

Válasz Prof. Dr. Posta Katalin opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Posta Katalin professzor asszonynak, hogy elvállalta az értekezéssel kapcsolatos opponensi feladatokat. Külön köszönöm dolgozatom alapos bírálatát, kritikai észrevételeit és támogató véleményét.

Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

Az Anyagok és módszerek mindössze hat oldal terjedelemben tartalmazzák a legfontosabb módszereket és vizsgálati anyagokat, a függelékben található táblázatokkal kiegészítve. A rövid terjedelem nem feltétlenül rossz, hiszen ilyen nagymértékű munka teljes módszertani leírása nem várható el, és a megjelent publikációkban megtalálhatóak az itt nem közölt információk. Ugyanakkor nagyobb odafigyelést igényelt volna ennek a résznek az összeállítása, mivel olyan dolgot is részletez, mely korántsem szükséges egy akadémiai értekezésben (pl. tápközegek összetevőinek leírása). Néhány elem pedig pontosabb, tudományosabb megfogalmazást, leírást igényelt volna.

Valóban lehetett volna egyes módszereket jobban részletezni. Ugyanakkor igyekeztem az amúgy is kissé hosszúra nyúlt szöveg terjedelmét nem tovább növelni, ezért arra törekedtem, hogy ahol lehetett, az eljárások hivatkozásait tüntettem fel. A tápközegek összetételének megadása talán valóban elhagyható lett volna. Azért kerültek bele a dolgozatba, mert a tápközeg összetétele a karotinoid tartalom és összetétel, valamint a morfológia (a Mortierellaceae vizsgálatánál) szempontjából meghatározónak bizonyult, illetve a karotinoid mennyiségeket túlnyomó részt ugyanazon tápközegen vizsgáltuk.

A vállalt feladat, a törzsgyűjtemény létrehozása jellegénél fogva kevésbé diszkutálható, éppen ezért nem is lett volna szükség az 5.1.1 fejezet egy részére. Ilyen részletességű kifejtést az irodalmi részben jobban el tudtam volna képzelni és a saját eredményekként csak rövid bemutatást adni erről a területről.

Az 5.1.1 fejezet a Mortierellaceae család filogenetikai vizsgálatát foglalja magában. A vizsgálatot a törzsgyűjteményben elhelyezett nagyszámú izolátum és az azokból nyert szekvenciaadat tette lehetővé. Valóban lehetett volna kevesebb irodalmi adatot, illetve háttér ismertetést adni ehhez a részhez. Mégis azért éreztem fontosnak, hogy ilyen jellegű információk is szerepeljenek itt, mert ez a talajban gyakori és elterjedt gombacsoport (illetve a velük kapcsolatos kérdések – taxonómiai problémák, lipidtermelés, stb.) csak igen kevésbé ismert és az itt közölt adatok az eredmények értékelését, illetve talán jelentőségének megértését megkönnyíthetik.

A Blakeslea trispora járomspórás gombát nagyüzemi karotin termelésre használják az iparban, vagyis a célkitűzésben vállalt feladatokhoz szorosan kapcsolódik ez a törzs. Meglepő, hogy a törzsgyűjteményük, mely valóban értékes, nem tartalmaz ilyen izolátumot, holott nyilvános törzsgyűjteményekből is könnyen beszerezhető és akár viszonyítási alapként is felhasználható lett volna a karotintermelés mennyiségére vonatkozó kísérleteknél.

