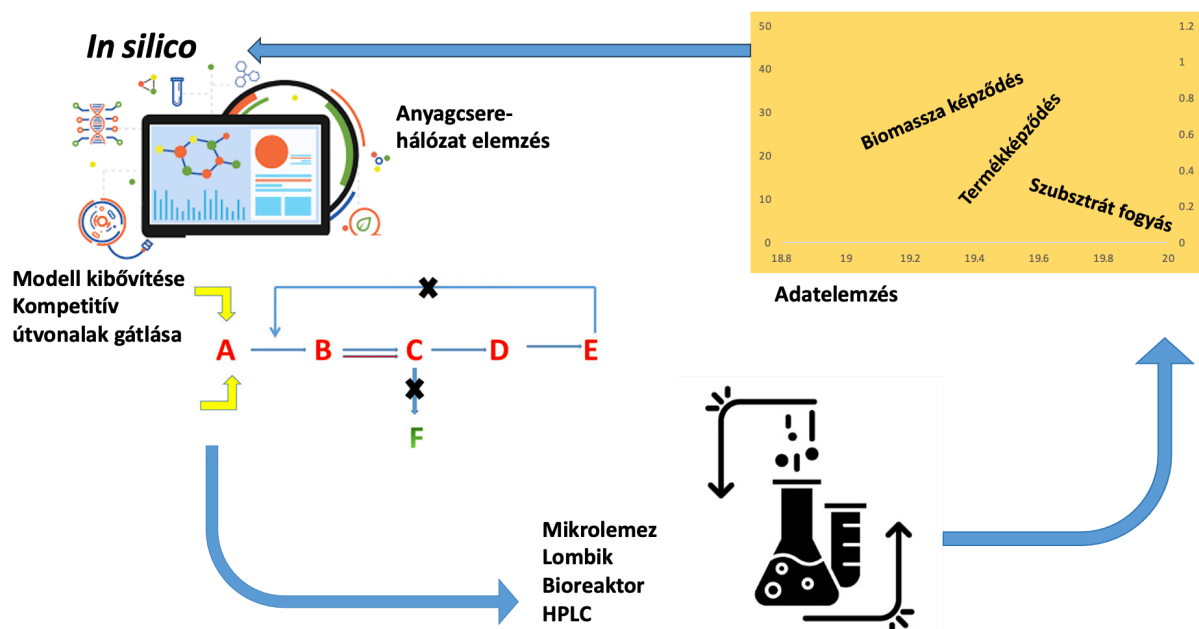
Kutatómunkám központját az *in silico* szimulációk és gyakorlatban kikísérletezett metabolikus termelőképes elemzése képezte. A modern biotechnológia elengedhetetlen része a valóság számítógépes leírása, mely egy-egy folyamathoz jelentős költséghatékonysággal járul hozzá. Jelen PhD fényében két nagy részre osztható: első az *in silico* elemzések míg a második a laborban elvégzett kísérletek. A számítógépes elemzések is tovább bonthatók. Első lépésben a rendelkezésre álló törzsre specifikus modellt bővítettem új paraméterekkel és egyenletekkel. Ezt követően a szakirodalomban fellelhető szubsztrát felhasználási sebességekkel különböző elemzéseket végeztem. A számítógépes elemzések második fázisát a laborkísérletek után hajtottam végre, az itt használt értékeket már a saját mérési eredményekből származtattam. A laborban elvégzett kísérletek során mikrolemes térfogattal, lombikos vizsgálatokkal, és bioreaktorban történő fermentációkkal elemeztem a törzset, vizsgálva szubsztrát hasznosító képességét és metabolikus profilját. A kutatómunka folyamatának sematikus megjelenítését a **31.Ábra** mutatja be.

A borostyánkősav kiemelt fontosságú alapmolekula, melyet az ipar széles spektrumában használnak, így a mezőgazdaságban, élelmiszeriparban, gyógyszeriparban és nem utolsósorban különféle biológiailag lebomló műanyagok gyártásában is. A század elejéig a szükséges mennyiséget jórészt kémiai szintézis révén állították elő, kőolajat használva. Fontosságát mi sem bizonyítja jobban, minthogy az Egyesült Államok Energiaügyi Minisztériuma által közzétett 12 legfontosabb alapmolekulák listájában ott találjuk a borostyánkősavat. Azért, hogy a petrolkémiai iparra nehezedő környezetkárosító negatív hatásokat ki lehessen küszöbölni, széleskörű kutatások zajlanak világszerte. A biológiai előállításához szükséges mikroorganizmusokat, továbbiakban racionális génszerkesztéssel módosítva, akár a már működő kémiai szintézisek hozamához hasonló borostyánkősav hozam érhető el.

Dolgozatomban egy kevésbé ismert, de mégis nagy potenciállal rendelkező baktériumtörzset vizsgáltam és választottam ki, amely egy fontos szerves savat, a borostyánkősavat termeli anyagcsere folyamatai során. A *Basfia succiniciproducens* egy kapnofil, marhabendőből izolált és a nemzetközi adatbázisokban is nyilvántartott baktérium. A biotechnológia versenyképességét a következő hármas határozza meg: hozam, termelési

sebesség és lehetségesen elérhető maximális céltermék koncentráció. A kihívás abban rejlik, hogy olyan alapanyagokat használjunk fel a bioszintézisre, melyek nemcsak a kapott termék fenntarthatóságát tartják szem előtt, de versenyképessé tegyék az egyéb iparágakból származó melléktermékeket. Példaként említhető a glükóz, xilóz és glicerin, melyek rendre a cukorgyártásból, lignocellulóz alapú technológiából és biodízel gyártásából származó melléktermékek.

Az idő múlásával egyre több olyan megközelítés lát napvilágot, melyeknek köszönhetően biológiai rendszereket tanulmányozhatunk és racionálisan szerkeszthetünk. Ezeknek a megközelítéseknek jelentős képviselője a rendszerbiológia, mely által a genotípus és fenotípus közötti komplex kapcsolatokat elemezhetjük, olyan metabolikus modellek felhasználásával, melyek az adott organizmust több-kevesebb részletességgel írja le. A genomléptékű metabolikus modellek vagy GSM-ek (**G**enom-**s**cale **m**odel) matematikai egyenletekből származó elemzések első lépése az adott organizmus metabolikus hálózatának leképezése révén (MatLab, COBRA). Így a minél részletesebben leírt modellek a laboratóriumban elvégzett kísérletek előrelátható eredményeit egyre pontosabban prediktálják. Ennek az ok-okozati összefüggésnek végeredménye a kísérletek egyszerűsödése, valamint anyagi vonzatának csökkentése.



31.Ábra A kutatás folyamatának sematikus összefoglalója

A 31.Ábrán összefoglalt kutatómunka részletes magyarázata:

- sikeresen megtörtént a xilóz és glicerín szubsztrátok és ezek metabolizmusának (EC 5.3.1.5 - xilóz-izomeráz, EC 2.7.1.17 - xilulóz-kináz és EC 2.7.1.30 - glicerín-kináz) *in silico* modellbe történő integrálása
- glükóz, glicerín és xilóz szubsztrátok esetén tömegegyensúly elemzés vizsgálata
- az előbbieken tárgyalt szubsztrátokra elvégzett elméleti maximumok, valamint a gén deléciós technikák (*Δpfl* és *Δldh*) révén elvégzett predikciók
- 5-20 g/L szubsztrátkoncentráció mellett tíz különféle szubsztrátra (arabinóz, fruktóz, glicerín, glükóz, inulin, laktóz, maltóz, maltodextrin, mannóz, xilóz) elvégzett mikrolemes térfogatú előkísérletek három különböző tápoldatban (TSB, BHI, M9)
- TSB tápoldatban mikrolemezen három szubsztrát (glükóz, glicerín, xilóz) esetén 5-10-15-20-25 g/L koncentrációval elvégzett kísérletek
- BHI tápoldatban mikrolemezen az előbbieken felsorolt három szubsztrát esetén 5-20 g/L koncentrációval elvégzett kísérletek
- M9 költséghatékony tápoldatban mikrolemes térfogatban a három szubsztrát esetén 5-15-30-50-70 g/L szubsztrátkoncentrációval és 0,1-1 g/L koncentrációjú élesztőkivonattal elvégzett kísérletek
- lombikban elvégzett kísérletek a három tápoldat (TSB, BHI, M9) esetén 20 g/L szubsztrátkoncentrációval, a három szubsztrátra (glükóz, glicerín, xilóz)
- bioreaktorban, szabályozott körülményen M9 tápoldatban a három szubsztrátra (glükóz, glicerín, xilóz) elvégzett kísérletek, 20 g/L szubsztrátkoncentrációval 60 ml/min CO₂ és 60/60 ml/min CO₂/LEV gázkeveréket alkalmazva
- nagy teljesítményű folyadékromatográfiás mintaelemzés
- a laborkísérletekből származó adatokból új *in silico* bemeneti paraméterek generálása és tömegegyensúly elemzés

