

Válasz Prof. Dr. Holb Imre opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Holb Imre professzor úrnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát. Külön köszönöm dicsérő szavait és támogató véleményét.

Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

A karotinoidtermelés biotechnológiai alkalmazásának biológiai lehetőségei a járomspórás gombákban, valamint a felhasználható törzsek bemutatása számos vonatkozásban kellően részletezettek az értekezésben. Ebből adódik az értekezés körében született eredmények hasznosulási, gyakorlati alkalmazási lehetősége is. Nevezetesen, hogy az értekezés körében értékesnek ítélt új törzsek esetében, eddig milyen ipari biotechnológiai alkalmazási, gyakorlati hasznosulási lehetőségek születtek ill., milyen stádiumban vannak a jövőbeni ipari hasznosulási lehetőségek? Mennyiben hasonlíthatók ezek össze az adott témában elért ipari alkalmazási lehetőségekkel?

A dolgozatban leírt kutatások és az ismertetett törzsek létrehozásának célja az volt, hogy megismerjük a karotinoid bioszintézis genetikai hátterét ezekben a gombákban és megvizsgáljuk, hogy lehetséges-e és milyen módon ennek fejlesztése. Ezt a célt sikerült elérni annyiban, hogy megállapítottuk, hogy milyen gének túlműködtetésével lehet elérni a karotinoidprodukciónövelését *Mucor circinelloides*-ben (elsősorban a *hmgR2*, *3*, *ipi* és *carG* géneket emelném ki). Emellett részt vettünk annak tisztázásában, hogy mely géneket érint (és hogyan) a karotinoid-bioszintézis fény általi indukciója. Megállapítottuk, hogy lehetséges a xantofilltermelés ebben a gombában, bár elsősorban a kantaxantintermelést sikerült megvalósítani.

A terpén bioszintézis gének túlműködtetésével nyert β -karotin-termelő mutánsok maximális karotinoidtartalma minimál táptalajon 2 mg/g (száraz tömeg) körüli volt, a β -karotin-tartalom pedig ~1-1,5 mg/g (száraz tömeg). Ez a tenyésztési körülmények optimalizálásával még fokozható, akár többszörösére is. Ezen törzsek (pl. MS12+pPT84) karotinoidtartalma megközelíti azét az *M. azygosporus* törzsét, amellyel már folytak a gyakorlati alkalmazhatóságot célzó kísérletek (Azmi és mtsi. 2011, 2015). Ugyanakkor elmarad a jelenleg iparban alkalmazott *Blakeslea trispora* törzs hozamától (ipari fermentáció során, optimalizált körülmények közt: ~30 mg/g (száraz tömeg) (Iturriaga és mtsi. 2005). A *M. circinelloides* karotinoidtermelése fokozható a bioszintézis fényfüggésének kiiktatásával, valamint a karotinoid degradáció (pl. a *carS* gén által kódolt karotin oxigenáz) gátlásával. A fényszabályozásban résztvevő *crgA* gén deléciójával a közelmúltban 4 mg/g (száraz tömeg) β -karotin-tartalmat sikerült elérni (Zhang és mtsi. 2016). Ilyen további módosítások megtételével, illetve az általunk javasolt gének túlműködtetésével véleményem szerint elő lehet állítani egy, a gyakorlatban is hasznosítható karotinoidtermelő törzset.

A jelenleg rendelkezésre álló törzsek tehát jó kiindulópontnak tekinthetők a további fejlesztésekhez. Erre jó példa, hogy az egyik kantaxantintermelő törzset (MS12+pCA8lf/1) sikeresen használtuk kísérletekhez szükséges tiszta kantaxantin előállítására saját és az együttműködő partnereink számára. E törzsnél, megfelelő tenyésztési körülmények közt szinte teljes volt a β -karotin–kantaxantin konverzió, ami megkönnyítette a kantaxantin nagy tisztaságban történő kinyerését.

Eredmények összefoglalása fejezet 23 pontban mutatja be az értekezés legfontosabb eredményeit. Számomra szokatlanul jelentős ez a 23-as szám, noha nem a tudományos tartalom tekintetében, hanem inkább abban a vonatkozásban, hogy az egyes pontok szakaszoltabb formában szerepelhettek volna e fejezetben, a 4 fő célkitűzési feladatpontnak megfelelő csoportosításban pl. az 1-7. pontok a törzsgyűjtemény létrehozása és tulajdonságainak jellemzése csoportba kerül és így tovább. Ezen belül talán egy-egy jelenlegi eredménypont (pl. 1-2. pontok) logikai összevonása is lehetséges, melyre a jelöltnek lehetősége adódhat az új eredmények összefoglalásának bemutatáskor az értekezés nyilvános vitáján.

