

### Az elért eredmények rövid ismertetése (T37471)

A karotének bioszintetikus reakcióútjának első fele megegyezik más biológiailag fontos izoprenoid származékokéval. Ezen első szakasz kulcs intermedierje a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A. A bioszintetikus út "nem-karotenoid specifikus" szakasza a geranilgeranil pirofoszfát kialakulásával zárul. A bioszintetikus út "karotenoid specifikus" szakaszában két molekula GGPP-ből fitoén (színtelen karotenoid), majd négy lépésben (dehidrogénezések) likopén keletkezik. Ez két ciklizációs lépésben alakul b-karoténné. Az astaxathint termelő élesztők esetében a karotenoid specifikus reakcióút végterméke az astaxanthin (3,3'-dihidroxy- $\beta$ , $\beta$ -carotene-4,4'-dione): astaxanthin adja a teljes pigmenttartalom 83-87%-át; a többi színanyagból jóval kevesebb van jelen.

A lazacok izomzatában felhalmozott rózsaszínű astaxanthin tengeri algákból származik. A mesterségesen nevelt lazacok takarmány kiegészítőjeként alkalmazott pigmenthez azonban az élelmiszeripar és a gyógyszeripar is nagy reményeket fűz. Az ipari szintű astaxanthin termelés közül egy ideje a legígéretesebbnek a *Phaffia rhodozyma* élesztőgomba tűnik, amellyel a remények szerint az ipari szintű fermentációs astaxanthin termelés is kivitelezhető. A kutatási program célja a *P. rhodozyma* astaxanthin termeléssel összefüggő fiziológiai és genetikai vizsgálata, továbbá genetikai állományának lehetőség szerinti olyan megváltoztatása, amely kedvező irányba befolyásolja az astaxanthin termelést. A közben elért kutatási eredmények egyértelművé tették, hogy az astaxanthin termelő élesztők izolátumai két, egymáshoz közel álló fajba tartoznak: ez a két faj a *Phaffia rhodozyma* és a *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

A kutatási program vállalásai:

1. Auxotróf mutánsok és légzésdeficiens mutánsok előállítás.
2. Az astaxanthin bioszintézisben változott haploid színmutánsok előállítás, beleértve a hiperproduktív színmutánsokat is.
3. Analitikai módszerek kidolgozása az astaxanthin termelés vizsgálatára.
4. Megváltozott ploiditású törzsek létrehozása elsősorban az általunk kidolgozott protoplasztfúziós és transzformációs eljárásokkal. Az astaxanthin termelés fokozása: hiperproduktív törzsek és tenyésztési körülmények vizsgálata.
5. A 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktáz gén klónozása *Phaffia rhodozyma*-ból.

A munkatervnek megfelelően a feladatok mindegyikében sikerült eredményeket elérni.

**1.-2.:** Létrehoztunk egy, mintegy tucatnyi (különböző helyről és szubsztrátról) származó vad típusú *Phaffia rhodozyma* izolátumot magába foglaló gyűjteményt.

- Ezek segítségével számos kísérletet végeztünk a mutagénkezeléshez, a törzsfenntartáshoz és tenyésztéshez szükséges optimális feltételek meghatározására.

- Kísérleteinkből kiderült, hogy *Phaffia* auxotróf mutánsok létrehozása a  $^{60}\text{Co}$ -besugárzással a leghatékonyabb. Az optimalizált kísérleti körülményeket (1241 Gray/h, 3.5h) használtuk fel egy auxotróf mutánsok létrehozására. A kísérletek eredményeként izolált és fenntartott stabil auxotrófia mutánsok adenin, arginin, izoleucin, leucin, és metionin igényes törzsek.

- A kísérleteinkből kiderült, hogy légzésdeficiens mutánsok spontán is jelentős arányban (>1%) létrejönnek, kémiai mutagénkezelésre is megjelentek, bizonyítván, hogy a *P. rhodozyma* a ritka előfordulású petite-pozitív fajok közé tartozik. A kémiai mutagének közül elsősorban az etidium bromiddal végrehajtott kísérletek voltak eredményesek, de jó hatásfokúnak bizonyult az etilmetánszulfonát is.

- Az astaxanthin bioszintézisben megváltozott haploid színmutánsok előállítása, beleértve a hiperproduktív színmutánsokat is, a project egyik legfontosabb célja volt. Mind fizikai (UV- és  $\gamma$ -sugárzás), mind kémiai (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG)) mutagén indukcióval sikerült létrehozni stabil színmutánsokat. Ilyen színmutánsokat mind az eredeti vad típusú törzsekből, mind egyes auxotróf mutánsokból (stabil kettős jelölés) létrehoztunk.