Az előbbieken részletezett *in silico* és laboratóriumi körülményeken végbemenő számítógépes predikciókból és fermentációs kísérletekből nyert adatok alapján, az alábbi következtetéseket tudjuk felsorakoztatni:

1. sikeresen megtörtént az *in silico* modellbe a számunkra kiemelt fontossággal bíró szubsztrátok (glicerín, xilóz) és metabolikus útvonalainak (xilóz-izomeráz - EC 5.3.1.5, xilulóz-kináz - EC 2.7.1.17 és glicerín-kináz - EC 2.7.1.30) integrálása. A metabolikus modell szakirodalmi források alapján ezidáig a glükóz szénforrás esetén volt elérhető (Becker és mtsai. 2013).

2. változó szubsztrát felhasználási sebesség mellett a számítógépes elemzések során eltérő biomassza növekedési sebességet kaptam, emellett glükóz és xilóz esetén hasonló képződési sebességgel eredményezett borostyánkősavat, míg glicerinnel alkalmazásával láthattuk a legkevesebb célterméket
3. a képződő szerves savak közül mindhárom szubsztrát esetén (glükóz, glicerinnel és xilózzal) az *in silico* elemzések során a hangyasav képződési sebessége volt a legmagasabb
4. elméleti maximum számításakor *in silico* predikciók során azt tapasztaltam, hogy ha gyakorlatban korlátozható lenne a képződő biomassza növekedési sebessége, több mint kétszeresére lehetne növelni a borostyánkősav képződési sebességét
5. laboratóriumban végzett előkísérleteim eredményeképpen a felhasznált szubsztrátok (arabinóz, fruktóz, glicerinnel, glükózzal, inulinnal, laktózzal, maltózzal, maltodextrinnel, mannózzal, xilózzal) egy (inulinnal) kivételével, mindenik alkalmas a *Basfia succiniciproducens* törzs nevelésére, úgy 5 g/L, mint 20 g/L alkalmazott szubsztrátkoncentráció esetén. Bővítettem a szakirodalomban leírt felhasználható szubsztrátok sorát, ahol eddig a glükózzal, xilózzal és glicerinnel mellett, a galaktózzal, szacharózzal, trehalózzal és mannitollal használták (Scholten és Dägele 2008; Kuhnert és mtsai. 2010).
6. a tápoldat komplexitásából adódóan a TSB és BHI közegek esetén 2-4 óra volt az exponenciális szakasz elérésének időintervalluma. M9 minimál tápoldatot alkalmazva ez az idő kitolódik a 4-6 óráig
7. laborkísérletek eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a mikrolemezes elemzések esetében a xilóz, mannóz és maltóz volt az a három szénforrás, amelyek esetében a törzs maximális biomassza koncentrációt produkált
8. az inulinnal, mint alkalmazott szubsztrát minimál (M9) tápoldatban az előkísérletek során a leggyengébb fajlagos növekedési sebességet mutatta
9. komplex TSB tápoldat esetén a vizsgált 5-10-15-20-25 g/L koncentrációk esetén nem tapasztaltam jelentős különbséget a baktériumtörzs fajlagos növekedési sebesség tekintetében
10. ugyancsak komplex BHI tápoldatot használva az 5 és 20 g/L-es alkalmazott szubsztrátkoncentrációk közül, a 20 g/L mutatott biztató eredményt
11. M9 tápoldatot alkalmazva az 5-70 g/L koncentráció intervallumban vizsgáltam a törzs növekedését. Megállapításom szerint a 50 g/L szubsztrátkoncentráció egy inhibíciós határérték

12. mikrolemezen végzett kísérleteim eredményeképpen a xilóz alapú M9 tápoldat volt a legproduktívabb (elért maximális sejtkoncentráció tekintetében), ami eredményeképpen úgy 0,1 g/L mint 1 g/L élesztőkivonatot alkalmazva maximális biomassza koncentrációt sikerült elérni, viszonyítva a többi szénforráshoz
13. a lombikban végzett kísérleteim rámutattak arra, hogy a glükóz és xilózt tartalmazó komplex TSB tápoldatokban a baktériumtörzs hasonló fajlagos növekedési sebességet mutatott. Amikor glicerint tartalmazó tápoldatot használtam, alacsonyabb meredekségű növekedési szakaszt figyeltem meg.
14. BHI komplex tápoldatot használva mindhárom szubsztrátot felhasználva, egy erősen meredek növekedési szakaszt (exponenciális szakasz) figyeltem meg
15. M9 tápoldatban, mindhárom szubsztrát felhasználásával megközelítőleg 0-4 óráig tart az adaptációs fázis, amit enyhe meredekséggel jellemezhető nyolc órás exponenciális szakasz követ. A vizsgálat során valószínűsíthetően a komplex tápoldatban előnevelt sejteknek nagy változást jelentenek a minimál körülmények, ezért jelentkezik egy hosszabb (más tápoldatokhoz viszonyítva) adaptációs szakasz.
16. a sejtnövekedési sebesség tekintetében a bioreaktorban elvégzett kísérletek során glükóz szénforrást tartalmazó minimál tápoldat (M9) esetén az anaerob körülményeket biztosító, kizárólag CO₂ gázfázist tartalmazó kísérletek mutattak előnyös eredményeket. Erre a szakirodalomban is találunk vonatkozó információkat (Lange és mtsai. 2017; D'ambrosio, Alfano, és Cimini 2021)
17. glicerint és xilózt tartalmazó tápoldatok felhasználásakor a CO₂/LEV gázkeverék mutatkozott hatékonyabb körülménynek, ezeknél magasabb volt a baktériumtörzs fajlagos növekedési sebessége. Minimál tápoldat (M9) és a felhasznált szubsztrátok esetén a szakirodalmat megközelítő eredményeket értem el (Eleni és mtsai. 2021; Stylianou és mtsai. 2020; Dimitrios és mtsai. 2018).
18. borostyánkősav hozamának tekintetében a glükóz és glicerin esetén volt hasznosabb a gázkeverék (CO₂/LEV) alkalmazása. Xilózt tartalmazó tápoldatban az anaerob körülmények esetén tapasztaltam magasabb borostyánkősav hozamot, 0,277 mol/mol értékben. A témában relevánsan tevékenykedő kutatócsoportok borostyánkősavra vonatkoztatott hozamaihoz közeli értéket sikerült elérnem a fermentációk során (D'ambrosio, Alfano, és Cimini 2021)

Jelen kutatásban elvégzett kísérletsor eredményeképpen mélyebb belátást nyerhettünk a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs modellezéséről, úgy a számítógépes elemzéseket, mint a laboratóriumban elvégzett kísérleteket figyelembe véve. Legelső lépésben a törzsre specifikus *in silico* modellt bővítettem, a tudomány és számomra érdekelt szubsztrátokkal és azok metabolizmusának útvonalaival, majd különféle predikciókat hajtottam végre. A számítógépes modellezést követően a laboratóriumi munkát tekintve először mikrolemezen vizsgáltam a törzs viabilitását és növekedésdinamikáját, széleskörű szubsztrátok felhasználásával. Az itt nyert eredményekből tovább elemeztem a baktériumtörzset nagyobb térfogatban, hasonló körülményen és tápoldatokban. Az így nyert információkat felhasználva szabályozott körülmények között, bioreaktorban neveltem a sejtkultúrát és az innen származó mintákból különféle analíziseket végeztem.