Az eredmények felsorolásakor, a könnyebb áttekinthetőség érdekében az egyes kísérleti szakaszoknak megfelelően szedtem pontokba az eredményeket. Valóban lehetett volna kevesebb eredménypontot felsorolni, illetve néhányat összevonni, erre a nyilvános védés során törekedni fogok.

*Az eredmények összefoglalása 5. pontjával kapcsolatban észrevételem a következő. A 38. oldalon a 7. ábrán az autentikus törzsek száma/a leírt fajok száma és a MOTU-k száma látható. Az ehhez kapcsolható lineáris függvények pedig a szövegben kerülnek bemutatásra. Az 'A' ábrán nem jelenik meg a lineáris függvény és így a MOTU 100 % és az autentikus törzsek száma közötti 170-es érték metszéspontja sem érzékelhető, ugyanígy a 'B' ábrán a 100 % és 126-os érték esetében sem. E nélkül az ábrák a trendszerűséget valóban csak sugallják, ahogy azt a szerző $y:0,54x$ függvény esetében le is írja. A 7A ábrára vonatkozó függvényből $0,54 * 170 : 91,8$ -as MOTU érték kapható, vagy fordítva 100% MOTU értékhez $(0,54 * x : 100)$ 185,2-es, azaz "185 autentikus törzsszám tartozik (a szerző által megadott 170-nel szemben), ami az mutatja, hogy a megadott lineáris függvény nem illeszkedik kellően. Ezt az is igazolja, hogy a szerző szerint is telítődési görbe jelleg várható, amihez viszont nem lineáris függvényillesztés tud megfelelő választ adni az autentikus törzsek számának becslésekor. Emellett, mivel becslésről van szó, egy tartományi értéket, nem pedig egy konkrét számot várhatnánk az autentikus törzsek számának meghatározásakor. Ugyanez érvényes a 7B ábra esetében is a leírt fajok számának becslésekor.*

Köszönöm a megjegyzést. A megadott görbék valóban telítési jelleget mutatnak és valóban a várható autentikus törzs, illetve fajszám 185-nek, illetve 139-nek adódna a megadott módszerrel, ezt pontosabban kellett volna megadni. Ugyanakkor ez a fajszám sem haladja meg markánsan a leírt fajok számát (kb. 127-130), így nem befolyásolja azt a végkövetkeztetést, hogy a *Mortierella* fajok többségét valószínűleg már leírták és a leírt fajok típusörzseinek szekvenálásával jelentősen javítható a környezeti mintákból származó meghatározatlan szekvenciaadatok identifikálása. El kell ismerni, hogy a leírt kísérlet eredménye valóban csak sugall egyfajta trendszerű jelleget. Látni kell azonban, hogy a kísérlet célja alapvetően az volt, hogy a korábbi publikációkban megjelent becslésekkel szemben, melyek sok esetben nagyon nagy számokkal adják meg a még le nem írt gombafajok számát (pl. Hawksworth, 2001; O'Brien et al., 2005; Mueller és Schmit, 2007), megalapozottabban, a ténylegesen leírt fajokat, valamint a fajszinten azonosított és nem azonosított szekvenciaadatokat is figyelembe véve tudjunk mondani valamit a még le nem írt fajok várható számáról. A korábbi becslések elsősorban az új fajokat leíró publikációk megjelenésének dinamikájából, a növényi vagy rovar gazdákhoz asszociálódó gombafajok számából vagy a környezeti mintákban előforduló, de fajszinten nem identifikált szekvenciák gyakoriságából próbáltak meg következtetéseket levonni. A jelenleg leírt gombafajok száma 100 000 körüli, a teljes (leírt és még le nem írt) fajszámra vonatkozóan azonban a hivatkozott cikkekben a becslések a 1,5-3,5 milliós fajszámot is elérik. Az ismertetett vizsgálat apropóját az adta, hogy a dolgozatban hivatkozott publikáció megjelenésének idején a környezeti minták (törzszolálás/tenyésztés nélküli) szekvenálásával kapcsolatban volt egy olyan szakmai várakozás, hogy segítségével rohamosan nőni fog a csak szekvenciák alapján leírt/leírható új fajok száma és ezt a nagyon nagyra becsült fajszámot sikerül viszonylag rövid, illetve belátható időn belül megközelíteni (Hibbett és mtsi. 2011).

