



A biotechnológia újabb eredményei

Fókuszban az „omikák” és a gomba-biotechnológia

Készítette:

**Dr. Pócsi István egyetemi tanár
az MTA doktora**

**Készült: Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar,
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék**

Terjedelem: 222 oldal

Kézirat lezárva: 2015. szeptember 30.

A tananyag elkészítését a Munkaerő-piaci igényeknek megfelelő, gyakorlatorientált képzések, szolgáltatások a Debreceni Egyetemen Élelmiszeripar, Gépészet, Informatika, Turisztika és Vendéglátás területen (Munkaalapú tudás a Debreceni Egyetem oktatásában) TÁMOP-4.1.1.F-13/1-2013-0004 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



Lektorok:

Dr. Hornok László

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Növényvédelmi Intézet,
Gödöllő

Dr. Tóth László

K+F vezető

TEVA Gyógyszergyár zRt, Alapanyaggyártó Igazgatóság, Debrecen

Dr. Vasas Gábor

tanszékvezető egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Növénytani Tanszék

Dr. Zákány Róza

egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Tartalomjegyzék

Fejezet	Oldalszám
Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke	10
1. Bevezető	14
1.1. A jegyzet megírásának célja	14
1.2. Irodalomjegyzék az 1.1. fejezethez	15
2. „Omikák” a modern biológiában és biotechnológiában	16
2.1. „Omikák” - általános áttekintés	16
2.1.1. Az „omikák”	16
2.1.2. Az „omikai” adatgyűjtés eszközei	17
2.1.3. Az „omikai” adatok feldolgozása, prezentációja	18
2.1.4. A rendszerbiológia kutatási területe, eszközei	19
2.1.5. Rendszerbiológiai szemléletű orvoslás	19
2.1.6. Az emberi mikrobiom integrálása az ember rendszerbiológiájába	20
2.1.7. Irodalomjegyzék a 2.1. fejezethez	21
2.2. Gombák a genomikai és metagenomikai kutatásokban	23
2.2.1. A gomba genomikai kutatások céljai, várható eredményei	23
2.2.2. A növényi alapanyagok („feedstock”) termelésének a biztosítása - mikorrhizák	23
2.2.3. Növények, mikorrhiza-képző gombák és szimbionta baktériumok	24
2.2.4. Növények, rejtőzködő gombák, endofitonok	24
2.2.5. Növényi alapanyagok („feedstock”) termelésének a biztosítása – növényi biológiai védekezés	25
2.2.6. Biofinomítási („biorefinery”) technológiák	26
2.2.7. A gombák evolúciójának a tanulmányozása, a gombák filogenetikai rendszere, az 1000 gomba projekt	27
2.2.8. Gomba másodlagos anyagcsere - a biokémiától a genomikáig	28
2.2.9. Gomba metagenomika - a biofilmek összetételének tanulmányozása	28
2.2.10. Gomba metagenomika - az emberi mikrobiom	29

Fejezet	Oldalszám
2.2.11. A gombákkal szembeni immunválasz	29
2.2.12. Irodalomjegyzék a 2.2. fejezethez	31
3. Az élelmiszer-biotechnológia legújabb eredményei	34
3.1. Az élelmiszer-biotechnológia tárgya, jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái	34
3.1.1. Az élelmiszer-biotechnológia tárgya	34
3.1.2. Az élelmiszer-biotechnológia jelene	34
3.1.2.1. Funkcionális élelmiszerek, táplálék-gyógyszerek - a fogalmak definiálása, élelmiszer-biotechnológiai aspektusok	35
3.1.2.2. Az élelmiszer-biotechnológia további területei - prebiotikumok és probiotikumok	37
3.1.2.3. Az élelmiszer-mikrobiológia élelmiszer-biotechnológiai jelentősége	39
3.1.3. Az élelmiszer-biotechnológia jövőbeni fejlődési tendenciái	41
3.1.3.1. Az „omikák” növekvő szerepe a jövő élelmiszer-biotechnológiájában: táplálkozás-genomika, táplálkozás-genetika és foodomika	42
3.1.3.2. Jelenlegi és jövőbeni funkcionális élelmiszer előállítási technológiák	44
3.1.3.3. A jövő prebiotikumai és probiotikumai	45
3.1.4. Irodalomjegyzék a 3.1. fejezethez	48
3.2. A mikotoxin kutatás legfrissebb eredményei	55
3.2.1. Mikotoxinok - hogyan kerültek az érdeklődés középpontjába?	55
3.2.2. Klímaváltozás és mikotoxin veszély - hogyan érintenek minket?	55
3.2.3. A mikotoxintermelés gombaélettani és ökológiai jelentősége	57
3.2.4. Szekunder metabolitok, köztük mikotoxinok, a gomba-növény interakciókban	58
3.2.5. Mikotoxinok a táplálékláncban	60
3.2.6. A mikotoxinok termelésének a szabályozása	60
3.2.7. Az aflatoxintermelés molekuláris szintű szabályozása <i>Aspergillus flavus</i> ban	64
3.2.8. Az oxidatív stressz bZIP-típusú transzkripciós faktorokon át hathat a szekunder metabolit termelésre	64
3.2.9. Az oxidatív stresszválasz <i>Saccharomyces cerevisiae</i> élesztőben	65
3.2.10. <i>S. cerevisiae</i> Hog1 MAPK ortológok <i>S. pombe</i> ban és az <i>Aspergillus</i> okban	66
3.2.11. A transzkripciós faktorok szabályzó hálózata regulálja az <i>Aspergillus</i> ok oxidatív stresszválaszát és szekunder anyagcseréjét	67

Fejezet	Oldalszám
3.2.12. Az <i>A. nidulans</i> AtfA transzkripció faktor élettani szerepe	68
3.2.13. A szekunder anyagcsere oxidatív stressz általi történő globális transzkripció szabályozása <i>A. nidulans</i> ban – teljes genomi DNS chippel nyert adatok elemzése	68
3.2.14. A mikotoxinok káros élettani hatásai emlősökön és embereken	70
3.2.15. Egészségügyi határértékek mikotoxinokra és az EU-ban eddig mért legmagasabb értékek	70
3.2.16. A mikotoxinokat termelő gombák és ezek miktoxintermelésének a prevenciója	71
3.2.17. A mikotoxinokat termelő gombák biológiai kontrollja	72
3.2.18. A mikotoxinokat termelő gombák biológiai kontrollja - jövőbeni lehetőségek	73
3.2.19. Az aflatoxinok kontrollja - a jelen és a jövő	74
3.2.20. A mikotoxinok citotoxicitása <i>S. pombe</i> modellben - patulin, citrinin	75
3.2.21. A gomba szekunder metabolit génklaszterek, mint kibontásra váró ékszerdobozok	76
3.2.22. Irodalomjegyzék az 3.2. fejezethez	77
3.3. A gombák által termelt, biológiai és biotechnológiai jelentőségű illékony szerves vegyületek	83
3.3.1. A gombák által termelt illékony szerves vegyületek („Volatile Organic Compounds”, „VOCs”) - a növényi egészségre ható anyagok	83
3.3.2. A gombák által termelt illékony szerves vegyületek a növényi patogének ellen	85
3.3.3. Gombák illékony szerves vegyületeinek szerepe a növény-mikroba kölcsönhatásokban	85
3.3.4. Gombák illékony szerves vegyületei - korai kutatások és környezeti egészségügyi aspektusok	86
3.3.5. A gombák által termelt illékony szerves vegyületek biotechnológiai jelentősége	87
3.3.6. Példák a gombák illékony szerves vegyületeinek a lehetséges biotechnológiai felhasználására	88
3.3.7. Mikodízel előállítás	88
3.3.8. Gombák illékony szerves vegyületei - analitikai felhasználás	90
3.3.9. Az élelmiszereken és takarmányon megjelenő penészek illékony szerves vegyületei	90

Fejezet	Oldalszám
3.3.10. A <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Aureobasidium</i> és <i>Trichoderma</i> fajok illékony szerves vegyület termelése	91
3.3.11. Humánpatogén gombák által termelt illékony szerves anyagok	92
3.3.12. A <i>Muscodor</i> fajok sikertörténete	93
3.3.13. A <i>Mucodor albus</i> története	93
3.3.14. „Mikofumigációs” stratégiák és technológiák	94
3.3.15. A mikofumigációs technológiák sikeres mezőgazdasági alkalmazásai	95
3.3.16. Az érlelő szobák mikofumigációja	95
3.3.17. Az épületpenészek kontrollja mikofumigációval	95
3.3.18. A felderített illékony szerves vegyületeket termelő gombák száma rohamosan nő!	96
3.3.19. Az élesztők által termelt illékony szerves vegyületek felhasználási lehetőségei	97
3.3.20. A talajmikrobák által termelt illékony szerves vegyületek	98
3.3.21. Irodalomjegyzék a 3.3. fejezethez	99
4. Az orvosi biotechnológia legújabb eredményei	103
4.1. Az orvosi biotechnológia tárgya, jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái	103
4.1.1. Az orvosi biotechnológia tárgya	103
4.1.2. Az orvosi biotechnológia jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái	103
4.1.2.1. Heterológ fehérjetermelés emlős sejtes és növényi rendszerekben	104
4.1.2.2. Molekuláris diagnosztikumok	109
4.1.2.3. Terápiás eszközök	112
4.1.2.3.1. Terápiás fehérjék	112
4.1.2.3.2. Terápiás nukleinsavak, emberi génterápia	114
4.1.2.3.3. Vakcinák	116
4.1.2.3.4. Szöveti sebészet, regeneratív orvoslás	119
4.1.2.3.5. Természetes eredetű hatóanyagok	122
4.1.3. Irodalomjegyzék a 4.1. fejezethez	124
4.2. A humánpatogén gombák evolúciója	134
4.2.1. Patogének a gombavilágban	134
4.2.2. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség	137
4.2.3. A patogén gombáink evolúciója	137

Fejezet	Oldalszám
4.2.4. Az <i>Aspergillus fumigatus</i> összehasonlító genomikai elemzése	138
4.2.5. A <i>Coccidioides</i> fajok összehasonlító genomikai elemzése	139
4.2.6. Az <i>Arthroderma benhamiae</i> és <i>Trichophyton verrucosum</i> dermatofita gombák genomjának elemzése	139
4.2.7. A <i>Candida albicans</i>	139
4.2.8. <i>Candida albicans</i> - molekuláris epidemiológia	140
4.2.9. A <i>Candida albicans</i> genom evolúciója	140
4.2.10. A filogenetikailag rokon <i>Candida albicans</i> és <i>Candida dubliniensis</i> összehasonlító élettani és genomikai vizsgálata	141
4.2.11. A filogenetikailag rokon <i>Candida albicans</i> és <i>Candida dubliniensis</i> összehasonlító transzkriptomikai vizsgálata	142
4.2.12. A <i>Candida albicans</i> és <i>Candida glabrata</i> eltérő fertőzési stratégiája	142
4.2.13. A <i>Candida albicans</i> és <i>Saccharomyces cerevisiae</i> eltérő stressz adaptációs stratégiái	142
4.2.14. Két új patogén a <i>Candida glabrata</i> kládban: <i>Candida nivariensis</i> és <i>Candida bracarensis</i>	143
4.2.15. Összehasonlító genomika - olyan esszenciális gének kiválasztása, melyek jövőbeni antimikotikumok célpontja lehet	144
4.2.16. További „omikai” lehetőségek a gombadiagnosztikában és új támadáspontok kijelölésében	145
4.2.17. Irodalomjegyzék a 4.2. fejezethez	147
4.3. Az antimikotikumkutatás legújabb eredményei	150
4.3.1. Az antimikotikumok rövid története	150
4.3.2. Az antifungális szerek elleni rezisztencia - hatások a klinikai gyakorlatra	151
4.3.3. Rezisztencia mechanizmusok a <i>Candida</i> fajokban	152
4.3.4. Rezisztencia mechanizmusok az <i>Aspergillus</i> fajokban	153
4.3.5. Az antimikotikumokkal szembeni rezisztencia klinikai jelentősége	153
4.3.6. A biofilmképzés problematikája, gátlása	154
4.3.7. Új megközelítések a <i>Candida albicans</i> elleni terápiákban	156
4.3.8. Személyre szabott gyógyászat a gombaellenes terápiákban	157
4.3.9. Antifungális hatású természetes származékok	158

Fejezet	Oldalszám
4.3.10. Kis molekulatömegű antifungális fehérjék, defenzinek	159
4.3.11. Gomba eredetű kis molekulatömegű antifungális fehérjék; a <i>Penicillium chrysogenum</i> antifungális fehérje (PAF)	160
4.3.12. További lehetséges alternatívák a gombaellenes terápiákban	161
4.3.13. Irodalomjegyzék a 2.3. fejezethez	163
5. A környezet-biotechnológia legújabb eredményei	165
5.1. A környezet-biotechnológia tárgya, jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái	165
5.1.1. A környezet-biotechnológia tárgya	165
5.1.2. A környezet-biotechnológia jelene	166
5.1.3. A környezet-biotechnológia jövőbeni fejlődési tendenciái	168
5.1.4. Irodalomjegyzék az 5.1. fejezethez	169
5.2. A fehér korhasztó gombák környezet-biotechnológiai felhasználása	172
5.2.1. A gombák felhasználása veszélyes kémiai anyagok ártalmatlanítására	172
5.2.2. A gombák előfordulása és ökológiai sajátosságai	172
5.2.3. A környezet-biotechnológiai szempontból érdekes taxonok, fajok	174
5.2.4. A környezetszennyezők lebontásának mechanizmusai	175
5.2.5. A lignint lebontó enzimek, extracelluláris hidrogén-peroxid termelés gombákban	176
5.2.6. Oxidáció lakkázokkal	177
5.2.7. A lakkázok biotechnológiai felhasználása	177
5.2.8. A gombák lehetséges felhasználása bioremediációs technológiákban	178
5.2.9. A gombák potenciális környezet-biotechnológiai alkalmazási lehetőségei	180
5.2.10. A szintetikus festékek biológiai lebontása	181
5.2.11. Az azofestékek lebontása fehér korhasztókkal	184
5.2.12. A festékek eltávolítása immobilizált fehér korhasztó gombával	185
5.2.13. A hormonrendszert megzavaró kemikáliák („Endocrine disrupting chemicals”, „EDCs”)	185
5.2.14. EDCs koncentrációk és hatások a természetben	185
5.2.15. A nonil-fenol probléma	186
5.2.16. A nonil-fenolok mikrobiális lebontása	189
5.2.17. Xenoösztrogének lebontása fehér korhasztókkal	189
5.2.18. A DDT lebontása gombákkal	190

Fejezet	Oldalszám
5.2.19. Gyógyszeripari és testápolási termékek („PPCPs”) lebontása fehér korhasztókkal	190
5.2.20. A fehér korhasztók legperspektivikusabb környezet-biotechnológiai felhasználásai	192
5.2.21. Irodalomjegyzék az 5.2. fejezethez	193
5.3. Gombák a nehézfém-szennyezők mentesítésében	196
5.3.1. Növényekkel társult mikrobák a nehézfém szennyezések fitoremediációval történő kezelésében	196
5.3.2. Növényekkel társult mikrobák elősegítik a nehézfémek mobilizációját és immobilizációját	197
5.3.3. Növényekkel társult mikrobák elősegítik a növények növekedését	198
5.3.4. Nehézfém hiperakkumulátor növények	198
5.3.5. Transzgénikus növények, mint a jövő bioremediátorai	199
5.3.6. Fitovolatizáció	200
5.3.7. Nehézfém-mentesítés gombákkal	201
5.3.8. „Omikai” eszközök alkalmazása a jövő nehézfém-toleráns gombáinak a géntechnológiai megalkotásában	204
5.3.9. Bioszorpció, a gomba bioszorbensek a jövő nehézfém-eltávolító technológiáiban	207
5.3.10. Ipari szennyvizek tisztítása fonalas gomba és élesztő biomasszával	210
5.3.11. Az emberi szervezet „bioremediációja” nehézfémektől	211
5.3.12. A nanorészecskék csoportosítása	212
5.3.13. Szervetlen nanorészecskék előállítása mikroorganizmusokkal, ezen belül kiemelten gombákkal	212
5.3.14. A mikonanotechnológia a mezőgazdaságban	216
5.3.15. A vas-oxid nanorészecskék felhasználása a bioremediációban	217
5.3.16. Nanorészecskék a természetben	218
5.3.17. A nanorészecskék veszélyei	218
5.3.18. Irodalomjegyzék az 5.3. fejezethez	219

Rövidítések jegyzéke

AAV - „adeno-associated virus”; adeno-asszociált vírus

ABTS - „2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)”; 2,2'-azino-bisz-(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)

AFLP - „amplified fragment length polymorphism; amplifikált fragmentum hosszúság polimorfizmus

bZIP - „Basic Leucine Zipper”; bázikus leucin zipzár

AMB - „amphotericin B”; amfotericin B

BDNF - „brain-derived neurotrophic factor”; agyi eredetű neurotrofikus faktor

BTEX - „benzene, toluene, ethyl-benzene, xylene”; benzol, toluol, etil-benzol, xilol

BOD - „biological oxygen demand”; biológiai oxigénigény

cAMP-PKA - „cAMP – protein kinase A”; cAMP - protein kináz A

CAP - „community-acquired pneumonia”, közösségben szerzett tüdőgyulladás

CC-IMS - „multi-capillary column - ion mobility spectrometry”; multikapilláris oszlop - ion mobilitás spektrometria

cDNS - komplementer DNS

CE-MS - „capillary electrophoresis - mass spectrometry”; kapilláris elektroforézis - tömegspektrometria

CFU - „colony-forming unit”; telepképző egység

CFTR - „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”; cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia szabályozó

CLL - „chronic lymphocytic leukemia”; krónikus limfoid leukémia

CLSI - „Clinical and Laboratory Standards Institute”

CGOB - „Candida Gene Order Browser”

CHO - „Chinese hamster ovary”; kínai hörcsög petefészek

CMR - „Common Metal Responsive”; általános nehézfém reszponzív

COD - „chemical oxygen demand”; kémiai oxigénigény

CRE - „cAMP response element”; cAMP-válasz elem

cRNS - komplementer RNS

- Cu/ZnSOD - „copper-and zinc-containing superoxide dismutase”; réz/cink superoxid
dizmutáz
- DDC - „N,N-diethyldithiocarbamate”; *N,N*-dietil-ditiokarbamát
- DDL - „duplication, diversification and differential gene loss”; duplikáció, diverzifikáció és
differenciális génvesztés
- DDT - „dichlorodiphenyltrichloroethane”; dikloro-difenil-triklór-etán
- DOE - „Department of Energy” (USA)
- DON - „deoxynivalenol”; dezoxi-nivalenol
- DST - „diploid sequence type”; diploid szekvencia típus
- ECM - „extracellular matrix”; extracelluláris mátrix
- EDCs - „endocrine disrupting chemicals”; a hormonrendszert megzavaró kémiai anyagok
- ELISA - „enzyme-linked immunosorbent assay”; enzimkötött immunoszorbens tesztek
- ENA - „ethylene-bridged nucleic acid”, etilénhidás nukleinsav
- EOCs - „emerging organic contaminants”; feljövőben lévő szerves szennyezők
- ER - endoplazmatikus retikulum
- ESR - „Environmental Stress Response”; környezeti stresszválasz
- EUCAST - „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
- FDA - „Food and Drug Administration” (USA)
- FGP - „Fungal Genome Program” (USA JGI)
- FLISA – „flourophor-linked immunosorbent assay”; fluorofór-kötött immunoszorbens
tesztekben
- FTOL - „Fungal Tree of Life (USA JGI)
- G6PD - „glucose-6-phosphate dehydrogenase”; glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
- GC-MS - „gas chromatography - mass spectrometry”; gázkromatográfia - tömegspektrometria
- GDNF - „glial cell line-derived neurotrophic factor”; glia sejtvonala eredetű neurotrofikus
faktor
- GFP - „green fluorescence protein”; zöld fluoreszkáló fehérje
- GMP - „good manufacturing practice”; helyes gyártási gyakorlat
- GPx - „glutathione peroxidase”; glutation peroxidáz
- GRAS - „Generally Recognised as Safe” (USA); általában biztonságosnak ítélt
- GST - „glutathione S-transferase”; glutation S-transzferáz
- HBT - „1-hydroxybenzotriazole”; 1-hidroxi-benzotriazol

HOG - „high osmolarity glycerol”, nagy ozmolaritású glicerin

HTS - „high throughput screening”; nagy áteresztőképességű szűrés (tesztelés)

JGI - „Joint Genome Institute” (USA DOE)

LC-MS - „liquid chromatography - mass spectrometry”; folyadékkromatográfia - tömegspektrometria

LNA - „locked nucleic acid”; zárt (lakolt) nukleinsavak

MALDI-TOF MS - „matrix assisted laser desorption ionisation - time-of-flight mass spectrometry”; lézeres mátrixdeszorpción alapuló ionizáció - repülési idő tömegspektrometria

MAPK - „mitogen-activated protein kinase”; mitogén-aktivált protein kináz

MFC - „microbial fuel cell”; mikrobiális üzemanyagcella

MLST - „multilocus sequence typing”; multilókuszos szekvencia tipizálás

MSB - „menadione sodium bisulfite”; menadion-nátrium-biszulfid

MTBE - „methyl- *tert*-butylether”; metil-*tert*-butil-éter

NSPCs - neural stem/progenitor cells; idegi őse/elődsejtek

OEG - „olfactory ensheathing glia”; szaglóiidegeket burkoló glia

OLA - „oligonucleotide ligation assay”; oligonukleotid ligációs teszt

OXR - „oxidative stress resistance”; oxidatív stressz rezisztencia

PAF - „*Penicillium chrysogenum* antifungal protein”; a *Penicillium chrysogenum* antifungális fehérjéje

PAHs - „polycyclic aromatic hydrocarbons”; policiklikus aromás szénhidrogének

PCBs - „polychlorinated biphenyls”; poliklórozott bifénilek

PCDDs - „polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins”; poliklórozott dibenzo-*p*-dioxinok

PCDFs - „polychlorinated dibenzofurans”; poliklórozott dibenzo-furánok

PMO - „phosphorodiamidate morpholino oligo”; foszforodiamidát-morfolino oligomerek

PNA - „peptide nucleic acid”; peptid-nukleinsav

PPCPs - „pharmaceutical and personal care products”; gyógyszeripari és testápolási termékek

QPS - „Qualified Presumption of Safety” (EU); vélelmezett biztonságos

RD - „regenerative dentistry”; regeneratív fogorvoslás

RDX - „Royal Demolition Explosive”

RIBI - „ribosome biogenesis”, riboszóma biogenezis

- RISA - „ribosomal intergenic spacer analysis”; riboszomális RNS intergénikus szakaszainak analízise
- RM - „regenerative medicine”; regeneratív (helyreállító) orvoslás (medicina)
- ROS - „reactive oxygen species”; reaktív oxigén részecskék (formák)
- RT-PCR - „real-time polymerase chain reaction”; valós idejű polimeráz láncreakció
- SAP - „secreted aspartyl proteinase”; szekretált aszpartil proteináz
- SARS - „severe acute respiratory syndrome”; súlyos akut légzőszervi szindróma
- shRNA - „small hairpin RNA”; kis hajtű RNS-ek
- siRNA - „small interfering RNA”; kis interferáló RNS-ek
- S/MARs - „scaffold/matrix attachment regions”; a kromatin hurkoknak a nukleáris mátrixhoz/scaffoldhoz való kapcsolódási (horgonyozódási) régiói (szekvenciái)
- SMC - „spent mushroom compost”; a gombatermesztés kimerített tápközege (komposztja)
- SNP - „single nucleotide polymorphism”; egyponos nukleotid-polimorfizmus
- STRE - „stress response element”; stresszválasz elem
- t*BOOH - „tert-butyl hydroperoxide”; *tert*-butil-hidroperoxid
- 2,3,7,8-TCDD - „2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin”; 2,3,7,8-tetraklór-dibenzo-*p*-dioxin
- TE - „tissue engineering”; szöveti sebészet vagy szövettechnológia
- TERM - „tissue engineering and regenerative medicine”; szöveti sebészet és regeneratív orvoslás
- TNT - „2,4,6-trinitrotoluene”; 2,4,6-trinitro-toluol
- TOR - „target of rapamycin”, rapamicin célpont
- T-RFLP - „terminal restriction fragment length polymorphism”; terminális restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus
- UCOEs - „ubiquitous (ubiquitously acting) chromatin opening elements”; mindenütt ható kromatint felnyitó elemek
- VEGF - „vascular endothelial growth factor”; vaszkuláris endotélium növekedési faktor
- VOCs - „Volatile Organic Compounds”; illékony szerves vegyületek
- XBP-1 - „X-box binding protein 1”; X-box kötő fehérje 1

1. Bevezető

1.1. A jegyzet megírásának célja

Az élettudományok a világgazdaság forgalmának legalább 30 %-ára vannak hatással, és ez a hatás a jövőben még inkább növekedni fog (Smith, 2009). Így talán már fel sem tűnik, hogy a biotechnológia, amely „a biológiai rendszerek, élő szervezetek, vagy ezek származékainak bármely olyan technológiai alkalmazására kiterjed, ami speciális felhasználásra alkalmas termékek vagy eljárások létrehozására vagy módosítására irányul” („Biotechnology” means any technological application that uses biological systems, living organisms, or derivatives thereof, to make or modify products or processes for specific use.” ;The United Nations Convention on Biological Diversity) mennyire részévé vált a mindennapjainknak. Ráadásul a 21. század elvárásai a biotechnológiával, mint diszciplínával szemben igen komolyak, hiszen diagnosztikumokat és terápiás eszközöket kell biztosítani az emberi, állati és növényi betegségek felismerésére és gyógyítására, esszenciálisan hozzá kell járulnia a világ népességének az élelmezéséhez valamint a kifogyóban lévő fosszilis üzemanyagok pótlásához, továbbá biztosítani kell a környezet megóvásához illetve remediációjához szükséges biotechnológiai eszközöket is. Kétségtelen, hogy mindezeknek a kihívásoknak megfelelni csak a legkorszerűbb molekuláris biológiai eszközök ismeretével és alkalmazásával lehetséges.

