

ZÁRÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ A
„TÖBBSZÖRÖSEN TELÍTETLEN ZSÍRSAVAK BIOSZINTÉZISE BIOTECHNOLÓGIAI
SZEMPONTBÓL JELENTŐS *MORTIERELLA* FAJOKBAN”
CÍMŰ POSZTDOKTORI OTKA PÁLYÁZATHOZ

OTKA azonosító: PD 101613

Témavezető: Dr. Nyilasi Ildikó

Kutatási időszak kezdete: 2011. 10. 01.

Kutatási időszak vége: 2015. 03. 31.

A projekt célja az volt, hogy alapvető új információkat nyerjünk a mikrobiális, azon belül is a gomba zsírsav-bioszintézisről. Ennek érdekében a kutatási program egyik célkitűzése számos olajtermelő gombafaj lipid termelésének és lipid profiljának analízise volt, emellett célunk volt a zsírsav bioszintetikus út genetikai és molekuláris hátterének vizsgálata a termelő organizmusokban. A későbbi alap és alkalmazott kutatások elősegítése érdekében terveink közt szerepelt a többszörösen telítetlen zsírsavtermelő gombatörzsek nemesítéséhez szükséges biológiai feltételek vizsgálata, illetve a későbbi kutatásokban felhasználható módszerek kidolgozása is.

A kutatási program részeként a munkatervben a következő konkrét célkitűzések szerepeltek:

- (1) *Mortierella* fajok többszörösen telítetlen zsírsav termelésének és zsírsav profiljának vizsgálata és új, ígéretes zsírsavtermelő törzsek azonosítása;
- (2) *A többszörösen telítetlen zsírsav-bioszintézis genetikai és molekuláris hátterének vizsgálata;*
- (3) *A többszörösen telítetlen zsírsavtermelés módosításához szükséges biológiai feltételek tanulmányozása;*
- (4) *Az egyes zsírsavprofilok, illetve az azonosított génszekvenciák bevonása filogenetikai és evolúciós tanulmányokba.*

A pályázatban vállalt feladatokat teljesítettük, a projekt során elért főbb eredményeink a következők:

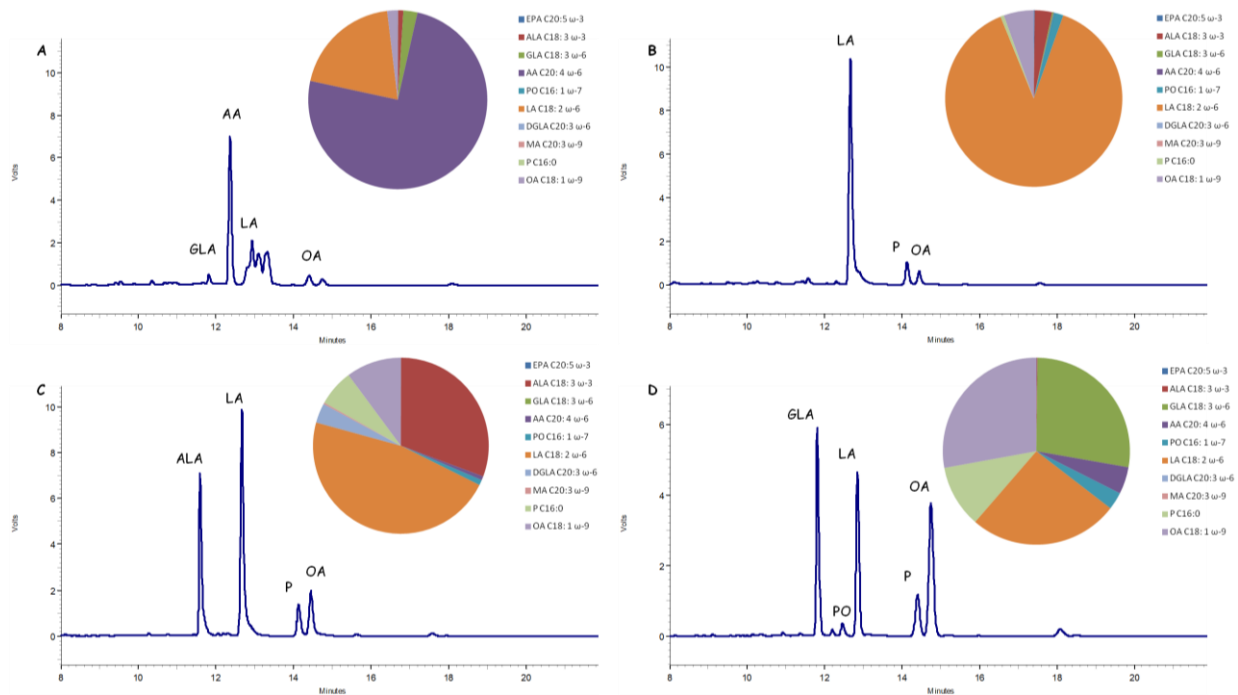
1.

***Mortierella* fajok többszörösen telítetlen zsírsav termelésének és zsírsav profiljának vizsgálata és új, ígéretes zsírsavtermelő törzsek azonosítása**

Munkánk során létrehoztunk egy többszörösen telítetlen zsírsavakat termelő gombákból álló törzsgyűjteményt, melyet a Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben (http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_id/987) helyeztünk el. A gyűjtemény közel 150, a *Mortierella*, *Gamsiella*, *Dissophora*, *Lobosporangium* és *Umbelopsis* nemzetségeket reprezentáló izolátumból áll. Az izolátumok egy része a Jena Microbial Resource Collection (Friedrich Schiller Egyetem, Németország) gyűjteményből származik, mely intézménnyel értékes tudományos kooperációt sikerült kialakítani. Részletesen vizsgáltuk a gyűjteményben elhelyezett törzsek zsírsavtermelését.

A zsírsavtermelés gyors és részletes elemzése és az új telítetlen zsírsavszármazékok kimutatása érdekében kidolgoztunk, illetve optimalizáltunk egy, a zsírsavak extrakciójára és kimutatására alkalmas analitikai módszert. A zsírsavak extrakcióját szárított micéliumokból végeztük nátrium-hidroxid–metanol–kloroform kezeléssel, a zsírsavak detektálásához pedig az alkil-halogenid típusú 3-bromometil-6,7-dimetoxi-1-metil-1,2-dihidrokinoxalin-2-on (Br-DMEQ) származékképző reagenst alkalmaztuk, amely fluoreszcens zsírsavszármazékok előállítását tette lehetővé. A gombák által termelt zsírsavakat HPLC-vel azonosítottuk, az általunk kidolgozott módszer 12 zsírsavszármazék kimutatását tette lehetővé.

