

Válasz Dr. Kovács L. Kornél professzor úr bírálataira

Először is szeretném megköszönni Kovács Kornél professzor úrnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatait. Külön köszönöm kedves, személyes szavait és támogató véleményét. Kritikai megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

FORMAI KÉRDÉSEK:

1) *A Rövidítések Jegyzéke a hasonló dolgozatokban gyakran előforduló hibaként nem teljes. Fejtörést okoz a DPM vagy a SHAM rövidítés megfejtése.*

Válasz:

Ezt a figyelmetlenséget a másik két bírálóm is teljes joggal szóvá tette. A DPM betűszó a „Disintegration Per Minute” rövidítése és a radioaktivitás egyik mértékegysége: az egységnyi radioaktív anyagban egy perc alatt elbomló atomok számát mutatja. A DPM és a gyakran használt CPM („Count Per Minute”) között elvi különbség, hogy utóbbi nem az elbomlott atomok, hanem a detektort ért részecskék számát adja meg.

Izotópos módszert az *Aspergillus nidulans* laktóz és az *Aspergillus niger* D-galaktóz felvételének tanulmányozásakor használtunk. Az első esetben [D-glükóz-1-¹⁴C]-laktóz volt a jelölt szubsztrátum. A micéliumot laktózon kinövesztettük és szénforrásmentes minimál táptalajba mostuk át úgy, hogy a sejtkoncentráció 1 g/L legyen. 10 mL tenyészetet tartalmazó 100 mL-es lombikokba annyi ¹⁴C-laktózt adtunk, amennyi 1 mL tenyészet 150000 DPM (= 2500 Bq) radioaktivitásához kellett. Az élettani laktóz koncentrációt jelöletlen („hideg”) laktóz tenyészethez adásával állítottuk be. Mintavételt követően a sejteket azonnal erősen lecentrifugáltuk, és a felülúszó radioaktivitását szcintillációs folyadékkal való elegyítést követően egy folyadék szcintillációs spektrométerrel határoztuk meg. A módszerrel tehát a táptalajban maradó (fel nem vett) laktóz mennyiségét mértük. A laktóz transzporterek kiütése a laktóz felvétel lassulását illetve leállítását eredményezte. A második esetben D-galaktóz-1-¹⁴C szubsztrátumot használtunk, az eljárás más szempontokból megegyezett az előzővel.

Meg szeretném jegyezni, hogy a radioaktív mérések lehetősége az EU akadémiai kutatóhelyein leszűkült: alkalmazásukat olyan szigorúan szabályozzák, hogy a fenti méréseket ma már nem tudnánk ugyanott, ugyanúgy elvégezni.

A SHAM a szalicil-hidroxamát, a legelterjedtebb alternatív oxidáz inhibitor rövidítése. Ezt a rövidítést a 26. oldal első bekezdésében megmagyaráztam – magam sem értem, hogy miért ott és nem a Rövidítések jegyzékében.

2) *A Célkitűzések fejezet 5 pontban foglalják össze a kutatási irányokat, feladatokat. Ehhez képest egy kicsit aránytalannak tűnik, hogy a Tézisekben és a dolgozat a 130. oldalon kezdődő, a Tézisekkel majdnem szó szerint megegyező Összefoglaló című ismételésében 22 pontban foglalja össze az 5 célkitűzés megvalósított eredményeit.*

Válasz:

A Célkitűzések a dolgozat stratégiai céljait jelöli ki, ezért igyekeztem kevés pontban, röviden megfogalmazni őket. Véleményem szerint tudományosan nem hiteles, ha a Célkitűzések túl részletes, hiszen senki sem láthatja előre kutatásainak eredményeit. A téziseket valóban meg

lehetett volna összevontan, kevesebb pontban is fogalmazni (ahogy Professzor Úr is tette a bírálát végén); én arra törekedtem, hogy minden egyes tézispont önálló legyen.

3) Az ábrák általában jól megszerkesztettek, áttekinthetőek, éppen ezért meglepő (és kicsit szórakoztató), hogy szinte az egész dolgozatban milyen keservesen küzdött a „fehér” és „fekete” szimbólumok közötti jelölések megkülönböztetésével az ábra aláírásokban.

Válasz:

Jogos a felvetés. Átnézve a dolgozatot magam is értetlenkedem néhány formai megoldáson.