A jövőben megvalósítandó tervek két nagy fázisra bonthatók:

- bioreaktorban történő optimalizálás, a kutatásban szereplő további szénforrásokra és azok hasznosíthatóságára vonatkozóan
- kompetitív útvonalak gátlása, a baktériumtörzs számítógépes elemzései rámutattak arra, hogy céltermékkel versengő metabolikus útvonalak eliminálásával növelhető ennek hozama

7. Megbeszélés

Kutatásomban a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzset vizsgáltam, úgy az *in silico* metabolikus termelő képesség szempontjából, mint a laboratóriumban végzett kísérleti munkák segítségével. A számítógépes modell felhasználásával tömegegyensúly elemzéseket végeztem, valamint a céltermék elméleti maximumát vizsgáltam. *In silico* gén eliminációs technikákat alkalmazva, olyan metabolikus útvonalakat állítottam le, melyek révén a szén fluxusának felhasználásával növelhető a céltermék képződési sebessége és a biomassza növekedési sebessége. A laboratóriumból származó saját kutatási adataim felhasználásával elvégeztem a számítógépes modell elemzését laboratóriumi adatok alapján, hasonlítva a szakirodalomban fellelhető értékekkel. A laboratóriumban végzett munkák során előbb kis térfogatban, mikrolemezen bizonyítottam a törzs széles szubsztrát hasznosító képességét, ahol tíz különböző szénforrást felhasználva vizsgáltam a törzs viabilitását. A mikrolemezen végzett kísérleteket nagyobb térfogatban, lombikban folytattam, a három, kutatás szempontjából releváns szubsztrátra (glükóz, glicerin és xilóz) vonatkoztatva. A kontrollált fermentációs körülmények biztosítása céljából szabályozottan, bioreaktorban végeztem a fermentációt, ahol biztosítottam az állandó kémhatást, hőmérsékletet, kevertetést, és különböző gázfázisok és azok keverékeinek áramlását. Az innen származó mintákat nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel elemeztem, a szubsztrátok, metabolitok koncentrációjának meghatározása céljából és számításaimat ezekkel az adatokkal végeztem.

A több kutatócsoport által összeállított és szakirodalomban fellelhető metabolikus modellt felhasználva, első és fontos lépésként a kutatásban érdekelt szénforrásokra (glicerin, xilóz) bővítettem a rekonstrukciót - metabolikus modellt. Legjobb szakirodalmi ismereteim alapján, elsőként integráltam az *in silico* modellbe a fent említett két szénforrás hasznosíthatóságának metabolikus útvonalait. Ezidáig a glükóz szénforrás esetén végzett elemzésre kaphattunk eredményeket, Becker és munkatársainak köszönhetően (Becker és mtsai. 2013). Az általam bővített modell alkalmas a biomassza növekedési sebességének, valamint a különféle szerves savak képződési sebességeinek predikciójára, mely hasznos kapcsolódást mutathat a laboratóriumban végzett gyakorlati kísérletekkel.

A bővített számítógépes modellel történő tömegegyensúly elemzések után elvégeztem a számítógépes gén eliminációkat is. A piruvát-formiát-liáz a piruvát acetyl-coenzim-A és

hangyasav irányába történő konverzió biokatalizátora, ezáltal központi szerepe van a glükóz metabolizmusában. A számítógépes modell vizsgálata során célszerűnek láttam olyan elemzéseket elvégezni, amely során az előbbieken említett gén deléciójával a céltermék (borostyánkősav) képződési sebessége növelhető. A glükóz szénforrásra elvégzett gén eliminációs elemzések eredményei alapján elmondhatom, hogy a borostyánkősav képződési sebesség közel 50%-al növelhető az alapállapothoz (vad típus - mutáció nélkül) képest. Ugyanez elmondható a glicerin és xilóz esetében, ahol rendre 56,1% és 46,8%-os növekedés számítható.

A számítógépes körülmények között végzett szimulációk és azok eredményei alapján elmondhatom, hogy a *pflB* gén eliminációjával optimalizált baktériumtörzsben ésszerű elvégezni a borostyánkősav előállítását glicerin és xilóz szubsztráton is, gyakorlati körülmények között, így hozzájárulva a céltermék hozamának növeléséhez, ugyanakkor a fenntartható szubsztrátok további felhasználásához.

A laboratóriumban végzett mikrolemezes és lombikos kísérletek eredményei alapján elmondhatom, hogy a vizsgált tíz szubsztrát közül kilenc a *Basfia succiniciproducens* által felhasználható szénforrásnak bizonyult. Hasonló témában a szakirodalom szerint Kuhnert és kutatócsoportja tevékenykedett, ahol a baktériumtörzs szénforrás preferenciáját vizsgálták (Kuhnert és mtsai. 2010), amely alap tanulmány eredményeit jelen munka keretében a laktóz, maltodextrin és fruktóz szénforrásként való alkalmasságának bizonyításával egészítettem ki. Emellett számos tanulmány ismert, ahol különféle növényi hidrolizátumokat felhasználva, úgy sejtömeget, mint borostyánkősav képződést figyeltek meg (Cimini és mtsai. 2016; Maria és mtsai. 2016; Anna és mtsai. 2018). Ezen eredmények láttán szükségszerűnek tűnik, hogy további kutatásokban a laktóz, fruktóz vagy maltodextrin tartalmú komplex, ipari tápoldatok formájában megújuló alapanyagokat *Basfia* alapú biotechnológiai folyamatokban használjuk.

A bioreaktorban történő fermentáció során két különböző körülményt vizsgáltam. Első esetben mikroaerob körülmények elérése érdekében 60/60 mL/perc térfogatáramban szén-dioxid és levegő keverékét (CO₂/LEV) juttattam a reaktor légterébe, míg második esetben kizárólag szén-dioxidot 60 mL/perc térfogatáramban. A glükóz szénforrás felhasználásával a két körülményre eltérő eredményt kaptam: az anaerob körülmények jobban hozzájárulnak a baktérium fajlagos növekedési sebességéhez. A baktériumtörzs 53%-al nagyobb fajlagos növekedési sebességet mutatott a kizárólag szén-dioxiddal átáramoltatott bioreaktor esetében. A törzs a másik két szubsztrát (glicerin és xilóz) felhasználása esetén a mikroaerob körülményeken mutatott nagyobb fajlagos növekedési sebességet. A

borostyánkősav hozamát illetően a glükóz és glicerín szénforrások alkalmazásánál a mikroaerob körülmények bizonyultak hatékonyabbnak. Glükóz szénforrás kezdeti 20 g/L koncentrációjának felhasználásával 0,43 mol/mol borostyánkősav hozamot számítottam, míg glicerín esetében 0,184 mol/mol hozamot. Xilóz szénforrás alkalmazásával a borostyánkősav hozama 0,277 mol/mol értéket mutatott, ugyancsak kezdeti 20 g/L szubsztrátkoncentráció alkalmazásával. Az így számított, szubsztrátra vonatkoztatott termék hozama a szakirodalomban fellelhető adatokhoz hasonlóságot mutat, ahol glükóz, glicerín és xilóz szénforrásokat felhasználva 0,31-0,93 mol/mol hozammal bioszintetizáltak borostyánkősavat (Stylianou és mtsai. 2020; Scholten, Renz, és Thomas 2009; Mahsa és mtsai. 2019). A biomassza képződés és a borostyánkősav hozamának növeléséhez ugyanakkor szükség van a gázkeverékek összetételének, valamint adagolási sebességének optimalizálására. Ugyanakkor a kutatási munka egyik fő célja az *in silico* modell pontosítása, finomítása illetve a laboratóriumi kísérletek során nyert adatokkal való összehasonlítása volt, nem az ipari szintű borostyánkősav termelés. Meglátásom szerint, a bioreaktorban végzett fermentációs kísérletekből származó adatok, különösen az alkalmazott gázkeverék összetételének hatása a biomassza, illetve céltermék hozamra értékes információkat szolgáltat biotechnológiai eljárások kidolgozásához.

A laboratóriumban kikísérletezett eredményekből a számítógépes modellel ismét szimulációkat végeztem, az új, bővített modell kísérleti adatokkal való összehasonlítása céljából. A szakirodalomból vett adatokra végzett szimulációk, és a gyakorlatban kapott növekedési sebességek, valamint termékképződési sebességek nem mutattak számottevő különbséget. A borostyánkősav képződési sebessége szakirodalmi adatok alapján, számítógépes predikciók során glükóz, xilóz és glicerín esetében rendre 5,57-5,79-4,52 mM gCDM⁻¹h⁻¹ értéket mutatott. A laboratóriumban, bioreaktoros fermentációk során képződött borostyánkősav sebessége glükóz, glicerín és xilóz szubsztrátok esetében rendre 6,27-5,1-5,05 mM gCDM⁻¹h⁻¹ értéket adott.