A biotechnológia rohamos fejlődése megkívánja mind a képzésben résztvevők, mind a végzett biotechnológus szakemberek ismereteinek a folyamatos frissítését, gyarapítását. Bár ennek természetes és hatékony formája a legújabb eredmények folyamatos nyomon követése, azaz az oktatók és szakemberek önképzése, mindenképpen törekednünk kellene arra is, hogy a legújabb biotechnológiai kutatási eredményeket, fejlesztéseket időnként rendszerezett formában is összefoglaljuk és bemutassuk az érdeklődők számára. Ezen jegyzet megírásával, többek között, kezdeményezni szeretném azt, hogy további hasonló szándékú, a biotechnológia legújabb eredményeinek a bemutatására vállalkozó, magyar nyelvű jegyzetek és könyvek szülessenek.

Külön ki szeretném hangsúlyozni a magyar biotechnológiai szakmai nyelv fejlesztésének a fontosságát, hiszen a jelenleg alapnyelvként funkcionáló angol nyelvben dinamikusan jönnek létre olyan szakmai kifejezések, melyeknek a magyar nyelvre történő szakmailag megfelelő fordítása még nem történt meg. Bár a jegyzetben törekedtem a magyar nyelvű kifejezések használatára, szomorúan vettem észre, hogy sok esetben ezek még nem is léteznek, vagy éppen többféle verzió létezik belőlük. Többször érzékelttem a magyar és angol kifejezések jelentése, felfogása között szakmai különbségeket különösen azokban az esetekben, mikor a kifejezések pontos szakmai tartalma még az angol nyelvben sem rögzült kellően. Meggyőződésem, hogy a magyar terminológia kialakítására, rögzítésére több időt és energiát kell fordítanunk a jövőben, és ehhez talán éppen ezek a szakmai továbbképzést biztosító jegyzetek és könyvek járulhatnak hozzá a leghatékonyabban.

Tekintettel a jegyzet véges tartalmi és terjedelmi lehetőségeire, továbbá a biotechnológia napjainkban zajló rohamos expanziójára, a figyelmemet elsősorban két, hozzám közelálló területre, az „omikai” eszközökkel nyert adatok biotechnológiai felhasználására, továbbá a gombák növekvő biotechnológiai jelentőségére és alkalmazására (Anke, 1997; Rai és Bridge, 2009) fókuszáltam. Emellett a célkitűzéseim között szerepelt az is, hogy átfogó képet nyújtsak az olvasók számára a biotechnológia részterületei közül háromnak, az élelmiszer-biotechnológiának, az orvosi biotechnológiának és a környezet-biotechnológiának a jelenéről és jövőbeni fejlődési lehetőségeiről is.

Meg szeretném még említeni, hogy ez a továbbképzési anyag nagymértékben épít a kollégáimmal 2013-ban elkészített Gyógyszer- és élelmiszer-biotechnológia jegyzetünk (Pócsi és munkatársai, 2013) ismeretanyagára.

1.2. Irodalomjegyzék az 1.1. fejezethez

Anke T. (1997) *Fungal Biotechnolgy*, Chapman & Hall GmbH, Weinheim

Pócsi I., Pusztahelyi T., Emri, T. és Leiter, É. (2013) *Gyógyszer- és élelmiszer-biotechnológia*, Digitális Tankönyvtár, http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011_0025_bio_3/index.html

Rai M. és Bridge P.D. (2009) *Applied Mycology*, CAB International, Oxon

Smith J.E. (2009) *Biotechnology, Fifth Edition*, Cambridge University Press, Cambridge

2. „Omikák” a modern biológiában és biotechnológiában

2.1. „Omikák” – általános áttekintés

2.1.1. Az „omikák”

Az „omikai” alapfogalmakat a 2014-es, „„Omikák” a modern biológiában” című, a hajdúnánási Kőrösi Csoma Sándor Gimnázium, Szakközépiskola, és Szakiskola és Kollégium középiskolában elhangzott „Meet the Scientist” előadásom alapján ismertetem (Pócsi, 2014).

Az előadás a következő web oldalon tekinthető meg teljes terjedelmében:

http://www.meetthescientist.hu/eloadasok/2014_01_29_pocsi.pdf, illetve itt nézhető meg:

<https://www.youtube.com/watch?v=w2mQdQ659VE>.

Az „omikák” definíciójával és jellemzésével kapcsolatban bővebb információt kaphatunk számos web oldalon, például: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Omika>;

https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_omics_topics_in_biology;

<http://www.genomicglossaries.com/content/omes.asp>.

Az „omikák” a biológiai molekulák egy-egy jól definiált csoportjának az együttes strukturális, funkcionális és számszerűsített jellemzését célozzák, és ennek megfelelően az egyes elnevezések meghatározzák a jellemzésbe bevont biomolekulák körét.

Az „omikák” kifejezések az 1990-es évek végétől kezdődően jelentek meg a szakirodalomban. Ilyen például a „genomika”, aminek tárgya az örökítő anyag összessége szekvenciájának a meghatározása, valamint annak szerkezeti és funkcionális tanulmányozása, beleértve a géneket és a nem-kódoló szakaszokat is, a „transzkriptomika”, azaz a DNS-ről átíródó RNS molekulák összességét vizsgáló „omika”, a „proteomika”, aminek tárgykörét a transzláció során képződött összes fehérje és ezek módosított származékai képezik, valamint a „metabolomika”, ami a sejtekben zajló kémiai folyamatok kis molekulatömegű termékeit, más néven a metabolitok összességét kutatja.

Mára a különféle „omikák” robbanásszerű gyarapodása figyelhető meg, aminek egyik oka a kutatott területek, az „omok”, számának a gyarapodása. Ennek magyarázata többrétű. Egyrészt növekszik azon biológiai molekulacsoportok száma, melyek együttes, sejt- vagy organizmus szintű jellemzésére lehetőségünk nyílik, ilyenek például a lipidek („lipidom”, „lipidomika”), a szénhidrátok („glikom”, „glikomika”), illetve a biológiailag aktív peptidek („peptidom”, „peptidomika”). Másrészt mára a kutatások kiterjednek a biológiai molekulák közötti sejtszintű, pl. gén-gén, gén-fehérje, fehérje-fehérje, fehérje-ligandum, kölcsönhatások tanulmányozására is („interaktom”, „interaktomika”). Az „omikák” gyarapodásának további oka az, hogy az egyes szakterületek létrehozzák a saját „omjaikat” és „omikáikat”, amelyekben az kutatási objektumok kijelölése és jellemzése speciális szempontok alapján történik meg, pl. „immunoproteomika”, „farmakogenomika”, „táplálkozás-genomika” („nutrigenomika”), „foodomika”.

Különösen a környezeti és emberi mikrobiom minták jellemzésében váltak mára fontossá a „meta” „omok” és „omikák”, melyek a biológiai molekulákat, így DNS, RNS-ek és fehérjék, már nem sejtszinten, hanem a közösség szintjén elemzik. Ilyenek pl. a „metagenomika”, „metatranszkriptomika”, „metaproteomika”.

2.1.2. Az „omikai” adatgyűjtés eszközei

Az „omikák” kialakulását és fejlődését számos műszaki és informatikai fejlesztés tette/teszi lehetővé (Pócsi, 2014). Ilyenek pl. a „nagy áteresztőképességű”, vagy „új-generációs” nukleinsav (DNS, RNS) szekvenálási módszerek és eszközök („genomika” és „transzkriptomika”). Az RNS szekvenálását, a nukleinsav érzékenysége miatt, általában megelőzi a komplementer DNS-sé (cDNS) történő átírás reverz transzkriptáz segítségével. Ezek a berendezések párhuzamosan igen sok DNS szakaszt képesek szekvenálni, ez adja a nagy áteresztőképesség magyarázatát. Az új generációs szekvenálási eljárások elvi alapjáról (pl. piroszekvenálás, továbbá szintézissel történő, ligálás alapú, félvezető alapú és egymolekulás valósídejű szekvenálások) és teljesítőképességéről, valamint a legelterjedtebb berendezésekről számos összefoglaló közlemény ad megfelelő áttekintést az érdeklődő olvasó számára (Koboldt és munkatársai, 2012; Liu és munkatársai, 2012; Quail és munkatársai, 2012; Aguilar-Pontes és munkatársai, 2014).

A transzkriptomika egyik alapeszköze az RNS szekvenálás mellett a teljes genomi DNS chippek alkalmazása. Ezek a DNS chippek gyakran 60-60 nukleotidból álló, kémiai szintetizált próbákat tartalmaznak, amelyek a gének RNS átíratai mennyiségének a meghatározására szolgálnak. Ezekben a transzkriptom analízisekben az RNS izolálása, tisztítása, tisztaságának ellenőrzése, cDNS-sé, majd (cDNS-ről) cRNS-sé (komplementer RNS-sé) történő átírása és jelzése, a cRNS fragmentálása, DNS chipre történő hibridizációja, és leolvasást követően az adatok elemzése történik (Bumgarner, 2013; Emri és munkatársai, 2015; Jaksik és munkatársai, 2015).

A proteomikai elemzéseket a fehérje elválasztási (2D protein elektroforézis) és analitikai eszközök (fehérje-tömegspektrometria) fejlődése tették lehetővé. Általánosságban a fehérjék elválasztása 2D SDS PAGE segítségével történik, majd denzitometrálással hasonlítjuk össze a fehérje pöttyök intenzitását. Ezt követően a szignifikánsan megváltozott fehérje mennyiséget tartalmazó pöttyöket kivágjuk, proteázzal, pl. tripszinnel emésztjük, majd MALDI-TOF MS (lézeres mátrixdeszorpción alapuló ionizáció - repülési idő tömegspektrometria; „matrix assisted laser desorption ionisation - time-of-flight mass spectrometry”) analízisnek vetjük alá. A peptid fragmentumok pontos molekulatömegének a meghatározása (peptidtömeg-ujjlenyomat) után kerülhet sor a fehérjék azonosítására (Aebersold és Mann, 2003).

A kémiai analitikai (pl. GC-MS, LC-MS) és szerkezetvizsgálati (pl. NMR) eszközök látványos fejlődésének köszönhetjük, hogy egy adott időpillanatban információt gyűjthetünk egy sejtkultúrában, vagy akár egy organizmusban jelenlévő metabolitok összességéről. Ezek a fejlesztések tették lehetővé a metabolomikai adatgyűjtést (Mashego és munkatársai, 2007).

2.1.3. Az „omikai” adatok feldolgozása, prezentációja

A bioinformatikai módszerek és eszközök dinamikus fejlődése teszi lehetővé a rendkívüli nagyságú „omikai” adatmennyiségek összegyűjtését, rendszerezését és *in silico* analízisét (Pócsi, 2014). A folyamat végeredményeként nagy információgazdagságú, a szakemberek számára könnyen használható adatbázisok jönnek létre, lásd pl. Karányi és munkatársai, (2013) munkáját.

2.1.4. A rendszerbiológia kutatási területe, eszközei

Az „omikai” adatok gyűjtése, komplex kiértékelése tette lehetővé a rendszerbiológiai szemlélet kialakulását és dinamikus terjedését a biológián és orvostudományon belül. Mint a tudományterület neve is jelzi, a rendszerbiológia a biológiai rendszerek (sejtek, szövetek, szervezetek) összetevői között megfigyelhető komplex interakciókat vizsgálja. Konkrétan azt, hogy miképpen magyarázható ezen interakciókkal a rendszer viselkedése, tulajdonságai és funkciói. A rendszerbiológia eszközei között kiemelkedik a modellezés, az integratív szemlélet- és gondolkodásmód, továbbá a rendszerek dinamikájának a tanulmányozása. A definíciónak megfelelően a rendszerbiológia tárgykörébe tartoznak például a metabolikus modellek szerkesztése és más biológiai hálózatok, pl. szignalizációs útvonalak és ezek hálózatainak a modellezése. Bővebb definíció és jellemzés elérhető ezen a web oldalon: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Rendszerbiol%C3%B3gia>

Jelenlegi ismereteink szerint a rendszerbiológiai kutatások szemléletváltáshoz vezethetnek az orvosi biotechnológia (4. fejezet) több területén, sőt a rendszerbiológiai szemléletű orvoslás (2.1.5. fejezet) jelentős fejlődéséhez és elterjedéséhez is előmozdítják.

2.1.5. Rendszerbiológiai szemléletű orvoslás

Az emberi sejtek, szövetek, sőt szervek metabolikus modelljeinek a létrehozása részben már megtörtént, illetve éppen folyamatban van (Mardinoglu és Nielsen, 2012). Például elkészültek a hepatociták (mind normál, mind rákos sejtek) (Agren és munkatársai, 2014; Mardinoglu és munkatársai, 2014) és adipociták (Mardinoglu és munkatársai, 2013) genomi szintű metabolikus modelljei („genome-scale metabolic models”; „GEMs”), és ezeknek az eredményeknek a hasznosítása megkezdődött a rákkutatásban, illetve az elhízás megértésében. Hasonló modellek kidolgozása lényegében minden emberi sejt- és szövettípusra folyamatban van, sőt sok esetben befejezés előtt áll.

A rákos sejtek metabolikus modelljei már ma kitüntetett szerepet kapnak új típusú rákellenes szerek kifejlesztésében (Agren és munkatársai, 2012, 2014; Ghaffari és munkatársai, 2015). A jövőben pedig várható a metabolikus modellek integrálása más biológiai hálózat modellekkel,

ami elősegítheti az átfogó sejt- és szövetmodellek elkészítését, majd ezek felhasználását a teljes test funkciók szimulálására (Mardinoglu és Nielsen, 2015). Ezek az új eredmények és szemlélet forradalmasíthatják az új terápiák kifejlesztését és elősegíthetik a személyre szabott orvoslás kialakulását és elterjedését (Mardinoglu és Nielsen, 2012, 2015).

2.1.6. Az emberi mikrobiom integrálása az ember rendszerbiológiájába

Az elmúlt évek kutatási eredményei nyomán lehetőség nyílik elsősorban az emberi bélrendszeri baktériumok és az ember metabolikus rendszerei összekapcsolódásának a felderítésére. Ezek a kutatások számos metabolikus betegség, pl. érelmeszesedés (Karlsson és munkatársai, 2012) és cukorbetegség (Karlsson és munkatársai, 2013a, 2013b) mélyebb megértéséhez járulhatnak hozzá (lásd még a 3.1.2.2. fejezetet). Az emberi mikrobiom elemzése már sok esetben elvezetett az emberi agyagcsere szempontjából is fontos gének, géncsoportok azonosításához, ezek jelentőségének a felderítéséhez. Például, Karlsson és munkatársai (2012) az érelmeszesedéssel együtt járó metagenomi változásokat tanulmányozta a bélrendszerben, és megállapították, hogy az egészséges emberekre jellemző *Roseburia* és *Eubacterium* domináns fajokat *Collinsella* fajok váltották fel, miközben drámai változást észleltek a metagenomi génkészletben, benne szignifikánsan redukált fitoén dehidrogenáz génmennyiséggel. Látványos következményként szignifikánsan kisebb β -karotén antioxidáns koncentrációkat mértek a betegek vérérumában, ami összefüggésbe hozható az atherosclerosis patogenezisével (Karlsson és munkatársai, 2012).

A jegyzet célkitűzésinek megfelelően az egyes élőhelyeken megfigyelhető gombák összességének, azaz a „mikrobiomok”-nak a kutatásával kapcsolatos eredményeket külön fejezetben (2.2. fejezet) mutatom be.

Az „omikai” eszközöknek és adatoknak az élelmiszer-biotechnológiában (3.1.3.1. fejezet), a mikotoxinokkal kapcsolatos kutatásokban (3.2.13. fejezet), az emberi gombák evolúciobiológiájában (4.2. fejezet), új gombaellenes szerek támadáspontjainak a kijelölésében (4.2.15. és 4.2.16. fejezetek), valamint a jövő nehézfém-toleráns gombáinak a megalkotásában (5.3.8. fejezet) való felhasználásáról a zárójelekben feltüntetett fejezetekben található bővebb információ.

2.1.7. Irodalomjegyzék a 2.1. fejezethez

- Aebersold R. és Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.
- Agren R. és munkatársai (2012) Reconstruction of genome-scale active metabolic networks for 69 human cell types and 16 cancer types using INIT. *PLoS Comput. Biol.* **8**, cikkazonosító: e1002518
- Agren R. és munkatársai (2014) Identification of anticancer drugs for hepatocellular carcinoma through personalized genome-scale metabolic modeling. *Mol. Syst. Biol.* **10**, cikkazonosító: 721
- Aguilar-Pontes M.V., de Vries R.P. és Zhou M. (2014) (Post-)genomics approaches in fungal research. *Brief. Funct. Genomics.* **13**, 424-439.
- Bumgarner R. (2013) Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 22**, Unit 22.1.
- Emri T és munkatársai (2015) Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* **16**, cikkazonosító: 478
- Ghaffari P. és munkatársai (2015) Identifying anti-growth factors for human cancer cell lines through genome-scale metabolic modeling. *Sci. Rep.* **5**, cikkazonosító: 8183
- Jaksik R. és munkatársai (2015) Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol. Direct* **10**, cikkazonosító: 46.
- Karányi Z. és munkatársai (2013) FSRD: fungal stress response database. *Database (Oxford)* **2013**, cikkazonosító: bat037
- Karlsson F.H. és munkatársai (2012) Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat. Commun.* **3**, cikkazonosító: 1245
- Karlsson F.H. és munkatársai (2013a) Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* **498**, 99-103.
- Karlsson F. és munkatársai (2013b) Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* **62**, 3341-3349.
- Koboldt D.C. és munkatársai (2012) Massively parallel sequencing approaches for characterization of structural variation. *Methods Mol. Biol.* **838**, 369-384.
- Liu L. és munkatársai (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, cikkazonosító: 251364
- Mardinoglu A. és Nielsen J. (2012) Systems medicine and metabolic modelling. *J. Intern. Med.* **271**, 142-154.
- Mardinoglu A. és munkatársai (2013) Integration of clinical data with a genome-scale metabolic model of the human adipocyte. *Mol. Syst. Biol.* **9**, cikkazonosító: 649



Mardinoglu A. és munkatársai (2014) Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat. Commun.* **5**, cikkazonosító: 3083

Mardinoglu A. és Nielsen J. (2015) New paradigms for metabolic modeling of human cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **34C**, 91-97.

Mashego M.R. (2007) Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1-16.

Pócsi I. (2014) „Omikák” a modern biológiában. „Meet the Scientist” előadás, Hajdúnánás, http://www.meetthescientist.hu/eloadasok/2014_01_29_pocsi.pdf;
<https://www.youtube.com/watch?v=w2mQdQ659VE>

Quail M.A. és munkatársai (2012) A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* **13**, cikkazonosító: 341

2.2. Gombák a genomikai és metagenomikai kutatásokban

2.2.1. A gomba genomikai kutatások céljai, várható eredményei

Mára nagyszámú gombafaj teljes genomjának a szekvenálását végezték el, és napjainkban is gombafajok százainak a genomját szekvenálják. Ezek közül kiemelkedik az US Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute (JGI) Fungal Genome Program (FGP); <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>; Grigorjev és munkatársai, 2011; Martin és munkatársai, 2011), aminek hármas célkitűzése van Grigorjev és munkatársai (2011) alapján:

1. A növényi alapanyagok („feedstock”) kártevők elleni védelme, beleértve a növény-gomba szimbiózisokat, a növénykórokozó gombákat és az ellenük való biológiai védekezés lehetőségeit is.
2. A biofinomítók („biorefinery”) hatékonyságának a növelése, elsősorban a lignocellulóz lebontásának, a cukrok fermentációs lehetőségeinek és az ipari mikroorganizmusok működésének a jobb megértése révén.
3. A gombadiverzitás és -törzsfajlás jobb megértése.

2.2.2. A növényi alapanyagok („feedstock”) termelésének a biztosítása - mikorrhizák

A növényi alapanyagok termelése szempontjából kritikus a növény-gomba szimbiózisok, mindenekelőtt a rhizoszféra növény-gomba-baktérium hármas rendszerének (2.2.3. és 3.3.20. fejezetek) a feltárása és működésének a megértése (Grigorjev és munkatársai, 2011). Számos ekto- és endoszimbionta gomba szekvenálása megtörtént, illetve van éppen folyamatban. A szimbiózis mélyebb megértését nehezíti, hogy ez a típusú szimbiózis több hullámban alakult ki az evolúció során. Ezért nehéz a szimbiózis-specifikus gének csoportját elkülöníteni. Általában megfigyelhető bizonyos fokú redukció a sejtfal alkotókat, pl. cellulózt, bontó enzimek számában, de gyakorlatilag a gomba genomok gyors evolúciója (duplikációk, neofunkcionalizációk révén) teszik lehetővé a növényekkel való mikorrhiza kapcsolat újabb és újabb evolúciós hullámban történő kialakulását.

A mikorrhiza-képző gombák genomjának a szekvenálása segít minket annak a kérdésnek a megválaszolásában, hogy a gomba-növény szimbiózis révén miképpen vált lehetségessé a szárazföld meghódítása az élet számára, illetve miképpen alakultak ki, illetve hogyan változnak a szárazföldi ökoszisztémák. A rhizoszféra kutatásban újabban előtérbe kerültek a metagenomikai, sőt metatranszkriptomikai és metaproteomikai módszerek is.