4) Számos ábrán és táblázatban a Jelölt nem tüntetett fel kísérleti hibát, szórást, vagy más, a szignifikanciára utaló paramétert. Úgy tűnik, ez különösen a kutatói pálya elején végzett kísérletek bemutatásánál maradt el.

Válasz:

Ezt a problémát én is észrevettem a dolgozat összeállításakor, de úgy gondoltam, nem volna szerencsés utólag beleszerkeszteni az ábrákba és táblázatokba még a hibák és szórások erejéig sem. Értekezésemben ezért az összes ábrát és táblázatot az eredeti közleményekben megjelent tartalmukkal és formájukban mutattam be, hiányosságaikkal együtt.

5) A táblázatokkal kapcsolatos másik kifogásolható szerkesztési eljárás, hogy helytelen a mért értékeket és azok hibáját eltérő számú tizedes pontossággal megadni.

Válasz:

Ez is jogos felvetés, és itt még az előző válaszomat sem ismételhetem meg, mivel ezt a hibát nem vettem észre a dolgozat készítésekor.

6) Számos ábránál és a szövegben zavaróan keveredik az „óra” megjelölés és a „h” jelzés (pl. 45. oldal). Ugyanígy nem lehet tudni, hogy a 80. ábra X tengelyén bejelölt „Idő (h)” skála az A és B ábrára is egyaránt vonatkozik-e? Ha igen, az ellentmondásban van a szöveges értékeléssel (122. oldal).

Válasz:

A 80. ábra „A” és „B” része egyaránt időbeli változásokat mutat, az „A” percben, a „B” pedig órában. A szövegben található erre utalás, de valóban szerencsésebb lett volna a tengelyen is feltüntetni a mértékegységet.

7) A III. táblázatban (46. oldal) nyilvánvalóan hibás a specifikus felvételi ráta $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ DCW mértékegysége.

Válasz:

Helyesen $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{DCW}}$, vagyis egységnyi (mg száraztömegben megadott) biomassza által egy perc alatt felvett laktóz mennyisége mikromólban. A dimenzióba anyagmennyiség (μmol) írandó, nem koncentráció (μM).

7) A hidrofób tokoferolt hogyan vitték be a vizes rendszerbe (125. oldal)?

Válasz:

Nem használtunk külön oldószert vagy hordozót: tágított hegyű pipettával belepipettáztuk a lombikokba. A steril fülke alatt (vagyis amikor a lombik nem rázódtott) a tokoferol szétterült a tápfolyadék felszínén, de intenzív rázatás során – feltételezem, pici cseppeket képezve – a

folyadék mélyére került, ahol a gombasejtfalon már meg tudott tapadni. A jelenség hasonló lehet a növényi olajok szénforrásként történő használatához: azok is hidrofób vegyületek, de a mikroorganizmusok fel tudják őket vizes oldatból is venni külön oldószer használata nélkül.

8) *Érdekes nyelvtani fejtörést okozó megjelölés a XVII. táblázatban használt „torlós” és „torlótlan” kifejezés. A kutatói zsargonban ez valószínűleg a kísérletekben használt lombikok aljának üvegtechnikai kialakítására utal, de ez a megfogalmazás – főleg az előre gyártott műanyag edényeket használó utókor számára – nem szabatos.*

Válasz:

A „baffled” és „non-baffled” kifejezéseket próbáltam magyarra fordítani, és most sem tudnék szabatosabb kifejezéseket a „torlós” és „torlótlan” rázott lombiknál; a nagy ipari fermentorok áramlástörőit is torlóknak nevezik. A torlós lombikokat mi magunk alakítottuk ki: a torlókat egy üveg szélesztőbot 4 cm hosszú darabjai képezték, melyeket hidegragasztóval rögzítettünk a lombik oldalfalának alsó részére, függőlegesen, egymástól egyenlő távolságra. A torlók a lombikok oxigéntranszfer ráta értékeit átlagosan két és félszeresre emelték. Egyetértek Professzor Úrral abban, hogy a mai fiatal kutatók aligha fognak ilyen eszközzel találkozni...

9) *Nehéz értelmezni, hogy a 85. és 86. ábra aláírásában a „tenyészetek időprofiljai”-ról esik szó, de az IDŐ paraméter és annak mértékegysége egyik tengelyen sem szerepel.*

Válasz:

Ez az egyik legzavaróbb hiba az értekezésben, ráadásul kétszer egymás után. Elnézést kérek értük. Az említett két ábrának nincs köze az időhöz – a tenyészetek egyes paramétereinek változását próbáltam bemutatni az egyesített tömegátviteli koefficiens (Kl_a) függvényében.