A törzsgyűjteményünk tartalmaz két *Blakeslea trispora* izolátumot (NRRL 2456, NRRL 2895), melyeket valóban nem tüntettem fel a dolgozatban. A *B. trispora* karotinoid tartalmát viszonyításként említettem a dolgozatban, igaz csak irodalmi hivatkozás formájában (Iturriaga és mtsi. 2005, Mehta és mtsi. 2003). Utóbbi hivatkozás a vad típusú törzsek karotinoid tartalmára vonatkozik (260-300 µg/g[száraz tömeg]), mely jóval elmarad az ipari, optimalizált körülmények közt (pl. eltérő párosodási típusú törzsek kevert tenyészetével, megfelelő adalékokkal kiegészített tápközegben) elérhető karotinoid tartalomtól (30 mg/g[száraz tömeg]). A törzsgyűjteményünkben megtalálható izolátumok össz-karotinoid és β-karotin tartalma, az általunk alkalmazott körülmények közt, kísérlettől és kivonástól függően kb. 350-580 és 212-352 µg/g[száraz tömeg] volt. Ezt valóban meg lehetett volna adni. Ugyanakkor e törzseket és általában a *B. trispora* karotinoid termelését azért nem vizsgáltuk és vontuk be a kísérleteinkbe, mert egyrészt ezeket nagyon részletesen tanulmányozták, illetve

tanulmányozzák, többek közt, az együttműködő partnereink közül többen is, másrészt éppen olyan új törzseket szerettünk volna azonosítani, melyek nem a *B. trispora*, illetve a *Phycomyces blakesleeanus* fajba tartoznak és esetleg éppen ezekkel szemben alternatívát jelenthetnek. Mindemellett a kutatásaink fő iránya a terpén és karotinoid bioszintézis genetikai hátterének és genetikai módosításuk lehetőségének feltárására, valamint az ehhez szükséges eszköztár létrehozására vonatkoztak. Mivel a két említett faj esetében azonban ez nem volt megvalósítható, munkánk során más könnyebben vizsgálható modellorganizmust használtunk. Egyébként jelenleg mind a *B. trispora*, mind a *P. blakesleeanus* esetében dolgozunk a genetikai módosítás megvalósításán, illetve a kutatócsoportunk által *M. circinelloides*-re kidolgozott *in vitro*, plazmidmentes CRISPR-Cas9 rendszer (Nagy és mtsi. 2017) adaptálásán és a módszer különböző génbeviteli eljárásokkal való kombinálásán (pl. biolisztikus eljárás, protoplaszt transzformáció).

Az F1 táblázat alapján úgy értelmeztem, hogy a 130 törzs többsége külföldi, csak egy magyar izolátumot tartalmazva. Tudjuk, a molekuláris biológiai- és barcode vizsgálathoz pontosan jellemzett izolátumok szükségesek, de mindez nem lehetett gát, hogy a 421 reprezentatív képviselő mellett a nemzetközi vizsgálat alapján pár magyar szabadföldi izolátum is bekerüljön. A törzsgyűjtemény többi genusza tartalmaz számos magyar és olyan izolátumot, amely nem található meg más törzsgyűjteményben. Miért pont a legjobban elemzett csoport esetében nincs több saját/magyar izolátum?

Az F1 táblázatban valóban egy magyarországi *Mortierella alpina* izolátum lett feltüntetve. Ezen kívül a törzsgyűjteménybe a dolgozatban említett vizsgálat óta elhelyezésre került még 2 *M. polycephala* és egy-egy *M. hyalina* és *M. verticillata* izolátum. A dolgozatban részletesebben ismertetett filogenetikai vizsgálathoz elsősorban típus és autentikus törzseket használtunk, a 421 törzset magába foglaló adatsor viszont nem csak a mi gyűjteményünkön alapult, hanem az általunk meghatározott szekvenciák mellett az együttműködő partnerek által meghatározott szekvenciák és több törzsgyűjteményben tárolt izolátum lett bevonva, ezeket terjedelmi okokból nem részleteztem. Mivel a vizsgált *Mortierella* törzsek ugyan képesek voltak karotinoid termelésre, de a karotinoid tartalmuk nem volt kiemelkedő, nem éreztük szükségét további törzsek bevonására.

A dolgozatban nehéz volt követni, hogy pontosan hány izolátumnál történt a karotin tartalom meghatározása HPLC és hány izolátum esetében VRK-val. Kicsit pontosabb módszerleírás/kísérleti rendszer leírás jó lett volna, és néhány kérdés itt is felmerült.