A projekt során 100 *Mortierella* és rokon izolátum, illetve 7 *Umbelopsis* izolátum zsírsavtermelésének és zsírsavösszetételének vizsgálatát végeztük el. Számos magas zsírsavhozammal rendelkező törzset azonosítottunk. Az *Umbelopsis* fajok mindegyike és számos *Mortierella* izolátum is jó zsírsavtermelőnek bizonyult. A törzsek zsírsavprofiljában jelentős különbségeket tapasztaltunk, és megállapítottuk, hogy az *Umbelopsis* és *Mortierella* fajok zsírsavtermelésük alapján is két csoportot alkotnak. Az **1. ábrán** 4 izolátum HPLC kromatogramja és zsírsavprofilja látható, amelyek négy különböző zsírsavprofil szemléltetnek.



1. ábra. *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátumok zsírsavtermelésének vizsgálatokor kapott HPLC kromatogramok és zsírsavprofilok. A: *Mortierella alpina* FSU 2698, B: *Mortierella cystojenkini* CBS 660.82, C: *Mortierella tuberosa* CBS 210.72, D: *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1296. Az egyes zsírsavak arányát a teljes zsírsavtartalomra vonatkoztatott százalékos értékben ábrázoltuk. Rövidítések: EPA: eikozapentaénsav, ALA: α -linolénsav, GLA: γ -linolénsav, AA: arachidonsav, PO: palmitolénsav, LA: linolsav, DGLA: dihomog γ -linolénsav, MA: 5,8,11-eikozatriénsav, P: palmitinsav, OA: olajsav.

Az *Umbelopsis* fajok kizárólag ω -9 és ω -6 zsírsavakat termeltek, míg a *Mortierella* fajoknál kis mennyiségben ugyan, de ω -3 zsírsavakat is tudtunk detektálni. A *Mortierella* fajok fő terméke a négyszeresen telítetlen arachidonsav (C20:4 ω -6) volt, míg az *Umbelopsis* fajok nagy mennyiségben termeltek γ -linolénsavat (C18:3 ω -6), linolsavat (C18:2 ω -6), olajsavat (C18:1 ω -9) és telített palmitinsavat (C16:0). Azonosítottunk olyan *Mortierella* törzseket is, amelyek a *M. alpina*, illetve a többi *Mortierella* izolátumtól jelentősen eltérő zsírsavprofil mutattak. A *M. histoplasmatoides* CBS 321.78, a *M. cystojenkini* CBS 660.82, a *M. wolfii* CBS 614.70, a *M. simplex* CBS 243.82, a *M. fimbricystis* CBS 943.70 és a *M. bainieri* CBS 508.81 izolátumok nem termeltek arachidonsavat, ehelyett főként a kétszeresen telítetlen linolsavat termelték. A *M. tuberosa* CBS 210.72 izolátum zsírsavprofilja egyedülálló volt a *Mortierella* fajok között, mivel linolsav mellett nagy mennyiségben termelte az ω -3 α -linolénsavat is. Számos *Mortierella* izolátum termelte kis mennyiségben a szintén az ω -3 zsírsavak közé tartozó eikozapentaénsavat is. A későbbi kutatások egyik célkitűzése lehet ezen ω -3 zsírsavszármazékok termelésének fokozása.

A zsírsavtermeléssel kapcsolatos eredményeinkről több hazai és nemzetközi konferencián beszámoltunk:

- Nyilasi et al. 2013. Screening of polyunsaturated fatty acid producing *Mortierella* strains. *Acta Microbiol Imm H* 60 (S) 61-62. MMT 2012. évi Nagygyűlése, Keszthely, Magyarország.
- Kovács et al. 2013. Investigation of the production of ω -6 and ω -3 fatty acids in *Mortierellales*. 14. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, Románia, Abstracts, pp 40.
- Nyilasi et al. 2013. Investigation of the polyunsaturated fatty acid production and profile of strains belonging to *Mortierellales*. In: Škrbić B: 15th Danube-Kris-Mures-Tisza (DKMT) Euroregion Conference on Environment and Health with satellite event LACREMED Conference "Sustainable agricultural production: restoration of agricultural soil quality by remediation, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, pp 115-116.
- Nyilasi et al. 2013. Investigation of the ω -6 and ω -3 fatty acid production of different *Mortierella* and related species. *Acta Microbiol Imm H* 60 (S), 201-202. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary.
- Nyilasi et al. 2013. Different polyunsaturated fatty acid profiles in *Mortierellales*. In: Teparić et al: Power of Microbes in Industry and Environment, Primošten, Croatia, Book of Abstracts, pp 73.
- Kovács et al. 2013. Comparison of the fatty acid yields and profiles of different *Mortierella* and *Umbelopsis* strains. In: Vágvölgyi Cs, Gácsér A: 1. Biomedica Minikonferencia: Kutatások az SZTE Biológus Tanszékein, Szeged, Hungary, p 33.

A zsírsavtermelés vizsgálatából folyamatban van egy publikáció összeállítása, melyet még ez év első felében szeretnénk közzéadni:

Nyilasi et al. 2015. Identification of *omega*-6 and *omega*-3 fatty acid producing *Mortierella* and *Umbelopsis* species (in preparation).

2.

A többszörösen telítetlen zsírsav-bioszintézis genetikai és molekuláris hátterének vizsgálata

A zsírsavösszetételben tapasztalt különbségek felderítéséhez és későbbi esetleges fejlesztéséhez fontos a zsírsav-bioszintézis genetikai hátterének tanulmányozása. Ennek érdekében azonosítottuk a többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézisének kezdő lépéséért felelős Δ^9 és Δ^6 zsírsav deszaturázokat kódoló géneket nagyszámú *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátumból. Ez a munka magában foglalta a megfelelő PCR primerek tervezését, a PCR körülmények optimalizálását, a felszaporított DNS fragmentumok visszaizolálását, plazmidba klónozását, továbbá szekvenálását is. 25 törzsből azonosítottuk a Δ^9 deszaturázt kódoló gén részleges szekvenciáját. A nukleotid szekvenciákból nyert aminosav szekvenciákat összehasonlítottuk adatbanki szekvenciákkal és azt tapasztaltuk, hogy ezek nagy része a *M. alpina* Δ^9 zsírsav deszaturázzal mutatta a legnagyobb hasonlóságot (89-100%). Az *U. ramanniana* NRRL 1296 és az *U. versiformis* CBS 473.74 Δ^9 zsírsav deszaturáza viszont a *Mucor circinelloides* Δ^9 zsírsav deszaturázhoz bizonyult hasonlóknak (81 és 79%), ami megerősíti az *Umbelopsis* nemzetségnek a Mucorales rendhez való közeli rokonságát. Az azonosított Δ^9 zsírsav deszaturáz aminosav szekvenciák egymással nagy hasonlóságot mutattak, azonban a génekben található intronok számában és hosszában jelentős különbségeket tapasztaltunk. Néhány törzs esetében 2, illetve 3 Δ^9 zsírsav deszaturázt kódoló gént azonosítottunk. Azokban az izolátumokban, amelyekben 2 gént azonosítottunk, a deszaturázok aminosav szinten is különböztek egymástól. A *M. alpina* CBS 210.32 izolátum esetében a Δ^9 zsírsav deszaturáz mellett 2 ω^9 deszaturázt kódoló gént is azonosítottunk, ezek azonban csak az intron hosszában különböztek egymástól. Egyes *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátumok esetében (*M. longicollis* CBS 209.32, *M. tuberosa* CBS 210.72, *Lobosporangium transversale* CBS 357.67, *U. isabellina* NRRL 1757) nem tudtuk azonosítani a Δ^9 zsírsav deszaturázt kódoló gént. Elképzelhető, hogy ezen izolátumok a többi *Mortierella* izolátumtól eltérő genetikai háttérrel rendelkeznek, ami jelentheti a Δ^9 zsírsav deszaturázt kódoló gén teljes hiányát vagy egy annyira eltérő Δ^9 zsírsav deszaturázt kódoló gén jelenlétét, amit az általunk használt degenerált primerekkel nem sikerült amplifikálni. Ennek kiderítése további