ÁLTALÁNOS SZAKMAI KÉRDÉSEK:

1) *...a bemutatott kísérletek túlnyomó többségében kiderül, hogy a laktóz és/vagy a D-Gal valóban meghatározó szabályozó szerepet játszik a gombák élettanában, bioaktív anyagokat termelő tevékenységük szabályozásában. De a fonalas gombák életének is túlzott leegyszerűsítése lenne feltételezni, hogy a működésüket csak ezek a cukrok irányítják. Feltételezhetően itt inkább arról van szó, hogy a kísérleteket minden más, növekedési paramétert befolyásoló vegyület (pl. N, P, S, mikroelemek, hőmérséklet, pH, oldott O_2 , stb) szempontjából optimálisra beállított körülmények között tervezték és végezték el. Hiányoltam, hogy erről a dolgozatban miért nem történt említés és diszkusszió?*

Válasz:

”God did not create filamentous fungi to grow in fermenter” (Prof. Anthony P. J. Trinci)

Ipari mikrobiológusként a gombák élettani folyamatait az eredeti életterüktől merőben eltérő közegben, bioreaktorban vizsgáljuk. A Pezizomycotinák a természetben általában szaprofiták vagy növényparaziták; szilárd felszínen élnek, nem vizes közegben. Szabadon elérhető mono és diszacharidok elvétele fordulnak elő természetes környezetükben, pláne nem a technológiai protokollok által előírt magas koncentrációkban. Az intenzív rázatás/keverés során a nyíróerő mechanikai, a magas oldott oxigénkoncentráció oxidatív stresszként jelentkezik rajtuk.

Az elmúlt időszakban a fonalas gombás közösségen belül is megfigyelhető egy olyan kutatási irányzat, mely az eredeti életteret igyekszik reprodukálni a kutató laboratóriumában.

Példa erre a szimbiotikus kapcsolatok tervszerű előállítása, pl. gomba és baktériumok közös tenyésztése, melynek során addig ismeretlen bioaktív vegyületeket sikerült kinyerni a közös fermentléből. A mi megközelítésünk azonban konzervatív volt: igyekeztünk úgy megtervezni kísérleteinket, hogy a lehető legtöbb (környezeti) változó állandó legyen.

A környezeti változók száma a kifinomultabb tenyésztési módszerekkel csökkenthető. Egy Petri-csészében növekvő gombatenyészet egyszerre van kitéve a szilárd fázis és a fölötté lévő gázfázis fizikai-kémiai viszonyainak, kölcsönhatásainak. Egy standard rázatott lombikos tenyészet már homogénebb, de a sejtek anyagcseréje a tápközeg összetételét folyamatosan változtatja; az eredeti szubsztrátumok koncentrációi időben csökkennek, a (vég)termékeké nő, az elhalt sejtekből sokféle vegyület szabadul fel. Szabályozókörök használatával a változók egy része (oldott oxigénszint, pH, habszint) állandósítható, a sejtek anyagcseréjének hatása pedig definiált táptalajok használatával standardizálható. A legtöbb általunk használt táptalaj több évtizedes múltra tekint vissza; az *Aspergillus Minimal Mediumot* (AMM) pl. 1953-ban írta le Pontecorvo, és azóta sok ezer tanulmányban használták világszerte.

A változók számának minimalizálása, és emiatt a reprodukálhatóság szempontjából a folytonos tenyészet a legjobb módszer (kifejlesztője a híres magyar fizikus, Szilárd Leó volt). A rögzített specifikus növekedési ráta miatt a szubsztrátum felvételi és a metabolit produkciós ráták is állandóak: steady-state állapotban a sejtek úgy vizsgálhatók, mintha életük egy adott pillanatát állandósítottuk volna. Hátránya, hogy fokozottan eszköz- és munkaigényes, emiatt rutinvizsgálatokra nem alkalmas.

2) Egy kicsit az előző ponthoz kapcsolódnak azok a kérdések, amelyek az egyes kísérletek eltérő körülmények közötti megvalósítására vonatkoznak. Nem tudjuk meg a kísérletek többségében, hogy miért éppen azokat a kísérleti körülményeket alkalmazták, miért éppen az alkalmazott gomba törzseket választották, más törzsek esetén is fennáll-e a jelenség és, hogy a kísérleti feltételek esetleges változása mekkora hatása van a végeredményre?