2.2.3. Növények, mikorrhiza-képző gombák és szimbióta baktériumok

A mikorrhizák valójában három résztvevős, növény-gomba-baktérium, szimbiózisok lehetnek (Bonfante és Anca, 2009; 3.3.20. és 5.3.1. fejezetek). A gomba-baktérium kapcsolatok széles skálán mozoghatnak a lazán asszociált baktériumoktól az igazi endoszimbiótáig. A hármas együttélés résztvevői biológiailag aktív anyagokkal, köztük illékony szerves molekulákkal (lásd a 3.3. fejezetet) kommunikálnak. A megfigyelések szerint ez a komplex együttélés pozitívan hat a növényi biomassza produkcóra, ráadásul a mikorrhiza-képző gombák endoszimbionta baktériumai nagyon fontosak a gomba partnerek pre-szimbiotikus fejlődésében. Ezen túlmenően, a baktérium partnerek stimulálják magát az ektomikorrhiza képzést („Mycorrhiza Helper Bacteria”, „MHB”), a növény fejlődését, biomassza produkcióját, stressztűrését is, pl. az etiléntermelés modulálásán keresztül (Bonfante és Anca, 2009).

2.2.4. Növények, rejtőzködő gombák, endofitonok

Az endofiton gombák a növényekben élnek anélkül, hogy bármiféle tünetet okoznának (Porrás-Alfaro és Bayman, 2011), ezért a növényi mikrobióta nagyon fontos részét alkotják. Ezek a gombák kölcsönhatásban vannak a mikorrhiza-képzőkkel, patogénekkel, epifitonokkal és szaprotrófokkal, egyes funkcióik átfednek ezekéivel. Egyes endofitonok befolyásolják a növény növekedését, a növény patogén gombákkal, növényevő állatokkal és környezeti hatásokkal, pl. stresszel szembeni válaszait. Az endofiton gombák funkciója változhat az életciklusuk alatt, illetve a gazdaszervezet és a környezet változó hatásai függvényeként.

A jelenlegi növényi szimbiotikus mikrobiom (benne a mikrobiom) vizsgálatok a szimbiózisban lévő mikrobiális konzorcium minden tagjára, így természetesen az endofitonokra is, az összes génre, továbbá a metabolikus kapacitások összességére kiterjednek!

Az endofitonok diverzitása nagy (Porras-Alfaro és Bayman, 2011). Egyetlen trópusi növény levélben például 90 endofiton faj is jelen lehet, és egy száraz füves területen élő faj gyökérszövetében akár 50 endofiton gombafaj is kimutatható. A leveleken a kolonizáció foka az éghajlati övtől függ, legkisebb az arktikus-boreális (<1 % - 41 %) és legnagyobb (90 %) a trópusi ökoszisztémákban. A trópusokon a levelekben, a mérsékelt égövön pedig a gyökerekben élő endofitonok diverzitása a nagyobb.

Az endofitonok biotechnológiai szempontból jelentősek lehetnek a következő területeken: (i) A patogén gombák és kártevő rovarok elleni biológiai védekezési technológiák fejlesztésében. (ii) Új típusú szekunder metabolitok felfedezése és kiaknázása. (iii) Fitoremediációs technológiák fejlesztése, hatékonyabbá tétele. (iv) A klímaváltozás káros hatásainak a kivédése gazdaságilag fontos növényekben (Porras-Alfaro és Bayman, 2011).

2.2.5. Növényi alapanyagok („feedstock”) termelésének a biztosítása – növényi kórokozók, biológiai védekezés

A növénypatogén gombák genomjának a szekvenálása és elemzése kiemelkedően fontos a növényvédelem szempontjából (Grigorjev és munkatársai, 2011). A kukorica déli levélfoltosság, amit a T toxint termelő *Cochliobolus heterostrophus* okoz, az 1970-es években tönkretette éves szinten az USA kukorica termésének a 15 %-át! Bár az energianövények, pl. az energianád, *Miscanthus giganteus*, relatíve kevés kártevővel bír, de a kialakuló monokultúrás termesztési technológiák várhatóan felgyorsítják a gombakártevők evolúcióját, ahogyan ez történt/történik például a termesztett búza (*Mycosphaerella graminicola*, a szeptóriás levélfoltosság kórokozója; kb. 10500 éve alakult ki) és árpa (*Rhynchosporium secalis*, rinhospóriumos levélfoltosságot okoz, kb. 2500-5000 éve alakult csak ki) kártevők esetében is. Érdeemes megjegyeznünk, hogy a monokultúrás gazdálkodás a talaj mikrobiomjának a megváltozása következtében egyes növényi kártevők szaporodását korlátozhatja is. Ilyen pl. a búza torsgomba betegsége, amit a *Gaeumannomyces graminis*

okoz, a visszaesése monokultúrás termesztés esetén („take-all decline”; Bakker és munkatársai, 2013). Napjainkban a hagyományos növényvédőszeres környezetre gyakorolt káros hatása miatt kiemelt jelentőségű azoknak a mikoparazita, rovarpatogén és nematóda patogén gombák genomjának a szekvenálása és ezek elemzése, amelyek a jövőben biokontroll technológiákban kerülhetnek felhasználásra (Grigorjev és munkatársai, 2011).

2.2.6. Biofinomítási („biorefinery”) technológiák

A biofinomítás a komplex poliszacharidok egyszerű cukrokká történő lebontását és, ezt követően, bioüzemanyagokká történő átalakítását jelenti (Grigorjev és munkatársai, 2011; lásd még az 5.1.2. fejezetet). A gombákkal kapcsolatos jelenlegi főbb innovációs tevékenységek ezen a területen a következők:

1. Az élesztők stressztűrésének továbbá poliszacharid-lebontó és pentózfermentáló képességének a javítása/kialakítása. Ezt elősegítendő nagyszámú xilózt, arabinózt fermentáló, továbbá keményítőt és kazeint lebontó, valamint ecetsavat és sótoleráló élesztő genomi szekvenciáját határozták már meg. Továbbá folyik az „omikai” eszközökkel megszerzett információk alapján a *Saccharomyces cerevisiae* géntechnológiai átalakítása.
2. Nagyszámú barna és fehér korhasztó gomba genomjának a szekvenálása történt meg, illetve van folyamatban a lignin- és cellulóz-lebontás mechanizmusának és enzimmészletének a felderítése érdekében.
3. A gombák számos metabolitot, pl. zsírokat és olajokat, poliketideket, terpéneket és izoprenoidokat, sőt bizonyos esetekben kész alkánokat és alkéneket állítanak elő, ami a gombákkal történő szénhidrogén-gyártás szempontjából kitüntetett jelentőségű lehet. Pl. *Hormoconis resinae* (*Cladosporium resinae*) C₇-C₃₆ alkánokat termel. A genomikai kutatások célja a szénhidrogén termeléshez és túltermeléshez szükséges információk megszerzése. (Bővebb információk találhatóak a 3.3., ezen belül pedig a 3.3.7. fejezetben.)
4. Kiemelt fontosságú terület az ipari gombatorzsek genomjának újraszekvenálása; ezzel azonosíthatók az egy-egy adott termék sikeres és rentábilis előállításához szükséges genomi szintű változások.
5. A kutatások célja új típusú enzimek felfedezése is. Az ipar a különféle technológiai folyamatokhoz újabb és újabb tulajdonságokkal felruházott biokatalizátorokat igényel.

6. Extremofil élőlények, köztük gombák, genomjának tanulmányozása új vegyületek (az új kémiai szerkezetek fontosságával kapcsolatban lásd a 3.2.21. fejezetet) és enzimek felfedezéséhez, továbbá az abiotikus stresszhatásokkal szembeni védelmi rendszerek összetevőinek és ezek szabályozásának (bővebb, főleg a mikotoxintermeléssel kapcsolatos, információk találhatóak a 3.2. fejezetben) a jobb megértéséhez segíthetnek minket hozzá.

Az eddigi kutatásokban külön figyelmet vívtak ki a termofil gombák, pl. *Thermomyces lanuginosus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thielavia terrestris*, *Myceliophthora thermophila*, *Rhizomucor miehei* és *Rhizomucor pusillus*, melyek a genomját megszekvenálták (Berka és munkatársai, 2012; Morgenstern és munkatársai, 2012; Zhou és munkatársai, 2014).

Napjainkban a kutatás folyik további termofil gombák után.

Külön szekvenálási projektek célozzák a pszichrofil (pl. *Sclerotinia boleari*), acidofil, alkalofil (pl. *Acremonium alcalophilum*), halofil (pl. *Eurotium herbariorum*), továbbá a sugárzásoknak ellenálló gombákat (Grigorjev és munkatársai, 2011). Talán nem meglepő módon nagyszámú gombafajt izoláltak a csernobili atomerőműben és környékén a nukleáris katasztrófát követően, pl. *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum* és *Paecilomyces lilacinus* fajokat (Dadachova és Casadevall, 2008).

2.2.7. A gombák evolúciójának a tanulmányozása, a gombák filogenetikai rendszere, az 1000 gomba projekt

A gombák kialakulása és a legősibb gombacsoportok rendszertani helye bizonytalan. Ezen kérdések megválaszolását célozza a JGI FTOL („Fungal Tree of Life”; <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>; Grigorjev és munkatársai, 2011; Martin és munkatársai, 2011) projekt.

A kiterjedt genomszekvenálások nyomán már jelentős rendszertani átrendezések történtek az ősi gombák csoportjaiban; pl. a Chytridiomycota phylumról leválasztották az új Blastocladiomycota és Neocallimastigomycota törzseket (Hibbett és munkatársai, 2007). Emellett megszűnt a Zygomycota törzs, a helyét a Glomeromycota törzs és négy „*incertae sedis*” altörzs, mégpedig a Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina és

a Zoopagomycotina vette át (Hibbett és munkatársai, 2007). Legújabb fejleményként pedig a Cryptomycota és Microsporidia törzsek várhatóan a Fungi regnumba kerülnek végleg besorolásra (James és munkatársai, 2013).

2.2.8. Gomba másodlagos anyagcsere – a biokémiától a genomikáig

Az újonnan szekvenált genomok elemzésekor kiemelt cél a szekunder metabolit génklaszterek felderítése (Keller és munkatársai, 2005; lásd még a 3.2.21. fejezetet). Ennek keretében először a fő bioszintetikus enzim azonosítására kerül sor, ezek lehetnek poliketid szintáz, nem-riboszomális peptid szintetáz, dimetilallil-triptofán szintetáz. A bioszintetikus gének klaszteres szerveződése és közös szabályozása megkönnyíti a klaszter elemeinek és helyi szabályozó faktorainak az azonosítását, de ez még a termék pontos kémiai szerkezetére vonatkozóan nem ad információt. Igen sok az „alvó” klaszter, amelyek felébresztése gyakran csak speciális tenyésztési körülmények között, illetve bizonyos, génszintű szabályozásban sérült mutánsok segítségével lehetséges. Tekintettel a gyógyszeripar égető igényét originális és biológiailag aktív kémiai szerkezetekre, a szekunder metabolit génklaszterek térképezése és funkcionális analízise jövedelmező tevékenység lesz a jövőben is (lásd még a 3.2.21. fejezetet).

2.2.9. Gomba metagenomika – a biofilmek összetételének tanulmányozása

A természetben, de a háztartásban is, sok helyütt alakul ki a tárgyak felszínén változatos összetételű, gombákat is tartalmazó, mikrobák alkotta élő bevonat, azaz biofilm. Ezek összetételének a felderítése kiemelkedő ökológiai, technológiai és biomedikai jelentőséggel bír, hiszen célunk ezen biofilmek képződésének a gátlása, vagy éppen elősegítése (lásd még a 4.3.6. fejezetet). Különös jelentőséggel bír annak a felderítése, hogy ezek a bevonatok tartalmaznak-e az emberi egészségre ártalmas kórokozókat. A biofilmek összetételét ma már metagenomikai vizsgálatokkal relatíve könnyen meg tudjuk állapítani. Erre szép, tanulságos példa a közelmúltból a mindenki által ismert, a vízcsap kifolyó részén megjelenő, feltűnő feketepenesz filmréteg összetételének meghatározása (Heinrichs és munkatársai, 2013a, 2013b).

A vízcsap környéki feketepénész metagenomi vizsgálatának a főbb eredményei a következők voltak (Heinrichs és munkatársai, 2013a, 2013b): (i) A biofilmek domináns összetevője a legtöbb esetben az ascomycota (Eurotiomycetes osztály) *Exophiala lecanii-corni*. (ii) A biofilmekben megjelenő gombák az egészségre nem jelentenek jelentős kockázatot. (iii) A megfigyelt gombák nem az ivóvíz-rendszerből érkeznek, hanem a csap környezetéből kolonizálhatnak. (iv) A gombák illékony szerves anyagokat (légfrissítők, illatszerek) jól hasznosítanak a biomasszájuk gyarapításához!

2.2.10. Gomba metagenomika - az emberi mikrobiom

Az elmúlt évek különösen jelentős fejleménye, hogy a rendelkezésünkre álló eszközökkel lehetővé vált az emberi mikrobiom és benne a mikrobiom vizsgálata (Rizzetto és munkatársai, 2014; Romani és munkatársai, 2015). Az emberi székletben például 66 gombafajt sikerült kimutatni, döntően *Saccharomyces* és *Candida* fajokat, de vannak *Cryptococcus*, *Penicillium* és *Pneumocystis* fajok is (Chen és munkatársai, 2011; Dollive és munkatársai, 2012; Hoffmann és munkatársai, 2013). Egér modellben pedig a vékonybél nyálkahártyán 14 gombanemzetség egyedeit azonosították (Scupham és munkatársai, 2006). Mára meghatározásra került az egészséges ember tüdő, szájüregi és bőr mikrobiomja is (Rizzetto és munkatársai, 2014; Romani és munkatársai, 2015), és a megfigyelések szerint az emberi mikrobiom diszregulációja súlyos betegségekben, pl. cisztás fibrózis, gyulladásos bélbetegség, krónikus májbetegség, atópiás dermatitisz és krónikus nyálkahártya candidiázis (Rizzetto és munkatársai, 2014; Romani és munkatársai, 2015) tetten érhető. Említést érdemel még, hogy jelentősek a gomba-baktérium kölcsönhatások is az emberi szervezetben is, pl. biofilmekben, továbbá a mikrobiom gombái az immunrendszer alkotóival is állandó, dinamikus kölcsönhatásban vannak (Rizzetto és munkatársai, 2014; Romani és munkatársai, 2015).

2.2.11. A gombákkal szembeni immunválasz

A gombák elleni immunválaszban mind a veleszületett, mind a szerzett immunitás elemei (Dranoff, 2004) fontos szerepet játszanak. Az immunrendszerünk egyensúlyt tart a gombák toleranciája és patogénekként való kezelésük között, és ezek a folyamatok gomba-, és testtáj-függők (Rizzetto és munkatársai, 2014).

A mikrobiom és az immunrendszer sejtjei között folyamatos a párbeszéd, és ebben kritikus elemek az immunrendszer oldaláról a következő sejtípusok (Rizzetto és munkatársai, 2014): tüdő: dendritikus sejtek; bélrendszer: Peyer plakkok sejtjei, M-sejtek, makrofágok, dendritikus sejtek; bőr: Langerhans sejtek, $\gamma\delta$ T-sejtek és T regionális memóriasejtek.

A gombák felismerése mintázatfelismerő receptorokkal („pattern recognition receptor”; „PRR”) történik (Rizzetto és munkatársai, 2014; Romani és munkatársai, 2015). Az immunrendszer aktiválásban a dendritikus sejtek játszanak jelentős szerepet a $T_{naïve} \rightarrow T_h$ differenciálódás elősegítése révén. A gombafertőzések leküzdésében monociták, makrofágok, neutrofilok továbbá az epitélium és endotélium sejtjei vesznek részt. A kórokozó hatékony eliminálásához a veleszületett és szerzett immunitás elemeinek az együttműködése szükséges, például a neutrofilok aktiválása a Th1 limfociták által termelt IFN- γ -nal (γ -interferonnal). IFN- γ KO egér nagyon érzékeny szisztémás kandidiázisra. A Th17 sejtek (interleukin 17-et, azaz IL-17-et termelnek) kitüntetett szerepet játszanak számos gombafertőzés, pl. kandidiázis és aszpergillózis, elleni küzdelemben. A Th1/Th2 és Th17 válaszok egymást gyengíthetik is, pl. a Th17 aktiválás gyengíti a IFN- γ -függő neutrofil választ, ami a patogének eliminálását (a „clearance”-t) lassíthatja.

A kommenzalista gombáinkat az egészséges összetételű mikrobiom, az epitélium által szekretált antimikrobiális peptidek (lásd a 4.3.12. fejezetet is) és a lokális veleszületett immunrendszeri elemek kontrollálják (Rizzetto és munkatársai, 2014). A szervezetünk megtanulta „kezelni” a kommenzalista állapotot és a regulatórikus Treg sejtek meggátolják a szükségtelen és veszélyes immunválaszt. Allergia esetén megfigyelhető, hogy a memória TEM („effector memory T lymphocytes”) sejtek száma patológiásan nagy a szervezetben.

A dendritikus sejtek inflammatórikus, illetve anti-inflammatórikus állapotát befolyásolja az indolamin-2,3-dioxigenáz függő Trp katabolikus, úgynevezett kinurenin, útvonal, amely nyomán az aril-hidrokarbon receptor (AhR) aktiváláson át a Treg sejtek fejlődése serkentődik ugyanakkor gátlódnak a Th17 sejtek (Romani és munkatársai, 2015). Ezzel párhuzamosan az ILC3 („innate lymphoid type 3 cells”) sejtek IL-22 termelése fokozódik, ami első helyen felelős az epitélium gombák elleni védelméért. Az AhR szubsztrát szinteket a mikrobiom

tagjai aktívan modulálják. Azaz az immunrendszer és a mikrobiom, benne a mikrobiom között párbeszéd folyamatos, és az ebben szerepet játszó metabolitok felderítése tovább folyik (Rizzetto és munkatársai, 2014). Új fejlemény a *Candida albicans* immunmodulátor, pl. oxilipin, termelésének a kimutatása.

Nagyon fontos, hogy a tápcsatorna *Saccharomyces* fajai képesek az immunrendszer patogén élesztők elleni trenírozására (Rizzetto és munkatársai, 2014). Ugyanakkor megfigyelték, hogy maga a *Candida albicans* is képes az immunrendszert baktériumok elleni küzdelemre felkészíteni. Ezért is fontos, hogy az újszülöttek környezetük mikrobáival való korai találkozását ne korlátozzuk minden áron. (A kommenzalisták immunmodulátor szerepének „higiénia hipotézise”). (Lásd még a 3.1.2.2. fejezetet.)

Ami a bőr normál mikrobiomját illeti, a *Malassezia* fajok 11 testtájon, pl. a karon dominánsak, ugyanakkor a lábon jelentős diverzitás észlelhető, ahol főképpen *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* és *Candida* fajok figyelhetők meg (Findley és munkatársai, 2013, Rizzetto és munkatársai, 2014).

A szájüreg mikrobiomja számos gombafajt tartalmaz, például *Candida* (75 %-ban az embereknek), *Cladosporium* (65 %), *Aureobasidium* (50 %), *Saccharomycetales* (50 %), *Aspergillus* (35 %), *Fusarium* (30 %) és *Cryptococcus* (20 %) fajokat (Ghannoum és munkatársai, 2010; Rizzetto és munkatársai, 2014).

Napjainkban kiemelt kutatási kihívása, miként lehet a károsodott emberi mikrobiomot helyreállítani. Ebben például a funkcionális élelmiszereknek (lásd a 3.1. élelmiszer-biotechnológiai fejezet releváns alfejezeteit) kiemelkedő jelentőségük lehet.

2.2.12. Irodalomjegyzék a 2.2. fejezethez

Bakker P.A. és munkatársai (2013) Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. *Plant Pathol. J.* **29**, 136-143.

Berka R.M. és munkatársai (2012) Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat. Biotechnol.* **29**, 922-927.

- Bonfante P. és Anca I.A. (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 363-383.
- Chen Y. és munkatársai (2011) Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**, 492-498.
- Dadachova E. és Casadevall A. (2008) Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 525-531.
- Dollive S. és munkatársai (2012) A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. *Genome Biol.* **13**, cikkazonosító: R60
- Dranoff G. (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11-22.
- Findley K. és munkatársai (2013) Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* **498**, 367-370.
- Ghannoum M.A. és munkatársai (2010) Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* **6**, cikkazonosító: e1000713
- Grigorjev I.V. és munkatársai (2011) Fueling the future with fungal genomics. *Mycology* **2**, 192-209.
- Hoffmann C. és munkatársai (2013) Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* **8**, cikkazonosító: e66019
- Heinrichs G. és munkatársai (2013a) Analysis of black fungal biofilms occurring at domestic water taps. I: compositional analysis using Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing. *Mycopathologia* **175**, 387-397.
- Heinrichs G. és munkatársai (2013b) Analysis of black fungal biofilms occurring at domestic water taps. II: potential routes of entry. *Mycopathologia* **175**, 399-412.
- Hibbett D.S. és munkatársai (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111**, 509-547.
- James T.Y. és munkatársai (2013) Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and microsporidia. *Curr. Biol.* **23**, 1548-1553.
- Keller N.P., Turner G. and Bennett J.W. (2005) Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937-947.
- Martin F. és munkatársai (2011) Sequencing the fungal tree of life. *New Phytol.* **190**, 818-821.
- Morgenstern I. (2012) A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biol.* **116**, 489-502.
- Porras-Alfaro A. és Bayman P. (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**, 291-315.
- Rizzetto L. és munkatársai (2014) Richness and diversity of mammalian fungal communities shape innate and adaptive immunity in health and disease. *Eur. J. Immunol.* **44**, 3166-3181.



Romani L. és munkatársai (2015) The cross-talk between opportunistic fungi and the mammalian host via microbiota's metabolism. *Semin. Immunopathol.* **37**, 3192-3120.

Scupham A.J. és munkatársai (2006) Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 793-801.

Zhou P. és munkatársai (2014) Genome sequence and transcriptome analyses of the thermophilic zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *BMC Genomics* **15**, cikkazonosító: 294

3. Az élelmiszer-biotechnológia legújabb eredményei

3.1. Az élelmiszer-biotechnológia tárgya, jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái

3.1.1. Az élelmiszer-biotechnológia tárgya

Az élelmiszer-biotechnológia az élelmiszerek hagyományos és korszerű (molekuláris) biotechnológiai eszközökkel való előállítását és feldolgozását jelenti. Természetesen ma már, mint ahogyan a biotechnológia többi területén sem, így az élelmiszer-biotechnológia területén sem választhatók el a „hagyományos” és „új” biotechnológiai eszközök és eljárások alkalmazása egy-egy termék előállításakor. A felhasznált biotechnológiai eszközök skálája igen széles, a hagyományos fermentációktól kiindulva a legkorszerűbb géntechnológiai („genetic engineering”), fehérjeteknológiai („protein engineering”) és metabolit technológiai („metabolic engineering”) ismeretek felhasználásáig terjed. Az élelmiszer-biotechnológiai ismeretek és tevékenységek mesterképzés szintű összefoglalása megtalálható a Digitális Tankönyvtárban Pócsi és munkatársai (2013) *Gyógyszer- és élelmiszer-biotechnológia* című tankönyvében

(http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011_0025_bio_3/index.html).

3.1.2. Az élelmiszer-biotechnológia jelene

Korunk élelmiszer-biotechnológiájának számos kihívásnak kell egyidejűleg megfelelnie. A legfontosabb feladat az emberiség megfelelő fehérje- és kalóriaigényének a biztosítása, ugyanakkor fontos szemponttá vált az emberi egészség megőrzése, vagy akár javítása az élelmiszerek segítségével (Shetty és munkatársai, 2006a). Ma már közzismert, hogy míg a fejlődő országok a megfelelő mennyiségű és minőségű élelmiszerek hiányától, addig a fejlett országok éppen a túlzott kalóriabevitelre visszavezethető, szinte járványszerű betegségektől, pl. cukorbetegség, kardiovaszkuláris megbetegedések, rák, szenvednek. Ezért nem meglepő módon a jelenlegi élelmiszer-biotechnológiai fejlesztések, többek között, éppen ezen súlyos egészségügyi problémák enyhítésére irányulnak.

