



Basfia succiniciproducens növekedése és
metabolit termelése különböző szubsztrátok
felhasználása mellett

PhD értekezés tézisei

- Bartos Hunor -

Vezetőtanárok:

Dr. Miklóssy Ildikó, Dr. Bodor Zsolt

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Pécs, 2023

Összefoglalás

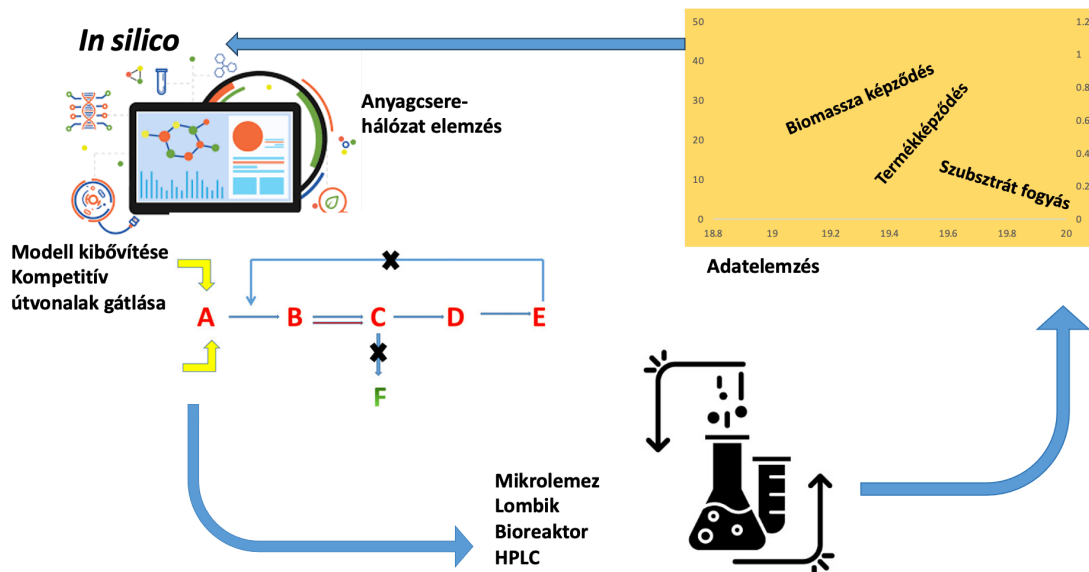
Jelenkori életünk elképzelhetetlen műanyagok nélkül. A széles körben elterjedt műanyagok problematikája viszont nemcsak az előállítás, hanem a felhasználást követően a lebomlás vagy újrahasznosítás során is jelentkezik. A vegyipar által szintetizált polimerek jelen pillanatban még javarészt fosszilis 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 életciklusával 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 anyagsere 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 (**1.Ábra**). Az *in silico* elemzéseimből kiderül, hogy a modell kibővítésével a két újonnan integrált szubsztrát esetében - xilóz és glicerin - 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 biomassa és borostyánkősav mennyiségére.



1.Ábra A PhD kutatás folyamatának sematikus ábrázolása

1. Bevezetés: a kutatás jelentősége és kérdésköre

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* baktériumtörzsrre specializált *in silico* modell bővítése alkalmas lehet glükóz mellett xilóz és glicerín 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. 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 deléción) 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

3. Anyagok és módszerek

3.1. A baktériumtörzs metabolikus termelőképességének számítógépes elemzése

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: glicerin és xilóz), 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 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 glicerin és xilóz felhasználási sebessége a szimulációk során rendre $15,4$ és $9,24 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$ érték volt.