A *P. rhodozyma* az astaxanthint az acetát-mevalonát bioszintetikus folyamatsor folytatásaként  $\beta$ -karotin intermediereken keresztül szintetizálja. Kísérleteink eredményeként, a bioszintetikus út különböző pontján blokkolt (sérült) színmutánsokat sikerült izolálnunk, a hófehértől a téglavörösig. Egyes esetekben (pl.  $\beta$ -karotin felhalmozódás) a végtermék könnyen azonosítható, más esetekben (pl. likopin) valószínűsíthető, illetve analitikai eljárásokkal (lásd később) tisztázható.

Ismételt mutáltatás és célzott szelekció révén olyan mutánsokhoz is jutottunk, amelyek asztaxantint (a kiindulási vad törzshöz képest) jelentős mértékben túlermelik.

Összefoglalva a pályázati időszak végére igen nagyszámú színmutánst, rezisztenciamutánst és auxotróf mutánst állítottunk elő (a jelenleg fenntartott markerezett törzsek száma már jóval 100 feletti) mindkét élesztőfajból (*P. rhodozyma*, *X. dendrorhous*). Rendelkezünk több, stabil kettős jelöléssel rendelkező mutánssal is (különböző marker-kombinációkban; pl. szín- és auxotrófia mutáció). Az OTKA projektünk keretében előállított mutánsparkot integráltuk az SZMC (*Szeged Microbiological Collection*) törzsgyűjteménybe. Vázlatos áttekintésként:

- Légzésdeficiens mutánsokat a *P. rhodozyma* CBS 5905 törzsből izoláltunk (a *P. rhodozyma* petite-pozitív).
- Benomyl rezisztens mutánsokat a *P. rhodozyma* CBS 5905 és a *X. dendrorhous* CBS 5908, CBS 6938, ATCC 24203 és ATCC 24229 törzsekből izoláltunk.
- Cikloheximid rezisztens mutánst az ATCC 24229 törzsből izoláltunk.
- Auxotróf mutánsokat az ATCC 24203 és ATCC 24229 törzsekből izoláltunk.
- Színmutánsokat a *P. rhodozyma* CBS 5905 és a *X. dendrorhous* CBS 5908, CBS 6938, ATCC 24203 és ATCC 24229 törzsekből izoláltunk.

A PTE, TTK, Általános és Környezetmikrobiológiai Tanszékével együttműködésben a különböző színmutánsok, hiperproducerek és vad típusú szülői törzsek oxidatív stressztűrő képességét vizsgáló kísérleteket is folytattunk. Ezekre az eredményekre alapozva olyan szelekciós rendszereket is elképzelhetők, amelyek mutagenezist követő hatékonyabb szelekció révén megnövekedett pigment tartalmú törzsek izolálását biztosítják.

Vizsgáltuk a karotenoid profiljukban megváltozott törzsek sajátosságait. A hőmérséklet különösen kritikus tényező a *Phaffia/Xanthophyllomyces* esetében tekintettel a alacsony (18-20°C) növekedési hőmérsékleti optimumra. *In vivo* EPR kísérletekkel meghatároztuk, hogy különböző karotenoidok beépülése, aránya, lokalizációja és stabilitása hogyan befolyásolja membrán dinamikáját (Blaskó és mtsi 2006).

**3.** A kutatási program egyik vállalásaként terveztük új analitikai eljárás kidolgozását a megtermelő színanyag mennyiségének és minőségének vizsgálatára. Itt elsősorban nem a gyors „előszűrésre” alkalmazható metodikákról (vékonyréteg kromatográfia, spektrofotometria) van szó, hanem egy, a színanyag tartalom pontos mérését biztosító eljárásról. Ennek megfelelően befejeződött egy új mérési módszer kidolgozása (Bartók és mtsi 2006), amely a tömegspektrometria és a HPLC analitikai módszerek kombinációjával az eddigieknél sokkal megbízhatóbb információval szolgál a vizsgált törzsek színanyag tartalmáról.