Valóban lehetett volna pontosabban megadni a karotinoid tartalom meghatározásának módját. A dolgozatban részletezett vizsgálatokban, ahol az össz-karotinoid szint és az egyes karotinoidok mennyisége meg van adva, természetesen HPLC-vel történt a meghatározás. Az F1 táblázatban megadott karotinoid összetételek többsége vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatokon alapul (azoknál a törzseknél végeztük el a HPLC analízist, ahol részletesebb elemzést is végeztünk).

Vizsgálatainkban 28 °C helyett 35 °C alkalmazása néhány esetben háromszoros mennyiségű karotintermelést eredményezett. A cukrok, így például aszparaginsav vagy trehalóz többszörösére növelte az összkarotinoid vagy és β -karotin tartalmat. Mindezen tapasztalatok alapján, véleménye szerint ipari méretekben, ipari és gazdasági szempontokat is figyelembe véve reális-e ezen törzsek használata karotin előállításra?

*Megjegyzem ebbe a kísérletsorozatba is jó lett volna bevonni az iparban alkalmazott *Blakeslea trispora* faj néhány izolátumát, hiszen a vizsgálatok során több olyan izolátumot is azonosítottak, melyek termelőképessége összevethető az ipari törzsszel (40. - 41. oldal).*

Ahogy korábban említettem, megfelelő fermentációs körülmények közt és mutánsok alkalmazásával a *B. trispora*, ipari körülmények közt kb. százszor nagyobb karotinprodukcióna képes, mint az egyedi természetes izolátumok. Az 2. és 3. táblázatokban bemutatott törzsek mindegyike ígéretes karotinoid forrás lehet és megérné tovább vizsgálni a karotinoid termelésük fokozásának

lehetőségeit. Ugyanakkor a gazdasági hasznosításhoz, akár a tenyésztési-fermentációs körülmények optimalizálásával (ehhez kiindulópontul szolgálhatnak a dolgozatban is ismertetett vizsgálatok), akár törzsnemesítéssel még tovább kellene fokozni a karotinoid akkumulációt (legalább kb. tízszeresére a jelenleginek). A jellemzett törzsek közül ebből a szempontból kiemelném a *Mucor azygosporus*-t, melynek hasznosíthatóságát mások is tanulmányozták már (Azmi és mtsi. 2011, 2015), valamint az *Amylomyces rouxii*-t, melyet egyes távolkeleti fermentált ételek starter kultúráiban és enzim termelésre használnak (Yu és Chou 2005, Watanabe és Oda 2008, Kito és mtsi. 2009), így amellet, hogy biztonságos mikroorganizmusnak tekinthető, a fermentációs ipar által ismert és használt organizmusról van szó. A *Backusella lamprospora* későbbi hasznosítása szempontjából érdekes lehet, hogy ennek genetikai módosításához szükséges eszközökkel rendelkezünk (a dolgozatban említésre került).

A HMG-KoA-reduktáz gének izolálása és transzkripciójuk elemzése - Ezért is meglepő, hogy a 3. táblázatban bemutatott eredmények alapján legnagyobb mértékű karotinoid szintet eredményező galaktóz, mint C-forrás nem került be a relatív transzkriptumok szintjének mérésénél vizsgált szénforrások közé. Mi ennek az oka?

Köszönöm az észrevételt. Valóban be lehetett venni a galaktózt mint szénforrást a *hmgR* gének transzkripciójának elemzésébe. A dolgozatba azért nem került be, mert későbbi vizsgálatokban kiegészített táptalajokban nem bizonyult annyira a karotinoid termelést fokozó szénforrásnak, mint azt az egyedüli szénforrásokkal végzett kísérletek sugallták. A három gén transzkripciója egyébként galaktózon, mint egyedüli szénforráson a maltózon és trehalózon tapasztalnak felelt meg, illetve azokhoz hasonló profilt mutatott, azaz a *hmgR1* esetében a glükózon tapasztalt transzkriptum szinttől nem volt szignifikáns eltérés, a *hmgR2* és *hmgR3* esetében pedig a glükózon mérthez képest csökkent a relatív transzkriptum szint.