Első körben a szubsztrát, valamint az oxigén felhasználási sebességét szabtam meg. A szubsztrát felhasználási sebességét az előbbieken tárgyalt értékekre, míg az oxigén felhasználási sebességét (oxigén = $0 \text{ mM gCDM}^{-1}\text{h}^{-1}$) nullára állítottam, ezáltal megteremtve a számítógépes modellben az anaerob körülményeket teljesítő feltételt. Második esetben elemeztem a céltermék maximális képződési sebességét, ami abban állt, hogy egy korlátolt biomassa növekedési sebesség (ennek értéke $0,1 \text{ h}^{-1}$ volt) mellett, mennyi az elérhető maximális céltermék képződési sebesség. Harmadjára a számítógépes elemzések során a piruvát-formiát-liáz (E.C. 2.3.1.54), valamint a laktát-dehidrogenáz (E.C. 1.1.1.27) metabolikus útvonalainak eliminálását végeztem, rendre Δpfl és Δldh . Utoljára a kísérletből

származó adatokat felhasználva szubsztrát felhasználási sebességeket (glükóz, glicerin, xilóz: 7,89-22,7-12,2 mM gCDM⁻¹h⁻¹) számítva futtattam a modellt.

3.2. A kutatásban használt baktériumtörzs laboratóriumban történő vizsgálata

A németországi Leibniz Intézettől (DSMZ) vásárolt baktériumtörzset három térfogatban elemeztem. Először mikrolemezen a törzs széleskörű szubsztrát hasznosító képességét vizsgáltam, majd nagyobb, lombikban végzett kísérletekben a kutatásban érdekelt három szénforrást (glükóz, glicerin és xilóz) komplex (TSB, BHI) és minimál (M9) tápoldatokban a sejt növekedését elemeztem. Harmadjára kontrollált körülmények között, bioreaktorban vizsgáltam a törzs növekedését valamint metabolit termelését.

3.2.1. Mikrolemezen végzett laboratóriumi kísérletek

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, glicerin, 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 kísérletek során három különböző tápoldatot (TSB, BHI, M9) vizsgáltam. A kísérletsorokat párhuzamosan, háromszoros ismétlésben végeztem.

3.2.2. Lombikban végzett laboratóriumi kísérletek

A törzsről alkotott kép felbontásának növeléséhez léptéknövelést alkalmaztam. A különböző mikrolemezen elvégzett kísérletek során kapott eredmények alapján a 20 g/L kezdeti szubsztrát koncentráció bizonyult a hasznosabbnak, így a lombikos elemzések során is 20 g/L szubsztrátkoncentrációval dolgoztam. A 300 mL ösztérfogatú 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).

3.2.3. 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. A bioreaktor össztérfogatának (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. 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.

3.2.4. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfias mintaelemzés

A fermentáció során gyűjtött mintákat 1260 Infinity (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok) automata, nagy teljesítményű folyadékkromatográfán analizáltam. 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, melyekből hígítással öt pontos kalibrációs egyenest vettem fel. Az oszlopra történő injektálást követően kromatográfias csúcsokat kaptam, az így generált kromatogramokat retenciós idő alapján értékeltem a standard kalibrációs egyeneseihez viszonyítva.

3.2.5. Számítások

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

$$\mu x = dx / dt \quad (1)$$

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, *Basfia succiniciproducens* baktériumtörzsre specifikusan, a Becker és kutatócsoportja által megállapítottak szerint számítottam:

$$\text{gCDM [g/L]} = 0.331 \times \text{OD600} \quad (\text{Becker és mtsai. 2013})$$