Egyéb periférikus megjegyzések: 6. oldal: gombák vonatkoztatva nem szerencsés a 'kárttevő' illetve a 'raktári kárttevő' kifejezés használata. Gombákra vonatkozóan a 'növénykórokozó gomba' illetve 'raktári növénykórokozó gomba' kifejezés javasolható. A 'kárttevő' kifejezés sokkal inkább az 'állati kárttevők' vonatkozásában a helytálló.

A „raktári kárttevő” kifejezés helyett valóban megfelelőbb lett volna a bíráló által javasolt „raktári növénykórokozó gomba” kifejezés.

8. oldal: az ergoszterin és annak bioszintézise nemcsak a klinikai gyakorlatban, de a mezőgazdaságban, a növényvédelemben is erőteljesen kutatott terület. EBI fungicidek néven ismert,

igen jelentős gombaölő szer csoport, noha nem a járomspórás gombák, hanem egyéb növénykórokozó gomba csoportok elleni védekezésben töltenek be jelentős szerepet.

Köszönöm az észrevételt. Mivel a Mucorales rend tartalmaz néhány opportunistá humánpatogénként is számontartott fajt, ezért emeltem ki az ergoszterin-bioszintézis klinikai relevanciáját.

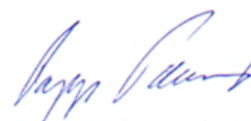
35. oldal: A 6. ábra esetében mindössze a 6 F, G, P, Q, és O részára hivatkozásokat találtam meg a szövegben, a 6 A-tól 6 R-ig terjedelmű részarábrákból.

Valóban helyesebb lett volna minden részára hivatkozni a szövegben is. A 6. ábra feladata ugyanakkor, szándékaim szerint, az lett volna, hogy egy általános képet adjon a Mortierellaceae családba tartozó, talán kevésbé ismert gombák morfológiájáról, illetve ebből a szempontból is bemutassa az 5. ábrán szereplő törzsfán elkülöníthető csoportokat. Ha a szövegben nem is minden panelre történik hivatkozás, az ábraalírásokból kiderül, hogy melyik részára, melyik gombára, illetve kládra vonatkozik.

A további, az „egyéb periférikus megjegyzések” alatt felsorolt észrevételekre szeretnék összevontan válaszolni: a bíráló összes észrevételével egyetértve, elnézést kérek az elírásokért és a formai pontatlanságokért, ezek kiküszöbölésére a további munkáimban fokozottan ügyelni fogok. A mondatkezdő és a táblázatok és ábrák felirataiban szereplő fajnevek esetében valóban ügyelni kellett volna arra, hogy a nemzetségnév teljesen ki legyen írva.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Holb Imre professzor úrnak dolgozatom alapos bírálatát, javításait és építő jellegű megjegyzéseit.

Szeged, 2018. 03. 27.



Dr. Papp Tamás

Hivatkozások

Azmi W, Thakur M, Kumar A (2011) Production of β -carotene from deproteinized waste whey filtrate using *Mucor azygosporus* MTCC 414 in submerged fermentation. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58: 189-200.

Azmi W, Thakur M, Javed A *et al.* (2015) Interactive effect of agitation speed and aeration rate on heat stable β -carotene production from *Mucor azygosporus* using deproteinized waste whey filtrate in stirred tank reactor. *Curr Biochem Eng* 2: 65-72.

Zhang Y, Navarro E, Cánovas-Márquez JT *et al.* (2016) A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate β -carotene over-producing strains by genetic engineering. *Microb Cell Fact* 15: 99.

Iturriaga EA, Papp T, Breum J *et al.* (2005) Strain and culture conditions improvement for β -carotene production in *Mucor*. In: *Microbial Processes and Products, Methods in Biotechnology series*; 18. Barredo JL (ed.) Humana Press, Totowa, pp. 239-256.

Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105: 1422-1432.

Hibbett DS, Ohman A, Glotzler D *et al.* (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fung Biol Rev* 25: 38-47.

O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA *et al.* (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 71: 5544-5550.

Mueller GM, Schmit JP (2007) Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiv Conserv* 16: 1-5.