Válasz:

A kísérleti körülmények kapcsán az előző válaszomra utalnék: amikor csak lehetőségünk volt, más laborokban jól bevált törzseket és módszereket adaptáltunk. Mivel nem törzs-specifikus tulajdonságokat, hanem a primer anyagcsere elemeit tanulmányoztuk, úgy érzem (és egyben remélem): ha az egyes gombafajokon belül másik referencia törzset, vagy egy adott mutációt más genetikai háttérben hordozó törzset használtunk volna, eredményeink hasonlóak lettek volna. Érdemi választ azonban sajnos nem tudok adni a felvetésekre.

*3) Kiemelkedő, és számomra elképesztően tanulságos példája annak, hogy a kísérleti körülmények akár lényegtelennek tűnő változtatása milyen jelentős eltéréseket okozhat az eredményekben az NO_3^- vs. NH_4^+ nitrogén forrás alkalmazását kísérő drasztikus változás (4.2.1. fejezet, 54. oldal). Az a – feltehetően az első kísérletek összeállításánál mellékesnek ítélt körülmény -, hogy NO_3^- helyett NH_4^+ -t adtak a gombáknak N-forrásként gyökeresen megváltoztatta a mások által az irodalomba bebetonozott eredményt, hogy az *Aspergillus nidulans* galE9 örömmel megél D-Gal kizárólagos szénforrást tartalmazó tápon. A megfigyelés a Leloir útvonal mellett felfedezett oxido-reduktív D-Gal lebontási útvonal felfedezéséhez vezetett, ami a Karaffa-csapat egyik kiemelkedő eredménye. Tehát rengeteg egyéb paraméter befolyásolja a gombák viselkedését, termelését. Hiányérzetet hagy az*

olvasóban, hogy ezt a fontos jelenséget ugyan megállapítja és publikációiban leközölte Levente, de értelmezésére már nem nagyon volt kíváncsi, az érdekes és furcsa jelenség valószínűsített magyarázatára egy rövid bekezdést szentelt csupán (63. oldal) mindenféle kísérletes bizonyíték nélkül. Így megválaszolatlan marad, mitől van ez a megdöbbentő N-forrás függése a cukor anyagcserének és milyen egyéb reakció utakkal kapcsolódik/kapcsolódhat még a cukor anyagcserében kapcsolatos, feltehetően sokkal összetettebb szabályozás? A gondolat visszaköszön a 61. oldalon, de magyarázat ott sincs.

Válasz:

A redukzív D-galaktóz lebontási út felfedezésének története némileg ellentmond a fentieknek – egy kísérleti körülmény megváltoztatása volt a kiindulópont – bár a nitrát ammónium ionra cserélését a β -galaktosidáz enzim aktivitásának maximálása okán, egy régi cikk (Fiedurek et al: *Effect of medium components and metabolic inhibitors on beta-galactosidase production and secretion by Penicillium notatum* J. Basic Microbiol. 1: 27-32; 1995) alapján tettük, nem pedig a kísérleti körülmények megváltoztatásának általános szándékával.

Professzor úrnak sajnós igaza van abban, hogy a jelenség magyarázatával máig adósok vagyunk. Nem a kíváncsiság hiányzott: többszöri nekifutásra sem tudtuk hipotézisünket – mely szerint a redukzív galaktóz lebontási út nitrogénforrás függése mögött az intracelluláris NADPH aktuális szintje áll – kísérletesen bebizonyítani. Az elmúlt egy évben azonban végre találtunk megoldást, mellyel a NADPH szintet reprodukálhatóan manipulálni tudjuk, s ezáltal meg tudjuk változtatni az *A. nidulans* galaktokináz mutáns galaktóz + nitrát fenotípusát: a sejtek csíráznak és nőnek galaktóz + nitráton.