Ezzel összhangban az élelmiszer-biotechnológia legfontosabb területei (Shetty és munkatársai, 2006a): (i) az élelmiszer nyersanyagok biokonverziója feldolgozott élelmiszerekké, (ii) az élelmiszerek minőségének és biztonságának a javítása, (iii) a funkcionális élelmiszerek összetevőinek a létrehozása továbbá (iv) a hagyományos fermentációk biokémiai folyamatainak a javítása. Jelenleg az élelmiszer-biotechnológia meghatározó módon biokémiai, kémiai, mikrobiológiai és vegyészmérnöki ismeretekre épít, illetve integrálja ezeket az élelmiszerek hatékony létrehozása érdekében (Levin, 2006).

3.1.2.1. Funkcionális élelmiszerek, táplálék-gyógyszerek – a fogalmak definiálása, élelmiszer-biotechnológiai aspektusok

Az élelmiszer-biotechnológián belül már napjainkban is igen nagy szakmai és közérdeklődést, sőt várakozást kiváltó terület a „funkcionális élelmiszerek” („functional food”) továbbá a „táplálék-gyógyszerek” („nutraceuticals”) előállítására.

Sajnos mindkét fogalommal kapcsolatban mind szakmai, mind jogi bizonytalanságok megfigyelhetők meg (http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/nutra-funct_foods-nutra-fonct_aliment-eng.php#1).

A „Functional Food Center” (Richardson, Texas, USA) a funkcionális élelmiszereket a következőképpen definiálja (<http://www.functionalfoodscenter.net/index.html>): „Olyan nyers (természetes) vagy feldolgozott élelmiszerek, melyek olyan ismert vagy ismeretlen biológiailag aktív vegyületeket tartalmaznak, amelyek meghatározott, hatékony, nem-toxikus mennyiségben klinikailag igazolt és dokumentált, egészségi hasznot nyújtanak krónikus betegségek megelőzésében, ellátásában vagy kezelésében”. Eredeti szövegben: „The Functional Food Center defines “functional foods” as “Natural or processed foods that contains known or unknown biologically-active compounds; which, in defined, effective non-toxic amounts, provide a clinically proven and documented health benefit for the prevention, management, or treatment of chronic disease”.”

A „Bureau of Nutritional Sciences, of the Food Directorate of Health Canada” hivatal a funkcionális élelmiszereket és táplálék-gyógyszereket a következőképpen különbözteti meg (http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/nutra-funct_foods-nutra-fonct_aliment-eng.php#1):

Eredeti szövegben:

„A *nutraceutical* is a product isolated or purified from foods that is generally sold in medicinal forms not usually associated with food. A nutraceutical is demonstrated to have a physiological benefit or provide protection against chronic disease.”

„A *functional food* is similar in appearance to, or may be, a conventional food, is consumed as part of a usual diet, and is demonstrated to have physiological benefits and/or reduce the risk of chronic disease beyond basic nutritional functions.”

„Azaz a táplálék-gyógyszer olyan termék, amit élelmiszerekből izoláltak, vagy tisztítottak, és általában olyan gyógyszer formulákban árusítják, amelyek általában nem kapcsolhatók össze az élelmiszerral. A táplálék-gyógyszer kimutathatóan élettani haszonnal bír, vagy védelmet nyújt krónikus betegséggel szemben.”

„A funkcionális élelmiszer megjelenésében hasonló egy olyan hagyományos élelmiszerhez, vagy éppen egy olyan hagyományos élelmiszer, amit a megszokott étrend részeként fogyasztunk, és amely kimutathatóan élettani haszonnal bír, és/vagy az alapvető táplálkozási funkciókat meghaladóan csökkenti a krónikus betegség kockázatát.”

A funkcionális élelmiszerek jelenlegi legfontosabb kutatási területei a növényi alapanyagok tekintetében: (i) A szójafehérjék genetikai módosítása pl. a fehérjék emészthetőségének, epesavkötő és fagocitózist növelő képességének a javítása és az aminosav-összetételének a megváltoztatása érdekében (Maruyama és munkatársai, 2006). (ii) A növényi keményítők genetikai átalakítása, pl. amilózmentes, valamint kis- és nagy amilóztartalmú keményítők előállítása céljából (Klucinec és Keeling, 2006). (iii) A növényi olajok genetikai módosítása, pl. a telítetlen zsírsav tartalom növelése (Kinney, 2006). (iv) Nyomelemek (pl. vas, cink, kalcium) és vitaminok (pl. A provitamin valamint E és C vitaminok) dúsítása gabonákban

molekuláris biotechnológiai eszközökkel (Paredes-López és Osuna-Castro, 2006), valamint (v) antioxidáns hatású fenolos fitokemikáliák túltermeltetése növényekben (Shetty és munkatársai, 2006b). Ezeket a genetikai átalakításokat a növényi genomok szekvenálásából nyert információk nagymértékben elősegítik (Olmedo és munkatársai, 2006). A növényi genomok szekvenálásával kapcsolatos aktuális információk elérhetők például a következő web oldalakon: <http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, <http://www.gramene.org/>, a búzára pedig: http://ensembl.gramene.org/Triticum_aestivum/Info/Index

Mindenképpen szeretném megemlíteni, hogy funkcionális élelmiszerfejlesztésekben egyre nagyobb figyelmet kapnak a tejfehérjék (kazein, tejsavófehérjék) és az ezekből származó bioaktív (immunomoduláns és antimikrobiális hatású) peptidok (McCarthy és munkatársai, 2014; Petrotos és munkatársai, 2014), a tejsír lipidjei és foszfolipidjei (Lock és munkatársai, 2014) valamint a tejben és tejtermékekben lévő ásványi anyagok és vitaminok (Gordon, 2014). A tej összetevői funkcionális élelmiszerek összetevőiként segítenek a testsúly kontrolljában, a kognitív teljesítmények javításában, valamint a szervezet természetes védelmi képességének a javításában (Kvistgaard és munkatársai, 2014).

3.1.2.2. Az élelmiszer-biotechnológia további területei – prebiotikumok és probiotikumok

További fontos élelmiszer-biotechnológiai fejlesztések történtek, a teljesség igénye nélkül, a termékek eltarthatóságának a növelésére (Pinhero és Paliyath, 2006), egyes élelmiszer-, pl. mogyoró, allergiák megszüntetésére (Dodo és munkatársai, 2006), valamint az állati eredetű alapanyagok tulajdonságainak a kedvező megváltoztatására is genetikai módosítások révén (pl. a tej összetételének a megváltoztatása; Pursel, 2006). Intenzíven fejlődő terület az utóbbi időben az emberi mikroflóra összetételének a kedvező befolyásolása prebiotikus (Casci és munkatársai, 2006; Quigley, 2014) és probiotikus (Quigley, 2014) készítmények alkalmazásával.

A probiotikumok a FAO/WHO definíciója szerint „Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host.”, azaz olyan élő

mikroorganizmusok, melyek megfelelő mennyiségben a szervezetbe juttatva a gazdaszervezetnek egészségügyi előnyöket nyújtanak (Nagpal és munkatársai, 2014).

A prebiotikumok pedig Gibson és munkatársai (2004) definíciója alapján „A prebiotic is a selectively fermented ingredient that allows specific changes, both in the composition and/or activity in the gastrointestinal microflora that confers benefits upon host well-being and health.”, azaz a prebiotikum olyan szelektíven fermentált összetevő, amely a gyomor és bélrendszer mikroflórájának az összetételében és/vagy aktivitásában olyan specifikus változásokat tesz lehetővé, amelyek előnyöket biztosítanak a gazda jólétére és egészségére nézve.

A probiotikumok és prebiotikumok jótékony hatásait napjainkban intenzíven kutatják, pl. az elhízás (Erbağci, 2014), gyomor- és bélrendszeri betegségek (pl. hasmenések, bélgyulladások és bélirritációk; Akpinar, 2014) és fertőzések (pl. *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile* és rotavírus; Francavilla és munkatársai, 2014; Kamiya, 2014) leküzdésében, valamint a rák (pl. vastagbél daganatok) megelőzésében (Gogineni és Morrow, 2014). Ma nagy erővel kutatják és modellezik az emberi tápcsatorna mikrobiomjának (bővebben: 2.1.6. fejezet) és magának az emberi szervezetnek a metabolikus összekapcsolódását (genomi szintű metabolikus modellek, „genome-scale metabolic models”, „GEMs”; Shoaie és Nielsen, 2014). Ezen ember-mikróba metabolikus hálózat alaposabb megismerése megteremtheti annak lehetőségét, hogy a mikrobiom probiotikumokkal illetve prebiotikumokkal történő módosítása révén meg tudjunk előzni, illetve kezelni tudjunk olyan népbetegségeket, mint az elhízás, a cukorbetegség és az érlelmeszesedés (Shoaie és Nielsen, 2014). Élelmiszer-biotechnológiai szempontból fontos teendő a bélrendszer baktériumai közötti metabolikus kapcsolatok felderítése is (Shoaie és munkatársai, 2013). A probiotikus baktériumok genomjának az elemzése pedig segíthet minket megérteni, pl. a prebiotikumok, amelyek legtöbbször igen komplex szerkezetű és általunk nem metabolizálható szénhidrátok, baktériumok általi hasznosíthatóságát, ami elvezethet minket a prebiotikus hatások mélyebb megértéséhez is (O’Sullivan és Halami, 2014).

Külön ki szeretném emelni, hogy a probiotikumok fogyasztásának kedvező hatása van mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer elemeinek a működésére, pl. a makrofágok és

természetes ölüsejtek aktivitására, valamint a különféle antitestek (IgA, IgM és IgG) termelésére is (Nova és munkatársai, 2014). Ezen kívül, prebiotikumok segíthetik a megfelelő bélflóra kialakulását, es ennek révén az immunrendszer érési folyamatait is újszülöttekben (Nova és munkatársai, 2014) (lásd még a 2.2.11. fejezetet). Említést érdemel még, hogy a tyúktörzs sárgájából kinyerhető IgY antitestek felhasználhatók számos fertőzés (pl. rotavírus, *Salmonella* fajok, *Streptococcus mutans*) elleni passzív immunizálásra (Kovacs-Nolan és Mine, 2006, 2012), valamint a kórokozók antigénjeinek növényekben történő kifejeztetésével aktív immunizálásra alkalmas, szájon át alkalmazható (orális) vakcinákhoz juthatunk (Rosales-Mendoza és Salazar-González, 2014; 4.1.2.1. fejezet). A növényekben expresszálatott rekombináns antitestek („plantibodies”) passzív immunizálásra használhatók fel, pl. *Streptococcus mutans* ellen (Robinette és munkatársai, 2011).

3.1.2.3. Az élelmiszer-mikrobiológia élelmiszer-biotechnológiai jelentősége

Az eddig leírtakból egyértelműen látszik, hogy az élelmiszer-mikrobiológiai ismeretek kiemelkedő jelentőségűek az élelmiszerek és élelmiszeradalékok mikrobiális előállításában, továbbá az élelmiszerbiztonságban is (Jay és munkatársai, 2005; McNail és munkatársai, 2013). Ma már tudjuk, hogy a különféle élelmiszerek mikroflórája jelentős mértékben eltérő, és hatással lehet a termék eladhatóságára, fogyaszthatóságára, sőt a fogyasztó egészségi állapotára is (Jay és munkatársai, 2005). Az utóbbi időben jelentős mértékben fejlődött a mikrobiális ökológia eszköztára, pl. „omikai” eszközökkel (2.1. fejezet) is, így egy-egy adott élőhelyen minden eddiginél átfogóbb képet kaphatunk az ott élő mikroorganizmusokról, beleértve az élelmiszerek mikroba közösségeit is. A jelenlévő káros, pl. ételmérgezést okozó, mikroorganizmusok megbízható kimutatása alapvetően fontos a megfelelő élelmiszervédelmi stratégiák kidolgozása szempontjából (Jay és munkatársai, 2005). Ugyanakkor igen sok élelmiszer-biotechnológiai folyamatban a megfelelő mikroorganizmusok jelenléte és ezek megfelelő metabolikus aktivitása alapfeltétele a kívánt minőségű termék létrehozásának (Jay és munkatársai, 2005; McNail és munkatársai, 2013).

A biotechnológiai iparban sokféle mikroorganizmust, köztük baktériumokat, gombákat és algákat használnak fel különféle élelmiszer-összetevők és –adalékok, valamint enzimek, sőt táplálék-gyógyszerek („nutraceuticals) előállítására (McNeil és munkatársai, 2013; Pócsi és

munkatársai, 2013). Ki szeretném emelni, hogy az élesztők és fonalas gombák élelmiszer-biotechnológiai felhasználása különösen széleskörű (McNeil és munkatársai, 2013; Pócsi és munkatársai, 2013).

Az élelmiszer-összetevők és -adalékok fermentorban, folyékony kultúrában történő előállítása tipikus, emellett ez a terület igen jól kutatott (Seviour és munkatársai, 2013). Emellett említést érdemel, hogy számos élelmiszeriparban felhasznált enzim és adalékanyag előállítására ma már hatékony szilárdfázisú fermentációs rendszereink is vannak (Pandey és Ramachandran, 2006).

A pékélesztő az élelmiszer-biotechnológia egyik kedvelt eszköze, melynek a genetikai átalakítására számos molekuláris genetikai eszköz ismert, továbbá a törzsfeljesztésekben egyre gyakrabban alkalmaznak rendszerbiológiai megközelítéseket (Mapelli és munkatársai, 2013). A napjainkban folyó élesztő genetikai módosítások három fő területet céloznak. (i) Az első terület a szubsztrátspektrum kiszélesítése annak érdekében, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* képessé váljon a melibióz, laktóz, keményítő, lignocellulóz, beleértve a cellulózt és hemicellulózt is, hasznosítására. (ii) A második terület a heterológ enzimtermelés (pl. amilázok, xilanázok, lipázok, fitázok) javítása élesztőben, míg (iii) a harmadik egyes esszenciális élelmiszer-összetevők és –adalékok, pl. aminosavak, vitaminok, új típusú lipidek, pl. ω -3 és ω -6 zsírsavakat tartalmazók, prebiotikus oligoszacharidok, pl. fruktoooligomerek) túltermeltetésére irányul (Prieto és munkatársai, 2006; Mapelli és munkatársai, 2013).

A fonalas gombák felhasználása szintén igen sokrétű, és a rendszerbiológiai alapú metabolikus mérnöki átalakítások itt is egyre gyakoribbak a törzsfeljesztésekben, főképpen *Aspergillus* fajok esetében (Vongsangnak és Nielsen, 2013). A fonalas gombák fontos szerepet játszanak számos élelmiszeripari enzim és adalékanyag előállításában. Ilyenek pl. a hidrolitikus enzimek, pl. pektinázok (Venkatesh és Umesh-Kumar, 2006; Hellmuth és van den Brink, 2013), valamint a szerves savak, köztük a citromsav (Roukas, 2006; Sauer és munkatársai, 2013).

Említést érdemel még a különféle íz-, illat- és színanyagok (Feron és Waché, 2006; Dvora és Koffas, 2013; Sanchez és munkatársai, 2013; Waché, 2013), olajok és zsírok (Wynn és

Ratledge, 2006), valamint a táplálék-gyógyszerekként felhasználható aminosav-származékok (pl. L-dihidroxil-fenil-alanin, D-*p*-hidroxil-fenil-glicin, hidroxil-L-prolin; Suzuki, 2013), politelítetlen zsírok (ω -3 és ω -6 zsírsavak; Ratledge, 2013) és a prebiotikus hatású oligoszacharidok (pl. frukto- és galakto-oligoszacharidok; Nguyen és Haltrich, 2013) mikrobiális előállítására főképpen baktériumokkal.

Sajnos az élelmiszerekben patogén mikroorganizmusok is előfordulnak, és ezek pontos azonosítása és kontrollja is az élelmiszer-mikrobiológia és élelmiszer-biotechnológia fontos területe (Danielsson-Tham, 2013). Ennek a területnek számos új kihívásra kell hatékony választ adnia, egyik ilyen kihívás például az antimikrobiális ágensekkel szembeni rezisztencia terjedése az ételmérgezést okozó baktériumok körében is (Heikinheimo, 2013). Ez egyértelműen összefügg az antibiotikumok nagy volumenű, nem terápiás célú (pl. az állattenyésztésben történő) alkalmazásával (Heikinheimo, 2013).

Az élelmiszerek károsításában jelentős szerepet játszanak a penészgombák, pl. *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* és *Penicillium* fajok (Asefa és Skaar, 2013). Ezen penészgombák mikotoxintermelése komoly élelmiszerbiztonsági problémákat is felvet, hiszen a gombák által termelt szekunder metabolitoknak súlyos egészségkárosító hatásuk van (Jay és munkatársai, 2005; Miller és Linz, 2006; Asefa és Skaar, 2013). A penészgombák szaporodásának és mikotoxintermelésének a korlátozása fontos élelmiszerbiztonsági feladat (Jay és munkatársai, 2005; Miller és Linz, 2006; Asefa és Skaar, 2013), és ezért ezen jegyzet keretében ennek a kérdéskörnek kitüntetett figyelmet szentelek (3.2. és 3.3. fejezetek).

3.1.3. Az élelmiszer-biotechnológia jövőbeni fejlődési tendenciái

Az élelmiszer-biotechnológia jövőbeni fejlődése szempontjából kitüntetett jelentőséggel bír a korszerű „omikai” eszközökkel nyert adatok (2.1. fejezet) felhasználása az élelmiszer-biotechnológiai fejlesztésekben (Olmedo és munkatársai, 2006; Shoaie és munkatársai, 2013; Shoaie és Nielsen, 2014).

3.1.3.1. Az „omikák” növekvő szerepe a jövő élelmiszer-biotechnológiájában: táplálkozás-genomika, táplálkozás-genetika és foodomika

Ki kell emelnünk, hogy napjainkban új „omikai” területként megjelent a táplálkozás-genomika („nutrigenomika”, „nutrigenomics”; Ordovas és Mooser, 2004), amely azt tanulmányozza, hogy milyen módon befolyásolják az élelmiszerek az emberi genomot, transzkriptomot, proteomot és metabolomot. Azaz az élelmiszerek emberi egészségre gyakorolt előnyös, vagy éppen hátrányos hatásait próbálja magyarázni molekuláris szinten, „omikai” adatok felhasználásával (Sales és munkatársai, 2014). A táplálkozás-genetika („nutrigenetics”; Ordovas és Mooser, 2004; Mariam, 2006) ezzel szemben összefüggéseket igyekszik találni az emberi genom variabilitása, továbbá az egyes emberek étrendje és a táplálkozással összefüggésbe hozható betegségei között. Az emberi genomban megfigyelhető polimorfizmusok ugyanis befolyásolhatják a táplálékok emésztését, abszorpcióját, transzportját, biotranszformációját, felvételét és eliminációját (El-Sohemy, 2007). Nagyon fontos, hogy ezek a polimorfizmusok magyarázhatják az élelmiszerek bioaktív összetevőinek (pl. antioxidánsok, vitaminok, fitokémiai anyagok, koffein, szterinek, zsírsavak és alkohol) a biotranszformációjában és hatásaiban megfigyelhető egyéni különbségeket (El-Sohemy, 2007). A legújabb vizsgálatok szerint az étrendnek hatása van az epigenomra is, aminek pl. a rák és kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában vagy éppen megelőzésében lehet jelentős szerepe (Hardy és Tollefsbal, 2011; Ong és munkatársai, 2011; Zaina és Lund, 2011; Vahid és munkatársai, 2015).

A dinamikusan gyarapodó táplálkozás-genomikai és táplálkozás-genetikai ismeretek elvezethetnek minket, a „személyre szabott gyógyászat” („personalized medicine”) mintájára, a „személyre szabott étrend” („personalized diet”) kialakításához. A személyre szabott étrendeknek a jövő gyógyászatában várhatóan nagy szerepük lesz pl. az elhízás (Martinez és munkatársai, 2008; Lundstrom, 2013), a cukorbetegség (Kaput és munkatársai, 2007), a rák (Riscuta és Dumitrescu, 2012; Lundstrom, 2013), valamint a kardiovaszkuláris betegségek (Lovegrove és Gitau, 2008; Engler, 2009, Merched és Chan, 2013) megelőzésében és kezelésében. Kétségtávol, a személyre szabott étrendek kialakítása már a közeljövő egyik legdinamikusabban fejlődő területe lehet az élelmiszer-biotechnológián belül is (Preuss és munkatársai, 2014).

Annak érdekében, hogy az élelmiszer-összetevők, köztük bioaktív molekulák, sejtekre gyakorolt hatását jobban megérthessük a molekulák szintjén, az élelmiszer és a táplálkozás doméneke fejlett „omikai” eszközökkel (2.1. fejezet) való tanulmányozása szükséges annak érdekében, hogy a fogyasztók jóléte, egészsége és bizalma javuljon (Cifuentes, 2009; Herrero és munkatársai, 2012; García-Cañas és munkatársai, 2012). Ez az új, átfogó tudományterület, amelyben az élelmiszerek és táplálkozás kutatása, a fejlett analitikai eszközök (főleg „omikai” eszközök) valamint a bioinformatika kombinálódnak, a foodomika („foodomics”; Herrero és munkatársai, 2012; García-Cañas és munkatársai, 2012). A foodomika kutatási területe már ma is impresszív, kiterjed például a következőkre García-Cañas és munkatársai (2012) összefoglaló közleménye alapján: (i) Azon kémiai, molekuláris és sejtszintű mechanizmusok megértése táplálkozás-genomikai eszközök segítségével, melyek bizonyos bioaktív élelmiszer-komponensek előnyös vagy hátrányos hatását eredményezik. (ii) Azon génszintű különbségek megértése táplálkozás-genetikai eszközökkel, melyek révén az egyes személyek másképpen reagálnak egy adott specifikus étrendre. (iii) Olyan gének azonosítása a (ii) pont alattiak közül, amelyek betegségek kialakulásában játszanak szerepet, és amelyek emiatt lehetséges biomarkerek is. (iv) A bioaktív élelmiszer-összetevők alapvető fontosságú molekuláris útvonalakra gyakorolt hatásának a megállapítása. (v) A tápcsatorna mikrobiom (2.1.6. fejezet) globális szerepének és funkcióinak a meghatározása. Ezek a vizsgálatok új, impresszív kutatási területet nyithatnak meg a számunkra a jövőben. (vi) Az élelmiszerben lévő patogének stressz-adaptációs válaszainak a megértése az élelmiszer higiénia, az élelmiszer feldolgozás és konzerválás biztonsága érdekében. (vii) Az élelmiszerek mikroorganizmusainak szállító rendszerekként (pl. vakcinák és gyógyhatású fehérjék szállítása; Nouaille és munkatársai, 2003; Pontes és munkatársai, 2011) történő alkalmazásának a tanulmányozása, beleértve ezen mikrobák géninaktiváló és gendelációs rendszerei (lásd pl. Barrangou és Horvath, 2012; Oh és van Pijkeren, 2014) hatásának a vizsgálatát is. (viii) A genetikailag módosított gabonák előre nem látott hatásainak a vizsgálata. (ix) Az élelmiszerbiztonság, -minőség és -nyomonkövethetőség átfogó áttekintése a kérdéskört egységes egésként kezelve. (x) A mezőgazdaságilag fontos és gazdaságilag is releváns biológiai folyamatok molekuláris alapjának a megértése. Ilyenek pl. a gabonafélék és a patogénjeik közötti kölcsönhatások (3.2.4. fejezet), valamint a gyümölcsök érésakor bekövetkező fizikai kémiai változások. (xi) A betakarítás utáni jelenségek („postharvest phenomena”) teljes megértése olyan globális

megközelítés révén, amely összekapcsolja a genetikai és környezeti válaszokat, és azonosítja az ezek alapjául szolgáló biológiai hálózatokat. Ebben a tekintetben várható, hogy az új „omikai” technológiák rendszerbiológiával történő kombinálása (2.1. fejezet) a betakarítás utáni kutatásokat új alapokra helyezheti (García-Cañas és munkatársai, 2012). A jövőben a különféle „omikai” eszközök alkalmazásának a kibővülése, pl. a kapilláris elektroforézis – tömegspektroszkópia („CE-MS”) alkalmazása a metabolomikai, peptidomikai és proteomikai kutatásokban (Ibáñez és munkatársai, 2013), sokoldalú és integrált foodomikai kutatásokat tesznek majd lehetővé.