4. A protoplaszt fúziós kísérletek részeként megtörtént a *Phaffia* és *Xanthophyllomyces* törzsek protoplasztképzésének optimalizálása. Ezt követően protoplaszt fúziós kísérleteket végeztünk két *Xanthophyllomyces* szülői törzsből (ATCC 24203 és ATCC 24229) izolált különböző markerezettségű mutánsokkal (ebből a két törzsből többféle, a fúziós hibridek szelekcióját biztosító auxotróf mutánst izoláltunk). Különböző fúziós kísérletekből több hibridet is izoláltunk, tisztítottunk, stabilitásukat ellenőriztük. Egyes hibridek a többszöri ellenőrző passzálás után is szegregáltak, azonban több ellenőrzött stabil fúziós hibridet is nyertünk. Alábbiakban látható egy vázlatos áttekintés a jelenleg fenntartott *Xanthophyllomyces* fúziós hibridekről:

fúziók	fenntartott hibridek száma
ATCC 24229 arg- x ATCC 24229 met-	19
ATCC 24229 arg- x ATCC 24203 arg-	3
ATCC 24229 met- x ATCC 24203 arg-	2
ATCC 24203 arg- x ATCC 24203 lys-	5
ATCC 24203 ade- x ATCC 24203 lys-	10

A fúziós hibridek egy részével elektroforetikus kariotipizálási kísérleteket végeztünk, amikor is a szülői és a hibrid törzsek kromoszómális állományának (kromoszóma mobilitási csoportok száma, kromoszómális DNS molekulák mérete, becsült genomméret) összehasonlító elemzésével is igazolni tudtuk a fúziós esemény lejátszódását. Az eddigi analizált hibridek színanyag tartalmának elemzése ritkán mutatta az astaxanthin tartalom jelentős növekedését, annak ellenére, hogy a PFGE elemzés sokszor igen jelentős eltérést tárt fel a szülői törzsekkel való összehasonlításban.

A pályázatban általános célként szerepel astaxanthin termelésben megváltozott törzsek izolálása. Ilyen törzsek létrehozására további lehetőség a transzformáció, illetve mutagenézist követő szelekció. Kísérleteket folytatunk mind *P. rhodozyma*, mind *X. dendrorhous* esetében egy *A. tumefaciens* Ti-plazmidján alapuló transzformációs rendszer kidolgozásával, tekintettel arra, hogy ezt a megközelítést egy más gombacsoportra sikeresen alkalmaztuk (Nyilasi és mtsi 2003, 2005). Itt tovább kísérletekre van még szükség. Sikeres volt ugyanakkor a mutagenézissel történő hiperproducer törzsek előállítás. Kombinált mutagenézissel (UV,  $\gamma$ -sugárzás, kémiai mutagenézis) és többszöri szelekciós ciklusok kombinálásával több túltermelő törzset hoztunk létre, amelyek az eredeti szülői törzs színanyagtermelését jelentősen meghaladják (Takó és mtsi 2005; Palágyi és mtsi 2006). Ezekkel stabilitási vizsgálatokat végeztünk, illetve a pigment profil meghatározása történt meg.

Törzs	Teljes karotenoid ( $\mu\text{g g}^{-1}$ szárazsúly)	Asztaxantin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ szárazsúly)	Asztaxantin / teljes karotenoid
CBS 6938	260	98	0.377
CBS 6938/S1	226	87	0.385
CBS 6938/S2	269	104	0.387
CBS 6938/S66	501	53	0.106
ATCC 24203	258	65	0.252
ATCC 24203/S33	827	58	0.070
ATCC 24229	177	41	0.232
ATCC 24229/S111	623	161	0.258
ATCC 24229/S119	756	274	0.362
ATCC 24229/S121	324	29	0.089

Az általunk létrehozott túltermelő törzsek pigment profiljának vizsgálata feltárta, hogy a teljes pigment tartalom növekedése nem járt minden esetben együtt az

astaxanthin tartalom növekedésével. Ugyanakkor, sikerült olyan törzset is létrehozunk, ahol az astaxanthin tartalom 6.7-szeresre emelkedett (*X. dendrorhous* ATCC 24229/S119; 274  $\mu\text{g g}^{-1}$  szárazsúly) (Palágyi és mtsi 2006).

Számos kísérletet végeztünk, az astaxanthin termelés tenyésztési körülményeinek vizsgálatával kapcsolatban is. Egyebek mellett tanulmányoztuk különböző alkoholok és természetes eredetű olajok jelenlétének a karotenoid szintézisre gyakorolt hatását. Ellentétben a vizsgált alkoholokkal, megvizsgált közel 12 különböző természetes olajtermék esetében találtunk olyat (pl. pálmaolaj), amely jelentős mértékben növeli a megtermelt színanyag mennyiségét (Lukács és mtsi 2005, Vágvölgyi és mtsi 2005).