4) Az olvasóval szemben barátságtalan megoldás, hogy a 4. fejezet (**Kísérleti eredmények és megvitatásuk**) egyes alfejezetei ugyan nyilvánvalóan a szerző egy-egy kiemelkedő publikációjára épülnek, de ezeket az alfejezetekben nem hivatkozza meg a szövegben. Így az olvasó csak találgathat, hogy az „Értekezésben szereplő saját közlemények” (8. fejezet) felsorolásban szereplő 22 publikáció közül melyik cikket kell átnézni a részletek megértéséhez. Ez azért is zavaró, mert az egyes kísérlet sorozatokban használt metodikák leírása meglehetősen szűkszavú a Függelék (7. fejezet) részben. Például a 4.1.1.2., egyébként nagyon fontos új tudományos eredményt leíró fejezetben (47-53. oldal) sok hivatkozás van mások releváns munkáira, de egyszer sem tudjuk meg, hogy a Jelölt melyik publikációjában közölte az itt leírt eredményeket. Pedig érdekes metodikai kérdésként vetődik fel itt és később is (pl. 100. oldal), hogy a kópia számot miért Southern-hibridizációval határozták meg? Ez a módszer elfogadott a korábbi irodalomban, de azt is tudjuk, hogy bizonytalansággal terhelt, főleg amikor kettőnél több kópia számban van jelen a vizsgált gén. Ezért, ma inkább a Karaffa laborban is használt RT-PCR-t használják ilyen kérdések megválaszolására. Hasonlóan érdekes lenne tudni, hogy a 4.4.1. fejezetben leírt intracelluláris peroxid szinteket hogyan határozták meg (79. ábra)?

Az igény a saját publikációk hivatkozására feltehetően felmerült Leventében is és ezért a 4.2.4. fejezetben néhány helyen megjelölte a vonatkozó saját cikkeket a citációk aláhúzásával, de például a 94. oldalon idézett Seiboth és mtsai 2002 cikk aláhúzással és anélkül is szerepel ugyanazon az oldalon. Sajnos ezt az „aláhúzos” gyakorlatot sem a 4. fejezet ezt megelőző, sem az ezután következő részében jórészt nem használta, üdítő kivétel a 81. oldalon az Ilyés és mtsai 2004 hivatkozás.

Válasz:

Különböző mértékben mindhárom bírálóm felvetette a dolgozat alapjául szolgáló szakeikkek említésének illetve hivatkozásának hiányát. Ebben az esetben nem tudok figyelmetlenségre hivatkozni; tudatosan nem említettem az „Eredmények és megbeszélésük” fejezetben a saját cikkeket, mivel hipotéziseken és tesztelésük bemutatásán alapuló önálló tudományos munkát próbáltam készíteni, melynek struktúrája adott esetben eltér az alapjául szolgáló cikkekétől. Azt is el kívántam kerülni, hogy az alkalmazott kísérleti módszerek folyamatos fejlődése kronológiai jelleget adjon az értekezésnek. Megpróbáltam ezért a hasonló témában, de eltérő időben született eredményeinket ugyanazon munkahipotézis köré építeni abban a reményben, hogy a régebbi és az újabb eredmények többé-kevésbé súrlódásmentesen kapcsolódnak. Írás közben természetesen számos kompromisszumot kötöttem, a célokat sokszor nem értem el, de saját cikkeinket – két esettől eltekintve – az „Eredmények és megbeszélésük” fejezetben nem hivatkoztam meg. Mindettől függetlenül elfogadom bírálóim véleményét. Erre részletesebben Salgó Professzor Úr bírálatára adott válaszütemben térek ki.

Aláhúzott hivatkozások: a 4.2.4. fejezetben (94. oldal) leírt kutatás, a *Trichoderma reesei* Leloir útvonal három génjének (*gal7*, *gal10*, *gal1*) klónozása során csak kétféleképpen vettem részt, a *gal7*-ében nem. A szöveges magyarázatot túl (43. lábjegyzet) aláhúzással jelöltem azt a Seiboth et al. 2002 hivatkozást, melyben nem vagyok szerző (a cikk a hivatkozások között található), míg azt a Seiboth et al. 2002 cikket, melyben szerző vagyok, az értekezés alapjául szolgáló közlemények között sorolom fel (vagyis ez két különböző cikk). Az Ilyés et al. 2004 közlemény is „saját” cikk, emiatt nem a hivatkozások között, hanem az értekezésem alapjául szolgáló közlemények között található.

Southern hibridizáció: ha egy enzimaktivitás több, függetlenül izolált mutánsban is rendre arányos az enzimet kódoló gén Southern hibridizációval megállapított kópiaszámával, nincs okunk kételkedni. Valamilyen mértékig minden mérőmódszer hibákkal terhelt; úgy vélem, a Southern hibridizáció megfelelő kontrollok alkalmazása mellett megbízható eljárás. Voltak esetek laborunkban, amikor nem adott egyértelmű eredményeket, de azoknál a kísérleteknél jellemzően egyéb problémák is adódtak, így közlésre sem kerültek.