3.1.3.2. Jelenlegi és jövőbeni funkcionális élelmiszer előállítási technológiák

A funkcionális élelmiszerek előállítási technológiáját három fő csoportba soroljuk (Betoret és munkatársai (2011) alapján:

(i) Az első csoportba azokat termékeket soroljuk, melyek előállításához hagyományos feldolgozási, formulázási és keverési technikákat alkalmaztak, az alapanyagok előállítása pedig hagyományos növénytermesztési és állattenyésztési technológiákkal történt (Betoret és munkatársai, 2011). Ide tartoznak pl. a só jódozása, továbbá a hagyományos élelmiszerekhez vitaminok (pl. A, D és B vitaminok), valamint egyéb biológiailag aktív anyagok, pl. prebiotikumok, hozzáadása. Ide tartozik a GM növényekkel való bioaktív hatóanyag-bevitel is, pl. a szükséges karotainoidok biztosítása „arany” rizzsel („Golden Rice”), vagy a hosszúláncú politelítetlen zsírsavak megtermeltetése repcében. Ugyancsak lehetőség van az állati alapanyagok összetételének, pl. zsírsavak minősége, szeléntartalom, módosítására a felhasznált takarmányok bioaktív anyag tartalmának a megváltoztatása révén.

(ii) A második csoportba tartoznak azok a funkcionális élelmiszerek, melyekben a biológiailag aktív összetevőt védik, pl. mikrokapszulázással, ehető filmekkel, bevonatokkal vagy vákuum-impregnálással (Betoret és munkatársai, 2011). Már számos sikeres kísérlet történt biológiailag aktív anyagok, így lipidek, fehérjék, szénhidrátok mikrokapszulázással történő megvédésére. A lipidek közé tartoznak pl. a politelítetlen zsírsavak (oxidációra nagyon érzékenyek), foszfolipidek, karotenoidok és zsírolékony vitaminok. A mikrokapszulázott fehérjék gyakran növekedési faktor, vérnyomáscsökkentő, antioxidáns és

immunregulátor funkciójúak. A szénhidrátok körében védelemre szorulnak a vízdoldható, de nem emészthető molekulák, melyek sokszor koleszterinszint-csökkentő, székrekedés-ellenes és tumorellenes hatásúak. A kapszulaanyagok skálája is igen széles, pl. keményítő, tejsavófehérjék, zselatin, maltodextrin. A kapszulázás nemcsak a környezeti hatásoktól és a tápcsatornában való lebomlástól védi az anyagokat, hanem biztosítja a bélrendszer megfelelő részében történő kiszabadulásukat is.

Mindenképpen említést érdemel a probiotikus baktériumok védelme mikrokapszulázással (Betoret és munkatársai, 2011). Ilyen például a probiotikus baktériumok szuszpenzióinak a bezárása alginát gyöngyökbe. Amennyiben a baktériumok kedvező hatásáért felelős molekulák a sejtfalban, vagy a sejmembránban vannak, akkor a cél ezek védelme, és nem a baktériumok életben tartása.

Az ehető filmek általában ehető csomagolóanyagok, melyek védik a terméket pl. a barnulástól, mikrobiális romlási folyamatoktól, továbbá színt, ízanyagokat és fűszereket tartalmazhatnak, valamint ezekbe a filmekbe bioaktív anyagokat is csomagolhatunk (Betoret és munkatársai, 2011). Erre példa esszenciális fémionok, pl. Ca^{2+} valamint vitaminok bezárása zselatin filmekbe. Vákuum-impregnálással szintén az élelmiszerek ásványi anyag, vitamin- és bioaktív anyag tartalma módosítható kedvezően.

(iii) A harmadik csoportba a személyre szabott funkcionális élelmiszerek előállításának a technológiai tartoznak. Ezek az élelmiszerek táplálkozás-genomikai és táplálkozás-genetikai kutatások alapján kerülhetnek majd személyre szólóan kialakításra. Ennek a területnek a jövőben viharos fejlődése várható különösen akkor, ha technológiafejlesztések és – felhasználás etikai és jogi háttere kellően letisztul (Betoret és munkatársai, 2011).

3.1.3.3. A jövő prebiotikumai és probiotikumai

Mint azt már az 3.1.2.2. fejezetben is láttuk, a probiotikumok kedvező egészségi hatásai sokrétűek lehetnek (Brunser és munkatársai, 2014), ilyenek például: (i) A tápcsatorna fertőzéseinek a megakadályozása szerves savak, hidrogén-peroxid és bakteriocinek termelése révén. (ii) Az élelmiszerek emészthetőségének a javítása enzimek (pl. α - és β -galaktozidázok,

észterázok) szekréciónál. (iii) Immunomoduláns és gyulladáscsökkentő hatások elsősorban a baktériumsejtek exopoliszacharid és lipoteikoinsav tartalma révén. (iv) Tumorellenes hatások pl. a prokarcinogénikus enzimaktivitások (β -glükuronidáz, nitroreduktáz, azoreduktáz) gátlásával, az apoptózis stimulálásával, gyulladáscsökkentő aktivitások továbbá a mutagének megkötése eredményeképpen, és végezetül, (v) a táplálkozási aktivitás növelése poliaminokkal, amelyek a bélnyálkahártya növekedését fokozzák (Brunser és munkatársai, 2014).

Ami a jövő várható tendenciáit illeti, a probiotikumok előretörése várható a csontok, a vesefunkciók és a központi idegrendszer funkcióinak a javításában (Brunser és munkatársai, 2014). A megfigyelések szerint a probiotikus baktériumok a vastagbél lumen savanyítása révén javítják a Ca^{2+} -ionok felszívódását, ugyanakkor fokozzák az „osteoclast” sejtek általi csontreszorpciót is. Emellett megfigyelték, hogy a probiotikumok lassították a reumatoid arthritis és az allergiás asztmás megbetegedések progresszióját. A krónikus vesebeteg embereknél a cél a vastagbélben történő fehérjefermentációnak - amely igen toxikus metabolitokat, pl. *p*-krezil- és indoxil-szulfátokat (tirozinból és triptofánból), eredményez - a csökkentése. Veseelégtelenség esetén többek között éppen ezek a fehérjéket módosító és emiatt kardiovaszkuláris komplikációkat kiváltó metabolitok halmozódnak fel a szervezetben. A legideálisabb megoldás a toxikus metabolitok előállításának és az NH_3 -termelésnek az egyidejű visszaszorítása - azaz a fölös nitrogén „elterelése” a székletképzés irányába a vastagbélben - lenne. Erre számos probiotikus baktérium és prebiotikus kiválóan alkalmas (Brunser és munkatársai, 2014).

Mára számos kísérlet igazolta, hogy a bélrendszeri mikroorganizmusok nemcsak a bélepitéliummal és az immunrendszerrel állnak igen szoros kapcsolatban, hanem hatnak a központi idegrendszer működésére is (Brunser és munkatársai, 2014). A kommunikáció a mikrobióta-bélrendszer-agy tengelyben kétirányú, és igénybe vesz anatómiai összeköttetéseket, pl. a bolygóideget (Forsythe és munkatársai, 2010; Bercik és munkatársai, 2011a; Bravo és munkatársai, 2011), valamint humorális komponenseket (immunrendszer és a hipotalamusz-agyalapi mirigy-mellékvese tengely; Forsythe és munkatársai, 2010; Cryan és Dinan, 2012; Bravo és munkatársai, 2012) is. A mikrobióta-bélrendszer-agy tengely regulációjának a felborulása betegségekhez, pl. a gyakori irritációs és gyulladáscsökkentő bélbetegségekhez vezet.

Mára állatkísérletekkel igazolták, hogy a bélrendszeri baktériumközösségek összetétele és az általuk termelt metabolitok hatással vannak az úgynevezett pszichés hangulati betegségekre is (Brunser és munkatársai, 2014). Más vizsgálatok eredményeképpen kiderült, hogy a mentális betegségekre szedett gyógyszerek egy része, pl. az atipikus antipszichotikum olanzapin, megváltoztatja a bélrendszer mikrobiótáját, ami hozzájárulhat az észlelt testsúly-növekedéshez (Davey és munkatársai, 2012). Ezen túlmenően rágcsálókban a korai életszakaszban elszenvedett stressz befolyásolta a bélrendszer mikrobiótáját, ami kihatott a felnőtt állatok viselkedésére is (O'Mahony és munkatársai, 2011, 2014). Egyes patogén baktériumok (pl. *Campylobacter jejuni*) tápcsatornába való bejutása ugyanakkor szorongást idézett elő a tesztállatokban (Goehler és munkatársai, 2008). Mindezek e megfigyelések szépen alátámasztják a mikrobióta-bélrendszer-agy tengely kétirányúságát (Brunser és munkatársai, 2014).

A kutatóknak szintén sikerült igazolniuk, hogy csíramentes állatokban a bélbaktériumok hiánya hatással volt a hipotalamusz-agyalapi mirigy-mellékvese tengely működésére (Brunser és munkatársai, 2014). Továbbá, a bélrendszeri mikrobióta tervszerű megváltoztatása befolyásolta a kísérleti állatok néhány olyan viselkedési jellegét, ami a szorongáshoz és depresszióhoz kapcsolható (Bercik és munkatársai, 2011a, 2011b, 2012). Ezen túlmenően a bélflóra megváltoztatása hatott a kognitív képességekre is.

Mindezek alapján a jövőben jó esélyünk lehet arra, hogy probiotikumokkal kedvezően befolyásolhassuk a bélrendszer funkcionális betegségeit, a fájdalomérzetet, a szorongásos betegségeket, valamint a korai életszakaszban elszenvedett stresszhatások időben elnyúló káros hatásait (Brunser és munkatársai, 2014). Bár a probiotikumok ilyen irányú használatával kapcsolatban egyelőre nagyon kevés humán adatunk van, Messaoudi és munkatársai (2011) igazolták, hogy az általuk használt *Lactobacillus helveticus* és *Bifidobacterium longum* törzsek kedvező hatással voltak a szorongás és depresszió néhány tünetére. Így a jövőben várható a probiotikumok felhasználása pszichiátriai állapotok pl. hangulati betegségek kezelésében, vagy akár a mentális egészség kognitív és emocionális aspektusainak a javításában (Brunser és munkatársai, 2014). Sőt a probiotikumok javíthatják a farmakológiailag aktív vegyületek hatékonyságát akár kisebb dózisok alkalmazása mellett is.

A prebiotikus anyagok a bélrendszeri baktériumok hatására lebomlanak pl. kis molekulatömegű savakra (ecetsav, propionsav, vajsav) és gázokra (szén-dioxid, hidrogén, metán). A savak megváltoztatják a vastagbél pH-ját, mikrobiótáját, a nyálkahártya felszínét, a folyadékáramlást, továbbá a kationok transzepiteliális transzportját is. Fontos megjegyeznünk, hogy a kis molekulatömegű savak hatással vannak a szervezet zsírmetabolizmusára, pl. csökkentik a vér koleszterin- és trigliceridtartalmát, valamint a prebiotikumok lebomlási termékei étvágycsökkentő hatásúak. A jövő eredményes prebiotikum kutatása érdekében szükséges a bélrendszer baktériumainak és ezek metabolizmusának az alaposabb megismerése. Szükséges továbbá a kevésbé ismert, illetve tanulmányozott prebiotikumok, pl. izomalto-oligoszacharidok, raffinóz, sztachióz és kitin alaposabb vizsgálata is új termékek kialakítása érdekében (Brunser és munkatársai, 2014).

Egy további lehetőség a probiotikumok alkalmazására az élelmiszerekben előforduló káros anyagok, pl. mikotoxinok, egészségre ártalmas hatásainak (3.2.14. fejezet) a mérséklése (Hathout és munkatársai, 2011; Vinderola és Ritieni, 2015).

Ezen jegyzet keretében összegezni szeretném a mikotoxinok kutatással kapcsolatos legfrissebb kutatási eredményeket (3.2. fejezet), illetve a gombák által termelt antimikrobiális hatású illékony anyagokat (3.3. fejezet), amelyek éppen a mikotoxinokat termelő gombák biológiai kontrolljában is szerepet kaphatnak.

3.1.4. Irodalomjegyzék a 3.1. fejezethez

Akpınar H. (2014) Probiotics for gastrointestinal diseases. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötleş S., CRC Press, Boca Raton, 308-324. oldalak

Asefa D.T. és Skaar I. (2013) Moulds as threat to food safety. *Food Associated Pathogens*, Szerkesztő: Danielsson-Tham M.L., CRC Press, Boca Raton, 141-155. oldalak

Barrangou R. és Horvath P. (2012) CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **3**, 143-162.

Bercik P. és munkatársai (2011a) The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol. Motil.* **23**, 1132-1139.

- Bercik P. és munkatársai (2011b) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* **141**, 599-609.
- Bercik P., Collins S.M. és Verdu E.F. (2012) Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 405-413.
- Betoret E. és munkatársai (2011) Functional foods development: trends and technologies. *Trends Food Sci. Technol.* **22**, 498-508.
- Bravo J.A. és munkatársai (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 16050-16055.
- Bravo J.A. és munkatársai (2012) Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 667-672.
- Brunser O., Bravo J.A. és Gotteland M. (2014) The future of prebiotics and probiotics. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötley S., CRC Press, Boca Raton, 464-493. oldalak
- Casci T., Rastall R.A. és Gibson G.R. (2006) Human gut in health and disease: focus on prebiotics. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 1133-1166. oldalak
- Cifuentes A. (2009) Food analysis and foodomics. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 7109.
- Cryan J.F. és Dinan T.G. (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 701-712.
- Danielsson-Tham M.L. (2013) Food-associated pathogens – insights and reflections. *Food Associated Pathogens*, Szerkesztő: Danielsson-Tham M.L., CRC Press, Boca Raton, 1-7. oldalak
- Davey K.J. és munkatársai (2012) Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. *Psychopharmacology (Berl)* **221**, 155-69.
- Dodo H., Konan K. és Viquez O. (2006) Genetic modification of peanut as a solution to peanut allergy. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 969-987. oldalak
- Dvora H. és Koffas M.A.G. (2013) Microbial production of flavonoids and terpenoids. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 234-261. oldalak
- El-Sohemy A. (2007) Nutrigenetics. *Forum Nutr.* **60**, 25-30.
- Engler MB. (2009) Nutrigenomics in cardiovascular disease: implications for the future. *Prog. Cardiovasc. Nurs.* **24**, 190-195.
- Erbağci A. (2014) Probiotics and prebiotics in obesity and energy metabolism. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötley S., CRC Press, Boca Raton, 232-257. oldalak



Feron G. és Waché Y. (2006) Microbial biotechnology of food flavor production. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 407-441. oldalak

Forsythe P. és munkatársai (2010) Mood and gut feelings. *Brain Behav. Immun.* **24**, 9-16.

Francavilla R. és munkatársai (2014) Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötles S., CRC Press, Boca Raton, 325-353. oldalak

García-Cañas V. és munkatársai (2012) Present and future challenges in food analysis: foodomics. *Anal. Chem.* **84**, 10150-10159.

Gibson G.R. és munkatársai (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* **17**, 257-259.

Goehler L.E. és munkatársai (2008) *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain Behav. Immun.* **22**, 354-366.

Gogineni V.K. és Morrow L.E. (2014) Probiotics and prebiotics in cancer prevention. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötles S., CRC Press, Boca Raton, 377-389. oldalak

Gordon I. (2014) Minerals and vitamin in milk and dairy products. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, Szerkesztő: Kanekanian A., John Wiley & Sohns, Chichester, 289-313. oldalak

Hardy T.M. és Tollefsbol T.O. (2011) Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics* **3**, 503-518.

Hathout A.S. és munkatársai (2011) Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed a aflatoxins-contaminated diet. *Toxicon* **58**, 179-186.

Heikinheimo A. (2013) Food associated antimicrobial resistance. *Food Associated Pathogens*, Szerkesztő: Danielsson-Tham M.L., CRC Press, Boca Raton, 9-19. oldalak

Hellmuth K. és van den Brink J.M. (2013) Microbial production of enzymes used in food applications. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 262-287. oldalak

Herrero M. és munkatársai (2012) Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrom. Rev.* **31**, 49-69.

Ibáñez C. és munkatársai (2013) Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in Foodomics: a review. *Anal. Chim. Acta* **802**, 1-13.

Jay J.M., Loessner M.J. és Golden D.A. (2005) *Modern Food Microbiology*, Springer Science+Business Media, New York

Kamiya S. (2014) Probiotics and prebiotics in infections. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötles S., CRC Press, Boca Raton, 354-376. oldalak

- Kaput J. és munkatársai (2007) Application of nutrigenomic concepts to Type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **17**, 89-103.
- Kinney A.J. (2006) Genetic modification of plant oils for food uses. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 723-733. oldalak
- Klucinec J.D. és Keeling P.L. (2006) Genetic modification of plant starches for food applications. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 675-708. oldalak
- Kovacs-Nolan J. és Mine Y. (2006) Egg yolk antibody farming for passive immunotherapy. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 1067-1086. oldalak
- Kovacs-Nolan J. és Mine Y. (2012) Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **3**, 163-182.
- Kvistgaard A.S. és munkatársai (2014) Milk ingredients as functional foods. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, Szerkesztő: Kanekanian A., John Wiley & Sohns, Chichester, 198-236. oldalak
- Levin R.E. (2006) Food microbiology. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 3-17. oldalak
- Lock A.L., Givens D.I. és Bauman D.E. (2014) Dairy fat: perceptions and realities. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, Szerkesztő: Kanekanian A., John Wiley & Sohns, Chichester, 174-197. oldalak
- Lovegrove J.A. és Gitau R. (2008) Personalized nutrition for the prevention of cardiovascular disease: a future perspective. *J. Hum. Nutr. Diet.* **21**, 306-316.
- Lundstrom K. (2013) Past, present and future of nutrigenomics and its influence on drug development. *Curr. Drug Discov. Technol.* **10**, 35-46.
- Mapelli V., Franzén C.J. és Olsson L. (2013) System biology methods and developments for *Saccharomyces cerevisiae* and other industrial yeasts in relation to the production of fermented food and food ingredients. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 42-80. oldalak
- Mariman E.C. (2006) Nutrigenomics and nutrigenetics: the 'omics' revolution in nutritional science. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **44**, 119-128.
- Martinez J.A. és munkatársai (2008) Genotype-dependent response to energy-restricted diets in obese subjects: towards personalized nutrition. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **17**, 119-122.
- Maruyama, N. és munkatársai (2006) Molecular design of soybean proteins for enhanced food quality. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 647-674. oldalak
- McCarthy R. és munkatársai (2014) Bioactive peptides from casein and whey proteins. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, Szerkesztő: Kanekanian A., John Wiley & Sohns, Chichester, 23-54. oldalak

- McNail B. és munkatársai (2013) *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Woodhead Publishing, Oxford
- Merched A.J. és Chan L. (2013) Nutrigenetics and nutrigenomics of atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **15**, cikkazonosító: 328
- Messaoudi M. és munkatársai (2011) Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* **105**, 755-764.
- Miller M.J. és Linz J.E. (2006) Genetic mechanisms involved in regulation of mycotoxin biosynthesis. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 1505-1541. oldalak
- Nagpal R. és munkatársai (2014) Probiotics, Prebiotics and Symbiotics: an introduction. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötley S., CRC Press, Boca Raton, 1-24. oldalak
- Nguyen T.H. és Haltrich D. (2013) Microbial production of prebiotic oligosaccharides. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 494-530. oldalak
- Nova E., Abad C. és Gómez-Martínez S. (2014) Probiotics and prebiotics in immune system protection. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 269-286. oldalak
- Nouaille S. és munkatársai (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* **2**, 102-111.
- Oh J.H. és van Pijkeren J.P. (2014) CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Res.* **42**, cikkazonosító: e131
- Olmedo G., Parra S. és Guzmán P. (2006) Genomic basics for food improvement. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 627-647. oldalak
- O'Mahony S.M. és munkatársai (2011) Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* **214**, 71-88.
- O'Mahony S.M. és munkatársai (2014) Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience* **277**, 885-901.
- Ong T.P., Moreno F.S. és Ross S.A. (2011) Targeting the epigenome with bioactive food components for cancer prevention. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **4**, 275-292.
- Ordovas J.M. és Mooser V. (2004) Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 101-108.
- O'Sullivan D.J. és Halami P.M. (2014) Genomics of probiotics and prebiotics. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötley S., CRC Press, Boca Raton, 446-463. oldalak

Pandey A. és Ramachandran S. (2006) Process developments in solid-state fermentation for food applications. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 87-110. oldalak

Paredes-López, O. és Osuma-Castro, J.A. (2006) Molecular biotechnology for nutraceutical enrichment of food crops: the case of minerals and vitamins. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 735-770. oldalak

Petrotos K. és munkatársai (2014) Casein and whey protein in human health. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, Szerkesztő: Kanekanian A., John Wiley & Sohns, Chichester, 94-146. oldalak

Pinhero R.G. és Paliyath G. (2006) Biotechnological approaches to improve nutritional quality and shelf life of fruits and vegetables. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 933-968. oldalak

Pócsi I., Pusztahelyi T., Emri, T. és Leiter, É. (2013) *Gyógyszer- és élelmiszer-biotechnológia*, Digitális Tankönyvtár, http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011_0025_bio_3/index.html

Pontes D.S. és munkatársai (2011) *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr. Purif.* **79**, 165-175.

Preuss C., Das M.K. és Pathak Y.V. (2014) Genomics and natural products: role of bioinformatics and recent patents. *Recent Pat. Biotechnol.* **8**, 144-151.

Prieto J.A., Aguilera J. és Randez-Gil F. (2006) Genetic engineering of baker's yeast: challenges and outlook. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 245-279. oldalak

Pusel V.G. (2006) Genetic modification of production traits in farm animals. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 1021-1038. oldalak

Quigley E.M.M. (2014) Probiotics and prebiotics and the gut microflora. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, Szerkesztő: Ötley S., CRC Press, Boca Raton, 258-268. oldalak

Ratledge C. (2013) Microbial production of polyunsaturated fatty acids as nutraceuticals. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 531-558. oldalak

Riscuta G. és Dumitrescu R.G. (2012) Nutrigenomics: implications for breast and colon cancer prevention. *Methods Mol. Biol.* **863**, 343-358.

Robinette R.A. és munkatársai (2011) A therapeutic anti-*Streptococcus mutans* monoclonal antibody used in human passive protection trials influences the adaptive immune response. *Vaccine* **29**, 6292-6300.

Rosales-Mendoza S. és Salazar-González J.A. (2014) Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 737-749.

Sales N.M., Pelegrini P.B. és Goersch M.C. (2014) Nutrigenomics: definitions and advances of this new science. *J. Nutr. Metab.* **2014**, cikkazonosító: 202759

Sanchez S. és munkatársai (2013) Microbial production of carotenoids. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 194-233. oldalak

Sauer M., Mattanovich D. és Marx, H. (2013) Microbial production of organic acids for use in food. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 288-320. oldalak

Seviour R.J. és munkatársai (2013) Production of foods and food components by microbial fermentation: an introduction. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 97-124. oldalak

Shetty K. és munkatársai (2006a) *Food Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton

Shetty K., Randhir R. és Shetty P. (2006b) Bioprocessing strategies to enhance L-DOPA and phenolic antioxidants in the fava bean (*Vicia faba*). *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 735-770. oldalak

Shoaie S. és Nielsen J. (2014) Elucidating the interactions between the human gut microbiota and its host through metabolic modeling. *Front. Genet.* **5**, cikkazonosító: 86

Shoaie S. és munkatársai (2013) Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. *Sci. Rep.* **3**, cikkazonosító: 2532

Suzuki H. (2013) Microbial production of amino acids and their derivatives for use in foods, nutraceuticals and medications. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 385-412. oldalak

Vahid F. és munkatársai (2015) The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: a review. *Gene* **562**, 8-15.