Amikor a modellt a saját méréseimből származtatott szubsztrát felhasználási sebességekkel futtattam, ismételen nem mutatkozott jelentős különbség a számítógépes elemzések, és a laboratóriumban elért értékek között. A borostyánkősav képződési sebessége, a kutatásból származó adatok alapján, számítógépes predikciók során glükóz, xilóz és glicerín szubsztrátok esetében rendre 5,7-7,63-6,64 mM gCDM⁻¹h⁻¹ értéket mutatott. Itt megjegyzendő, hogy a számítógépes modellek validálása laboratóriumban elvégzett kísérletekkel, a rendszerbiológiában alkalmazott metabolikus modellek megbízhatóságához és a predikciók pontosításához járul hozzá.

8. Tézispontok

1. *In silico* modell kibővítése és predikciók - a számítógépes modell, valamint a valóság kapcsolatának minél pontosabb leírásának legfontosabb alapköve, a minél részletesebb modell megalkotása. Minél részletesebb egy mikroorganizmust leíró metabolikus modell, a benne található metabolikus útvonalak komplexitása annál pontosabb, így számítógépes predikciók végezhetőek el. Legjobb tudásom szerint elsőként integráltam a *Basfia succiniciproducens* számítógépes modelljébe a glicerín és xilóz hasznosulását biztosító útvonalakat. Az első megfogalmazott hipotézisre a következők adnak választ: a számítógépes modellbe integrált két új szubsztráttal (glicerín és xilóz), és ezek biokémiai felhasználásának matematikailag leírt egyenleteivel, újabb kapcsolódási pontokat határoztam meg a számítógépes modellezés és a valóság között. Az újonnan definiált és integrált szubsztrátokra végzett predikciók eredményeképpen, az alapmodellben már szereplő glükóz szubsztráthoz hasonlóan biomassza növekedési sebességére és borostyánkősav képződési sebességére vonatkozó adatot kaptam. Így biomassza tekintetében glükóz, xilóz és glicerín esetén rendre $0,3 \text{ h}^{-1}$, $0,26 \text{ h}^{-1}$ és $0,448 \text{ h}^{-1}$ növekedési sebességeket prediktáltam. A borostyánkősav képződési sebességét illetően a kapott eredmények a következők: $5,57 - 5,79 - 4,52 \text{ mM gCDM}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A módosított modellben, olyan reakcióegyenleteket elimináltam, amelyek akadályozzák a céltermék képződési sebességét. A piruvát-formiát-liáz gén deléciójakor, a glükóz és xilóz szubsztrátok alkalmazásakor, a borostyánkősav képződési sebessége rendre 67,59%-al és 68,1%-al emelkedik az alapállapothoz (vad típus - mutáció nélkül) viszonyítva. A glicerín esetében valamennyivel kevesebb, de itt is jelentős növekedés tapasztalható, a céltermék képződési sebessége 64%-al nőtt. A kapott eredményeim alapul szolgálhatnak egy későbbiekben elvégzett laboratóriumban történő anyagcsere mérnökségi kutatásnak.

2. *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs széles spektrumú szubsztrát metabolizáló képessége - előkísérleteimből kiderült, hogy a törzs a rendelkezésre álló szénforrások közül, egy kivételével (inulin) képes volt mindeniket felhasználni. Második feltevésre adott válaszként elmondhatom, hogy a mikrolemezen elvégzett kísérletek alapján a következő szubsztrátok alkalmasak a baktériumtörzs nevelésére: arabinóz, fruktóz, glicerín, glükóz, laktóz, maltodextrin, maltóz, mannóz és xilóz. A komplex (TSB, BHI) és minimál (M9) tápoldatok szénforrásokkal való társítása esetén jól

megfigyelhető sejtnövekedést fedeztem fel. A minimál tápoldat alkalmazásakor válik evidenssé, hogy a törzs az inulint nehezen tudja metabolizálni. A többi kilenc szénforrás alkalmazása azonban bizonyítja, hogy a különféle forrásokból származó monoszacharidok mindenike alkalmas a törzs nevelésére. Széleskörű szubsztrát hasznosító képessége vonzó kutatási “alannyá” teszi a PhD értekezésben tárgyalt baktériumtörzset.

Megvizsgálva a kutatásban szereplő baktériumtörzs természetes életformáját kijelenthetjük, hogy a kérődzők bendője tápanyagokban gazdag étletteret jelent. Ezzel ellentétben a minimál tápoldat, különféle ásványi anyagok és szubsztrát tartalmával egy drasztikus változást jelent a törzs viabilitására és céltermék bioszintézisére. A kutatás során használt minimál (M9) tápoldat esetén számottevő növekedési sebességeket értem el a baktériumtörzssel, a három szubsztrát (glükóz, glicerin és xilóz) esetén: $0,48 \text{ h}^{-1}$, $0,182 \text{ h}^{-1}$ és $0,235 \text{ h}^{-1}$. A borostyánkősav és egyéb metabolitok termelése bizonyítja, hogy a törzs a minimál körülmények ellenére képes életben maradni.

3. Baktériumtörzs és alkalmazott gázkeverék kapcsolata - bioreaktorban elvégzett vizsgálataim eredményeképp elmondhatom, hogy bizonyosságot nyert a feltételezés, miszerint nagyobb borostyánkősav hozam elérése érdekében a törzset mikroaerob körülmények között szükséges tartani a fermentáció ideje során. Mikroaerob körülmények és glicerin, valamint xilóz szénforrás alkalmazásakor a baktériumtörzs növekedési sebessége jóval nagyobb értéket mutat (glicerin és xilóz esetén rendre több mint háromszoros és közel 40%-os különbség az anaerob körülményekhez képest).

Ahogy a gázkeverék hatással van a biomassza képződésre, úgy ez megfigyelhető a többi termelődött szerves sav esetében is. Mikroaerob körülmények esetén és glicerin szubsztrát alkalmazásakor, úgy a biomassza koncentrációja, mint a borostyánkősav hozama jóval nagyobb (több mint háromszoros és ötszörös) volt. Xilóz felhasználásakor a biomassza képződés tekintetében is a mikroaerob körülmények bizonyultak előnyösebbnek. A céltermék hozamát illetően az anaerob körülmények mutatkoztak hatékonyabbnak. Glükóz szénforrás használatakor érdekes megjegyezni, hogy mikroaerob körülményen jóval kisebb sejtnövekedési sebességet ($0,482 \text{ h}^{-1}$) mértem, közel fele annyit, mint anaerob körülményen ($0,739 \text{ h}^{-1}$), ennek ellenére a borostyánkősav hozama több mikroaerob kondíció esetén ($0,437 \text{ mM/mM}$), mint anaerob körülményen ($0,379 \text{ mM/mM}$)

4. *In silico* és a gyakorlat - utolsó felvetésem azt a témakört boncolgatja, hogy egyszerű, részletekben nem gazdag modellek is alkalmasak lehetnek alapszintű predikciók elvégzésére. Kutatásom során *in silico* és laborkísérleteket végeztem annak érdekében, hogy a *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzs metabolizmusára minél szélesebb betekintést nyerhessek. Első körben szakirodalmi adatok alapján a számítógépes modellel predikciókat végeztem. Laborkísérleteim során a gyakorlati adatokból bemeneti paramétereket alkottam a modell számára, és ezekkel végeztem újabb elemzéseket. Végül elmondható, hogy a laborkísérleti adatokból származó új bemeneti szubsztrát felhasználási sebességekre elvégzett elemzések a valósághoz közeli előrejelzéseket mutatják. Ebből arra következtethetünk, hogy az egyszerű számítógépes modellek is alkalmasak arra, hogy alapszintű predikciókat végezzünk egy mikroorganizmus lehetséges viselkedését illetően.