Intracelluláris peroxid szintek: a 2, 7-dichlorofluorescein fluoreszcens festék felszabadulásával jellemeztük. A tenyészetekhez etanolban oldott 2, 7-dichlorofluorescein-diacetátot (11 µM) adtunk. A két acetátcsoport intracellulárisan hidrolizál, majd a vegyületet peroxidok 2, 7-dichlorofluoresceinné oxidálják. Ezen utóbbi molekula fluoreszcens tulajdonságú (504/529 nm hullámhosszak), ami sejteltérítést követően fluoriméterrel mérhető. A kapott eredmény a 2, 7-dichlorofluoresceinnel arányos, intracelluláris peroxid szint, melyet összeférjé tartalomra vonatkoztattunk. Hivatkozás: Royall and Ischiropoulos: *Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. Arch. Biochem. Biophys. 302: 348-55; 1993.*

5) A fentebb 3. pontban említett, csak a laktóz/D-Gal szabályozó szerepére koncentráló megközelítéssel kapcsolatos probléma köszön vissza a 4.1.5. „Laktóz és D-galaktóz anyagcsere *Penicillium chrysogenum*-ban” fejezetben. A gondosan megtervezett és kivitelezett kísérletek szerint a gomba „megnövekedett penicillin-termelő potenciálja nem jár együtt a

laktóz asszimilációs ráta megváltozásával.” (82. oldal). Ezzel annak az izgalmas kérdésnek a vizsgálata, hogy a két penicillin-termelő törzs miért termeli a hatóanyagot különbözőképpen tovább nem is érdekli a kutatót, pedig ettől még a probléma megoldása izgalmas feladat lenne.

Válasz:

A *Penicillium chrysogenum* penicillin túltermelését az ipari mikrobiológia legérdekesebb kérdései egyikének tartom – mi azonban nem ezt, hanem egy túltermelő illetve egy vad típusú törzs laktóz asszimilációját tanulmányoztuk. A laktóz anyagcsere és a hatóanyag kihozatal kvantitatív aspektusai nehezen vizsgálhatók együtt: az előbbihez kizárólagos szénforrásként laktózt tartalmazó táptalajon kell a sejteket növesztetni, míg nagy mennyiségű penicillint csak komplex táptalajon lehet termeltetni, mely a sztöchiometrikus mennyiségű oldallánc-prekurzoron kívül jellemzően kukoricafehérjét és növényi olajokat is tartalmaz. Megoldás a radioaktívan jelölt laktóz használata lehetne, de ezt – mint első válaszomban említettem – akadémiai közegben egyre nehezebb kivitelezni, pláne viszonylag nagy térfogatban.

6) Teljesen új szemléletmódot és kísérleti megközelítési stratégiát mutat be a 4.2. fejezet, amelyben a folyamatos („folytonos”) fermentációs tenyészeteket vizsgálnak. Ez a kísérleti elrendezés érdekes új kutatási kérdéseket vet fel, ráadásul sokkal közelebb áll az iparban használatos fermentációs körülményekhez. Jó lett volna olyan vizsgálatokat is beiktatni, amelyekben a korábban alkalmazott „batch” fermentációk és a folyamatos fermentációk eredményeit összehasonlítják, azaz megtudhatjuk, hogy a korábbi tapasztalatok, ismeretek mennyire alkalmazhatóak a folyamatos fermentáció körülményei között. A 4.2.1. fejezetben (86. oldal) ismét egy kicsit „részhajló” hipotézist olvasunk: „a metabolikus aktivitás a micéliumon átáramló szénváz fluxusát jelenti”. Ez természetesen igaz, de csak akkor, ha minden más, a tenyészet növekedéséhez és termelő aktivitásához szükséges feltétel (pl. N, P, S, mikroelemek, stb.) optimális mértékben adott.

Válasz:

A folytonos fermentációs rendszerek sok szempontból egyedülálló kísérleti adottságait az első általános szakmai kérdésre adott válaszomban már részleteztem. Ha lehetőségünk lenne rá, az összes kísérletünk tenyésztési részét kemosztátban végeznénk. Mivel azonban egy kemosztát létrehozása és fenntartása idő- és munkaigényes, csak akkor volt módunk alkalmazni, amikor célzottan a specifikus növekedési ráta hatását vizsgáltuk.