kísérleteket igényel. A Δ^6 zsírsav deszaturázt kódoló gén részleges szakaszát 17 izolátumból azonosítottuk. Az ezekből származtatott aminosav szekvenciák többsége az adatbanki *M. alpina* Δ^6 deszaturázzal mutatta a legnagyobb egyezést, míg néhány törzs esetén ezek inkább *Mucor* és *Rhizopus* deszaturázokkal mutattak hasonlóságot. Az izolátumokban található Δ^6 zsírsav deszaturázok számában, illetve az intronok hosszában és számában itt is jelentős különbségeket tapasztaltunk. Az azonosított szekvenciákat az EMBL-EBI adatbankba depozitáltuk.

Munkánk során vizsgáltuk az azonosított Δ^9 és Δ^6 zsírsav deszaturázt kódoló gének kifejeződését és a különböző tenyésztési paraméterek zsírsavtermelésre és a deszaturáz gének kifejeződésére gyakorolt hatását is. A génkifejeződést valós-idejű kvantitatív PCR alkalmazásával vizsgáltuk. A tenyésztési paraméterek zsírsavtermelésre és zsírsavösszetételre gyakorolt hatásának vizsgálatai alapján egyrészt a zsírsavtermelés körülményeit szeretnénk optimalizálni, másrészt kíváncsiak voltunk arra, hogy a tenyésztési paraméterek változtatásával módosítható-e a zsírsavösszetétel. A vizsgálatokhoz 10 különböző zsírsavhozamú és zsírsavprofilú törzset választottunk ki. A kiválasztott törzsek esetében vizsgáltuk a tenyésztési idő, a hőmérséklet és a tápoldat összetétel zsírsavtermelésre és génkifejeződésre gyakorolt hatását. A valós-idejű PCR kísérletek során kontrollként az aktin gént alkalmaztuk, ezért a Δ^9 és Δ^6 zsírsav deszaturázt kódoló gének mellett az aktint kódoló gént is azonosítottuk a kiválasztott törzsekből. Az azonosított nukleotid szekvenciákat szintén elhelyeztünk az EMBL-EBI adatbankban. A tenyésztési idő zsírsavtermelésre és génkifejeződésre gyakorolt hatásának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a zsírsavtermelés a 7.-9. nap körül volt maximális, ezután már nem növekedett, illetve a sejtlízissel egyenes arányban csökkent. Ezzel szemben a zsírsav deszaturáz gének kifejeződése a 4.-5. napon volt maximális, majd jelentősen lecsökkent. A hőmérséklet hatásának vizsgálatát 4 különböző hőmérsékleten végeztük el. A biomassa mennyisége a törzsek optimális növekedési hőmérsékletétől függően változott, de a legtöbb esetben 15 és 20°C-on tapasztaltuk a legnagyobb biomassa mennyiséget. Az össz-zsírsav mennyisége a *Mortierella* izolátumok esetében szintén 20°C-on volt maximális a legtöbb esetben, míg az *Umbelopsis* izolátumok 15, 20 és 25°C-on is magas zsírsavtermelést mutattak. A zsírsavösszetétel vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a legtöbb törzs zsírsavösszetételét nem befolyásolta jelentősen a hőmérséklet, míg néhány esetben a hőmérséklet emelkedésével csökkent a többszörösen telítetlen zsírsavak aránya az egy vagy kettő telítetlen kötést tartalmazó zsírsavakhoz képest. A deszaturáz gének kifejeződésének vizsgálatakor *M. alpina* esetében a Δ^9 és ω^9 deszaturázok 20°C-on expresszáldottak leginkább, ami egybevág a zsírsavtermelési adatokkal, míg a Δ^6 deszaturáz gén relatív transzkripciója a hőmérséklet emelésével párhuzamosan nőtt, ez azonban nem befolyásolta a zsírsavösszetételt. A tápoldat összetétel hatásának vizsgálatakor a legnagyobb biomassa mennyiséget glükóz-élesztő (GY) és malátás tápoldatokban (MEA), a legkisebb biomassa mennyiséget pedig minimál tápoldatban (YNB) tapasztaltuk. Ugyanakkor az 1 g száraz micéliumra vonatkoztatott össz-zsírsav mennyiségek vizsgálatakor szinte mindegyik törzs a YNB és a burgonya-dextróz (PDB) tápoldatban mutatta a legnagyobb, míg GY tápoldatban a legalacsonyabb zsírsavtermelést. A zsírsavösszetétel minden tápoldatban hasonló volt, csak kisebb eltéréseket tapasztaltunk az egyes zsírsavak arányában. A zsírsav deszaturáz gének, a zsírsavtermeléssel összhangban, YNB és PDB tápoldatban mutatták a legnagyobb relatív transzkripciót. Vizsgáltuk a különböző zsírsavakkal, illetve különböző növényi olajokkal kiegészített minimál tápoldatok génkifejeződésre gyakorolt hatását is. *M. alpina* esetében olajsav hatására emelkedett Δ^6 deszaturáz génkifejeződést tapasztaltunk, míg *M. antarctica* esetén a zsírsavakkal kiegészített tápoldatokban a kontrollhoz képest alacsonyabb expressziót tapasztaltunk. A különböző telített, egyszeresen és többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó növényi olajokkal kiegészített tápoldatok alkalmazása esetén azt tapasztaltuk, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó olajok (napraforgóolaj, tökmagolaj, szezámolaj, búzacsíraolaj) alkalmazásakor

a zsírsav deszaturáz gének expressziója csökkent, míg az egyszerűen telítetlen zsírsavakat tartalmazó olívaolaj esetén kis mértékben emelkedett. Összefoglalva a génkifejeződés vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket elmondhatjuk, hogy a zsírsav deszaturáz gének 20°C-on, YNB és PDB tápoldatban, a tenyésztés 4.-5. napján mutatták a legmagasabb relatív transzkripciót.

