

Opponensi bírálat

Karaffa Levente: „Fermentációs ipari szénforrások asszimilációjának vizsgálata fonalas tömlősgomba (*Pezizomicotina*) fajokban” c. doktori értekezéséről.

Szerkezet, forma

A dolgozat 149 oldal + 10 oldal Függelék, közlemények jegyzéke és tudományometriai adatok részekből áll többnyire követve a szokásos struktúrát.

Tartalomjegyzék, köszönetnyilvánítás, rövidítések jegyzéke, előszó és rövid bevezetés 6 oldalban adják meg a dolgozat indítását.

20 oldalnyi irodalmi áttekintés a a., Laktóz és galaktóz biológiája és biotechnológiai aspektusai

b., A karbon katabolit represszió

c., A cianid rezisztens alternatív légzés fejezeteit foglalja magában.

A dolgozat célkitűzéseit 5 koncentrált és általánosan fogalmazott pontban összegzi a Szerző.

A kísérleti eredményeket és azok diszkusszióját 100 oldalnyi, 4 fejezetbe csoportosítható „eredmény sereg” demonstrálja az alábbi struktúrában: a., Szénforrás felvétel 57 oldal, b., A szénforrás és fajlagos növekedési sebesség összefüggései 13 oldal, c., A szénforrások szerepe a metabolitok túltermelésében, d., Terminális oxidáció: A C-forrás asszimiláció utolsó állomása 8 oldal.

Az Összefoglalás-tézisek (8 oldal) szakasz az előbbi négy fejezet eredményeit rövidítve, 22 tézis pontba foglalva összegzi.

A munka irodalmi háttérét 12 oldalnyi 278 tételt tartalmazó irodalomjegyzék mutatja be.

Egy 10 oldalas Függelék fejezet főleg az anyagok és módszerekre vonatkozó valamint technikai természetű információkat foglal össze.

Tartalmi bírálat, kérdések és megjegyzések

Előjáróban fontosnak tartom megfogalmazni, hogy a Jelölt rendkívül széleskörűen, integráló és összefüggés kereső jelleggel, hatalmas kutatási eredmény halmaz feldolgozására és értékelésére vállalkozik, ami biológiai, mikrobiológiai, biokémiai-szabályozási, molekuláris biológiai és gyakorlati biotechnológiai szempontból egyaránt fontos kérdésekkel foglalkozik. Ennek megfelelően a dolgozat mint írásmű „mozaikjainak” összeillesztése és azok érthető interpretációja nem könnyű feladat.

Az „Irodalmi áttekintés” –szerintem nagyon bölcsen- csak az eredmények megítélése szempontjából fontos ismereteket és fejezeteket tárgyalja: A laktóz és galaktóz hasznosítás koncentrált összefoglalása jó áttekintést nyújt a biokémiai, szabályozási és egyes biotechnológiai szempontból fontos ismereteiről. Külön üdvözlendő, hogy a humán patobiokémiai vonatkozások is említésre kerülnek. Kicsit hosszúnak találtam a lac-operon ismertetését, ugyanakkor a Leloir útvonal részletes ismertetését, épp a későbbi kapcsolódó eredmények okán jónak tartom. Megfelelőnek találtam a karbon katabolit represszió és a cianid rezisztens alternatív légzést taglaló fejezetek részletezéseit.

Megjegyezném, hogy a 13. oldalon idézett Boze és mtsai citátum helyesen 1987, nem 1992, valamint a 18. oldalon idézett Tarrío és mtsai (2006) publikáció hiányzik az irodalom jegyzékből.

Szokatlan körülmény, hogy a dolgozat nem tartalmaz önálló Anyagok és módszerek fejezetet. A jelölt ezen fejezet hiányára vonatkozó magyarázatát el tudom fogadni, de ez egyben felveti a publikációs háttér bemutatásának fontosságát.

Az értekezés lényegi eredményeit a Szerző 4 fejezetben (ld. a szerkezet elemzése) 22 pontba rendszerezve mutatja be, ami 22 pont lényegében a dolgozat téziseit jelentik, így a „Kísérleti eredmények és diszkussziójuk” és a „Tézisek” fejezetek párhuzamosan elemezhetők, bírálhatók.

Az eredmények értékelése során egy rövidebb- hosszabb bevezetést követően mutatja be Szerző az adott pontokhoz tartozó eredményeket (ábrák, táblázatok, gél képek stb.), majd elemez és értékeli. A tézispontoknál ugyanezen módszert követi lényegesen rövidebb formában.

A bíráló számára nem könnyű feladat, a terjedelmi korlátok miatt csupán néhány eredmény bemutatása után, az elemzések tartalmi, tárgyyszerű követése illetve a levont következtetések realitásának belátása.

Nézetem szerint az eredményeken nyugvó tézispontok, mint új tudományos eredmények akkor nyernek igazolást, ha azok a Szerző saját publikációi révén alátámasztottak.

Ezért javaslatot tennék arra, hogy az eredmények diszkussziójában illetve a 22 tézispontban kerüljön bemutatásra (vagy legalább jelzésre) az, hogy az egyes eredmény (tézis) pontokhoz a Szerző 22+11 közleménye közül melyik(ek) nyújt(anak) releváns adathátteret.