„Részhajló” hipotézis: lassan növekvő tenyészetnek is lehet magas metabolikus aktivitása, mivel a növekedéshez illetve termeléshez szükséges környezeti feltételek eltérőek is lehetnek. Az ipari fermentációs technológiák – egy vagy akár több komponensre nézve – növekedésre nézve gyakran nem optimális körülményeket írnak elő. A citromsav gyártásánál például szub-optimális nyomelem (pl. Mn(II) ion), nitrogén és foszfor, és szuper-optimális H^+ koncentráció mellett folyik a szénforrás masszív felvétele. Ilyen körülmények között az *A. niger* tenyészet növekedési rátája közel nulla, de metabolikus aktivitása nagy.

SPECIFIKUS SZAKMAI KÉRDÉSEK

a) A 18-19. oldalon kapunk egy viszonylag rövid összefoglalót a D-galaktóz (D-Gal) biológiai szerepeiről. Mivel a D-Gal meghatározóan fontosnak tűnik szinte az egész munkában,

megválaszolatlan marad az a kérdés, hogy miért éppen a D-Gal viselkedik másként a legtöbb vizsgált rendszerben, mint a többi hexóz cukor?

Válasz:

Munkánk során nem magát a D-galaktózt vizsgáltuk, hanem néhány gombafaj D-galaktóz anyagcseréjét. Ilyen szempontból a D-galaktóz valóban a dolgozat egyik főszereplője, de arról sajnos nem tudok nyilatkozni, hogy másként viselkedik-e, mint a többi hexóz cukor, mivel a kontroll D-glükózon kívül érdemben nem vizsgáltuk más hexóz cukor anyagcseréjét.

b) 57. oldalhoz kapcsolódó laikus kérdés: „A galaktóz elfogyása után a sejtek szétesnek” megállapítás általános érvényű? Ha tényleg szétesnek a sejtek, akkor sok minden megváltozik a D-Gal elfogyása után, ezt pedig figyelembe kellene venni a kísérletek kiértékelésekor nem csak itt, hanem másutt is. Vagy nem minden esetben esnek szét a sejtek?

Válasz:

A kísérlet során a mutáns törzs tenyésztését éhezettettük, azt várva, hogy az intracellulárisan felhalmozott galaktitolt elkezdje hasznosítani. Nem tette, akkor sem, amikor már elkezdtek szétesni a sejtek. Ez napokkal a galaktóz elfogyása után történt, és nem is egyszerre minden sejtnél. Igazából csak az *araA1* mutánsok galaktitol-fenotípusának abszolút jellegét próbáltam ilyen módon is szemléltetni.

*c) A 64. oldalon felvetődik, hogy a D-Gal maga indukálja a *bgaD/lacpA* (permeáz és hidroláz) működését vagy a D-Gal egy „lebontási köztese”. A hipotézis tesztelésére elvégzett kísérlet sorozat azt feltételezi, hogy csak egyetlen vegyület lehet a permeáz és hidroláz induktora. Mire alapozták ezt a feltételezést? Ha több induktor is lehetséges, akkor nem elegendő az első enzimatis lépésekben mutánsok vizsgálata alapján levonni a következtetést, hogy a D-Gal valóban az egyetlen induktor. Ebből a szempontból is érdekes a 100. oldalon a *Trichoderma reesei* celluláz termelésre leírt diszacharid induktor, amelyik nyilván nem terméke egyik (Leloir vagy oxido-redukciós) laktóz/D-Gal lebontási útvonalnak. Kizárható egy hasonló, rejtélyes úton keletkező induktor az *A. nidulans* hidroláz/permeáz enzimek esetében? Ebben a kísérlet sorozatban és másutt sem köszön vissza, hogy van-e az eseményekre hatása a N, P, S, stb forrásnak.*

Válasz:

A kérdésünk az volt, hogy a D-galaktóz valamelyik lebontási köztesének létre kell-e jönnie az indukcióhoz, vagy elég hozzá maga a természetben megtalálható vegyület, a galaktóz. Az alkohol lebontása során *A. nidulans*-ban az *alc* génnek induktora az acetaldehid, nem az etanol – ennek analógiájára tettük fel kérdésünket, és a fenti példával ellentétes választ kaptunk.