Vinderola G. és Ritieni A. (2015) Role of probiotics against mycotoxins and their deleterious effects. *J. Food Res.* **4**, 10-21.

Vongsangnak W. és Nielsen J. (2013) Systems biology methods and developments of filamentous fungi in relation to the production of food ingredients. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 19-41. oldalak

Waché Y. (2013) Microbial production of food flavours. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Szerkesztők: McNail B. és munkatársai, Woodhead Publishing, Oxford, 175-193. oldalak

Wynn J.P. és Ratledge C. (2006) Microbial production of oils and fats. Sauer M., Mattanovich D. és Marx, H. (2013) Microbial production of organic acids for use in food. *Food Biotechnology*, Szerkesztők: Shetty K. és munkatársai, CRC Press, Boca Raton, 443-472. oldalak

Zaina S. és Lund G. (2011) Epigenetics: a tool to understand diet-related cardiovascular risk? *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **4**, 261-274.

3.2. A mikotoxin kutatás legfrissebb eredményei

3.2.1. Mikotoxinok – hogyan kerültek az érdeklődés középpontjába?

Az élelmiszer-biotechnológiai kutatások egyik fő vonulatát jelentik ma a mikotoxinokkal kapcsolatos kutatási tevékenységek. Ezek a toxikus hatású vegyületek az 1960-es évek elejétől kezdődően („turkey X disease”, a pulykák tömeges, földimogyoró okozta aflatoxin mérgezése történt 1960-ban Nagy-Britanniában; Homei és Worboys, 2013) kerültek az érdeklődés középpontjába. Az köztudott, hogy jelenleg a tárolás során a betakarított gyümölcsök és zöldségek 20-25 %-a válik fogyaszthatatlanná a különféle penészgombák elszaporodása miatt (de Medeiros és munkatársai, 2012). Csak az USA-ban a mezőgazdaság évente 1 milliárd dollár veszteséget szenved el a mikotoxin szennyezések következtében (Amaike és Keller, 2011). A téma időszerűségét az adja, hogy a napjainkban zajló globális klímaváltozási folyamatok elősegíthetik új, toxintermelő gombák megjelenését a mi éghajlati övünkön is, illetve stimulálhatják a természetett növényeken megjelenő gombafajok toxintermelését. Az elmúlt időszakban a levegő CO₂ koncentrációjának növekedése felgyorsult, hiszen míg 1750-ben a koncentráció értéke 280 ppm, 2000-ben pedig 368 ppm volt, addig az úgynevezett A2 emisszió scenárió (<http://www.ipcc.ch/ipccreports/sres/emission/index.php?idp=98>) előrejelzése szerint ez ~2095-re elérheti az 1250 ppm értéket (Chakraborty és Newton, 2011). A CO₂ halmozódása a légkörben az elmúlt 100 évben +0,74 °C hőmérséklet-változást eredményezett, míg az A2 scenárió által 2095-re prognosztizált érték +3,4 °C lesz (Chakraborty és Newton, 2011).

3.2.2. Klímaváltozás és mikotoxin veszély – hogyan érintenek minket?

Ha áttekintjük az Európára vonatkozó előrejelzéseket (<http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg1/ar4-wg1-chapter11.pdf>), akkor megállapíthatjuk, hogy Délkelet-Európában +4-5 °C hőmérséklet-változás, hosszú aszályos periódusok, elsivatagosodás, a gabonatermés csökkenése, Nyugat-Európában +2,5-3,5 °C hőmérséklet-növekedés mellett szárazabb és melegebb nyarak, Közép-Európában +3-4 °C változás mellett több eső, áradások. Ugyanakkor, Észak-Európában +3-4,5 °C hőmérséklet-növekedés és +30-40 %

csapadékmennyiség növekedés várható, ennek köszönhetően hosszabb lesz a gabonafélék tenyészideje és nagyobb termésátlagok várhatók (Magan és munkatársai, 2011).

Minden valószínűség szerint már a változó éghajlati viszonyoknak tulajdoníthatók a 2012. év végi és a 2013. év eleji, a kukorica aflatoxin szennyeződéséről Szerbiából érkező aggasztó hírek (pl. „Serbia ramps up aflatoxin testing”, http://www.agriculture.com/news/crops/serbia-ramps-up-aflatoxin-testing_2-ar27915; „Aflatoxin pose new risk to European maize production”, <http://www.romerlabs.com/hu/company/latest-news/detail/article/aflatoxins-pose-new-risk-to-european-maize-production/>; „Agriculture ministry was „stunned” by aflatoxin affair”, http://www.b92.net/eng/news/in_focus.php?id=1146 és „Govt. raises permitted level of aflatoxin in milk”, http://www.b92.net/eng/news/politics.php?yyyy=2013&mm=02&dd=28&nav_id=84927). Ennek következtében a magyar hatóságok is szigorították a takarmánykukorica aflatoxin mennyiségének a vizsgálatát; szerencsére az összes megvizsgált tejminta negatív volt a tejben várható M1 aflatoxin variánsra nézve (<http://www.reuters.com/article/2012/12/10/hungary-maize-idUSL5E8NACY620121210>).

Ami a magyarországi mikotoxin helyzet várható alakulását illeti, az éghajlat szélsőségesse válása és a gyakori aszály rontani fogja a gabonafélék ellenállóságát, majd az extrém csapadék mennyiségek és hőhullámok megnövelik a növénypatogén gombák elszaporodásának az esélyét (Farkas és munkatársai, 2011). A „mediterránizáció” nyomán eddig trópusinak, szubtrópusinak ismert gombafajok törhetnek be ebbe a földrajzi régióba. Amennyiben a hőmérséklet 2 °C-kal emelkedik, akkor Dél-Európában az aflatoxin fenyegetettség egyértelműen nő, emellett alacsony, illetve közepes kockázat jelenik meg a négy fő kukoricatermelő országban, konkrétan Romániában, Franciaországban, Magyarországon, továbbá Olaszország északkeleti részén (Farkas és munkatársai, 2011). Néhány helyi vizsgálat a régiókban már kimutatta az *Aspergillus flavus* növekvő előfordulását. Ami a *Fusarium* toxinokat illeti, várható, hogy a fumonizineket termelő fajok, pl. *F. verticillioides*, szintén gyakoribbá válnak. Európában dominánssá válik a homothalliás peritéciumos *F. graminearum* (*Gibberella zea*) kiszorítva a korábban ugyancsak gyakori, szexuális szaporodást viszont nem mutató *Fusarium culmorum*ot (Miedaner és munkatársai, 2008; Farkas és munkatársai, 2011). Emellett meg kell említeni, hogy az ochratoxint és

fumonizint termelő fekete aspergillusokat is kimutatták már Magyarországon fokhagymán és szőlőn (Farkas és munkatársai, 2011). A jelenlegi magyar mikotoxin helyzettel kapcsolatban ajánlom még a következő irodalmakat: Borbély és munkatársai (2010), Farkas és munkatársai (2013) valamint Kocsubé és munkatársai (2013).

A klímaváltozás és ennek a mezőgazdaságra, pl. a növényi betegségekre gyakorolt hatása, ezen belül is a kórokozó gombák spektrumában bekövetkező várható változások, mind a szakemberek, mind a közvélemény számára kiemelkedő fontosságú területek (Luck és munkatársai, 2011; Pautasso és munkatársai, 2012; Juroszek és Tiedemann, 2013). Ezekre a változásokra megfelelő intézkedési tervekkel, pl. megfelelő kémiai és biológiai növényvédelemmel, kell felkészülnünk (Luck és munkatársai, 2011).

3.2.3. A mikotoxintermelés gombaéletteni és ökológiai jelentősége

A mikotoxintermelés gombaéletteni és ökológiai jelentősége sokrétű, amit többféle elmélet támaszt alá. Ezek közül kiemelkedik a Mikotoxin Bioszintézis Oxidatív Stressz Elmélete („Oxidative stress theory of mycotoxin biosynthesis”; Reverberi és munkatársai, 2010). Ezen elmélet azon megfigyeléseket foglalja össze, melyek oxidánsok, pl. lipid-peroxidok szerepét igazolták a toxintermelés kiváltásában. A mikotoxinok élettani szerepe így a gombasejtek reaktív oxigén részecskék („reaktive oxygen species”, „ROS”) elleni védelmében, illetve detoxifikációs folyamataiban lehet (Reverberi és munkatársai, 2010). Az aflatoxintermelés szabályozásán túlmenően a legutóbbi kutatások szintén igazolták az oxidatív stressz szerepét az alábbi szekunder metabolitok termelésének megindításában: citrinin – *Penicillium verrucosum* (Schmidt-Heydt és munkatársai, 2015), valamint lovasztatin – *Aspergillus terreus* (Miranda és munkatársai, 2014). Emellett egy adott élőhelyen a mikotoxinok termelése segítheti a termelő gombát a más organizmusokkal való kommunikációban, továbbá hatékony fegyver is lehet az élőhely megvédésében, pl. a kompetítor mikroorganizmusok szaporodásának a gátlása révén (Hymery és munkatársai, 2014). A mikotoxinok termelése megkönnyítheti kedvezőtlen környezeti hatásokhoz, pl. nagy sókoncentrációkhoz, való adaptációt is (Schmidt-Heydt és munkatársai, 2012, 2013; Hymery és munkatársai, 2014). Az is jól ismert, hogy a mikotoxint termelő gombák jobban védettek az adott élőhelyen élő organizmusokkal, pl. gombaevő ízeltlábúakkal, szemben (Rohlf és munkatársai, 2007).

A patogén gombák megtelepedését, a szövetek kolonizációját a mikotoxinok segíthetik, pl. az ochratoxin A, amit egyes *Aspergillus* és *Penicillium* fajok termelnek, nekrotikus léziókat hoz létre *Arabidopsis thaliana* leveleken. Peng és munkatársai (2010) vizsgálatai szerint az ochratoxin A oxidatív „burst”-öt indukált, stimulálta a lipid-peroxidációt, miközben represszálta az antioxidáns védelmi rendszer elemeit *Arabidopsis thaliana*-ban. Bőséggel vannak további kísérleti adatok a gombatoxinok magvak csírázását gátló, apoptózist kiváltó, növényi szövetet nekrotizáló hatásáról, ami mind hozzájárul a gombák növényi szövetekben való inváziójához (Pusztahelyi és munkatársai, 2015).

3.2.4. Szekunder metabolitok, köztük mikotoxinok, a gomba-növény interakciókban

A mikotoxinok élettani szerepére vonatkozóan új megközelítési lehetőségeket adhatnak azok a kísérleti eredmények, amelyek igazolták, hogy a növénypatogén gombákban a mikotoxintermelést oxidatív stressz indukálhatja, pl. a *Fusarium graminearum* „B” típusú trichotecének termelésekor is (Ponts és munkatársai, 2006; Nobili és munkatársai, 2014). Így nem meglepő, hogy ezen veszedelmes toxinok bioszintézisét antioxidáns hatású fenollokkal csökkenteni lehetett (Bakan és munkatársai, 2003; Boutigny és munkatársai, 2009). Említésre méltó, hogy Chitarrini és munkatársai (2014) összefüggést találtak a pohánka (hajdina) fajok (*Fagopyrum* spp.) antioxidáns-termelőképesége és a növények *Aspergillus falvus* toleranciája továbbá, ilyen módon, a magvak aflatoxin kontaminációjának a mértéke között.

A növénypatogén gombák esetében a szekunder metabolitok termelése része lehet a gombák hiperszenzitív válaszához („oxidative burst”) történő adaptációjának is (Montibus és munkatársai, 2013; Pusztahelyi és munkatársai, 2015). Ekkor a mikotoxin molekulák a kémiai szerkezetükből adódó antioxidáns karakterük (Reverberi és munkatársai, 2010; 3.2.3. és 3.2.6. fejezetek) és/vagy virulenciafaktor jellegük folytán segíthetik a gomba túlélését, valamint a növényi szövetekben folyó inváziós növekedést (Montibus és munkatársai, 2015; Pusztahelyi és munkatársai, 2015). A növény oldaláról pedig egyes antioxidánsok, mindenekelőtt fenolos jellegű vegyületek (Reverberi és munkatársai, 2010; 3.2.6. fejezet), gátolhatják az invazív gombák mikotoxintermelését, ami kiváló biokontroll lehetőséget is biztosíthat a számunkra a

növények antioxidáns termelésének a modulálása révén (Atanasova-Penichon és munkatársai, 2012).

A növénypatogén gombák által termelt szekunder metabolitok között, a mikotoxinok mellett, meg kell említenünk a fitotoxinokat is (Pusztahelyi és munkatársai, 2015). Ezek a toxinok változatos kémiai szerkezetűek és élettani hatásúak, ugyanakkor a patogének virulenciája szempontjából is nagy jelentőségük van (Pusztahelyi és munkatársai, 2015). Ilyen például a poliketid szerkezetű T-toxin, amit a *Cochliobolus heterostrophus* kukoricapatogén gomba termel, és amely mitokondriumkárosodást okoz (Rhoads és munkatársai, 1995; Inderbitzin és munkatársai, 2010).

Szintén említést érdemel, hogy a gombákhoz hasonlóan a növények is a szekunder metabolitok széles spektrumát állítják elő (Pusztahelyi és munkatársai, 2015). Ezek között nagy számban vannak gombaellenes hatású anyagok, pl. fenolos vegyületek, szaponinok (glikozidok triterpénvázas vagy szterinvázas, szapogeninnek nevezett aglikonnal) és terpének (pl. a kukorica által termelt zealexinek, többek között *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* és *Rhizopus microsporus*-ellenes hatással; Huffaker és munkatársai, 2011). Egyes növényi szekunder metabolitok termelését szintén biotikus és abiotikus stresszhatások váltják ki; ilyen metabolitok az antifungális hatású fitoalexinek. A megtámadott növények stresszválaszának a szabályozásában a szalicilsav, jázminsav és etilén fitohormonok játszanak kitüntetett szerepet (Heil és Bostock, 2002; Pieterse és munkatársai, 2009). Vannak az egészséges növények által konstitutíve termelt antimikrobiális hatású vegyületek is, ezek a fitoanticipinek (Pusztahelyi és munkatársai, 2015).

Partida-Martinez és Hertweck (2005) megfigyelése szerint egy rizspatogén *Rhizopus* faj rhizoxin fitotoxin-termeléséért nem maga a gomba, hanem a vele endoszimbiózisban élő *Burkholderia* baktérium a felelős. Azaz lehetséges, hogy bizonyos esetekben a gomba-növény interakció vizsgálatokat egy fontos harmadik, baktérium, partnerrel is ki kell egészítenünk (Partida-Martinez és Hertweck, 2005).

3.2.5. Mikotoxinok a táplálékláncban

A mikotoxinok tehát tipikusan a toxintermelő gombák elszaporodása és a toxintermelés biotikus és abiotikus faktorok által történő indukciója nyomán (3.2.3., 3.2.4. és 3.2.6. fejezetek) kerülnek a mezőgazdasági terményekbe, majd az ezeket elfogyasztó állatok révén jutnak a táplálékainkba, pl. a tejtermékekbe (Hymery és munkatársai, 2014), ahol ezek fel is dúsulhatnak. Például az aflatoxin M₁ nagyobb koncentrációban figyelhető meg a sajtban, mint a felhasznált tejben, mert jól kötődik a kazeinhez (Manetta és munkatársai, 2009; Cavallarin és munkatársai, 2014). Emellett mikotoxinok kerülhetnek még be az élelmiszerekbe azok penészgomba-kontaminációja révén is (Hymery és munkatársai, 2014). Jelenleg élénken tanulmányozott terület az élelmiszerek érlelésekor alkalmazott *Penicillium* fajok (*Penicillium roqueforti* és *Penicillium camemberti*) szekunder anyagcsere termékeinek, illetve ezek élettani hatásának a felderítése (Hymery és munkatársai, 2014; Fontaine és munkatársai, 2015).

3.2.6. A mikotoxinok termelésének a szabályozása

A gombák mikotoxintermelése függ a környezeti paramétereiktől, illetve ezek változásaitól. A környezeti paraméterek egy részéről igazolták, hogy a mikotoxintermelést indukálják, illetve stimulálják, ezek közül ki szeretném emelni a környezeti stresszhatások, a fény, a tápanyag-ellátottság, egyes környezeti faktorok és a gazdaszervezettel való kölcsönhatások szerepét, amelyek hatását részletesen tárgyalja két összefoglaló munka is (Reverberi és munkatársai, 2010; Pusztahelyi és munkatársai, 2015).

Környezeti stressz, ezen belül oxidatív stressz

A fonalas gombák morfológiai változásait, pl. a konidiumtartók és egyéb spóratermelő képletek kialakulását, reaktív oxigén részecskék („reactive oxygen species”, „ROS”) átmeneti felhalmozódása előzi meg. Ez a stimulus felelős a szekunder metabolitok, pl. mikotoxinok, bioszintézisének az iniciálásáért is. Oxidánsok, pl. lipid-peroxidok, a mikotoxintermelést stimulálják, míg antioxidánsok, pl. *Lentinula edodes* (shiitake) extraktum, továbbá a növényi eredetű kávésav, flavonoidok és fenolsavak gátolják azt. Szép példa erre az *Aspergillus parasiticus* aflatoxintermelése. A *Fusarium* toxinok, pl. trichotecének, dezoxi-nivalenol

(DON), szintézisét a H_2O_2 és diamid stimulálják, míg a kataláz represszálja. A búzában található ferulinsav pedig gátolja a *Fusarium* fajok DON, 15-acetil-dezoxi-nivalenol és fuzarenon termelését, továbbá az *A. flavus* és *A. parasiticus* fajok aflatoxintermelését is. További, mikotoxin szintézist gátló antioxidánsok még a rezveratrol, kvercetin és az umbelliferon (Reverberi és munkatársai, 2010).

Fény

A fény az aszexuális spórázásnak, míg a sötét a szexuális spórázásnak és a szekunder metabolitok, pl. a szterigmatocisztin termelésnek kedvez a modellszervezet *Aspergillus nidulans*ban. A fény általi szabályozás középpontjában a sejtmagban megfigyelhető „velvet” proteinek, továbbá az ezek és a LeaA metiltranszferáz-domén fehérje által létrehozott komplexek, köztük a VelB-VeA-LaeA trimer „velvet” komplex áll. Az első leírt „velvet” fehérje a VeA volt, melynek a VeA1 mutánsa nagymennyiségű aszexuális spórát termel sötétben is, ami a telepnek „velvety”, azaz „bársonyos” karaktert ad. A fényt egy vörös fény fitokróm receptor (FphA) és két kék fény receptor (LreA és LreB) érzékeli, de minden részletében még nem ismert, hogy ezek miképpen hatnak a „velvet” komplex kialakulására. Ugyanakkor a „velvet” komplex kialakulására és élettani szerepére vonatkozóan ma már nagyszámú kísérleti adat található a szakirodalomban főképpen az *Aspergillus nidulans* fonalas gombára vonatkozóan, amelyeket számos kitűnő cikk foglal össze, pl. Bayram és Braus (2012) és Park és Yu (2012) munkái.

A kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy az aszexuális spórázás FluG aktivitást igényel *Aspergillus nidulans*ban, ami az FlbA heterotrimer G-protein regulátor fehérjén keresztül kikapcsolja FadA-GpgA-SfaD G-protein-függő vegetatív növekedési szignált (Park és Yu, 2012). Egyúttal bekapcsolja a FlbE-FlbB-FlbD és FlbC útvonalakat, amelyek aktiválják a BrlA transzkripciósfaktort, a konidiogenezis első központi szabályozó elemét. Ami a „velvet” proteinekkel illeti, a hifákban felhalmozódó VelB-VelB homodimerek pozitívan, míg a fialidokban megfigyelhető VelB-VosA heterodimerek negatívan (negatív „feedback”) hatnak az aszexuális spórázásra. Ugyanakkor a VelB-VosA heterodimerek elősegítik a konidiospórák érését. A VeA-VelB heterodimerek szükségesek a szexuális spórázáshoz, míg a VelB-VeA-LaeA heterotrimer „velvet” komplex a szekunder metabolit

bioszintézis globális szabályozásához. Az FphA vörös fény receptor pozitívan, míg a LreA-LreB kék fény szenzorok negatívan hatnak a konidiogenezisre. Az FphA, LreA és LreB szenzorok, továbbá a VeA fehérje egy fény szabályozó komplexet alkotnak, ami valószínűleg a gomba fő fényérzékelő egysége (Park és Yu, 2012).

Említést érdemel, hogy a VeA ortológ FgVe1 a trichotecén termelés regulátora *Fusarium graminearum*-ban (Jiang és munkatársai, 2011, Merhej és munkatársai, 2012), továbbá a *veA* gén diszrupciója csökkentette ugyanazon növényi patogén DON termelését (Jiang és munkatársai, 2011). A LaeA ortológ Lae1 pedig szintén jelentős szerepet játszik a *Fusarium* fajok szekunder metabolit termelésének a szabályozásában (Wiemann és munkatársai, 2010; Butchko és munkatársai, 2012).

Tápanyag-ellátottság

Bizonyos aminosavak egyes gombákban elősegíthetik, míg másokban gátolhatják egyes mikotoxinok szintézisét. Pl. a triptofán stimulálja az aflatoxin B1 termelést *A. parasiticus*-ban, míg ugyanazon mikotoxin termelését gátolja *A. flavus*-ban (Reverberi és munkatársai, 2010). Érdekes módon a *Fusarium graminearum* DON és a *Fusarium proliferatum* fumonizin termelését a nitrogénéhezés indukálta (Desjardins és munkatársai, 1993; Kohut és munkatársai, 2009), míg az *Aspergillus parasiticus* aflatoxintermelését az ammónia indukálta, míg a nitrát gátolta (Feng és Leonard, 1998; Pusztahelyi és munkatársai, 2015). A szénforrások szerepe, illetve hiánya a mikotoxintermelés szabályozásában szintén nem egyértelmű (Reverberi és munkatársai, 2010). Ugyanakkor Gressler és munkatársai (2015) legújabb kutatási eredményei szerint az *Aspergillus terreus* terrein {fitotoxikus és antifungális hatású, továbbá képes a Fe(III) vegyületek redukálására} termelését a nitrogén- és vaséhezés, valamint a megnövekedett metionin szintek indukálták, ami összhangban van a vegyület feltételezett ökológiai jelentőségével.

Környezeti faktorok és ezek változásai

Általában az enyhe stresszhatások kedveznek a mikotoxintermelésnek tekintettel a hőmérsékletre, vízaktivitásra és pH-ra. Növekedési optimumon pedig általában a primer

metabolizmus kielégítő működése gátolja a szekunder metabolitok képződését. A toxintermelés ideális pH értéke gyakran 4.0 és 5.0 közötti (Reverberi és munkatársai, 2010). Érdeemes megemlíteni, hogy a növények gombafertőzésekkel és a mikotoxinokkal szembeni ellenálló képességét is nagymértékben befolyásolják az egyéb környezeti stresszhatásokkal, pl. szárazsággal, hőstresszel, amelyek a klímaváltozással kapcsolatos abiotikus stresszhatások (3.2.1. és 3.2.2. fejezetek), szembeni tűrőképesség (Fountain és munkatársai, 2014).