A vizsgált C-források közül a trehalóz alkalmazásakor kismértékű expressziót mértek, ugyanakkor 3. táblázat szerint azonos izolátumnál (SZMC12082 = MS12) a legmagasabb szintű össz-karotinoid illetve β -karotin szint jelentkezett. Mi lehet ennek a magyarázata, hiszen a HMG-KoA képződés feltételezett prekursoraként szolgáló dihidroxi acetonnál és nátrium acetátnál nagymértékű expressziót mértek.

E tekintetben sajnos csak feltételezéseink vannak. Ahogy a dolgozatban említettem a nátrium-acetát és a dihidroxi-aceton közvetlenül befolyásolja a prekursor mennyiséget a mevalonsav út számára, továbbá kimutatták, hogy az acetát hatással van a *Blakeslea* és *Phycomyces* terpén-bioszintézisére (Kuzina és Cerdá-Olmedo 2006) és baktériumban igazolták, hogy stimulálja a HMG-KoA enzim aktivitását (van Laar és mtsi. 2012). Tehát ez a két vegyület a mevalonsav út kezdeti szakaszán fejt ki hatását. A trehalóz karotinoid termelésre gyakorolt kedvező hatását más gombák, pl. *Xanthophyllomyces dendrorhous* esetében is kimutatták (Palágyi és mtsi. 2001) A trehalóz a gombákban, így a Mucorales rendbe tartozók esetében is, fontos tartaléktápanyag, mely pl. *Phycomyces* esetében a spórák szárazanyag tartalmának akár 35%-át is kitehetik (Rúa és mtsi. 2008). Tápanyaghiány esetén a trehalóz felhasználásra kerül, ilyenkor a trehaláz enzim hatására glükózzá alakul és ebben a formában hasznosul tovább. Ez alapján azt is várhatnánk, hogy a glükózhoz hasonló hatást gyakorol a vizsgált gének átíródására (nem ezt tapasztaltuk). Ugyanakkor lehetséges, hogy e diszacharid karotinoid szintet növelő hatása nem a *hmgR* gének indukciójának szintjén, hanem a karotinoid bioszintézis későbbi, pl. karotinoid-specifikus szakaszán érvényesül (akár a génműködésre hatva, akár a szabályozás más szintjén). Megjegyzendő, hogy a gombák által akkumulált trehalóz egyik leglényegesebb funkciója, hogy hatékony antioxidáns és (egyébként a β -karotinnal együtt) fontos részét képezi az oxidatív stresszel szembeni nem enzimatiszikus védelmi rendszernek (De Castro és mtsi. 2013, Rúa és mtsi. 2014). Elképzelhető az is, hogy a rendelkezésre álló trehalóz nem (vagy nem csak) közvetlenül a karotinoid termelésre hat, hanem akkumulációja esetleg védelmet biztosít a képződő karotinoidok oxidatív degradációjával szemben.

Vizsgálták a gomba ergoszterin-tartalmát is aerob, és anaerob tenyésztést követően megállapítva, hogy a *hmgR3* transzkripciója erősödött, a teljes ergoszterintartalom anaerob közegben azonban radikálisan csökkent. Mivel magyarázható ez a jelenség, és hogyan változik az összes karotinoid tartalom?

Ahogy a dolgozatban említettem, több gombánál is igazolták, hogy az oxigénszint hatással lehet a HMG-KoA reduktáz gének működésére, illetve *Saccharomyces cerevisiae* esetében, hogy az anaerob viszonyok a gomba két izogénje közül a HMG2 kifejeződését indukálják.