E kísérletek jelenleg is folyamatban vannak, az eddigi eredményeinkről múlt évben két szakmai konferencián számoltunk be:

Nyilasi et al. 2014. Investigation of the fatty acid production and identification of the $\Delta 9$ and $\Delta 6$ desaturase genes in several *Mortierella* and *Umbelopsis* strains. In: Cotoraci C, Ardelean A: 16th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregion Conference on Environment and Health, Arad, Romania, Book of Abstracts 23.

Nyilasi et al. 2014. Investigation of the fatty acid production and the expression of the $\Delta 9$ and $\Delta 6$ fatty acid desaturase genes in different *Mortierella* and *Umbelopsis* strains. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting, Keszthely, Magyarország, Absztraktfüzet, pp 54.

A zsírsav deszaturáz gének azonosításáról és a tenyésztési feltételek génexpresszióra gyakorolt hatásának eredményeiből folyamatban van egy publikáció összeállítása is, amelyet még ebben az évben szeretnénk közlésre benyújtani:

Nyilasi et al. 2015. Identification and analysis of $\Delta 9$ and $\Delta 6$ fatty acid desaturase genes involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in several *Mortierella* and *Umbelopsis* strains (in preparation).

Emellett eredményeinket idén egy nemzetközi szakmai konferencián is ismertetjük:

Nyilasi et al. 2015. Expression of $\Delta 9$ and $\Delta 6$ fatty acid desaturase genes involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis under different culturing conditions in *Mortierella* and *Umbelopsis* strains. 17th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health, Szeged, Hungary, Book of Abstracts.

A génizolálásra és azok funkcionális elemzésére vonatkozó eredményeinket más járomspórás gombákkal kapcsolatos munkákban is sikerrel alkalmaztuk:

Nagy et al. 2014. Transcription of the three HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides*. *BMC Microbiology* 14, 93. IF: 2.976.

3.

A többszörösen telítetlen zsírsavtermelés módosításához szükséges biológiai feltételek tanulmányozása

Munkánk hosszú távú célja a különböző *Mortierella* és *Umbelopsis* törzsek zsírsav termelésének módosítása, ezáltal megváltozott zsírsavprofilú és zsírsavtúltermelő törzsek előállítása. Ehhez hatékony szelekciós és transzformációs rendszerek szükségesek, ezért terveink között szerepelt egy általánosan alkalmazható domináns szelekciós markeren alapuló rendszer kidolgozása. Munkánk során négy antifungális anyagot teszteltünk, amelyek a későbbi transzformációs kísérletek során a szelekció alapjául szolgálhatnak. 40 *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátum antifungális érzékenységét vizsgáltuk mikrodilúciós módszerrel hygromycin B-vel, karboxinnal, nourseotricinnel és pyritiaminnal szemben és megállapítottuk az antibiotikumok minimális gátló, illetve minimális fungicid koncentrációit. A pyritiamin egyáltalán nem befolyásolta a *Mortierella* és *Umbelopsis* törzsek növekedését, viszont számos *Mortierella* izolátum nagyfokú érzékenységet mutatott a hygromycin B-vel szemben. Az *Umbelopsis* izolátumok szintén érzékenyek voltak a hygromycin B-re, habár növekedésük gátlása viszonylag magas antibiotikum koncentrációkat igényelt. Nourseotricin-t főleg élesztők szelekciójánál alkalmaznak, *Mortierella* fajoknál eddig még nem alkalmazták. Kísérleteink során a vizsgált törzsek fele rezisztensnek bizonyult rá, néhány törzs azonban extrém fogékonyságot mutatott. A nourseotricin gátolta az *Umbelopsis* izolátumok növekedését is, így ezek transzformációjához megfelelő szelektív ágensnek bizonyult. A karboxin egy szisztémás fungicid, amelyet korábban *M. alpina* transzformációja során is alkalmaztak szelektív ágensként. Kísérleteink során számos *Mortierella* törzs esetében már kis koncentrációnál

megfigyeltük a karboxin hifanövekedést és spóracsírázást gátló hatását, ugyanakkor az *Umbelopsis* izolátumok nagyfokú rezisztenciát mutattak vele szemben. Habár a karboxin egy széleskörűen használható szelektív ágensnek tűnik, mivel a legtöbb törzs növekedését már kis koncentrációban alkalmazva gátolta, hatása fungisztatikus volt, azaz a gomba spórák képesek voltak akár 1600-3200 µg/ml karboxin alkalmazása után is kicsírázni, ezért mégsem alkalmazható szelektív ágensként a transzformációs kísérletek során.

Az antifungális tesztek eredményei alapján létrehoztuk a hygromycin B és nourseotricin rezisztencia géneken alapuló szelekciós vektorokat. A rezisztencia gének megfelelő kifejeződéséhez szükséges homológ promóter biztosításához degenerált primerekkel felszaporítottuk és klónoztuk a *M. alpina* hiszton H3-H4 régióját, és az azonosított, 600 bp-nyi intergénikus közös promóter régiót alkalmaztuk a vektorok építéskor. Univerzális primerek alkalmazásával felszaporítottuk a riboszómális DNS régió 1,8 kb-nyi szakaszát is, ami a szelekciós vektorok kromoszómális integrációját segíti elő. A szelekciós vektorok a rezisztencia géneken és a *M. alpina*-ból izolált hiszton promóter és riboszómális DNS régiókon kívül tartalmazták a *Mucor circinelloides* gliceraldehid-foszfát-dehidrogenáz gén terminális régióját is. A rezisztencia géneket, illetve a promóter és terminális régiókat tartalmazó rezisztencia kazettákat fúziós PCR alkalmazásával hoztuk létre, majd szintén fúziós PCR segítségével kapcsoltuk hozzá a riboszómális régiót tartalmazó DNS szakaszt is. Az így létrehozott lineáris vektort az *Escherichia coli* EL350 törzs alkalmazásával kapcsoltuk össze a pTZ57 alapvektorral, amely egy defektív λ profág segítségével képes lineáris DNS szakaszokat rekombinálni rövid homológ szakaszok irányításával. Jelenleg folyamatban van a létrehozott szelekciós vektorok transzformációja PEG-mediált transzformáció és elektroporáció segítségével hygromycin B és nourseotricin érzékeny *Mortierella* és *Umbelopsis* törzsekbe. A transzformációs kísérleteket 3 törzssel végeztük, melyeket a zsírsavhozamban és zsírsavprofilban tapasztalt különbségek alapján választottunk ki. A hygromycin B-vel és a nourseotricinnel szembeni érzékenység vizsgálatával párhuzamosan elvégeztük a törzsek protoplasztálásának optimalizálását, majd meghatároztuk az izolátumokból képzett protoplasztok antifungális érzékenységét is. Jelenleg a transzformációs módszerek tesztelése folyik, a későbbiekben pedig tervezzük a Δ^9 és Δ^6 zsírsav deszaturáz géneket tartalmazó vektorok létrehozását és ezek bejuttatásával megváltozott zsírsavprofilú és zsírsavtúltermelő törzsek előállítását.