A gazdaszervezet hatásai

A szaprofiton szervezetek életmódváltását, benne a mikotoxinok termelését is, a gazdaszervezetből érkező stimulusok is modulálják (Reverberi és munkatársai, 2010; Pusztahelyi és munkatársai, 2015; 3.2.6. fejezet). Ilyenek pl. a gomba oxilipin hatások felváltása növényi oxilipinekével (oxidált polién zsírsavak; Scarpari és munkatársai, 2014). Az *Aspergillus*ok szexuális spórázását *psi* („precocious sexual inducer”) oxilipinek stimulálják. *Aspergillus flavus*ban az oxilipinek felelősek a szkleróciumok és konídiumok populáció denzitás függő (quorum-függő) kialakulásáért („morphology switch”) és az aflatoxintermelés mértékéért (Brown és munkatársai, 2009; Affeldt és munkatársai, 2012). Ezen szabályozást a növényi eredetű lipid-peroxidok modulálhatják (Tsitsigiannis és munkatársai, 2005; Reverberi és munkatársai, 2010; Scarpari és munkatársai, 2014). Így nem meglepő módon az oxilipinek előállításáért felelős növényi lipoxigenázok inaktíválása az adott növény gombafertőzések iránti fogékonyságát fajspecifikus módon növelheti, vagy éppen csökkentheti (Gao és munkatársai, 2009). A növényi oxilipinek szintén befolyásolhatják az adott patogén mikotoxintermelését, pl. kukorica mag oxilipinek helyreállították egy oxilipin termelésben defektes *Aspergillus flavus* mutáns konídiumképző és aflatoxintermelő képességét (Scarpari és munkatársai, 2014). Továbbá különféle búzafajták magvainak csírázásakor a reaktív oxigén részecske és a 9-oxilipin felhalmozódás korrelált a fertőző *Fusarium graminearum* dezoxi-nivalenol termelésével, továbbá az aleuronrétegekben megfigyelhető apoptózissal (Nobili és munkatársai, 2014). Fontos megjegyeznünk, hogy a legújabb vizsgálatok szerint a politelítetlen zsírsavak autooxidációs folyamatai is befolyásolják ezen lipidek mikotoxintermelésre gyakorolt élettani hatását (Yan és munkatársai, 2015).

Érdemes megemlíteni, hogy a mikotoxinok termelésének a környezeti változások által való szabályozása nem egyedi, hiszen pl. a szintén másodlagos anyagcseretermék pigmentek esetében hasonló szabályozási mintázatokat figyelhetünk meg. Megfigyelések szerint, a *Fusarium fujikuroi* vörös pigmentanyagának, a poliketid szerkezetű bikaverinnek, amelynek ráadásul antimikrobiális és emlős tumor sejtvonalakon citotoxikus aktivitása is van, a termelése a nitrogén-ellátottság és a pH által is szabályozott (Wiemann és munkatársai, 2009; Kohut és munkatársai, 2010).

3.2.7. Az aflatoxintermelés molekuláris szintű szabályozása *Aspergillus flavus*ban

Az aflatoxin génklaszter körülbelül 30 különböző génből áll, melyek a 3. kromoszóma telomer régiójához közel található. Az első fontos köztitermék, a norzolorinsav szintéziséhez zsírsav szintáz (*aflA*, *aflB*) és poliketid szintáz (*aflC*) gének szükségesek, majd ebből az intermedierből további enzimek hozzák létre a szterigmatocisztint (ez a végtermék *A. nidulans*ban), majd ebből az aflatoxint (Amaike és Keller, 2011). Emellett megfigyelhetők még szabályozó elemek, köztük az AflR útvonal specifikus regulátor, továbbá az AflS, ami valószínűleg AflR koaktivátor. Ami a szekunder metabolit termelés globális szabályozását illeti, a LaeA („loss of *aflR* expression”) fehérje globális regulátora a szekunder metabolit szintézisnek, továbbá a VelB-VeA-LaeA „velvet” komplex részeként a kromatin szerkezet módosításában vehet részt a metiltranszferáz aktivitása révén. *Aspergillus nidulans*ban a bZIP („Basic Leucine Zipper”) típusú transzkripciós faktor RsmA („remediation of secondary metabolism”) túltermeltetése vissza tudta állítani a $\Delta laeA$ és ΔveA mutánsok ST termelését (Amare és Keller, 2014).

3.2.8. Az oxidatív stressz bZIP-típusú transzkripciós faktorokon át hathat a szekunder metabolit termelésre

Érdekes módon, bár az RsmA bZIP-típusú transzkripciós faktor génjének a deléciója, illetve fokozott expressziója a várakozásnak megfelelően nagymértékben befolyásolta az *A. nidulans* ST termelését, ugyanakkor nem befolyásolta annak oxidatív stressztoleranciáját (Yin és munkatársai, 2013). Ugyanakkor a *napA*, egy másik bZIP-típusú transzkripciós faktort kódoló gén, fokozott expressziója csökkentette az ST termelést és askospóráképzést, ugyanakkor

jelentősen megnövelte a konídiumok képzését és az *A. nidulans* oxidatív stressz toleranciáját. A *napA* gén deléciója oxidatív stressz érzékeny fenotípusokat eredményezett (Yin és munkatársai, 2013). Valószínűsíthető tehát, hogy a környezeti stresszhatások, köztük az oxidatív stressz, bZIP-típusú transzkripciós faktorokon keresztül hatnak a szekunder metabolit termelésre a különböző *Aspergillus* fajokban (Reverberi és munkatársai, 2010; Yin és munkatársai, 2013; Amare és Keller, 2014). Ugyanakkor lehetséges a bZIP-típusú faktor fehérjék kölcsönhatása is, bár FRET analízis igazolta, hogy a bZIP-típusú transzkripciós faktorok között homodimerizáció lehet a preferált kölcsönhatási forma *A. nidulans*-ban (Yin és munkatársai, 2013).

Annak érdekében, hogy megfelelő modellt hozhassunk létre az *Aspergillus* fajok szekunder metabolit termelésének oxidatív stressz által történő szabályozásának a mélyebb megértésére, röviden meg kell ismerkednünk az élesztők oxidatív stresszválasz rendszerével, illetve annak szabályozásával. Bár nagy az evolúciós távolság a *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztők, mint általánosan használt gomba modellszervezetek, valamint a mikotoxinokat termelő *Aspergillus* fonalas gomba fajok között, az élesztőalapú modellek mindmáig a legkedveltebb eszközök más gombák stresszválasz rendszerének a megismerésében (Miskei és munkatársai, 2008).

3.2.9. Az oxidatív stresszválasz *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben

A pékélesztő stresszválasz rendszerére vonatkozóan számos összefoglaló közlemény érhető el, például a de la Torre-Ruíz és munkatársai (2010) által írt munka. Az élesztő főbb stresszválasz elemei a következők: Az oxidatív stressz aktiválja a Yap1 protein kinázt, ami elősegíti a Hsf1-Skn7 (Hsf1: hőszokk transzkripciós faktor, Skn7: sejtmagban lokalizálódó válaszregulátor fehérje és transzkripciós faktor, egy kétkomponensű rendszer szabályozó eleme) komplex aktiválódását, ami indukálja a hőszokk gének expresszióját oxidatív stresszhatások esetében. Yap1 szintén foszforilálja az Msn2/4 faktorokat (a környezeti stresszválaszt szabályozó transzkripciós faktorokat), amelyek a sejtmagba transzlokálódnak, és indukálják az általános stresszválasz géneket. Yap1 bZIP-típusú transzkripciós faktor a citoszolban oxidálódik, majd a sejtmagban, az Skn7 válaszregulátorral történő heterodimer képzést követően, indukálja az OXR (oxidatív stressz rezisztencia) géneket. Az oxidatív

stressz meggátolja a TORC1 („target of rapamycin 1”) kináz komplexet (a sejt növekedést fenntartó egyik rendszerének a központi eleme, mely többek között szabályozza a riboszóma biogenezis gének expresszióját is) abban, hogy az Sfp1 transzkripció szabályzó fehérje aktiválása révén indukálja a riboszóma biogenezis (RIBI) géneket.

Ha a szén- és nitrogén-ellátottság megfelelő, akkor az oxidatív stressz elleni védelem erőteljesen csökken az Msn2/4 és Gis1 transzkripció faktorok gátlása miatt, ami a Ras2/PKA, TOR1 és Sch9 protein kináz aktivitásoknak tulajdonítható. Az oxidatív stressz mindezeket a kináz aktivitásokat gátolja, és a Rim15 kinázon át aktiválja az Msn2/4 and Gis1 faktorokat. A *ras2*, *cyr1* és *sch9* géneket érintő mutációk megnövelik a stressztűrést és a kronológiai élettartamot (de la Torre-Ruiz és munkatársai 2010). Részletesebb génfunkciók megtalálhatók a *Saccharomyces* Genome Database adatbázisban (<http://www.yeastgenome.org/>).

3.2.10. *S. cerevisiae* Hog1 MAPK ortológok *S. pombe*ban és az *Aspergillus*okban

A HOG („high osmolarity glycerol”) szignalizációs útvonal különféle stressz szignálokat továbbít mind a sarjadzó, mind a hasadó élesztőkben (Gasch, 2007). A *S. pombe*ban, a Hog1 ortológ Sty1/Spc1 MAPK egy „mindenes” („all-purpose”) mesterregulátora a környezeti stresszválasznak, és az Sty1-target bZIP-típusú transzkripció faktor Atf1 számos stresszválasz gén expresszióját indukálja. Említést érdemel, hogy *Aspergillus*okban egy robosztus és komplex stresszválasz rendszer részeként mind sarjadzó élesztő mind hasadó élesztő típusú stresszválasz elemek megtalálhatók egyidejűleg. Így például az Atf1 (*S. pombe*) ortológ AtfA (bizonyos *Aspergillus* fajokban AtfB is) valamint a Yap1 (*S. cerevisiae*) és Pap1 (*S. pombe*) ortológ NapA bZIP-típusú transzkripció faktorok, továbbá az Skn7 (*S. cerevisiae*) és Prr1 (*S. pombe*) ortológ SrrA válaszregulátor fehérje, végül a Hog1 (*S. cerevisiae*) és Sty1 (*S. pombe*) ortológ HogA (vagy SakA) mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), de az általános kép inkább „hasadó élesztőszerű” (Miskei és munkatársai, 2008).

3.2.11. A transzkripció faktorok szabályzó hálózata regulálja az *Aspergillus* oxidatív stresszválaszát és szekunder anyagcseréjét

Az aflatoxint termelő *Aspergillus parasiticus*ban legalább 4 transzkripció faktor, AtfB, MsnA, SrrA és AP-1 (ebben a gombában a sarjadzó élesztő Yap1 ortológja) meghatározó szerepet játszik az oxidatív stresszválasz, valamint a szekunder metabolitok termelésének az együttes szabályozásában (Hong és munkatársai, 2012). Az AtfB bZIP-típusú transzkripció faktor, ami a CRE („cAMP response element”, cAMP-válasz elem) kötőhelyhez kapcsolódik mind az oxidatív stresszválasz gének mind az aflatoxin bioszintézis gének promóter régióiban, talán más bZIP-típusú faktorial, pl. AtfA, heterodimert tud képezni ebben a fajban, hasonlóan az *S. pombe*ban megfigyelhető Atf1-Pcr1 kölcsönhatáshoz. Az AP-1 hatása lehetséges, hogy az SrrA válasz regulátorral (Skn7 és Prr1 a megfelelő *S. cerevisiae* és *S. pombe* ortológok) való asszociáció révén érvényesül csakúgy, mint *S. cerevisiae*ben a megfelelő ortológ fehérjék esetén (Skn7-Yap1 interakció igazolt oxidatív stressz alatt). SrrA kötőhelyeket azonosítottak mind a stresszválasz, mind az aflatoxin bioszintézis gének promótereiben. Az MsnA (Msn2/4 ortológ transzkripció faktor, ami a STRE („stress response element”), azaz stresszválasz elemekhez kapcsolódik a stresszválasz gének és az aflatoxin szintézis génjei promóter régióiban) pedig segítheti az AtfB kötődését. Ezt követően az AtfB segíti az AfIR aflatoxin bioszintézis útvonal specifikus regulátor fehérje kapcsolódását, továbbá AP-1 is elősegítheti az AfIR indukcióját. Mint azt fentebb már említettem, az AfIR transzkripció faktor egy jól ismert pozitív szabályzója az aflatoxin bioszintézisnek. Lehetséges, hogy az aflatoxin bioszintézis egy kései válasz az oxidatív stresszhatásokra (Hong és munkatársai, 2012)?

Az eddigi megfigyelések alapján a következő főbb szabályzási lépéseket tételezhetjük fel mind az oxidatív stresszválasz mind pedig az aflatoxin bioszintézis gének indukciójakor: (i) cAMP-PKA (cAMP – protein kináz A) szignalizációs útvonal ROS általi repressziója elősegíti az MsnA kötődését az adott promóter régiókhoz, (ii) a SakA/HogA MAPK szignalizáció az AtfB transzkripció faktor és az SrrA válaszregulátor kötődését eredményezi és, az antioxidatív védelem aktiválását követően, (iii) az MsnA, AtfB és az SrrA-AP-1 heterodimer együtt indukálják az aflatoxin bioszintézisét és az oxidatív stresszválaszt (Hong és munkatársai, 2012).

3.2.12. Az *A. nidulans* AtfA transzkripció faktor élettani szerepe

Eddigi kísérleteink szerint az *A. nidulans* AtfA fehérje igazi funkcionális ortológja a hasadó élesztő Atf1-nek, amint azt egy *S. pombe* $\Delta atf1$ törzsben végrehajtott komplementációs kísérletek igazolták (Balázs és munkatársai, 2010). Ezen túlmenően mind az oxidatív, mind az ozmotikus stresszválasz rendszer fontos elemeinek az expresszióját szabályozza az *A. nidulans* AtfA. Ezzel is magyarázható, hogy az *atfA* gén deléciója oxidatív stresszre érzékeny fenotípusokat eredményezett *A. nidulans*ban (Balázs és munkatársai, 2010). Ugyanakkor az *A. nidulans*ban a kiválasztott *S. pombe* általános környezeti stresszválasz gén ortológok AtfA általi regulációja inkább volt stressztípus specifikus, sem mint általános stresszreszponzív. Ezek a megfigyelések nem támasztják alá azt a feltételezést, hogy a hasadó élesztőre hasonló általános környezeti stresszválasz létezne *A. nidulans*ban (Balázs és munkatársai, 2010).

Mint azt Hagiwara és munkatársai (2009) kísérleteikben megmutatták, az AtfA transzkripció faktor a HogA (SakA) MAPK-tól „down-stream” helyezkedik el, és szabályozza a szorbit és fludioxonil expozíciók által kiváltott ozmotikus stresszválaszt. Lara-Rojas és munkatársai (2011) kísérletei pedig arra hívták fel a figyelmet, hogy a SakA-AtfA rendszer mellett, hogy oxidatív stressztoleranciát biztosít a gomba számára, szintén felelős a konídiumtartók és konídiumok megfelelő stressztoleranciájáért is.

3.2.13. A szekunder anyagcsere oxidatív stressz általi történő globális transzkripció szabályozása *A. nidulans*ban – teljes genomi DNS chippel nyert adatok elemzése

Munkatársaimmal elvégeztük az *A. nidulans* gomba transzkriptom változásainak a tanulmányozását teljes genomi DNS chipek felhasználásával különféle oxidatív stresszhatásoknak kitett kontroll és $\Delta atfA$ deléciós mutáns tenyészetekben (Emri és munkatársai, 2015). Főbb megállapításaink a szekunder metabolit bioszintézis génklaszterek oxidatív stressz által történő szabályozására vonatkozóan a következők voltak:

A kontroll törzsben 41 szekunder metabolit génklaszter bizonyos számú génje indukálódott vagy represszálódott különböző stressz körülmények között. Gyakran csak egy vagy két gén expressziója változott meg stresszhatásra egy-egy klaszterben, de voltak nevezetes kivételek.

- Például az AN7884 klaszter esetében 13 génből 7 indukálódott oxidatív stresszhatásokra, amiből ötnek az expressziója menadion-nátrium-biszulfit („menadione sodium bisulfite”, MSB; megnöveli a sejtek szuperoxid tartalmát) stresszre nőtt meg. Említést érdemel, hogy egy gént a diamid {kémiaailag 1,1'-azobisz(*N,N*-dimetil-formamid), ami a glutationt sztöchiometrikusan oxidálja glutation-diszulfiddá, miközben felborul a sejtek glutation/glutacion-diszulfid redox egyensúlya} kezelés represszált.

- A terrikinon (anti-tumor aktivitással bíró vegyület) klaszterben 3 gén az 5 közül indukálódott *tert*-butil-hidroperoxid (*t*BOOH, felgyorsítja a sejtek lipid-peroxidációját) jelenlétében.

- Az emericellamid (antibiotikum) klaszter vizsgálatokor 3 gén (*easA*, *easB* and *easD*) a klaszter 5 génjéből represszáldott MSB, *t*BOOH és diamid expozíciók alatt, továbbá az *easA* és *easB* gének szintén represszáldottak H₂O₂ (75 mM) és NaCl kezelések esetében.

Összességében megállapítottuk, hogy 21 klaszter génjei indukálódottak, 7 klaszteré pedig represszáldottak, míg 13 klaszter esetében egyes gének indukálódottak vagy represszáldottak, vagy ezek indukciója vagy repressziója stresszfüggőnek bizonyult. Azaz az oxidatív stresszhatások bizonyos szekunder metabolit bioszintetikus géneket inkább indukáltak, míg másokat inkább represszáltak, ami a Mikotoxin Bioszintézis Oxidatív Stressz Elméletét („Oxidative stress theory of mycotoxin biosynthesis”; Reverberi és munkatársai, 2010; 3.2.3, 3.2.4. és 3.2.6. fejezetek) csak részben támasztja alá. A szterigmatocisztin génklaszter (*stc*) esetében sem tudunk a gének indukcióját és represszióját illetően egyértelmű tendenciákat megállapítani.

Az *AtfA* hatását figyelembe véve, az *atfA* deléciója számos klaszter, pl. az *xptA*-t tartalmazó, AN8504, *dba* és F9775 hibrid, továbbá az *mdp* és *pkf*, bizonyos génjei indukcióját váltotta ki, míg az AN2924 klaszter 3 génje represszáldott a géndeléció törzsben különféle oxidatív stresszkörülmények esetében. Míg egyes *stc* bioszintézis gének oxidatív stressz által kiváltott indukciója *AtfA*-függőnek bizonyult, addig mások mRNS szintje bizonyos stresszhatások alatt nagyobb volt a kontroll törzs esetében megfigyelt értékeknél (Emri és munkatársai, 2015).

Fontos megjegyeznünk, hogy a szaprofiton *Aspergillus nidulans* esetében megfigyeltekkel (Emri és munkatársai, 2015) szemben a *Botrytis cinerea* és *Fusarium graminearum* Atf1-ortológ transzkripciós faktorai egyértelműen részt vesznek a gombák fitotoxikus metabolitjai, illetve mikotoxinjai termelésének a szabályozásában (Temme és munkatársai, 2012; Van Nguyen és munkatársai, 2013; Miranda és munkatársai, 2015).

A jövőben mindenképpen szükséges a mikotoxintermelés átfogóbb, akár további „omikai” eszközök bevonásával történő, tanulmányozása, továbbá a nyert adathalmazok rendszerbiológiai szemléletű feldolgozása (Subramaniam és Rampitsch, 2013).

3.2.14. A mikotoxinok káros élettani hatásai emlősökön és embereken

Sok információnk van az egyes mikotoxinok élettani, továbbá sejt- és szövetkárosító hatásaira vonatkozóan, pl. közzismert az aflatoxinok és a szterigmatocisztin májkárosító, hepatokarcinogén hatása, a citrinin nefrotoxicitása, a patulin idegrendszert és tüdőt károsító hatása, a vomitoxin (dezoxi-nivalenol) táplálkozásra gyakorolt negatív hatásai, vagy a zearalenon hiperösztrogén effektusai. További értékes információk számos összefoglaló cikkben fellelhetők, pl. Zaki és munkatársai (2012), valamint Oliveira és munkatársai (2014) közleményében. A *Fusarium* mikotoxinok *in vivo* toxicitásának (szubakut toxicitás, szubkrónikus toxicitás, akut toxicitás, toxikokinetikai vizsgálatok, teratogenicitás, stb.) a vizsgálatára alkalmas állatmodellekről (sertés, patkány, baromfi, egér) Escrivá és munkatársai (2015) összefoglaló cikkében olvashatunk alapos elemzést.

3.2.15. Egészségügyi határértékek mikotoxinokra és az EU-ban eddig mért legmagasabb értékek

Az Oliveira és munkatársai (2014) közleménye azért is nagyon hasznos, mert megtalálhatjuk benne a jelenleg érvényes, élelmiszerekre vonatkozó EU határértékeket, és az eddig mért legnagyobb mikotoxin koncentrációkat is. Például aflatoxin B1-re a határérték $2 \mu\text{g kg}^{-1}$, míg a gabonaalapú csecsemőételekre $0,10 \mu\text{g kg}^{-1}$, de a legnagyobb megfigyelt értékek rizsben $34,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, nassolnivalókban („snacks”) $23 \mu\text{g kg}^{-1}$, a bébiétel gabonafélékben pedig $3,11 \mu\text{g kg}^{-1}$ volt. A világ országaiban ezek a határértékek nagymértékben eltérhetnek, míg pl. az

aflatoxin M1 legnagyobb megengedett mennyisége az EU-ban $0,025-0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701>), addig ugyanez a határérték az USA-ban $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (<https://www.ngfa.org/wp-content/uploads/NGFAComplianceGuide-FDARegulatoryGuidanceforMycotoxins8-2011.pdf>).

3.2.16. A mikotoxinokat termelő gombák és ezek mikotoxintermelésének a prevenciója

Kétségtelenül, a mikotoxinokkal kapcsolatos technológiai lehetőségek közül a leghatékonyabbak a termelést megelőző, prevenciós lépések, melyek három csoportba, elsődleges, másodlagos és harmadlagos prevenció, sorolhatók (Atanda és munkatársai, 2012).

Elsődleges prevenció: A gombafertőzések és mikotoxin-kontaminációk előtti prevenciós lépések. Ebbe a körbe tartozik a gombarezisztens termesztett növények nemesítése, a kiültetett növények gombafertőzésének a megakadályozása, megfelelő ütemtervek elkészítése a betakarítás előtti, a betakarítási és a betakarítás utáni időszakokra, a növényi magvak nedvességtartalmának a csökkentése a betakarítás után és a tárolás alatt, alacsony hőmérsékleten történő tárolás, fungicidek és tartósítószer alkalmazása a gomba növekedés gátlására továbbá a rovarkártételek mérséklésére.

Másodlagos prevenció: A potenciális mikotoxintermelő gombák inváziója korai fázisában szükséges lépések. Ilyenek a fertőző gombák növekedésének a megállítása a termények ismételt kiszárításával, a fertőződött magvak eltávolítása, a szennyező mikotoxinok inaktiválása és detoxifikálása, végül a tárolt termények védelme a gombafertőzés terjedését elősegítő körülményektől.

Harmadlagos prevenció: A gombafertőzés és a mikotoxin-kontamináció előrehaladott fázisában a cél a gombafertőzés terjedésének a gátlása, valamint a kontaminálódott termény táplálékláncba való bejutásának a megakadályozása. Ekkor már csak nagyon kevés lehetőség közül választhatunk, lényegében az elszennyeződött terméket megsemmisíthetjük, illetve szóba kerülhet még a mikotoxinok detoxifikálása, valamint az elérhető legnagyobb mértékben történő lebontása.

A gombanövekedés kontrolljára számos lehetőség kínálkozik a különböző prevenciók szinteken, pl. szárítás, alacsony hőmérséklet és nedvességtartalom biztosítása, a rovarok és más állatok távoltartása, γ -besugárzás, kezelés szintetikus fungicidekkel, szerves savakkal (pl. ecetsav, propionsav, vajsav, malonsav, benzoésav, tejsav, citromsav), NaCl-dal, benzoésav származékokkal, kálium-szulfittal és –fluoriddal, fumigáció ammóniával és foszfinnel, kezelés növényi származékokkal, pl. allicin és rokon vegyületek foghagymából és hagymából, fahéj extraktummal, szegfűszeg-olajjal, továbbá kakukkfű, ánizs és bors magokkal, illetve rákpáncélból készült kitozán preparátummal (Atanda és munkatársai, 2012).