Az ergoszterin bioszintézise erősen oxigénigényes folyamat (1 ergoszterin molekula bioszintéziséhez 12 oxigén molekulára van szükség), pontosabban az általános mevalonsav útról leágazó ergoszterin bioszintézisnek a szkvalén köztitermék képződését követő lépései igényelnek oxigént (Todd és mtsi. 2006, Zavrel és mtsi. 2013). Anaerob körülmények közt ezért az ergoszterin szint számos gombában lecsökken. *S. cerevisiae* esetében, anaerob tenyésztés mellett, ha a gomba nem jut a tápközegből ergoszterinhez, 6-7 generációt követően leáll a növekedés (Dumitru és mtsi. 2004, Zavrel és mtsi. 2013). Nem minden gomba igényel azonban ergoszterint az anaerob növekedéshez, ilyen pl. a *C. albicans* (Dumitru és mtsi. 2004, Zavrel és mtsi. 2013). A *Mucor circinelloides* sajátossága, más rokon fajokhoz hasonlóan, hogy míg aerob körülmények közt fonalas morfológiát mutat, addig anaerob körülmények közt élesztőszerű formában nő (Lübbehüsen és mtsi. 2003, Lee és mtsi. 2015). A morfológiai váltás pedig hat a membrán anyagcserére, illetve összetételre is. A dolgozatban is hivatkozott tanulmányban (Gordon és mtsi. 1970) a közeli rokon és ugyancsak dimorf *M. genevensis*-t vizsgálták. Ennél a gombánál is azt tapasztalták, hogy anaerob körülmények közt élesztőszerű sejteket produkáló gombában az ergoszterin tartalom a mi kísérleteinkben tapasztaltakhoz hasonló mértékben lecsökken (sajnos újabb az ergoszterin tartalom összehasonlítására vonatkozó publikációt nem találtam).

Az ergoszterinszint csökkenése és az oxigénhiány hatására számos gombában indukálódik/megnövekszik egyes gének, pl. a terpén és ergoszterin bioszintézis gének kifejeződése (Todd és mtsi. 2006, Bien és Espenshade 2010). *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus fumigatus* és *Cryptococcus neoformans* esetében is igazolták, hogy oxigénhiány esetén az emlősök SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) transzkripció faktorával homológ fehérjék (pl. Sre1) aktiválnak egy sor gént, köztük a HMG-KoA reduktáz géneket és így szerepet játszanak az oxigénhiányos állapothoz való alkalmazkodásban (Bien és Espenshade 2010). A SREBP kötőhelye viszonylag konzervált (SRE; *sterol regulatory element*), de ilyet a *Mucor hmgR* gének promóter régióiban nem találtunk. Ennek ellenére rendelkezhetnek ilyen mechanizmussal, mivel gyakori, hogy a más gombacsoportokban megállapított konszenzus szekvenciák járomspórás gombák esetében nem találhatók/nem felismerhetők.

Tehát oxigénhiány esetén csökken az ergoszterin szint, az oxigénhiány és az ergoszterin szint csökkenés hatására az ergoszterin bioszintézis gének működése fokozódik. Ugyanakkor az ergoszterinszint (külső ergoszterin forrás nélkül) oxigén hiányában végül is csökkenni fog.

A karotinoid bioszintézis szintén oxigénigényes folyamat, ezért anaerob viszonyok esetén az össz-karotinoid mennyiség minimális (Mosqueda-Cano és Gutiérrez-Corona 1995, Iturriaga és mtsi. 2005).

Az ergoszterin és karotinoid tartalomtól függetlenül az általános mevalonsav út és az annak kulcslépését katalizáló HMG-KoA reduktáz aktivitásának fenntartására anaerob körülmények közt is szükség van, mivel azon keresztül egyéb fontos terpenoidok (pl. egyes fehérjék prenil csoportjai, membránalkotók, stb.) is képződnek, melyekre a sejtnak szüksége van (Kuranda és mtsi. 2009).