A *Mortierella* törzsek antifungális érzékenységének vizsgálatáról 2 konferencián számoltunk be:

Nyilasi et al. 2012. Investigation of the antifungal susceptibility of polyunsaturated fatty acid producing *Mortierella* strains. *Mikol közlem, Clusiana* 51(1), 107-108.

Nyilasi et al. 2012. Antifungal susceptibility of different *Mortierella* strains. 14th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health, Szeged, Hungary, Abstract CD 26.

Emellett eredményeinket egy folyóiratban közölt publikációban is bemutattuk:

Nyilasi et al. 2015. Hygromycin B, carboxin and nourseotricin susceptibility of polyunsaturated fatty acid producing *Mortierella* and *Umbelopsis* strains. *Acta Biol Szeged* 59 (1), 1-8 (in press).

Az antifungális érzékenységi vizsgálatoknál szerzett tapasztalatokat más gombacsoportok vizsgálata során is felhasználtuk:

Nyilasi et al. 2014. Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. *Med Mycol* 52, 140-148. IF: 2.261.

4.

Az egyes zsírsavprofilok, illetve az azonosított génszekvenciák bevonása filogenetikai és evolúciós tanulmányokba

Elvégeztük a vizsgálatba vont gombatörzsek részletes genetikai jellemzését molekuláris markerek segítségével. A molekuláris jellemzés és azonosítás során született DNS szekvencia adatsorokat a fajazonosítást szolgáló barcoding és filogenetikai vizsgálatokban is felhasználtuk. Ezek az eredmények nagyban hozzájárultak a *Mortierella* fajok filogenetikai viszonyainak tisztázásához is. Ezen eredményeinket 1 hazai és 2 nemzetközi konferencián is bemutattuk:

Petkovits et al. 2013. Multilocus based phylogeny and morphological, physiological analysis of the Mortierellales. *Acta Microbiol Imm H* 60 (S) 68-69. MMT 2012. évi Nagygyűlése, Keszthely, Magyarország.

Petkovits et al. 2013. Carbon source utilization patterns in the order Mortierellales used as characters for stochastic mapping. Emerging Zygomycetes, a new problem in the clinical lab, A workshop of the ECMM/ISHAM Working Group on Zygomycetes, Utrecht, The Netherlands, Abstracts, pp 34.

Petkovits et al. 2013. Stochastic character mapping of carbon source utilization data on a multigene phylogenetic tree of the Mortierellales. *Acta Microbiol Imm H* 60 (S), 215-216. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary.

A molekuláris markerek segítségével létrehozott filogenetikai törzsfát szénforrás-hasznosítási adatokkal is kiegészítettük, melynek eredményét egy nemzetközi konferencián mutattuk be:

Papp et al. 2014. Analysis of carbon source utilization data combined with a multigene phylogeny of Mortierellales. In: Avalos et al.: 12th European Conference on Fungal Genetics (ECFG12), Seville, Spain, Book of Abstracts 277 (P413).

Ezen eredményekből egy kéziratot is összeállítottunk, melyet közlésre nyújtottunk be:

Nyilasi et al. 2015. Five-gene phylogeny and carbon source utilization of *Mortierella* and related genera. *Antonie van Leeuwenhoek* (submitted). IF: 2.137

A filogenetikai analízis során meghatározott szekvencia adatokat általános érvényű evolúciós és filogenetikai jellegű munkák során is felhasználtuk. Részben a *Mortierella* fajok azonosításában szerzett tapasztalatoknak és adatoknak köszönhető, hogy részt vehettünk a „Fungal Barcoding Consortium” nemzetközi együttműködésben, melynek célja a gombák azonosítására alkalmas barcoding szekvenciák kijelölése volt. Ezek az eredmények egy, a PNAS folyóiratban megjelent cikkben lettek közölve:

Fungal Barcoding Consortium, Schoch et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(16), 6241-6246, IF: 9.737.

A szénforrás-hasznosítási vizsgálatokra kidolgozott módszerünket más járomspórás gombacsoportok vizsgálata során is sikerrel alkalmaztuk:

Schwartz et al. 2012. *Lichtheimia* species exhibit differences in virulence potential. *PLoS One* 7(7):e40908. IF: 3.730.