9. Szakirodalmi jegyzék

- Agarwal, Lata, Jasmine Isar, and Rajendra K. Saxena. 2005. "Rapid Screening Procedures for Identification of Succinic Acid Producers." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 63 (1): 24–32.
- Alan A. 2005. "Systems Biology: Its Practice and Challenges", *Cell* 121 (May): 511-513
- Anestis, Vlysidis, Binns Michael, Webb Colin, and Theodoropoulos Constantinos. 2011. "Glycerol Utilisation for the Production of Chemicals: Conversion to Succinic Acid, a Combined Experimental and Computational Study." *Biochemical Engineering Journal* 58-59 (December): 1–11.
- Anna, Pennacchio, Vantorino Valeria, Cimini Donatella, Pepe Olimpia, Schiraldi Chiara, Inverso Michela, and Faraco Vincenza. 2018. "Isolation of New Cellulase and Xylanase Producing Strains and Application to Lignocellulosic Biomasses Hydrolysis and Succinic Acid Production." *Bioresource Technology* 259 (July): 325–33.
- Anthony, Burgard, Burk Mark, Osterhout Robin, Dien Stephen Van, and Jim Harry. 2016. "Development of a Commercial Scale Process for Production of 1,4-Butanediol from Sugar." *Current Opinion in Biotechnology* 42 (December): 118–25.
- Bai, Bing, Jie-Min Zhou, Mao-Hua Yang, Yi-Lan Liu, Xiao-Hui Xu, and Jian-Min Xing. 2015. "Efficient Production of Succinic Acid from Macroalgae Hydrolysate by Metabolically Engineered Escherichia Coli." *Bioresource Technology* 185 (June): 56–61.
- Balázs, Márta, Hunor Bartos, Szabolcs Lányi, Zsolt Bodor, and Ildikó Miklóssy. 2023. "Substrate Type and CO₂ Addition Significantly Influence Succinic Acid Production of *Basfia Succiniciproducens*." *Biotechnology Letters*, July, 1–13.
- Barros, M. de, S. Freitas, G. Padilha, and R. Alegre. 2013. "Biotechnological Production of Succinic Acid by *Actinobacillus Succinogenes* Using Different Substrate." *Chemical Engineering Transactions* 32 (June): 985–90.
- Bartos, Hunor, Márta Balázs, Ildikó Hajnalka Kuzman, Szabolcs Lányi, and Ildikó Miklóssy. 2021. "Production of High Added-Value Chemicals in *Basfia Succiniciproducens*: Role of Medium Composition." *Sustainability: Science Practice and Policy* 13 (6): 3513.
- Bechthold, I., K. Bretz, S. Kabasci, R. Kopitzky, and A. Springer. 2008. "Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources." *Chemical Engineering & Technology* 31 (5): 647–54.
- Becker, Jasper Reinefeld, René Stellmacher, Rudolf Schäfer, Anna Lange, Hanna Meyer, Michael Lalk, et al. 2013. "Systems-Wide Analysis and Engineering of Metabolic

- Pathway Fluxes in Bio-Succinate Producing *Basfia Succiniciproducens*.” *Biotechnology and Bioengineering* 110 (11): 3013–23.
- Becker, Scott A., Adam M. Feist, Monica L. Mo, Gregory Hannum, Bernhard Ø. Palsson, and Markus J. Herrgard. 2007. “Quantitative Prediction of Cellular Metabolism with Constraint-Based Models: The COBRA Toolbox.” *Nature Protocols* 2 (3): 727–38.
- Berovic, Marin, and Matic Legisa. 2007. “Citric Acid Production.” *Biotechnology Annual Review* 13: 303–43.
- Blankschien, Matthew D., James M. Clomburg, and Ramon Gonzalez. 2010. “Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for the Production of Succinate from Glycerol.” *Metabolic Engineering* 12 (5): 409–19.
- Bradfield, Michael F. A., and Willie Nicol. 2016a. “Continuous Succinic Acid Production from Xylose by *Actinobacillus Succinogenes*.” *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39 (2): 233–44.
- 2016b. “The Pentose Phosphate Pathway Leads to Enhanced Succinic Acid Flux in Biofilms of Wild-Type *Actinobacillus Succinogenes*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (22): 9641–52.
- Bretz, Karlheinz, and Stephan Kabasci. 2012. “Feed-Control Development for Succinic Acid Production with *Anaerobiospirillum Succiniciproducens*.” *Biotechnology and Bioengineering* 109 (5): 1187–92.
- Camilo S., López-Garzón, Ottens Marcel, Luuk A. M. van der Wielen, and Straathof Adrie J. J. 2012. “Direct Downstream Catalysis: From Succinate to Its Diethyl Ester without Intermediate Acidification.” *Chemical Engineering Journal* 200-202 (August): 637–44.
- Cheng, Ke-Ke, Xue-Bing Zhao, Jing Zeng, Ru-Chun Wu, Yun-Zhen Xu, De-Hua Liu, and Jian-An Zhang. 2012. “Downstream Processing of Biotechnological Produced Succinic Acid.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (4): 841–50.
- Cheng, Ke-Ke, Xue-Bing Zhao, Jing Zeng, and Jian-An Zhang. 2012. “Biotechnological Production of Succinic Acid: Current State and Perspectives.” *Biofuels, Bioproducts & Biorefining* 6 (3): 302–18.
- Chen, Ke-Quan, Jian Li, Jiang-Feng Ma, Min Jiang, Ping Wei, Zhong-Min Liu, and Han-Jie Ying. 2011. “Succinic Acid Production by *Actinobacillus Succinogenes* Using Hydrolysates of Spent Yeast Cells and Corn Fiber.” *Bioresource Technology* 102 (2): 1704–8.
- Chen, Zhen, Hongjuan Liu, Jianan Zhang, and Dehua Liu. 2010. “Elementary Mode Analysis for the Rational Design of Efficient Succinate Conversion from Glycerol by *Escherichia*

- Coli.*” *BioMed Research International* 2010 (September).
<https://doi.org/10.1155/2010/518743>.
- Chong, Li, Yang Xiaofeng, Gao Shi, Wang Huaimin, and Sze Ki Lin Carol. 2017. “High Efficiency Succinic Acid Production from Glycerol via in Situ Fibrous Bed Bioreactor with an Engineered *Yarrowia Lipolytica*.” *Bioresource Technology* 225 (February): 9–16.
- Cimini, Donatella, Ottavia Argenzio, Sergio D’Ambrosio, Licia Lama, Ilaria Finore, Rosario Finamore, Olimpia Pepe, Vincenza Faraco, and Chiara Schiraldi. 2016. “Production of Succinic Acid from *Basfia Succiniciproducens* up to the Pilot Scale from *Arundo Donax* Hydrolysate.” *Bioresource Technology* 222 (December): 355–60.
- D’ambrosio, Sergio, Alberto Alfano, and Donatella Cimini. 2021. “Production of Succinic Acid From *Basfia Succiniciproducens*.” *Frontiers of Chemical Engineering in China* 3 (December). <https://doi.org/10.3389/fceng.2021.785691>.
- Dimitrios, Ladakis, Michailidi Katerina, Vlysidis Anestis, Koutinas Apostolis, and K. Kookos Ioannis. 2018. “Valorization of Spent Sulphite Liquor for Succinic Acid Production via Continuous Fermentation System.” *Biochemical Engineering Journal* 137 (September): 262–72.
- Du, Chenyu, Sze Ki Carol Lin, Apostolis Koutinas, Ruohang Wang, Pilar Dorado, and Colin Webb. 2008. “A Wheat Biorefining Strategy Based on Solid-State Fermentation for Fermentative Production of Succinic Acid.” *Bioresource Technology* 99 (17): 8310–15.
- Eleni, Stylianou, Pateraki Chrysanthi, Ladakis Dimitrios, Vlysidis Anestis, and Koutinas Apostolis. 2021. “Optimization of Fermentation Medium for Succinic Acid Production Using *Basfia Succiniciproducens*.” *Environmental Technology & Innovation* 24 (November): 101914.
- Ergönül, Pelin Günç, and Cevdet Nergiz. 2010. “Determination of Organic Acids in Olive Fruit by HPLC.” *Czech Journal of Food Science* 28 (3): 202–5.
- Ferone, Mariateresa, Francesca Raganati, Alessia Ercole, Giuseppe Olivieri, Piero Salatino, and Antonio Marzocchella. 2018. “Continuous Succinic Acid Fermentation by *Actinobacillus Succinogenes* in a Packed-Bed Biofilm Reactor.” *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 11 (1): 1–11.
- Ferone, Mariateresa, Francesca Raganati, Giuseppe Olivieri, and Antonio Marzocchella. 2019. “Bioreactors for Succinic Acid Production Processes.” *Critical Reviews in Biotechnology*, March. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1592105>.
- Ferone, Mariateresa, Francesca Raganati, Giuseppe Olivieri, Piero Salatino, and Antonio