A R. miehei HMG-KoA-reduktáz gén vizsgálata – *A szép eredmények értelmezését és összehasonlíthatóságát nagyban segítené, ha a 6. táblázat és 19. ábra egységesítve lenne, vagyis mindkét helyen MIC vagy növekedési ráta lenne feltüntetve (esetleg mindkettő).*

Valóban áttekinthetőbb lett volna a két adatsor egy egységes formában. Ugyanakkor nehéz őket egységesíteni, mivel eltérő sztatinek és eltérő hatások szerepelnek bennük. Bár a dolgozatban (a dolgozat szerkesztése, logikája miatt) később kerül bemutatásra, időben a 19. ábrán bemutatott vizsgálatot végeztük előbb (Lukács és mtsi. 2009). Itt a három vizsgált sztatint, aszerint lett kiválasztva, hogy teszteljük a hatását egy a természetben előforduló (lovasztatin), egy félszintetikus (szimvasztatin) és egy szintetikus (fluvasztatin) sztatinnak is. Ebben a vizsgálatban a MIC érték csak a fluvasztatin esetében volt értelmezhető (4 µg/ml az MS12 esetében és >16 µg/ml a mutáns törzsek esetében), mivel a másik két sztatint nem okozott teljes gátlást a vizsgált koncentráció tartományban. Ezért ábrázoltuk a sztatinek hatását a növekedési rátával. A 6. táblázatban bemutatott vizsgálatához (Nagy és mtsi. 2014) már a sztatinek az előzőekben említett és más, időközben végzett vizsgálatok tapasztalatai alapján, az erősebb gombaellenes hatással rendelkező szintetikus sztatinek közül választottuk ki (fluvasztatin, atorvasztatin és rozuvasztatin), mivel itt az volt a cél, hogy a gének csendesítésének sztatint érzékenységre gyakorolt hatását teszteljük/igazoljuk. Mivel itt a MIC érték változása minden esetben értelmezhető volt és ezt egyértelműbbnek gondoltuk, mint az OD értékeken alapuló növekedési ráta értékek ábrázolását, ezért alkalmaztuk ezt a módját az eredmények bemutatásának.

Itt is szerepel, hogy a transzformánsok karotin termelő képessége összemérhető az iparban alkalmazott törzs vad típusának nem optimalizált körülmények közti termelésével, konkrét adatot azonban nem mutat be. Feltételezem, a vad törzs is többet termel optimalizált körülmények között. A megadott µg/g mértékegység csak akkor használható fel összehasonlításra, ha egy egységnyi tápoldatban/táptalajon mindig ugyanannyi mennyiségű micélium képződne adott idő alatt. Ez pedig biztosan nem teljesül, főleg ha különböző fajokat hasonlítunk össze.

Az iparban alkalmazott törzs termelőképességét a korábbi válaszokban említettem. Valóban a különböző gombafajok termelőképességének összehasonlításához és a gyakorlati alkalmazások értékeléséhez szükség van a tenyésztési idő, a növekedési ráta és a biotermék képződés figyelembe vételére. A *B. trispora* növekedése, az adott idő alatt képződő micélium mennyisége a vad típusú törzsek esetében hasonló a *M. circinelloides*-éhez. Az összehasonlítás megemlékezésével csak azt kívántuk érzékeltetni, hogy a transzformánsokban megemelkedett a karotinoid szint. Vizsgálatainkban mindig a szárazanyag tartalomra vonatkoztattunk és igyekeztünk azonos körülményeket biztosítani, hogy az ugyanazon gomba, általában a *M. circinelloides* MS12 törzse és az ebből képzett mutánsok esetében a kapott eredmények összehasonlíthatók legyenek (az MS12 törzsből képzett mutánsok és az eredeti törzs növekedési üteme, csírázóképesége nem tért el lényegesen, kivéve ott, ahol ezt kifejezetten jeleztem pl. a *hmgR3* csendesítése esetén). Mivel az eredményeinket ismertető és a más kutatók által a témában közölt publikációkban (lásd pl. Velayos és mtsi. 2000, Navarro és mtsi. 2001, Zhang és mtsi. 2016, stb.) is ebben a formában szerepelnek a karotinoid tartalmak, illetve mivel alaputatásról van szó és elsősorban a karotinprodukciónak növekedését/csökkenését szerettem volna értelmezni/bemutatni (és nem annyira a dinamikáját és a kihozatalát), ezért alkalmaztam ezt a dolgozat során.