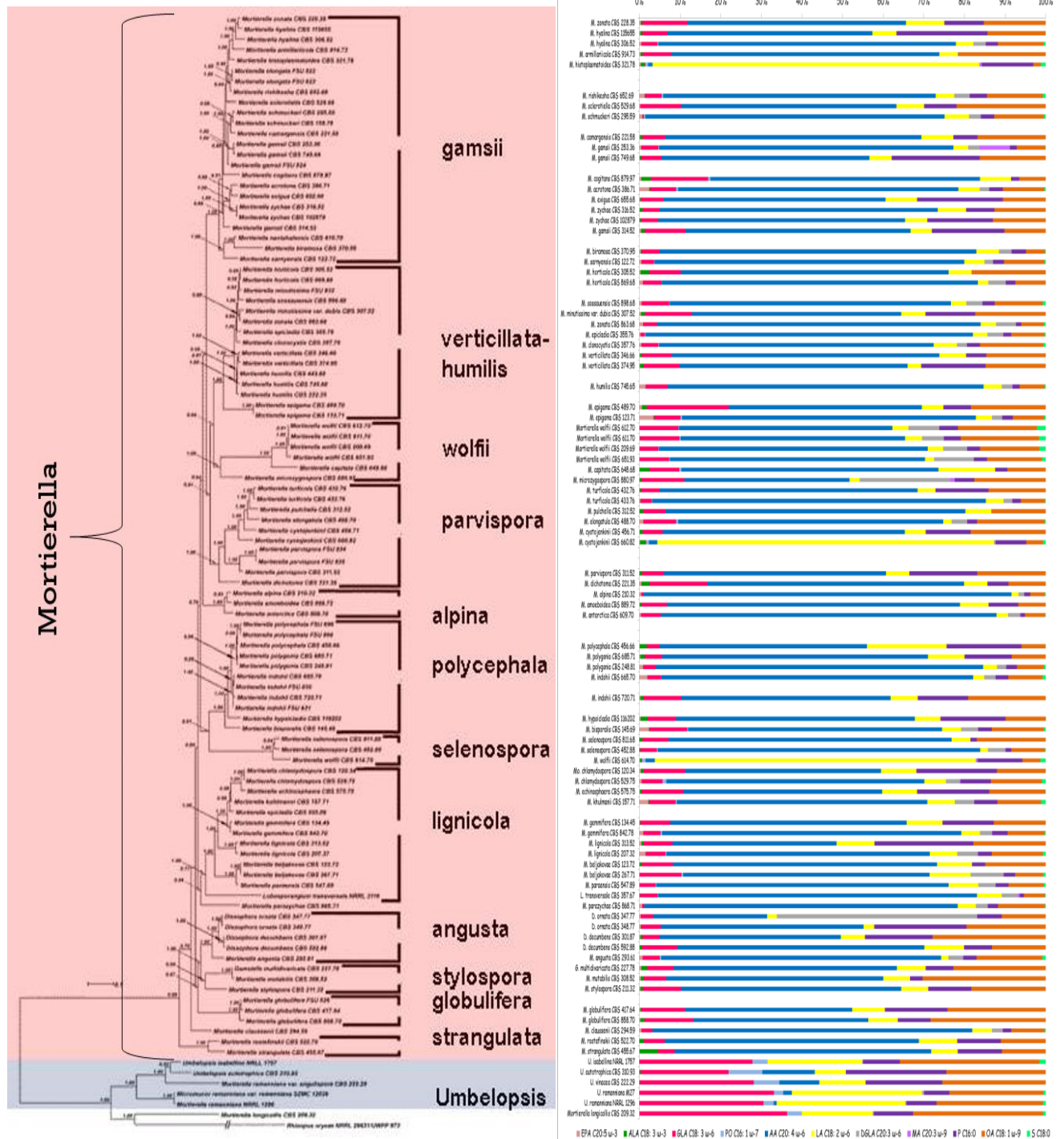
Kaerger et al. 2015. Adaptation to thermotolerance in *Rhizopus* coincides with virulence as revealed by avian and invertebrate infection models, phylogeny, physiological and metabolic flexibility. *Virulence* (in press). IF: 3.319.

A projekt eredményeként nagyszámú *Mortierella* és rokon izolátum zsírsavtermeléséről és zsírsavprofiljáról szereztünk információkat. Ezeket a molekuláris markereken alapuló filogenetikai adatokkal összevetve vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a filogenetikai eredmények alapján is elkülönülő *Mortierella* és *Umbelopsis* fajok zsírsavprofiljuk alapján is két csoportot alkotnak (**2. ábra**). Néhány korábban *Micromucor*-ként azonosított izolátum és egyes *Mortierella* fajok molekuláris filogenetikai vizsgálatok alapján átkerültek az *Umbelopsis* nemzetségbe, ezeknél az izolátumoknál az *Umbelopsis* fajokra jellemző zsírsavprofil tapasztaltunk, tehát a zsírsavprofil alátámasztotta a korábban megállapított filogenetikai viszonyokat.

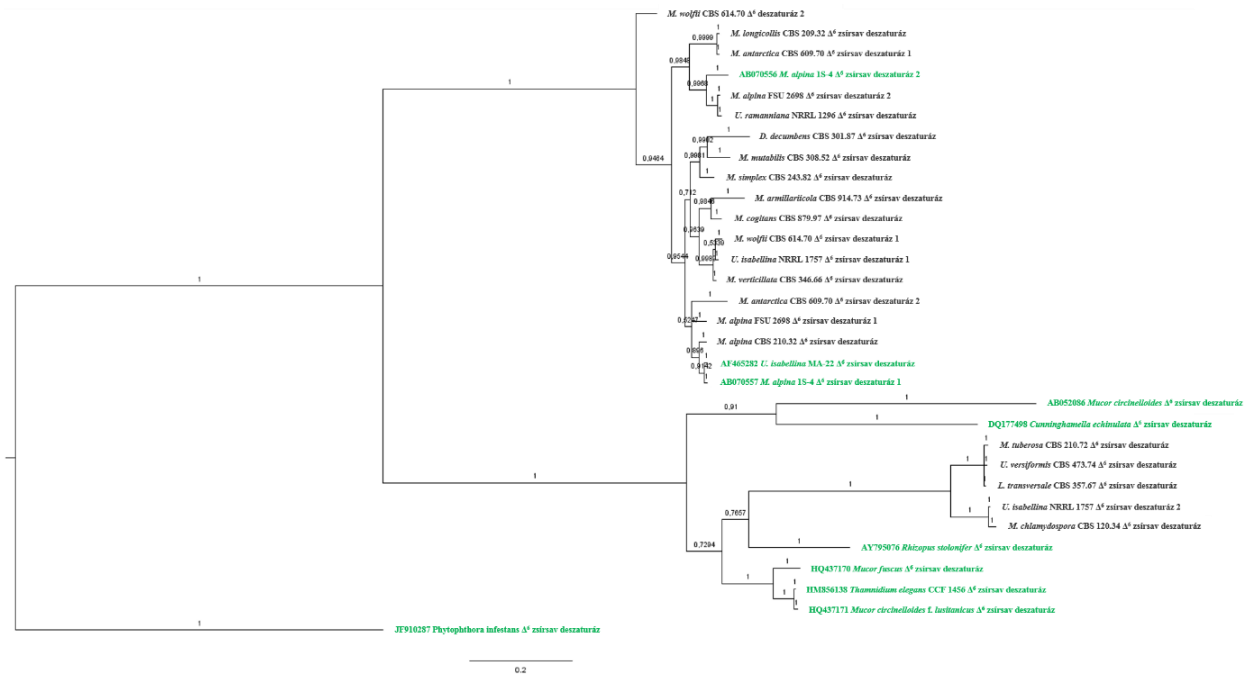
A zsírsavtermelés *Mortierellales* renden belüli diverzitásának tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy néhány *Mortierella* izolátum a többi *Mortierella* izolátumtól eltérően nem termelt arachidonsavat, helyette linolsavat termelt legnagyobb arányban. Ezen izolátumok

között azonban nem találtunk filogenetikai kapcsolatot. A molekuláris filogenetikai analízis során a *Mortierella* nemzetség parafiletikusnak bizonyult, mivel a *Mortierella* nemzetség mellett magába foglalja a *Dissophora*, *Gamsiella* és *Lobosporangium* nemzetségeket is. Ezen rokon nemzetségek izolátumai, habár alacsonyabb zsírsavhozammal rendelkeztek, szintén termeltek többszörösen telítetlen zsírsavakat és a *Mortierella* izolátumokra jellemző zsírsavprofilal rendelkeztek, amely szintén megerősíti a molekuláris markerekkel kapott filogenetikai analízis eredményét. Jelenleg folyamatban van a zsírsavtermelés vizsgálatából származó adatok átkódolása, mely során a zsírsavhozamban és a zsírsavprofilban tapasztalt különbségeket filogenetikai analízisre alkalmas adatsorokká alakítjuk át.