4. Eredmények

4.1. Metabolikus modell bővítése és a metabolitok termelésének előrejelzése

A biomassza növekedési sebesség mellett a predikciók során, egyéb más metabolitok is képződtek: borostyánkősav, ecetsav és hangyasav. Ezeknek képződési sebességét “mM gCDM⁻¹h⁻¹” mértékegységben kaptam meg. A 0,3 h⁻¹ növekedési sebességgel bíró biomassza esetében glükóz szubsztráton a hangyasav képződési sebessége volt a legnagyobb, 6,88 mM gCDM⁻¹h⁻¹ értékkel. Xilóz és glicerín felhasználási sebessége 9,24 mM gCDM⁻¹h⁻¹ és 15,4 mM gCDM⁻¹h⁻¹ volt. A biomassza növekedési üteme, rendre 0,26 h⁻¹ és 0,448 h⁻¹ értékű volt. Mindhárom szubsztrátot (glükóz, xilóz, glicerín) vizsgálva a hangyasav képződési sebessége a legtöbb, míg xilóz esetén ennek értéke 6,97 mM gCDM⁻¹h⁻¹, addig glicerín esetén 6,49 mM gCDM⁻¹h⁻¹ volt. Mindhárom szubsztrát esetén a szerves savak képződési sebessége közül, a borostyánkősav volt a legkisebb (rendre 5,57 - 5,79 - 4,52 mM gCDM⁻¹h⁻¹), de értéke megközelítőleg azonos volt az ecetsav képződési sebességével.

Korlátolt biomassza képződési sebesség mellett ($\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$), glükóz és xilóz esetén hasonló, 12,06 mM gCDM⁻¹h⁻¹, míg a glicerín esetén valamivel kevesebb 11,72 mM gCDM⁻¹h⁻¹ volt a borostyánkősav képződési sebességét számítottam.

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 Δ pfl 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.

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

A laboratóriumban végzett előkísérleteim (mikrolemezes elemzések) eredményeképpen a felhasznált szubsztrátok (arabinóz, fruktóz, glicerín, glükóz, inulin, laktóz, maltóz, maltodextrin, mannóz, xilóz) egy (inulin) kivételével, mindenik alkalmas a *Basfia succiniciproducens* törzs nevelésére, úgy 5 g/L, mint 20 g/L alkalmazott szubsztrátkoncentráció esetén.

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. BHI komplex tápoldatot használva mindhárom szubsztrátot felhasználva, egy erősen meredek növekedési szakaszt (exponenciális szakasz) figyeltem meg. M9 tápoldatban, mindhárom szubsztrát felhasználásával megközelítőleg 0-4 óráig tart az adaptációs fázis, amit enyhe meredekséggel jellemezhető nyolc órás exponenciális szakasz követ.

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. A glicerint és xilózt tartalmazó tápoldatok felhasználásakor a CO₂/LEV gázkeverék mutatkozott hatékonyabb körülménynek, ezeknél magasabb volt a baktériumtörzs fajlagos növekedési sebessége. A borostyánkősav hozamának tekintetében a glükóz és glicerín esetén volt hasznosabb a gázkeverék (CO₂/LEV) alkalmazása. Xilózt tartalmazó tápoldatban az anaerob

körülmények esetén tapasztaltam magasabb borostyánkősav hozamot, 0,277 mol/mol értékben.

5. Megbeszélés

A több kutatócsoport által összeállított és szakirodalomban fellelhető metabolikus modellt felhasználva, első és fontos lépésként a kutatásban érdekelt szénforrásokra (glicerin, xilóz) bővíttem 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 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 glicerin szénforrások alkalmazásánál a mikroaerob körülmények bizonyultak hatékonyabbnak. Glükóz szénforrás kezdeti 20 g/L koncentrációjának felhasználásával 0,43 mol/mol borostyánkősav hozamot számítottam, míg glicerin 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, glicerin 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).

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.

6. 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 számítógépes modelljébe a glicerin és xilóz hasznosulását biztosító útvonalakat. Az első megfogalmazott hipotézisre a következők adnak választ: a számítógépes modellbe integrált két új szubsztráttal (glicerin és xilóz), és ezek biokémiai felhasználásának matematikailag leírt egyenleteivel, újabb kapcsolódási pontokat határoztam meg a számítógépes modellezés és a valóság között.

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, glicerin, 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 mindegyike alkalmas a törzs nevelésére.

3. A 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.

4. *In silico* és a gyakorlat - utolsó hipotézisem 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.

7. 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