A 14. táblázatban az MS12 alaptörzs termelése is fel van tüntetve. Elméletileg ez a törzs azonos a 3. táblázatban lévő SZMC 12082 törzsszel. Ugyanakkor a két táblázatban a termelt összkarotinoid illetve β-karotin mennyiségek jelentős mértékben eltérnek. Véleménye szerint mi lehet ennek az oka?

Az MS12/SZMC 12082 törzs össz-karotinoid és β-karotin tartalmára a 3. táblázatban (YNB, 25 °C, 4 nap) 580 ± 55 és 360 ± 51 µg/g szerepel, a 14. táblázatban (ugyancsak YNB, 25 °C, 4 nap) viszont 412 ± 31 illetve 245 ± 12 µg/g. Sajnos a karotinoid termelés vizsgálatának egyik legnagyobb nehézségét az okozza, hogy egy adott organizmus esetében, az eltérő vizsgálatok során detektált karotinoid mennyiségek akkor is némileg eltérhetnek, ha törekszünk azonos feltételeket (tápközeg, hőmérséklet, megvilágítás) biztosítani a tenyésztések során. Ehhez elegendő, ha pl. a tápközeg összetevőit eltérő gyártótól szereztük be, ha a hőmérsékletben vagy a megvilágításban volt valami eltérés, esetleg az inokulum mennyiségekben. Emellett a karotinoidok fény és oxigén jelenlétében

gyorsan degradálódnak ezért a minta kivonása és tárolása is okozhat egyedi különbségeket. Mindezek miatt az egyes publikációkban (pl. Navarro és mtsi. 1995, 2001, Velayos és mtsi. 1997) is bizonyos határon belül, de némileg eltérő adatok szerepelnek. Ezért az a bevett gyakorlat és mi ezt alkalmaztuk, hogy minden egyes kísérlet során (minden tenyésztés során és minden kivonáshoz) az eredeti nem transzformáns, illetve kontroll törzset is leoltottuk (megfelelő ismétlésben) és mindig elvégeztük ebből is a karotinoid tisztítást és az adott kísérletben, mindig az adott kontrollhoz viszonyítottuk a változásokat (a kísérleteken belül az egyes törzsek esetében tapasztalt arányok nem mutatnak szignifikáns eltérést). A két táblázatban és a kísérleteink során összességében az MS12 törzsre kapott eredmények egyébként az össz-karotinoid és a β -karotin tartalomra vonatkozóan ebben a kb. 400-600 és 250-350 $\mu\text{g/g}$ körüli tartományban voltak.

Járomspórás gombák genetikai manipulációjához szükséges transzformációs rendszerek kidolgozása – Kicsit meglepő, hogy a dolgozat végén található ez a jól dokumentált, szép és a megértést megkönnyítő képekkel és ábrákkal ellátott fejezet. Apró dolog, de megjegyzem, hogy nem indokolt itt 5.4.1 alfejezet bevezetésére, mivel nincs folytatása.

Egyetérték a bírálóval, hogy mivel az 5.4 fejezet csak egy alfejezetet tartalmaz, ezért helyesebb lett volna, ha ezt a fejezetet nem bontottam volna meg.

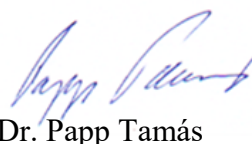
Az alapos, csaknem hibátlan jegyzékből kimaradt Takó, (2010) bár a felhasznált irodalomban szerepel. Ugyanakkor az alábbi cikk szerepel az irodalomjegyzékben és a dolgozat témájához kapcsolódó cikkek közt, de a dolgozat szövegében viszont nincs hivatkozás.

Schoch CL, Robbertse B, Kovács GM, Krizsan K, Papp T, Petkovits T, Vágvölgyi C, Federhen S [101] (2014) Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database 2014: Paper bau061. IF: 3,372, Független idéző: 12

„Takó és mtsi. 2010” valóban kimaradt az „IDÉZETT IRODALOM” fejezetből, amiért elnézést kérek. Ugyanakkor szerepel a dolgozat alapjául szolgáló közleményeket felsoroló a 8. fejezetben. A „Schoch és mtsi. 2014” esetében viszont a hivatkozás megtalálható a szövegben: a 30. oldal alján.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Posta Katalin professzor asszonynak dolgozatom alapos bírálatát és építő jellegű megjegyzéseit és javaslatait.