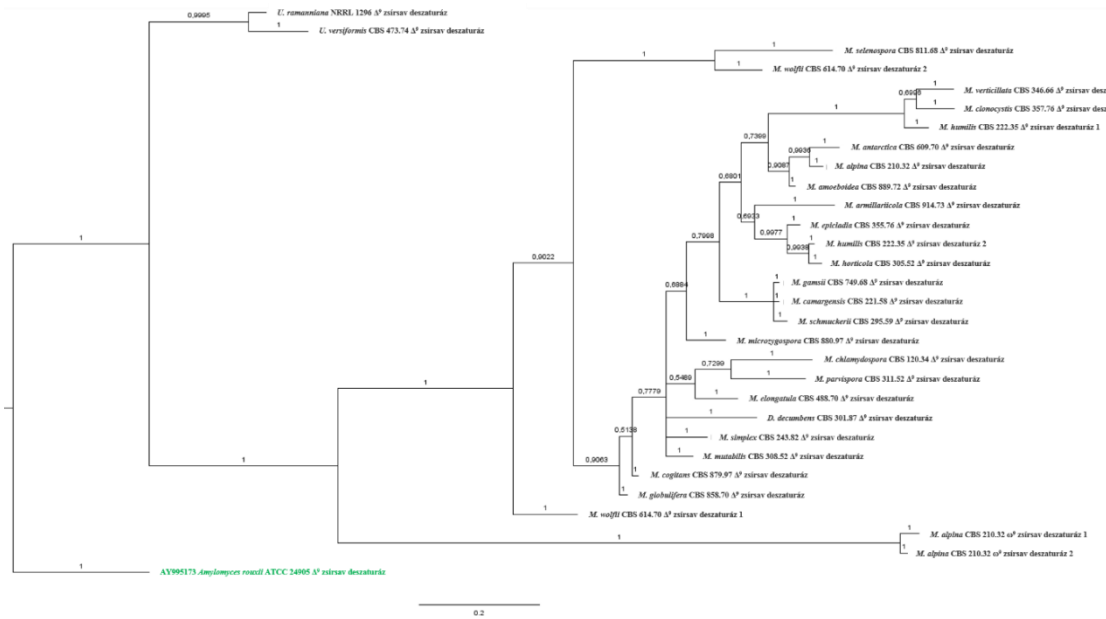
A zsírsav-bioszintézisben résztvevő Δ^6 és Δ^9 zsírsav deszaturázokat kódoló gének azonosítása következtében nagyszámú szekvenciaadat keletkezett. Az azonosított *Mortierella* és *Umbelopsis* zsírsav deszaturázok nukleotid szekvenciáiból származtatott aminosav szekvenciáikat összevetve más Mucoromycotina zsírsav deszaturáz szekvenciákkal a zsírsav deszaturáz gének evolúciós folyamatairól szereztünk információkat. A Δ^6 zsírsav deszaturázok esetében az izolátumok két nagy csoportra különültek. Az egyik csoportba *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátumok kerültek, míg a másik csoport a Mucoromycotina képviselői mellett szintén tartalmazott *Umbelopsis* és *Mortierella* szekvenciákat is. Feltételezésünk szerint a Mucoromycotina és Mortierellomycotina altörzsekbe tartozó gombák közös ősében már jelen volt a Δ^6 deszaturáz kódoló gén, majd a Mortierellomycotina és Umbelopsidaceae szétválása előtt a gén duplikálódott. Ezt az elméletet alátámasztja, hogy az *Umbelopsis isabellina* NRRL 1757 izolátum esetében 2 Δ^6 zsírsav deszaturáz gént azonosítottunk, amiből az egyik a *Mortierella* Δ^6 zsírsav deszaturázokkal, míg a másik a Mucoromycotina Δ^6 zsírsav deszaturázokkal mutatott hasonlóságot (**3. ábra**). Ez azonban némileg ellentmond a jelenleg elfogadott nézeteknek, amelyek az Umbelopsidaceae család Mucorales renddel való közelebbi rokonságát feltételezik. Egyes *Mortierella* fajokban (*M. wolfii* CBS 614.70, *M. alpina* FSU 2698, *M. antarctica* CBS 609.70) további génduplikáció játszódhatott le és feltételezhetően az ősi Δ^6 zsírsav deszaturáz gén elveszett, mivel mindkét azonosított Δ^6 zsírsav deszaturáz a *Mortierella* Δ^6 zsírsav deszaturázokkal mutatott hasonlóságot. A Δ^9 zsírsav deszaturáz szekvenciák összehasonlításakor két nagy csoportra különültek el a *Mortierella* és az *Umbelopsis* izolátumok (**4. ábra**). Mivel az adatbankban nem találtunk további Mucoromycotina Δ^9 zsírsav deszaturáz szekvenciákat, a későbbiekben tervezzük a Δ^9 zsírsav deszaturáz azonosítását különböző járomspórás gombákból, majd ezek bevonását a filogenetikai analízisbe.



2. ábra. Az ITS régió, a 18S és 28S rRNS gének, valamint a *tef* és *RPB1* szekvenciák alapján BayesPhylogenies programmal számolt 50% többségi konszenzus törzsfá és a zsírsavprofilok összevetése. A törzsfán feltüntetett értékek a poszterior valószínűségeket jelzik. A zsírsavprofil esetében az egyes zsírsavak arányát a teljes zsírsavtartalomra vonatkoztatva ábrázoltuk. Rövidítések: EPA: eikozapentaénsav, ALA: α -linolénsav, GLA: γ -linolénsav, PO: palmitolénsav, AA: arachidonsav, LA: linolsav, DGLA: dihomó- γ -linolénsav, MA: 5,8,11-eikozatriénsav, P: palmitinsav, OA: olajsav, S: sztearinsav.



3. ábra. Az azonosított *Mortierella* és *Umbelopsis* és adatbanki Mucoromycotina Δ^6 zsírsav deszturáz szekvenciák alapján BayesPhylogenies programmal számolt 50% többségi konszenzus törzsfá. A törzsfán feltüntetett értékek a poszterior valószínűségeket jelzik.



4. ábra. Az azonosított *Mortierella* és *Umbelopsis* Δ^9 zsírsav deszturáz szekvenciák alapján BayesPhylogenies programmal számolt 50% többségi konszenzus törzsfá. A törzsfán feltüntetett értékek a poszterior valószínűségeket jelzik.