Lényeges volt, hogy egyértelműen tisztázzuk, a „*Phaffia rhodozyma*” néven fenntartott izolátumok valóban egy fajba tartoznak e. Ennek érdekében a rendelkezésünkre álló törzsekkel RAPD analízist végeztünk. A RAPD analízis alapján végzett csoportelemzés korrelációt talált a vizsgált izolátumok egyes RAPD markerei és genoméretbeli eltérése, illetve biológiai sajátosságai (pl. önsporázási képesség, azaz feltételezhető homothallia) között (Palágyi és mtsi 2004). Az eredmények alapján egyértelműen megállapítható, hogy két astaxanthin termelő élesztőgomba fajról van szó, amelyek közül az egyik elfogadva (a homothallikus) a *Phaffia rhodozyma*, a másik a (Golubev által javasolt névvel) *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tekintettel arra, hogy mindkét faj astaxanthint termel domináns pigmentként a genetikai vizsgálatokat is mindkét fajhoz tartozó izolátumokkal folytattuk.

5. A *P. rhodozyma* 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktáz gén klónozásával kapcsolatos kísérleteket is megkezdtük, amelynek eredményeként már rendelkezünk a gén részleges szekvenciájával. Itt a teljes génszekvenciáig még nem rendelkezünk: a munkát jelentősen nehezíti, hogy az ismert HMG-CoA reduktáz gének mindegyikében a szekvencia nagyobb részét erőteljesen variábilis, egymással értékelhető homológiát nem mutató régiók teszik ki. Ennek ellenére sikerült egy viszonylag konzervatívabb régió szekvenciáját a *P. rhodozyma* CBS 5908 törzsből meghatározni (a szekvenciát depozitáltuk (EMBL submission DS[61987]). Jelenleg az ún. inverz PCR eljárást próbálkozunk a gén további részeinek felderítésével.

A HMG-CoA reduktáz génnel kapcsolatos kísérleteket azonban más megközelítéssel is folytattunk. Kutatásaink eredményeként klónoztuk ezt a gént a *Rhizomucor miehei* ATTC 46344 törzsből (Lukács és mtsai 2003). Számos struktúrgén (pl. orotidin-5- monofoszfát dekarboxiláz, gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz) esetében végzett filogenetikai elemzés azt a meglepő eredményt hozta, hogy a járomspórás gombák a többi gombacsoport közül a bazídiumos gombákhoz álltak a legközelebb. Ezen eredmények alapján amennyiben megfelelő transzformációs rendszer rendelkezésre áll, megkísérrelhető a *R. miehei* HMG-CoA reduktáz génjével történő *Phaffia* transzformáció.

6./ A projekt kísérleti munkájának eredményeként kiderült, hogy a *P. rhodozyma* és a *X. dendrorhous* képes adszorbeálni és lebontani az ochratoxin A-t (Péteri és mtsi 2006). Vizsgálataink szerint a lebontásának terméke a (biológiailag nem aktív) ochratoxin  $\alpha$ . Feltételezhető, hogy a folyamatban egy carboxipeptidáz típusú enzim játszik szerepet. Kísérleti eredményeink szerint ez feltehetően egy metalloproteáz, hasonló a karboxipeptidáz A-hoz. Az enzim hőmérsékleti optimuma 30°C, amely jóval a *P. rhodozyma* növekedésének optimuma (18-20°C) felett van. Eddigi vizsgálataink szerint az enzim sejthez kötött. Ebben az irányban jelenleg is folynak a kísérleteink.

Összefoglalva elmondható, hogy a munkatervben vállalt kísérleti feladatok lényegében sikerült teljesíteni. Az eredmények egy részének publikálása azonban még nem történt meg. Ennek csúszásában sajnos meghatározó szerepet játszik, hogy 2004. márciusában hosszú betegeskedést követően elhunyt Dr. Ferenczy Lajos Professzor Úr, a projekt témavezetője. Betegségének időszaka és halála minden erőfeszítés ellenére törést okozott a normális munkamenetben. A témavezetést az utolsó évre vehettem át, amely időszakban érthető módon elsősorban a kísérleti munka folyamatosságát kellett biztosítani, de minden laboreredmény kézírattá történő feldolgozása elhúzódik.

Szeged, 2006. február 25.

Dr. Vágvölgyi Csaba  
egyetemi docens  
témavezető