- Marzocchella. 2017. "Biosuccinic Acid from Lignocellulosic-Based Hexoses and Pentoses by *Actinobacillus Succinogenes*: Characterization of the Conversion Process." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 183 (4): 1465–77.
- Gerigk, M. R., D. Maass, A. Kreutzer, G. Sprenger, J. Bongaerts, M. Wubbolts, and R. Takors. 2002. "Enhanced Pilot-Scale Fed-Batch L-Phenylalanine Production with Recombinant *Escherichia Coli* by Fully Integrated Reactive Extraction." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (1): 43–52.
- Geyer, Roland, Jenna R. Jambeck, and Kara Lavender Law. 2017. "Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made." *Science Advances* 3 (7): e1700782.
- Giulio, Natta, and Pino Piero. 1958. Preparation of succinic acids. USPTO 2851486. *US Patent*, filed March 23, 1956, and issued September 9, 1958. <https://patentimages.storage.googleapis.com/95/4a/d1/c58e73701396f9/US2851486.pdf>.
- Glassner, David A., and Rathin Datta. 1992. Process for the production and purification of succinic acid. USPTO 5143834. *US Patent*, filed March 17, 1989, and issued September 1, 1992. <https://patentimages.storage.googleapis.com/04/12/b3/d366bf84ef37cd/US5143834.pdf>.
- Goldberg, I., and J. S. Rokem. 2009. "Organic and Fatty Acid Production, Microbial," January, 421–42.
- Guettler, M. V., D. Rumler, and M. K. Jain. 1999. "Actinobacillus Succinogenes Sp. Nov., a Novel Succinic-Acid-Producing Strain from the Bovine Rumen." *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 1 (January): 207–16.
- Gunnarsson, I. B., D. Karakashev, and I. Angelidaki. 2014. "Succinic Acid Production by Fermentation of Jerusalem Artichoke Tuber Hydrolysate with *Actinobacillus Succinogenes* 130Z." *Industrial Crops and Products* 62 (December): 125–29.
- Hariz, Hikmah Bajunaid, Siti Aisyah Syazwani Zaidi, Abdullah Amru Indera Luthfi, Nurul Adela Bukhari, Mohd Shaiful Sajab, Masturah Markom, Shuhaida Harun, Jian-Ping Tan, Gong-Tao Ding, and Peer Mohamed Abdul. 2023. "Succinic Acid Production from Oil Palm Biomass: A Prospective Plastic Pollution Solution." *Fermentation* 9 (1): 46.
- Harry-O'kuru, R. E., S. H. Gordon, and M. Klokkenga. 2015. "Bio-Generation of Succinic Acid by Fermentation of *Physaria Fendleri* Seed Polysaccharides." *Industrial Crops and Products* 77 (December): 116–22.
- Heisig, Carina, Jelka Diedenhoven, Christopher Jensen, Helmut Gehrke, and Thomas Turek. 2020. "Selective Hydrogenation of Biomass-derived Succinic Acid: Reaction Network and Kinetics." *Chemical Engineering & Technology* 43 (3): 484–92.

- Hema N., Sreenat K. P. 2018. "Molecular Identification of Bacterial Strains Producing Succinic Acid from Indian Sources." *Journal of Pure and Applied Microbiology* 12 (4): 2313–19.
- Hermann, B. G., and M. Patel. 2007. "Today's and Tomorrow's Bio-Based Bulk Chemicals from White Biotechnology: A Techno-Economic Analysis." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136 (3): 361–88.
- Hong, Soon Ho, Jin Sik Kim, Sang Yup Lee, Yong Ho In, Sun Shim Choi, Jeong-Keun Rih, Chang Hoon Kim, Haeyoung Jeong, Cheol Goo Hur, and Jae Jong Kim. 2004. "The Genome Sequence of the Capnophilic Rumen Bacterium *Mannheimia Succiniciproducens*." *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1010>.
- Hopewell, Jefferson, Robert Dvorak, and Edward Kosior. 2009. "Plastics Recycling: Challenges and Opportunities." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364 (1526): 2115–26.
- Hyohak, Song, and Lee Sang Yup. 2006. "Production of Succinic Acid by Bacterial Fermentation." *Enzyme and Microbial Technology* 39 (3): 352–61.
- Ito, Yuma, Takashi Hirasawa, and Hiroshi Shimizu. 2014. "Metabolic Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae* to Improve Succinic Acid Production Based on Metabolic Profiling." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78 (1): 151–59.
- Joeri, Beauprez, De Mey Marjan, and Wim K. Soetaert. 2010. "Microbial Succinic Acid Production: Natural versus Metabolic Engineered Producers." *Process Biochemistry* 45 (7): 1103–14.
- Kim, Tae Yong, Hyun Uk Kim, Jong Myoung Park, Hyohak Song, Jin Sik Kim, and Sang Yup Lee. 2007. "Genome-Scale Analysis of *Mannheimia Succiniciproducens* Metabolism." *Biotechnology and Bioengineering* 97 (4): 657–71.
- Kitano, Hiroaki. 2002. "Systems Biology: A Brief Overview." *Science* 295 (5560): 1662–64.
- Kuhnert, Peter, Edzard Scholten, Stefan Haefner, Désirée Mayor, and Joachim Frey. 2010. "Basfia *Succiniciproducens* Gen. Nov., Sp. Nov., a New Member of the Family Pasteurellaceae Isolated from Bovine Rumen." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (Pt 1): 44–50.
- Kurzrock, Tanja, and Dirk Weuster-Botz. 2010. "Recovery of Succinic Acid from Fermentation Broth." *Biotechnology Letters* 32 (3): 331–39.
- Lange, Anna, Judith Becker, Dennis Schulze, Edern Cahoreau, Jean-Charles Portais, Stefan Haefner, Hartwig Schröder, Joanna Krawczyk, Oskar Zelder, and Christoph Wittmann. 2017. "Bio-Based Succinate from Sucrose: High-Resolution ¹³C Metabolic Flux

- Analysis and Metabolic Engineering of the Rumen Bacterium *Basfia Succiniciproducens*.” *Metabolic Engineering* 44 (November): 198–212.
- Lata, Agarwal, Isar Jasmine, K. Meghwanshi Gautam, and Kumar Saxena Rajendra. 2007. “Influence of Environmental and Nutritional Factors on Succinic Acid Production and Enzymes of Reverse Tricarboxylic Acid Cycle from *Enterococcus Flavescens*.” *Enzyme and Microbial Technology* 40 (4): 629–36.
- Lee, Sang Jun, Hyohak Song, and Sang Yup Lee. 2006. “Genome-Based Metabolic Engineering of *Mannheimia Succiniciproducens* for Succinic Acid Production.” *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1939-1948.2006>.
- Leung, Cho Chark Joe, Anaxagoras Siu Yeung Cheung, Andrew Yan-Zhu Zhang, Koon Fung Lam, and Carol Sze Ki Lin. 2012. “Utilisation of Waste Bread for Fermentative Succinic Acid Production.” *Biochemical Engineering Journal* 65 (June): 10–15.
- Liang, Li-Ya, Rong-Ming Liu, Jiang-Feng Ma, Ke-Quan Chen, Min Jiang, and Ping Wei. 2011. “Increased Production of Succinic Acid in *Escherichia Coli* by Overexpression of Malate Dehydrogenase.” *Biotechnology Letters* 33 (12): 2439–44.
- Litsanov, Boris, Melanie Brocker, Marco Oldiges, and Michael Bott. 2014. “Succinic Acid.” In , 435–72. *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Liu, Yin, Yong-Guang Zhang, Ru-Bing Zhang, Fan Zhang, and Jianhang Zhu. 2010. “Glycerol/Glucose Co-Fermentation: One More Proficient Process to Produce Propionic Acid by *Propionibacterium Acidipropionici*.” *Current Microbiology* 62 (1): 152–58.
- Liu, Yu-Peng, Pu Zheng, Zhi-Hao Sun, Ye Ni, Jin-Jun Dong, and Lei-Lei Zhu. 2008. “Economical Succinic Acid Production from Cane Molasses by *Actinobacillus Succinogenes*.” *Bioresource Technology* 99 (6): 1736–42.
- Maass, D., M. R. Gerigk, A. Kreutzer, D. Weuster-Botz, M. Wubbolts, and R. Takors. 2002. “Integrated L-Phenylalanine Separation in an *E. Coli* Fed-Batch Process: From Laboratory to Pilot Scale.” *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (2): 85–96.
- Maharaj, K., M. F. A. Bradfield, and W. Nicol. 2014. “Succinic Acid-Producing Biofilms of *Actinobacillus Succinogenes*: Reproducibility, Stability and Productivity.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (17): 7379–86.
- Mahsa, Babei, Tsapekos Panagiotis, Alvarado-Morales Merlin, Hosseini Maryam, Ebrahimi Sirous, Niaei Alogholi, and Angelidaki Irini. 2019. “Valorization of Organic Waste with Simultaneous Biogas Upgrading for the Production of Succinic Acid.” *Biochemical Engineering Journal* 147 (July): 136–45.