Összefoglalva eredményeinket, elmondhatjuk, hogy a kitűzött célokat megvalósítottuk. A kutatási program eredményeként:

Több mint 100 *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátum zsírsavtermelését vizsgáltuk meg és számos magas zsírsavhozammal, illetve eltérő zsírsavprofillal rendelkező törzset azonosítottunk, melynek eredményeként létrehoztunk egy többszörösen telítetlen zsírsavakat termelő gombákból álló törzsgyűjteményt.

Számos *Mortierella* és *Umbelopsis* törzsben azonosítottuk és vizsgáltuk a többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézisében szerepet játszó Δ^9 és Δ^6 zsírsav deszaturázokat kódoló géneket. Vizsgáltuk a tenyésztési paraméterek (hőmérséklet, idő, tápoldat összetétel, külsőleg adott zsírsavak és olajok) zsírsavtermelésre és a deszaturáz gének kifejeződésére gyakorolt hatását, ami az ipari alkalmazhatósághoz szolgálhat új információkkal.

A zsírsavtermelés vizsgálatából nyert adatokat és a projekt során azonosított nukleotid és aminosav szekvenciákat filogenetikai és evolúciós tanulmányokba is bevontuk.

Megkezdjük a zsírsavtermelés genetikai manipulálásához szükséges feltételek vizsgálatát, mely során teszteltük a gomba törzsek antifungális érzékenységét különböző gombaellenes hatóanyagokkal szemben és kidolgoztunk egy hygromycin B és egy nourseotricin rezisztencián alapuló direkt szelekciós rendszert.

Új, a későbbi alap- és alkalmazott kutatásokban is felhasználható eljárásokat, protokollokat dolgoztunk ki, elsősorban a *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátumok szelekciójára és a zsírsavtermelés vizsgálatához szükséges extrakciós és analitikai módszerekre vonatkozóan, melyek a későbbi kutatások során is felhasználhatók.

A projekt során létrejött eredmények nagymértékben hozzájárulnak a járomspórás gombák zsírsavtermelésére és zsírsav-bioszintézisére vonatkozó ismeretek bővüléséhez. A nagyszámú azonosított gén szekvencia felhasználható a későbbi alapkutatások során a zsírsav-bioszintézis molekuláris mechanizmusának és regulációjának vizsgálatához, emellett alapul szolgálhat a túltermelő és megváltozott zsírsavprofilú törzsek előállításához szükséges vektorok létrehozásához. A pályázat során azonosított többszörösen telítetlen zsírsavakat termelő törzsek további törzsnemesítés alapját képezhetik, távlati célként egyes törzsek ipari felhasználása is elképzelhető.

A pályázathoz kapcsolódóan eddig **2 MSc diplomamunka** és **3 BSc szakdolgozat** született és **2 további BSc** hallgató jelenleg is dolgozik a témán, valamint folyamatban van egy PhD munka is. A projekten dolgozó hallgatók munkájuk eredményeként **egy OTDK második helyezést, egy különdíjat** és **három első helyezést** értek el helyi TDK konferenciákon. Emellett a csoportban dolgozó egyik hallgató elnyerte a Nemzeti Kiválóság Program **Eötvös Lóránd Hallgatói Ösztöndíját** is.

A XXXI. Biológia OTDK-n Kovács Aranka Stella a **JATE Press Kiadó Publikációs Díját** is elnyerte, melynek eredményeként dolgozatának anyagát könyvfejezetként publikálhatta:

Kovács et al. 2014. Többszörösen telítetlen zsírsavakat termelő *Mortierella* fajok filogenetikai és fiziológiai vizsgálata. In: Vágvölgyi Cs, Szekeres A: *A biológia jövője, a jövő biológusai, avagy szemelvények a magyarországi felsőoktatási intézményekben végzett tudományos munka eredményeiből*. JATE Press, Szeged, pp 19-32.

A projekt eredményeit

6 szakfolyóiratban megjelent cikkben (összesített **IF: 22,023**; független hivatkozások száma eddig: **351**);

1 könyvfejezetben (magyar nyelvű);

valamint **15 konferencia anyagban** (poszter/előadás)

publikáltuk, és folyamatban van további **3 szakfolyóiratban megjelent cikk** összeállítása, illetve publikálása.

A pályázatban kitűzött célokat sikerült maradék nélkül megvalósítani. A kutatási eredmények alapján nem volt szükség a feladatok módosítására. Ugyanakkor a 3. munkaszakaszban a kísérletes munka és annak feldolgozása jelentősen feltorlódott, így az eredmények egy részének publikálása áthúzódott a 2015. évre. Ezeket az eredményeket, az eddigiekhez hasonlóan, rangos nemzetközi folyóiratokban kívánjuk ez év során publikálni. Ennek érdekében az utolsó munkaszakasz 6 hónapos hosszabbítását kértük (2015.03.31-ig) a feladatok és költségterv módosítása nélkül, melyet meg is kaptunk. A támogatási összegen felül nem volt szükség saját forrás bevonására.

Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az OTKA pályázat keretében megvalósított kutatást – elsősorban a zsírsav-bioszintézis genetikai hátterének vizsgálatát és a zsírsavtermelés fokozását, illetve módosítását – folytatni szándékozunk. Ehhez segítséget nyújtanak azok a nemzetközi együttműködések, melyek épp a jelen kutatási program megvalósítása során és a támogatás segítségével mélyültek el.

Ezek közül is ki kell emelnünk **Dr. Milan Čertík** (Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Biochemical Technology, Pozsony, Szlovák Köztársaság) kutatócsoportját, amely különböző gomba metabolitok termelésének vizsgálatával, azon belül is a mikrobiális zsírsavtermeléssel és annak genetikai hátterével foglalkozik. A projekt munkájának folytatásaként egy **Közös Magyar-Szlovák Kormányközi TÉT** együttműködést nyertünk el (TÉT_12_SK-1-2013-0007, *Biotechnológiai jelentőségű karotin- és lipidtermelő gombák jellemzése és módosítása, 2015-2016*). Szintén fontos megjegyeznünk a járomspórás gombák transzformációjában és filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatában elismert **Dr. Kerstin Voigt** (University of Jena, Jena Microbial Resource Collection, Jéna, Németország) által vezetett csoporttal kialakított együttműködést, melynek keretében a projekt megvalósítása alatt több közös publikáció is született. Emellett a *Mortierella* fajok azonosításában szerzett tapasztalatoknak és adatoknak köszönhetően részt vettünk az **International Fungal Working Group Fungal Barcoding projektben** is (Szervező: Dr. Conrad Schoch Fungal curator, GenBank taxonomy, NIH/NLM/NCBI Bethesda, Maryland, USA. Honlap: <http://www.fungalbarcoding.org>).

Szeged, 2015. április 28.

Dr. Nyilasi Ildikó
témavezető
tudományos munkatárs