Ezzel a módszerrel az olvashatóság, követhetőség, érthetőség és eredmény azonosítás nagyban javítható.

Javaslatom alátámasztásául a továbbiakban tézis pontonként teszem meg észrevételeimet:

1., A β -galaktozidáz és laktóz permeáz génpár azonosítása és a génklaszter további tagjainak (15 ilyen került meghatározásra) azonosítása szép eredmény, aminek igazolására bemutatott 2. és 3. ábra forrásának megjelölésével (saját cikk) könnyű lenne beláthatóvá tenni az eredményt.

2., A *bgaD/lacpA* génpár kifejeződését „bizonyító” eredmények a 4. ábra segítségével követhetők és a levont következtetések helytállóak. A tézis utolsó mondata – ami a D-glükóz három szintű hatására vonatkozik – azonban részletes(ebb) magyarázatra szorul ill. saját hivatkozást igényelne.

3. A harmadik tézis üzenete, hogy „a *bgaD* géntermék nem az egyetlen *bGal* aktivitású enzim”. A tézispont második felében tett állítások a bemutatott eredmények alapján nehezen követhetők. A tézispont állításait saját publikációs hivatkozással kellene alátámasztani.

4., A negyedik tézispont a *lacpA* géntermék kísérletesen igazolt tulajdonságait összegzi és igazolja a laktóz permeáz enzim jelleget. Az értékes eredmények a publikációs háttérre való hivatkozással meggyőzőek lehetnek. Kérdésként merül fel ugyanakkor, hogy mit jelent az állítás: „A fenotípus nem abszolút” ill. mit értsünk az alatt, hogy egy eredmény „sugall” valamit? Jelen esetben „ az ismeretlen laktóz permeáz a tejcukor iránt a *lacpA*-hoz képest kisebb affinitással bír”. Ez utóbbi feltételezés?

A 4.1.1.2 fejezet eredményeit a Szerző az 5. és 6. tézispontokban összegzi.

Elfogadom az 5. és 6. tézispontok állításait, hogy (5.) az *A. nidulans* laktóz felvétele kétkomponensű (*lacpA* és *lacpB* alkotja), ill. hogy a *lacpB* egy funkcionális cellobióz permeáz enzimet kódol, ugyanakkor ezek publikációs alátámasztását fontosnak tartanám.

A 4.1.2 fejezet és a 7. és 8. tézispontok kapcsán igazoltnak látom (7), hogy a *galE* (galaktokináz) mutánsok csak ammónium ion (mint N forrás) jelenlétében működnek, ugyanakkor kérdezem, hogy melyek azok a „biokémiai és genetikai bizonyítékok, amelyek az alternatív, oxido-reduktív D-galaktóz

lebontás útvonalat igazolják? Itt jegyzem meg azt is, hogy ebben a pontban (63. oldal az értekezésben) és később a 17. és 18. tézisekben is hivatkozás történik Seiboth és Mtsai (2004)-es cikkére, de ez a cikk nem szerepel az értekezés irodalomjegyzékében.

A 8. tézispont azon állításának igazolására, hogy a *bgaD/lacpA* génpár élettani induktora D-galakózon maga a metabolizálatlan cukor ill. nem kellene lebontási intermedierek a *bgaD/lacpA* gének indukciójához, hiányolok kvantitatív eredményeket vagy saját publikációt.

Nagyon értékesnek tartom a dolgozat további fejezeteinek eredményeit, amelyekben a gyakorlati, ipari biotechnológiai jelentőségű fajok, a *T. reesei* és az *A. niger* laktóz és D-galakóz anyagcsere feltételeit vizsgálta a Jelölt.

A 9. tézispontban a *T. reesei* és az *A. niger* galaktóz hasznosításának különbségei kerültek bemutatásra. A *bgaI* indukciója a *T. reesei*-ben igazoltnak látszik, az *A. niger*-re vonatkozó megállapítás azonban sokkal kisebb gyakorlati jelentőségű.

A 10. pontban összefoglalt ioncserés HPLC módszer fejlesztés galaktokináz enzimaktivitás meghatározását célozta. A módszerfejlesztés eredményeképp jelzett „5%-os hiba” pontosabb, az analitikai teljesítmény jellemzők szélesebb körű megadását érdemelte volna, s a kalibrációs viszonyokra vonatkozóan sincs adat a dolgozatban.

A 4.1.2 fejezetben és a 11. tézis pontban élettani vizsgálatok segítségével igazolt, hogy az *A. niger* D-galakóz felvétele növekedési ciklus függő (konídium nem, micélium igen) és konídiumban nincs, micéliumban pedig kifejezett a Leloir útvonal enzimek génjeinek expressziója. Kapcsolható ezen állításhoz saját publikációs eredmény?