- Maicai, Shen, Huang Wei, Chen Ming, Song Biao, Zeng Guangming, and Zhang Yaxin. 2020. "(Micro)plastic Crisis: Un-Ignorable Contribution to Global Greenhouse Gas Emissions and Climate Change." *Journal of Cleaner Production* 254 (May): 120138.
- Maria, Alexandri, Papapostolou Haris, Komaitis Michael, Stragier Lutgart, Verstraete Willy, Danezis Georgios P., Georgiou Constantinos A., Papanikolau Seraphim, and Koutinas Apostolis. 2016. "Evaluation of an Integrated Biorefinery Based on Fractionation of Spent Sulphite Liquor for the Production of an Antioxidant-Rich Extract, Lignosulphonates and Succinic Acid." *Bioresource Technology* 214 (August): 504–13.
- Matthews, Chloe, Fiona Crispie, Eva Lewis, Michael Reid, Paul W. O'Toole, and Paul D. Cotter. 2019. "The Rumen Microbiome: A Crucial Consideration When Optimising Milk and Meat Production and Nitrogen Utilisation Efficiency." *Gut Microbes* 10 (2): 115–32.
- McKinlay, James B., C. Vieille, and J. Gregory Zeikus. 2007. "Prospects for a Bio-Based Succinate Industry." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (4): 727–40.
- Merlin, Alvarado-Morales, Gunnarsson Ingólfur, Fotidis Ioannis, Vasilakou Eleni, Lyberatos Gerasimos, and Irini Angeldaki. 2015. "Laminaria Digitata as a Potential Carbon Source for Succinic Acid and Bioenergy Production in a Biorefinery Perspective." *Algal Research* 9 (May): 126–32.
- Nghiem, Nhuan P., Brian H. Davison, Bruce E. Suttle, and Gerald R. Richardson. 1997. "Production of Succinic Acid by Anaerobiospirillum Succiniciproducens." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63 (1): 565–76.
- Nikel, Pablo I., M. Julia Pettinari, M. Cecilia Ramírez, Miguel A. Galvagno, and Beatriz S. Méndez. 2008. "Escherichia Coli arcA Mutants: Metabolic Profile Characterization of Microaerobic Cultures Using Glycerol as a Carbon Source." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15 (1): 48–54.
- Pai, Rajaram A., Michael F. Doherty, and Michael F. Malone. 2002. "Design of Reactive Extraction Systems for Bioproduct Recovery." *AIChE Journal. American Institute of Chemical Engineers* 48 (3): 514–26.
- Palsson, B. 2000. "The Challenges of in Silico Biology." *Nature Biotechnology* 18 (11): 1147–50.
- Pu, Zheng, Dhong Jin-Jun, Sun Zhi-Hao, Ni Ye, and Fang Lin. 2009. "Fermentative Production of Succinic Acid from Straw Hydrolysate by Actinobacillus Succinogenes." *Bioresource Technology* 100 (8): 2425–29.
- Qinglin, Yu, Cui Zhiyong, Zheng Yaqin, Huo Hailing, Meng Lingli, Xu Junjie, and Gao

- Cuijuan. 2018. "Exploring Succinic Acid Production by Engineered *Yarrowia Lipolytica* Strains Using Glucose at Low pH." *Biochemical Engineering Journal* 139 (November): 51–56.
- Samuelov, N. S., R. Lamed, S. Lowe, and J. G. Zeikus. 1991. "Influence of CO₂-HCO₃⁻ Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum Succiniciproducens*." *Applied and Environmental Microbiology*, October. <https://doi.org/10.1128/aem.57.10.3013-3019.1991>.
- Santillan, Eugenio Felipe U., Timothy M. Shanahan, Christopher R. Omelon, Jonathan R. Major, and Philip C. Bennett. 2015. "Isolation and Characterization of a CO₂-Tolerant *Lactobacillus* Strain from Crystal Geysers, Utah, U.S.A." *Frontiers of Earth Science* 0. <https://doi.org/10.3389/feart.2015.00041>.
- Saxena, R. K., S. Saran, J. Isar, and R. Kaushik, eds. 2017. "Production and Applications of Succinic Acid." In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 601–30. Elsevier.
- Scholten, Edzard, and Dirk Dägele. 2008. "Succinic Acid Production by a Newly Isolated Bacterium." *Biotechnology Letters* 30 (12): 2143–46.
- Scholten, Edzard, Torsten Renz, and Jochen Thomas. 2009. "Continuous Cultivation Approach for Fermentative Succinic Acid Production from Crude Glycerol by *Basfia Succiniciproducens* DD1." *Biotechnology Letters* 31 (12): 1947–51.
- Sinkler, Réka, Márta Both-Fodor, Emőke Antal, Hunor Bartos, Szabolcs Lányi, and Ildikó Miklóssy. 2019. "Metabolic Engineering of *E. Coli*: Influence of Gene Deletions and Heterologous Genes on Physiological Traits." *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia* 64 (2 T1): 159–74.
- Steinsiek, S., S. Frixel, S. Stagge, and K. Bettenbrock. 2011. "Characterization of *E. Coli* MG1655 and *frdA* and *sdhC* Mutants at Various Aerobiosis Levels." *Journal of Biotechnology* 154 (1): 35–45.
- Stylianou, Eleni, Chrysanthi Pateraki, Dimitrios Ladakis, María Cruz-Fernández, Marcos Latorre-Sánchez, and Caterina Coll. 2020. "Evaluation of Organic Fractions of Municipal Solid Waste as Renewable Feedstock for Succinic Acid Production." *Biotechnology for Biofuels* 13 (1): 1–16.
- Vilela, Carla, Andreia F. Sousa, Ana C. Fonseca, Arménio C. Serra, Jorge F. J. Coelho, Carmen S. R. Freire, and Armando J. D. Silvestre. 2014. "The Quest for Sustainable Polyesters – Insights into the Future." *Polymer Chemistry* 5 (9): 3119–41.
- Wan, Caixia, Yebo Li, Abolghasem Shahbazi, and Shuangning Xiu. 2008. "Succinic Acid