Ha egy lebontási útvonal első enzime hiányzik, akkor a lebontás azon az úton leáll. A galaktóznak foszforileződnie kell ahhoz, hogy a Leloir-, illetve dulcitolá redukálódnia, hogy az oxido-reduktív útvonalra kerülhessen. Megkerülni – tudomásunk szerint – az *A. nidulans* anyagcsere nem tudja ezeket a lépéseket. Mivel lebontási köztesek nem keletkezhetek, de a *bgaD/lacpA* génpár mégis kifejeződött, egyéb lehetőségek híján csak a galaktóz lehet az induktor. További bizonyíték, hogy a galaktokináz/hexokináz kettős mutáns nőni sem tud galaktózon – vagyis a szénváz nem jut túl a lebontási útvonal első lépésein – mégis indukálódik a génpár.

d) 73. oldal, 49. ábra: Sikerült-e időközben kísérletes bizonyítékot találni arra, hogy az *Aspergillus niger*-ben tényleg csak egy D-Gal permeáz található?

Válasz:

Sajnos nem sikerült, a gént még nem üttük ki.

e) A cukor sztereokémiában kevésbé jártas olvasó csak a 4.3.1. fejezetben (98. oldal) kerül szembe a mutarotáció jelenségével és a galaktokináz enzim anomer szelektivitásával. Ez érdekes új szempontot hoz be a szabályozással összefüggő kérdésekbe is, amiről korábban nem volt szó. Miért csak itt kerül elő a mutarotáció kérdése és a spontán vs. enzimatis anomer átalakítás hogyan befolyásolhatta a korábbi kísérletek eredményeit? A többi vizsgált *Ascomycetes* gomba mindegyike rendelkezik mutarotáz aktivitással, azaz az UDP-glükóz epimerázuk minden más esetben tartalmaz aktív mutarotáz domént? Sikerült időközben választ kapni a rejtélyes induktor bioszintézisére és feltárni a *Trichoderma reesei* celluláz termelés szabályozását?

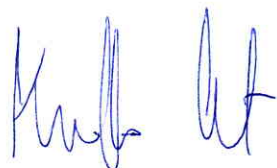
Válasz:

Noha az enzim-katalizált mutarotációt *Penicillium chrysogenum*-ból írták le először (Keilin and Hartree: *Biological catalysis of mutarotation of glucose*. *Biochem J* 50: 341–348; 1952), fonalas gombában a D-galaktóz anyagsere kapcsán eddig nem vizsgálták a mutarotációt (= a C-1 anomer szénatomon lévő hidroxil csoport konfigurációjának megváltozását). Emiatt az elmúlt időszakban laborunk kísérletesen jellemezte az *A. nidulans* D-galaktóz mutarotázait, és *in silico* megvizsgáltuk a három *Ascomycota* altörzsbe (*Pezizomycotina*, *Taphrinomycotina*, *Saccharomycotina*) tartozó genom-szekvenált fajok többségét ebből a szempontból.

Emberből, *E. coli*-ből és *Saccharomyces cerevisiae*-ből már írtak le és jellemeztek is mutarotáz enzimeket. Ezeket mintának véve *A. nidulans*-ban két mutarotáz homológ gént találtunk, melyeket *galmA*-nak (lókusz AN3184) és *galmB*-nek (AN3432) neveztünk el. A megvizsgált több száz gombagenom szinte mindegyikében találtunk feltételezett ortológokat (kivétel: *S. cerevisiae* és néhány közelrokon élesztőfaj, melyekben a mutarotáz nem önálló, hanem az UDP-glükóz epimeráz része). A *Pezizomycotina* genomok általában egynél több feltételezett galaktóz mutarotázt tartalmaznak: az *A. nidulans* *galmA* és *galmB* ortológjai is megtalálhatók bennük. A *Taphrinomycotina* és *Saccharomycotina* fajok genomjai viszont általában csak egy feltételezett galaktóz mutarotáz gént tartalmaznak.

A *T. reesei* törzsekben talált Hex-β-1,1-Hex diszacharid pontos szerkezete továbbra is ismeretlen. A variációk nagy száma miatt azonosításához szisztematikus szerves szintézisekre lenne szükség, amihez még nem találtunk sem szakmai partnereket, sem forrásokat.

Végezetül, szeretném még egyszer megköszönni Kovács Kornél professzor úr bírálatát.



Dr. Karaffa Levente

Debrecen, 2017. augusztus 17.