Szeged, 2018. 03. 27.



Dr. Papp Tamás

Hivatkozások

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.

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.

Bien CM, Espenshade PJ (2010) Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukar Cell* 9: 352-359.

De Castro C, Del Valle P, Rúa J *et al.* (2013) Antioxidant defence system during exponential and stationary growth phases of *Phycomyces blakesleeanus*: Response to oxidative stress by hydrogen peroxide. *Fungal Biol* 117: 275-287.

Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW (2004) Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2350-2354.

Gordon PA, Stewart PR, Clark-Walker DG (1970) Fatty acid and sterol composition of *Mucor genevensis* in relation to dimorphism and anaerobic growth. *J Bacteriol* 107: 114-120.

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

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

Kito H, Abe A, Sujaya IN *et al.* (2009) Molecular characterization of the relationships among *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, and *Rhizopus delemar*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 861-864.

Kuranda K, François J, Palamarczyk G (2009) The isoprenoid pathway and transcriptional response to its inhibitors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 10: 14-27.

Kuzina V, Cerdá-Olmedo E (2006) Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*. *Appl Environ Microbiol* 72: 4917-4922.

Lee SC, Li A, Calo S *et al.* (2015) Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol* 97: 844-865.

Lübbehüsen TL, Nielsen J, McIntyre M (2003) Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *J Appl Microbiol* 95: 1152-1160.

Mehta BJ, Obraztsova IN, Cerdá-Olmedo E (2003) Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Appl Environ Microbiol* 69: 4043-4048.

Mosqueda-Cano G, Gutiérrez-Corona JF (1995) Environmental and developmental regulation of carotenogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Curr Microbiol* 31: 141-145.

Nagy G, Szebenyi C, Csernetics Á *et al.* (2017) Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Sci Rep* 7: 16800.

Navarro E, Lorca-Pascual J, Quiles-Rosillo M *et al.* (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol Gen Genom* 266: 463-470.

Navarro E, Sandmann G, Torres-Martínez S (1995) Mutants of the carotenoid biosynthetic pathway of *Mucor circinelloides*. *Exp Mycol* 19: 186-190.

Palágyi Z, Ferenczy L, Vágvölgyi C (2001) Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *World J Microbiol Biotechnol* 17: 95-97.

Rúa J, de Castro C, de Arriaga D, *et al.* (2014) Stress in *Phycomyces blakesleeanus* by glucose starvation and acetate growth: response of the antioxidant system and reserve carbohydrates. *Microbiol Res* 169: 788-793.

Rúa J, de Cima S, del Valle *et al.* (2008) Glycogen and trehalose mobilization by acetic acid in *Phycomyces blakesleeanus*: dependence on the anion form. *Res Microbiol* 159: 200-206.

Todd BL, Stewart EV, Burg JS *et al.* (2006) Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. *Mol Cell Biol* 26: 2817-2831.

van Laar TA, Lin YH, Miller CL *et al.* (2012) Effect of levels of acetate on the mevalonate pathway of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 7: e38171.

Velayos A, Eslava AP, Iturriaga EA (2000) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *FEBS J* 267: 5509-5519.

Velayos A, López-Matas MA, Ruiz-Hidalgo MJ *et al.* (1997) Complementation analysis of carotenogenic mutants of *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet Biol* 22: 19-27.

Watanabe T, Oda Y (2008) Comparison of sucrose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Amylomyces rouxii*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 3167-3173.

Yu P-J, Chou C-C (2005) Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. *Food Technol Biotechnol* 43: 283-288.

Zavrel M, Hoot SJ, White TC (2013) Comparison of sterol import under aerobic and anaerobic conditions in three fungal species, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukar Cell* 12: 725-738.

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.