- Production from Cheese Whey Using *Actinobacillus Succinogenes* 130 Z.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 145 (1-3): 111–19.
- Wang, Wanli, Nickolas J. Themelis, Kai Sun, Athanasios C. Bourtsalas, Qunxing Huang, Yunhe Zhang, and Zhaohui Wu. 2019. “Current Influence of China’s Ban on Plastic Waste Imports.” *Waste Disposal & Sustainable Energy* 1 (1): 67–78.
- Xiao, Han, Zengyi Shao, Yu Jiang, Sudhanshu Dole, and Huimin Zhao. 2014. “Exploiting *Issatchenkia Orientalis* SD108 for Succinic Acid Production.” *Microbial Cell Factories* 13 (August): 121.
- Yan, Qiang, Pu Zheng, Jin-Jun Dong, and Zhi-Hao Sun. 2014. “A Fibrous Bed Bioreactor to Improve the Productivity of Succinic Acid by *Actinobacillus Succinogenes*.” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 89 (11): 1760–66.
- Yedur, Sanjay, Kris A. Berglund, and Dilum D. Dunuwila. 2001. Succinic acid production and purification. USPTO 6265190. *US Patent*, filed September 2, 1999, and issued July 24, 2001. <https://patentimages.storage.googleapis.com/a6/91/26/cea06965d1e744/US6265190.pdf>.
- Yikuli, Li, Li Mingji, Zhang Xu, Yang Peng, Liang Quafeng, and Qi Qingsheng. 2013. “A Novel Whole-Phase Succinate Fermentation Strategy with High Volumetric Productivity in Engineered *Escherichia Coli*.” *Bioresource Technology* 149 (December): 333–40.
- Yu-Peng, Liu, Zheng Pu, Sun Hao, Li Zhenwei, Dong Jin-Jun, and Wei Ping. 2008. “(1) Strategies of pH Control and Glucose-fed Batch Fermentation for Production of Succinic Acid by *Actinobacillus Succinogenes* CGMCC1593.” ResearchGate. February 5, 2008. https://www.researchgate.net/publication/229506976_Strategies_of_pH_control_and_glucose-fed_batch_fermentation_for_production_of_succinic_acid_by_Actinobacillus_succinogenes_CGMCC1593.
- Yuzbashev, Tigran V., Evgeniya Y. Yuzbasheva, Tatiana I. Sobolevskaya, Ivan A. Laptev, Tatiana V. Vybornaya, Anna S. Larina, Kazuhiko Matsui, Keita Fukui, and Sergey P. Sineoky. 2010. “Production of Succinic Acid at Low pH by a Recombinant Strain of the Aerobic Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Biotechnology and Bioengineering* 107 (4): 673–82.
- Zhao, Yi, Kuan Chang, Qingqing Gu, Bing Yang, Jing Xu, Ying Zhang, Chengsi Pan, Zhenlin Wang, Yang Lou, and Yongfa Zhu. 2022. “Noble Metal-Free 2D 1T-MoS₂ Edge Sites Boosting Selective Hydrogenation of Maleic Anhydride.” *ACS Catalysis*, July. <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c02122>.

10. Publikációs jegyzék

Jelen PhD értekezés elkészítéséhez hozzájáruló publikációk:

1. Márta Balázs, **Hunor Bartos**, Szabolcs Lányi, Zsolt Bodor, Ildikó Miklóssy (2023), “Substrate type and CO₂ addition significantly influence succinic acid production of *Basfia succiniciproducens*”. Biotechnology Letters, 45(9).

IF:2.7

2. **Hunor Bartos**, Márta Balázs, Ildikó Hajnalka Kuzman, Szabolcs Lányi, Miklóssy Ildikó (2021), “Production of High Added-Value Chemicals in *Basfia succiniciproducens*: Role of Medium Composition”. Sustainability, 13(6), 3513.

IF: 3.88

3. Réka Sinkler, Márta Both-Fodor, Emőke Antal, **Hunor Bartos**, Szabolcs Lányi, Ildikó Miklóssy (2019), “Metabolic engineering of *E.coli*: influence of gene deletions and heterologous genes on physiological traits”. Studia UBB Chemia, LXIV(2), 159-174.

IF: 0.49

Össz IF érték: 7.07

Jelen PhD értekezés elkészítéséhez hozzájáruló konferencia előadások:

1. **Bartos Hunor**, Miklóssy Ildikó, Balázs Márta, Albert Csilla, Bodor Zsolt (2019), “Substrate utilization studies of the succinate producer *Basfia succiniciproducens*”, 19th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Suior, Romania, Abstract book p.82
2. **Bartos Hunor**, Miklóssy Ildikó, Balázs Márta, Bodor Zsolt (2019), “Analysis of metabolic potential of *Basfia succiniciproducens* for bio-based succinic acid production from renewable resources”, 10th International Conference on Environmental Engineering and Management, Jászvásár, Romania, Abstract book p.41

Jelen PhD értekezés elkészítéséhez hozzájáruló konferencia poszterbemutatók:

1. **Bartos Hunor**, Miklóssy Ildikó, Bodor Zsolt, Both-Fodor Márta, Lányi Szabolcs (2018), “*In silico* and *in vivo* investigation of high added-value components production in *Basfia succiniciproducens*”, 18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Komárom, Szlovákia, Abstract book p.50

2. Balázs Márta, **Bartos Hunor**, Antal Emőke, Miklóssy Ildikó, Bodor Zsolt (2018), “A *Basfia succiniciproducens* bioszintetikus potenciáljának tanulmányozása”, XXIV Nemzetközi Vegyészkonferencia, Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság (EMT), Szováta, Románia, Konferenciakötet
3. Bodor Zsolt, **Bartos Hunor**, Bodor Katalin, Both-Fodor Márta, Orbán Csongor-Kálmán, Lányi Szabolcs, Miklóssy Ildikó (2018), “Quantitative prediction of *Basfia succiniciproducens* metabolic potential, for succinic acid and 1,4-butanediol production, with constraint-based models”, International Conference on Mathematical Methods and Models in Biosciences and a School for Young Scientists, Sofia, Bulgária, Abstract book
4. **Bartos Hunor**, Miklóssy Ildikó, Bodor Zsolt, Both-Fodor Márta (2017), “Anyagcseremérnökségi módszerek alkalmazása 1,4-butándiol bioszintézise céljából *Basfia succiniciproducens* törzsben”, XXIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság (EMT), Konferenciakötet p.85
5. Bodor Zsolt, Kuzman-Ildikó Hajnalka, Both-Fodor Márta, **Bartos Hunor**, Lányi Szabolcs, Miklóssy Ildikó (2017), “*In silico* modeling and evaluation of *Basfia succiniciproducens* for 1,4-butanediol production from renewable resources”, MATHMODEL'17, Mathematical modeling technological and socio-economic processes, Borovets, Bulgária, Proceedings, Issue 1/2017, ISSN: 2535-0978, p.133

Jelen PhD értekezés elkészülésén kívül elkészült tudományos tevékenységek:

1. **Bartos Hunor**, Salamon Rozália-Veronika, Albert Csilla, Laslo Éva, Orbán Csongor (2022), “Apple vinegar production using wild apple vinegar bacterial consortia”, 20th International Symposium and Summer School, Pécs, Magyarország, Abstract book p.92
2. Varga Orsolya, Péter Tünde, **Bartos Hunor**, Mara Gyöngyvér (2017), “Strukturális szénhidrátbontó baktériumtörzsek jellemzése növényi növekedést serkentő és antagonistá tulajdonságaik alapján”, XXXIII Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Agrártudományi szekció, Mosonmagyaróvár, Magyarország, Rezümékötet p.236

Melléklet

I. Kutatás során használt vegyszerek és anyagok

Tápoldatok	Gyártó
TSB	RS Micromedia International (Dakka, Bangladesh)
BHI	Beckton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok)
M9 (minimál médium)	
CaCl ₂	Merck (Darmstadt, Németország)
MgSO ₄	VWR (Radnor, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok)
Élesztő kivonat (YE)	Roth (Karlsruhe, Németország)
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	ChemPUR (Karlsruhe, Németország)
K ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt, Németország)
NH ₄ Cl	Chimopar (Bukarest, Romania)
MnCl*4H ₂ O	Merck (Darmstadt, Németország)
ZnCl ₂	Merck (Darmstadt, Németország)
CuCl ₂ *2H ₂ O	Merck (Darmstadt, Németország)
CoCl ₂ *6H ₂ O	Chimreactiv (Bukarest, Romania)
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	Merck (Darmstadt, Németország)
FeCl ₃ *6H ₂ O	Fluka (BioChemika) (Charlotte, Észak-Karolina, Amerikai Egyesült Államok)
Szubsztrátok	Gyártó
L-Arabinóz	Merck (Darmstadt, Németország)
D-Fruktóz	Roth (Karlsruhe, Németország)
Glicerin	VWR (Radnor, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok)
D-Glükóz	Riedel-de Haën (Honeywell) (Charlotte,

Inulin	Észak-Karolina, Amerikai Egyesült Államok) Sigma-Aldrich (Saint Louise, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
Laktóz	Merck (Darmstadt, Németország)
Maltodextrin	Sigma-Aldrich (Saint Louise, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
Maltóz	Sigma-Aldrich (Saint Louise, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
Mannóz	Merck (Darmstadt, Németország)
Xilóz	Fluka (BioChemika) (Charlotte, Észak-Karolina, Amerikai Egyesült Államok)
Bioreaktoros és HPLC során felhasznált kémiai vegyszerek	Gyártó
NaOH	Sigma-Aldrich (Saint Louise, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
HCl	Merck (Darmstadt, Németország)
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich (Saint Louise, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
0,45 µm membránszűrő	TPP (Trasadingen, Svájc)