A 4.1.5. fejezet eredményei a 12-14 tézispontokban kerültek röviden megfogalmazásra. Elfogadom a Szerző közvetett bizonyítékát (12) arra vonatkozóan, hogy a *P. chrysogenum* kettős laktóz asszimilációs mechanizmussal rendelkezik és kérem az eredményre vonatkozó saját publikáció megadását.

A 13. tézispont állítását jelen formában nem látom igazoltnak/megalapozottnak. Ugyanez vonatkozik a 14. pontra is. Állítások kerülnek megfogalmazásra, de ezek igazolására a bemutatott eredmények és magyarázatok korlátozottak, hiányzik a háttér publikációs alátámasztása.

Szintén gyakorlati szempontból tartom jelentősnek a 4.2. fejezet specifikus növekedési sebesség és szénváz asszimilációs sebesség összefüggéseinek vizsgálatát.

A metabolikus aktivitás és fajlagos növekedési sebesség mérésére (becslésre) kidolgozott módszert (15. tézis), ami az akridin narancsos kezelés és fluoreszcens optikai mikroszkópos mérésen alapul, nagyon ötletes *in situ* módszernek tartom. A módszer használhatóságának megítélésében segített volna néhány analitikai teljesítmény jellemző (relatív hiba, robusztusság, ismételhetőség) megadása.

A 4.2.2. és 4.2.3. fejezetek eredményei a 16. tézis pontban kerülnek összefoglalásra. Sommásan, az új tudományos megállapítás szerint, az alacsony fajlagos növekedési sebesség alkalmazásával a karbon katabolit represszió kikerülhető ill. a szénforrások által kialakított metabolikus fluxus szabályozza elsődlegesen a karbon katabolit repressziót. Kérdésem ezzel kapcsolatban, hogy mennyire tekinthetők új felismerésnek a fenti, fontos gyakorlati jelentőségű állítások?

A *T. reesei*-ben történő cellulázok indukciójának vizsgálata során Szerző igazolta, hogy az indukció forrása maga a laktóz és nem annak monomerjei külön-külön vagy együtt. Ez a 17. tézisben tett megállapítás a laktóz különleges szerepére utal.

A 4.3.1. fejezet eredményei kísérletet tesznek a laktóz különleges szerepének ill. potenciáljának igazolására. A 18. tézispont demonstrálja (vagy bizonyítja?), hogy a mutarotáz aktivitás specifikus a laktózra, de a pont végső konklúziója nincs világosan megfogalmazva és a potenciális konklúzió gyakorlati „kimenetét” nem érzékelem világosan.

Ugyanezen fejezethez tartozó 19. tézis a *T. reesei* túltermelő és galaktóz bontásban sérült mutánsaiban azonosít potenciális induktorokat és talált egy olyan 2 hexózból felépülő β -(1-1) induktort, ami csak laktóz szénforráson termelődik. Ezen elméleti szempontból érdekes felismerés (saját publikáció?) az induktorok szerkezetének további vizsgálatát igényli.

A 4.3.2. fejezetben az *Acremonium chrysogenum* CPC termelése és morfológiája közötti összefüggést elemzi a Szerző kemosztát tenyészet vizsgálatával (20. tézis). Az eredmények jól demonstrálják, hogy a fajlagos növekedési sebesség valójában nem befolyásolja a termékképzést. Kérdésem ezzel kapcsolatban: Milyen elméleti termelési stratégia javasolható a fentiek alapján a CPC maximalizálása érdekében?

Az itakonsav termelés optimalizálására vonatkozó 4.3.3. fejezet (21. tézis) eredmények egy különleges fermentációs feltétel rendszer biztosítását igazolták. A nagy hozam elérése érdekében a min. 120 g/l glükóz és egy extrém alacsony (<5 μ g/l) Mn koncentrációt kell alkalmazni. Vagyis ezzel az *A. terreus* is potenciális ipari alkalmazásban hasznosítható. Itt is javaslom a saját publikációs háttér megadását.

Az értekezés 4.4. fejezete és a kapcsolódó 22. tézispont mutatja be tartalmában, kiméretében és saját irodalmi hivatkozás tekintetében példamutatóan, az eredmény „csomag” szerintem optimális interpretációját. A cianid rezisztens alternatív légzésre vonatkozó saját eredmények értékesek és jól demonstráltak.

Összefoglalóan elmondható, hogy az összességében 22 tézisponton nyugvó értekezés tartalmában, szakmai színvonalát és publicitását tekintve egyaránt kielégíti az MTA doktora címmel kapcsolatos követelményeket. A munka jól demonstrálja a Szerző tudományos iskolateremtő törekvéseit, amelyben az új tudományos eredmények és ismeretek integráló jellegű elemzésével a gyakorlat számára is hasznosítható új felismeréseket fogalmaz meg.

A dolgozat hiteles, új tudományos felismeréseket fogalmaz meg, azokat tézisekben összegezve prezentálja, amelyek többségét (ld. részletes bíráló) mint új eredményt, elfogadom.

Fenti indokok alapján az értekezést nyilvános vitára alkalmasnak tartom és sikeres védés esetén az MTA doktora cím magadását javaslom.

Budapest, 2017. július 28.



Salgó András

bíráló, az MTA doktora