A mikotoxinok dekontaminálására is számos technológiát dolgoztak ki, pl. kezelések ecetsavval, ammóniával, kalcium-hidroxiddal, formaldehiddel, hidrogén-peroxiddal, ózonnal, metilamminnal, foszforsavval, foszfinnel, nátrium-bikarbonáttal, nátrium-biszulfittal és nátrium-hipoklorittal (Atanda és munkatársai, 2012; Zaki és munkatársai, 2012). Bár a mikotoxinok dekontaminálására és inaktiválására már eddig is számos fizikai, extrakciós, adszorpciós, kémiai és biológiai lebontási technológiát fejlesztettek ki, a legígéretesebb az állatok takarmányának a szupplementálása a mikotoxinokat megkötő, valamint a felszívódásukat gátló, nem emészthető szorbensekkel, pl. agyagásványokkal (bentonitok) (Zaki és munkatársai, 2012; Vekiru és munkatársai, 2015).

A mikotoxinok biológiai lebontási technológiája a jövőben élesztők (Pfliegler és munkatársai, 2015) továbbá Actinobacteria fajok (pl. *Rhodococcus* fajok; Cserhádi és munkatársai, 2013) felhasználásával minden bizonnyal hatékonyabbá tehető majd.

3.2.17. A mikotoxinokat termelő gombák biológiai kontrollja

A világon számos olyan készítmény van kereskedelmi forgalomban, főképpen amerikai és német gyártóktól, melyek vagy egy adott gomba (pl. *A. flavus*) egy adott toxint (pl. aflatoxint) nem termelő változatát, mutánsát, vagy adott gombapatogének növekedését gátló mikoparazitát (pl. *Ampelomyces quisqualis*), élesztőt (pl. *Candida oleophila*) vagy baktériumokat (pl. *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*) tartalmaz (de Medeiros és munkatársai, 2012; Formenti és munkatársai, 2012). A

toxintermelő gombák csoportjai szerint biológiai kontrollra alkalmas mikrobák csoportjai: aflatoxint termelő *Aspergillus* fajok ellen: atoxigenikus *Aspergillus* törzsek, tejsavbaktériumok, aflatoxinokat lebontó gombák, ochratoxin A-t termelő *Aspergillus* fajok, pl. *A. carbonarius*, ellen: a filloszféra élesztői, pl. *Aureobasidium pullulans*, fumonizint és dezoxi-nivalenolt termelő *Fusarium* fajok, pl. *F. verticillioides*, *F. graminearum* és *F. culmorum* ellen: *Fusarium equiseti*, *Bacillus* fajok, *Pseudomonas* fajok, *Kluyveromyces* élesztők, *Penicillium expansum* ellen: *A. pullulans*, *P. syringae*, *Candida sake* és *Pantoea agglomerans* (egy Gram-negatív baktérium, Enterobacteriaceae család) (Tsitsigiannis és munkatársai, 2012). Az egy adott toxinra, pl. aflatoxinra, nézve atoxigenikus törzsek biokontroll technológiai használatakor meg kell vizsgálnunk, hogy az adott törzsek más kémiai szerkezetű mikotoxinokból mennyit termelnek (King és munkatársai, 2011).

3.2.18. A mikotoxinokat termelő gombák biológiai kontrollja – jövőbeni lehetőségek

Az ismert, biológiai kontroll technológiákban felhasználható mikroorganizmusok közül ki szeretném emelni a tejsavbaktériumokat és élesztőket, mint jövőbeni mikotoxin prevenció és mentesítő technológiák ágenseit.

A tejsavbaktériumok GRAS („Generally Recognised as Safe”, USA; „általában biztonságosnak ítélt”) és QPS („Qualified Presumption of Safety”, EU; „vélelmezett biztonságos”) besorolásúak, ami a technológiai felhasználtság szempontjából meghatározó jelentőségű (Oliveira és munkatársai, 2014). Ezek a baktériumok sok, a gombákkal szemben antagonistá metabolitot termelnek, pl. szerves savakat (tejsav, ecetsav, hangyasav, propionsav, vajsav, fenil-tejsav és származékai), antagonistá vegyületeket (CO_2 , etanol, H_2O_2 , zsírsavak, acetoin, diacetil), antifungális hatású vegyületeket (propionát, fenil-laktát, hidroxifenil-laktát, ciklikus dipeptidok, 3-hidroxi-zsírsavak), továbbá a baktériumokkal szemben bakteriocionokat. A gombaellenes hatáshoz hozzájárulnak még a pH csökkentése, a gomba kiszorítása jó növekedési ráta révén a szubsztrátmátrixból, valamint a gombaspórák membránszerkezetének (viszkozitás, permeabilitás) megváltoztatása. A tejsavbaktériumok igen sok élőhelyen képesek elszaporodni, miközben megőrzik a széles spektrumú gombaellenes aktivitásukat (Oliveira és munkatársai, 2014).

Az élesztők biológiai kontroll ágensként történő felhasználása is kecsegtethet sikerrel (Pfliegler és munkatársai, 2015). Néhány élesztő kiválóan képes mikotoxinokat akkumulálni, illetve lebontani. Bizonyos élesztők felhasználhatók biokontroll ágensnek, a mikotoxintermelés gátlására, a toxinok lebontására és adszorpciójára. Ugyanakkor egyes élesztők mikotoxin-érzékenysége gondot jelenthet az élesztőket felhasználó biotechnológiai folyamatokban (3.2.20. fejezet; Pfliegler és munkatársai, 2015).

3.2.19. Az aflatoxinok kontrollja - a jelen és a jövő

Az aflatoxinok nevezetes rákkeltő hatású szekunder metabolitok, melyek sikeres kontrollja nagy élelmiszertudományi jelentőséggel bír. A szakirodalomban nagyszámú közlemény számol be sikeres próbálkozásokról az aflatoxin szennyezések megakadályozására, illetve kontrolljára vonatkozóan (Roze és munkatársai, 2013). A legígéretesebb technológiák és a jövőbeni lehetséges technológiafejlesztési lehetőségek a következők: Bt kukorica termesztése a rovarvektorok korlátozására (fumonizin ellen is), előfertőzés aflatoxint nem termelő *A. flavussal* (vigyázat, más mikotoxinokat még nagyobb koncentrációban termelhet!), aflatoxint adszorbeáló agyag (pl. NovaSil) bevétele az étkezések előtt, továbbá növényi illékony anyagok felhasználása a mikotoxint termelő gombák kontrolljára (pl. etilén, krotin-alkohol, gyapotlevél illékony anyagok, *Aspergillus*-rezisztens kukorica által termelt illékony anyagok, fűzfakéreg illékony anyagai) (Roze és munkatársai, 2013).

Az eddig közölt adatok alapján várható és szükséges a mikotoxintermelést kiváltó, befolyásoló környezeti körülmények további vizsgálata, a mikotoxintermelés génszintű szabályozásának a mélyebb megismerése, hatékony biokontroll organizmusok és technológiák kifejlesztése, mikotoxinok gyors és megbízható kimutatására alkalmas bioszenzorok és analitikai eljárások további fejlesztése. És végül, de nem utolsó sorban, szükséges a mikotoxinok egészségkárosító, pl. citotoxikus, rákkeltő, hatásának a tanulmányozása különféle eukarióta modellszervezetek, köztük élesztők felhasználásával (3.2.18. és 3.2.20. fejezetek).

3.2.20. A mikotoxinok citotoxicitása *S. pombe* modellben – patulin, citrinin

Élesztőmodellben a mikotoxinoknak mind az oxidatív stresszt kiváltó hatása, mind a genotoxicitása kiválóan tanulmányozható és a megszerzett ismeretanyag jól hasznosítható más eukarióta élőlények, sőt az ember tanulmányozásakor (Horváth és munkatársai, 2012; Papp és munkatársai, 2011; Máté és munkatársai, 2014). Másrészt, mint az az 3.2.18. és 3.2.19. fejezetekben már említésre került, az élesztők felhasználhatók a mikotoxinokat képző gombák szaporodásának, valamint a mikotoxinok bioszintézisének a gátlásában, továbbá a mikotoxinok lebontásában és adszorpciójában is (Pfliegler és munkatársai, 2015). Ezen felhasználások elősegítése, valamint az élesztőalapú biotechnológiai folyamatoknak a mikotoxinoktól való hatékony védelme érdekében szükséges további információkat szerezni a mikotoxinok élesztőkre gyakorolt káros élettani hatásairól (Pfliegler és munkatársai, 2015).

A *Schizosaccharomyces pombe* hasadóélesztőben például a patulin expozíciók gyorsan kiürítették a hasadó élesztő glutation raktárait, ami a sejten belüli szuperoxid és peroxid szintek átmeneti megnövekedésével járt. Ezt Pap1p-függő adaptáció követte, ami a specifikus Cu/ZnSOD (réz/cink szuperoxid dizmutáz) és GST (glutation S-transzferáz) aktivitások növekedését foglalta magába (Papp és munkatársai, 2011). A kisebb patulin koncentrációk a *S. pombe* sejtek zsugorodását váltották ki, míg nagyobb koncentrációknál a sejtek mérete megnőtt, ami a nekrotikus sejtpusztulásra jellemző. Ugyanakkor sem a nekrotikus, sem az apoptotikus sejtpusztulásra jellemző sejtbiológiai változásokat nem észleltük az állati sejteknél leírt formában. A mikotoxin ugyanakkor jelentős zavarokat okozott a kromatin kondenzációs folyamatokban (Horváth és munkatársai, 2012).

Egy másik kísérletsorozatban citrinin expozíciók mind a peroxid, mind a glutation koncentrációkat megnövelték *S. pombe*-ben, a Pap1p- és Atf1p-függő adaptáció pedig a specifikus GPx (glutation peroxidáz), G6PD (glükóz-6-foszfát dehidrogenáz) és GST (glutation S-transzferáz) aktivitások növekedését foglalta magába. A citrinin G2/M sejtciklus megállást, a sejtmagok fragmentálódását és apoptotikus sejtpusztulást váltott ki a gomba modellszerzetben (Máté és munkatársai, 2014).

3.2.21. A gomba szekunder metabolit génklaszterek, mint kibontásra váró ékszerdobozok

Napjainkban elementáris igény mutatkozik új típusú, biológiailag aktív molekulák felfedezésére (Demain és Zhang, 2005; Demain, 2014), lásd például a használatban lévő antibiotikumokkal szembeni aggasztó mértékű rezisztenciát (Srinivasan és munkatársai, 2014). Érdekes módon, a gombák szekunder metabolit génklaszterei (Inglis és munkatársai, 2013; 2.2.8. fejezet) között számos transzkripciósan inaktív, úgynevezett „alvó” géncsoport van. Jelenleg fel sem tudjuk mérni azt az értéket, amit ezen klaszterek aktivizálása, azaz „felébresztése” jelenthet a számunkra új kémiai szerkezetű metabolitok megjelenése, szerkezetanalízise és biológiai jellemzése révén. Az „ébresztés” sajnos legtöbbször igen nehéz feladat, mert nem ismerjük azokat a környezeti körülményeket, melyek kiválthatják ezen klaszterek aktivizálódását. Mindazonáltal számos eszköz létezik ezen érdekes kutatások kivitelezésére. Például alvó klasztereket már sikerült aktivizálni epigenetikai módosítások, promótercsere indukálható promóterre, az adott bioszintetikus útvonal specifikus transzkripció faktorának a túltermeltetése, baktériumokkal való együttes tenyésztés, továbbá a tenyésztési körülmények megváltoztatása, pl. oxidatív stressz alkalmazása segítségével (Ahuja és munkatársai, 2012; Yaegashi és munkatársai, 2014).

Maguk a mikotoxinok is felhasználhatók lehetnek elvileg az orvostudományban, pl. kemoterápiás szerekként, amennyiben a támadni kívánt tumor sejtek érzékenysége nagymértéken meghaladja az egészséges sejtekét (Balde és munkatársai, 2010)! Szép példa erre, hogy a biszlongikinolid („bislongiquinolide”) és a dihidro-trichodimerol („dihydrotrichodimerol”) mikotoxinok (*Trichoderma citrinoviride* termeli őket) hatékonyan gátolták hat tumorsejtvonal proliferációját (Evidente és munkatársai, 2014)!

A jövőben tehát várható az, hogy a mikotoxinokról eddig kialakult, joggal negatív kép némileg árnyaltabbá válik, tekintettel a vegyületcsoport esetleges/feltételezett gyógyászati jelentőségére.

3.2.22. Irodalomjegyzék az 3.2. fejezethez

- Affeldt K.J., Brodhagen M. és Keller N.P. (2012) *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on g protein-coupled receptors. *Toxins (Basel)* **4**, 695-717.
- Ahuja és munkatársai (2012) Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8212-8221.
- Amaike S. és Keller N.P. (2011) *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 107-133.
- Amare M.G és Keller N.P. (2014) Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genet. Biol.* **66**, 11-18.
- Atanasova-Penichon V. és munkatársai (2012) Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**, 1605-1616.
- Atanda S.A. és munkatársai (2012) Mycotoxin management in agriculture: a review. *J. Anim. Sci. Adv.* **2**, 250-260.
- Bakan B. és munkatársai (2003) Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J Agric. Food Chem.* **51**, 2826-2831.
- Balázs A. és munkatársai (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genomics* **283**, 289-303.
- Balde E.S. és munkatársai (2010) Investigations of fungal secondary metabolites with potential anticancer activity. *J. Nat. Prod.* **73**, 969-971.
- Bayram O. és Braus, G.H. (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 1-24.
- Borbély M., Sipos P., Pelles F. és Györi Z. (2010) Mycotoxin contamination in cereals. *J. Agriliment. Proc. Technol.* **16**, 96-98.
- Boutigny A.L. és munkatársai (2009) Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol. Res.* **113**, 746-753.
- Brown S.H. és munkatársai (2009) Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of *Aspergillus flavus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**, 882-894.
- Butchko R.A. és munkatársai (2012) Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.* **49**, 602-612.
- Cavallarin L. és munkatársai (2014) Transfer of aflatoxin M₁ from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. *Food Control* **38**, 174-177.
- Chakraborty S. és Newton A.C. (2011) Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathol.* **60**, 2-14.

- Chitarrini G. és munkatársai (2014) Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Int. J. Food Microbiol.* **189**, 1-10.
- Cserhádi M. és munkatársai (2013) Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **166**, 176-185.
- de la Torre-Ruiz M.A. és munkatársai (2010) How budding yeast sense and transduce the oxidative stress signal and the impact in cell growth and morphogenesis. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**, 669-679.
- Demain A.L. (2014) Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 185-201.
- Demain A.L. és Zhang L. (2005) Natural products and drug discovery. *Natural Products*, Szerkesztők: Zhang L. és Demain A.L., Humana Press, Totowa, 3-29. oldalak
- de Medeiros F.H.V. és munkatársai (2012) Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciênc. Agrotec., Lavras* **36**, 483-497.
- Desjardins A.E., Hohn T.M. és McCormick S.P. (1993). Trichothecene 1 biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.* **57**, 595-604.
- Emri T. és munkatársai (2015) Core oxidative stress response (COSR) in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* **16**, cikkazonosító: 478
- Escrivá L., Font G. és Manyes L. (2015) *In vivo* toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: a review. *Food Chem. Toxicol.* **78**, 185-206.
- Evidente A. és munkatársai (2014) Fungal metabolites with anticancer activity. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 617-627.
- Farkas J., Beczner J. és Mohácsi-Farkas, Cs. (2011) Potential impact of the climate change on the risk of mycotoxin contamination of agricultural products in Southeast Central Europe. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*, **4**, 89-96. <http://www.acta.sapientia.ro/acta-alim/C4/alim4-8.pdf>
- Farkas J. és munkatársai (2013) A Kárpát-medence éghajlatváltozásának kihatása élelmiszerbiztonságunkra. *Magyar Tudomány*, 147-158.
- Feng G.H. és Leonard T.J. (1998) Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2275-2277.
- Fontaine K. és munkatársai (2015) Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M₁ mycotoxins in blue-veined cheeses. *Food Control* **47**, 634-640.
- Formenti S. és munkatársai (2012) *In vitro* impact on growth, fumonizins and aflatoxins production by *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus flavus* using anti-fungal compounds and a biological control agent. *Phytopathol. Mediterran.* **51**, 247-256.
- Fountain J.C. és munkatársai (2014) Environmental influences on maize - *Aspergillus flavus* interactions and aflatoxin production. *Front. Microbiol.* **5**, cikkazonosító: 40

- Gao X. és munkatársai (2009) Inactivation of the lipoxygenase ZmLOX3 increases susceptibility of maize to *Aspergillus* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**, 222-231.
- Gasch A.P. (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* **24**, 961-976.
- Gressler M. és munkatársai (2015) Phytotoxin production in *Aspergillus terreus* is regulated by independent environmental signals. *eLIFE* **4**, cikkazonosító: e07861
- Hagiwara D. és munkatársai (2009) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 868-878.
- Heil M. és Bostock R.M. (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann. Bot.* **89**, 503-512.
- Homei A. és Worboys M. (2013) *Fungal Disease in Britain and the United States 1850–2000*, Palgrave Macmillan., Basingstoke
- Hong S.Y. és munkatársai (2012) Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *MicrobiologyOpen* **283**, 289-303.
- Horváth E. és munkatársai (2012) Effect of the fungal mycotoxin on the chromatin structure of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Basic Microbiol.* **52**, 642-652.
- Huffaker A. és munkatársai (2011) Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. *Plant Physiol.* **156**, 2082-2097.
- Hymery N. és munkatársai (2014) Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* **13**, 437-456.
- Inderbitzin P., Asvarak T. és Turgeon B.G. (2010) Six new genes required for production of T-toxin, a polyketide determinant of high virulence of *Cochliobolus heterostrophus* to maize. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 458-472.
- Inglis D.O. és munkatársai (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* **13**, cikkazonosító: 91
- Jiang J. és munkatársai (2011). Involvement of a velvet protein FgVeA in the regulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One* **6**, cikkazonosító: e28291
- Juroszek P. és von Tiedemann Ai. (2013) Plant pathogens, insect pests and weeds in changing global climate: a review of approaches, challenges, research gaps, key studies and concepts. *J. Agric. Sci.* **151**, 163-188.
- King E.D. és munkatársai (2011) An industrial perspective on the use of „atoxigenic” strains of *Aspergillus flavus* as biological control agents and the significance of cyclopiazonic acid. *Toxin Rev.* **30**, 33-41.
- Kocsubé S. és munkatársai (2013) *Aspergillus* species as mycotoxin producers in agricultural products in Central Europe. *J. Nat. Sci, Matrica Srpska Novi Sad*, **124**, 13-25.

Kohut G. és munkatársai (2009) N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonizin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *Int. J. Food Microbiol.* **130**, 65-69.

Kohut G. és munkatársai (2010) Adenylyl cyclase regulates heavy metal sensitivity, bikaverin production and plant tissue colonization in *Fusarium proliferatum*. *J. Basic Microbiol.* **50**, 59-71.

Lara-Rojas F. és munkatársai (2011) *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol. Microbiol.* **80**, 436-454.

Luck J. és munkatársai (2011) Climate change and diseases of food crops. *Plant Pathol.* **60**, 113-121.

Magan N., Medina A. és Aldred D. (2011) Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol.* **60**, 150-163.

Manetta A.C. és munkatársai (2009) Distribution of aflatoxin M₁ during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chem.* **113**, 595-599.

Máté G. és munkatársai (2014) Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicon* **90**, 155-166.

Merhej J. és munkatársai (2012) The velvet gene, *FgVel1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 363-374.

Miedaner T., Cumagun C.J.R. és Chakraborty S. (2008) Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *J. Phytopathol.* **156**, 129-139.

Miranda R.U. és munkatársai (2014) Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biol.* **118**, 979-989.

Miskei M., Karányi Zs. és Pócsi I (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet. Biol.* **46**, S105-S120.

Montibus M. és munkatársai (2015) Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**, 295-308.

Nobili C. és munkatársai (2014) ROS and 9-oxylipins are correlated with deoxynivalenol accumulation in the germinating caryopses of *Triticum aestivum* after *Fusarium graminearum* infection. *Eur. J. Plant Pathol.* **139**, 429-444.

Oliveira P.M., Zannini E. és Arendt E.K. (2014) Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiol.* **37**, 78-95.

Papp G. és munkatársai (2011) Genotoxic chromatin changes in *Schizosaccharomyces pombe* induced by hexavalent chromium (CrVI) ions. *Cellular Effects of Heavy Metals* (Bánfalvi G., Ed.), Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, pp. 179-193.

- Park H.S. és Yu J.H. (2012) Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 669-677.
- Partida-Martinez L.P. és Hertweck C. (2005) Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature Lett.* **437**, 884-888.
- Pautasso M. és munkatársai (2012) Impacts of climate change on plant diseases – opinions and trends. *Eur. J. Plant Pathol.* **133**, 295-313.
- Peng X.L. és munkatársai (2010) Mycotoxin Ochratoxin A-induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **29**, 153-161.
- Pieterse C.M. és munkatársai (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 308-316.
- Pfliegler W.P., Pusztahelyi T. és Pócsi I. (2015) Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.* **55**, 805-818.
- Ponts N. és munkatársai (2006) Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**, 102-107.
- Pusztahelyi T., Holb I.J. és Pócsi I. (2015) Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front. Plant Sci.* **6**, cikkazonosító: 573
- Reverberi M. és munkatársai (2010) Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 899-911.
- Rhoads D.M., Levings C.S. 3rd és Siedow J.N. (1995) URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 437-445.
- Rohlf M. munkatársai (2007) Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biol. Lett.* **3**, 523-525.
- Roze L.V., Hong S.Y. és Linz J.E. (2013) Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **4**, 293-311.
- Scarpari M. és munkatársai (2014) Lipids in *Aspergillus flavus*-maize interaction. *Front. Microbiol.* **5**, cikkazonosító: 74
- Schmidt-Heydt M. és munkatársai (2012) The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiol.* **29**, 233-241.
- Schmidt-Heydt M. és munkatársai (2013) Intraspecific variability of HOG1 phosphorylation in *Penicillium verrucosum* reflects different adaptation levels to salt rich habitats. *Int. J. Food Microbiol.* **165**, 246-250.
- Schmidt-Heydt M. és munkatársai (2015) Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *Int. J. Food Microbiol.* **192**, 1-6.
- Srinivasan A., Lopez-Ribot J.L. és Ramasubramaniam A.K. (2014) Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today Technol.* **11**, 65-71.

Subramaniam R. és Rampitsch C. (2013) Towards systems biology of mycotoxin regulation. *Toxins* **5**, 675-682.

Temme N. és munkatársai (2012) BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 704-718.

Tsitsigiannis D.I. és munkatársai (2005) *Aspergillus* infection inhibits the expression of peanut 13S-HPODE-forming seed lipoxygenases. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 1081-1089.

Tsitsigiannis D.I. és munkatársai (2012) Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathol. Mediterranea* **51**, 158-174.

Van Nguyen T. és munkatársai (2013) The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production, and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **26**, 1378-1394.

Vekiru E. és munkatársai (2015) *In vitro* binding assessment and *in vivo* efficacy of several adsorbents against aflatoxin B₁. *World Mycotoxin J.* **2015**, nyomtatásban, doi: 10.3920/WMJ2014.1800, <http://www.wageningenacademic.com/doi/pdf/10.3920/WMJ2014.1800>

Wiemann P. és munkatársai (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol. Microbiol.* **72**, 931-946.

Wiemann P. és munkatársai (2010) FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol. Microbiol.* **77**, 972-994.

Yaegashi J., Oakley B.R. és Wang C.C. (2014) Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 433-442.

Yan S. és munkatársai (2015) Autoxidated linolenic acid inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* via oxylipin species. *Fungal Genet. Biol.* **81**, 229-237.

Yin W.B. és munkatársai (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-UK*, **159**, 77-88.

Zaki M.M. és munkatársai (2012) Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* **4**, 13-28.

3.3. A gombák által termelt, biológiai és biotechnológiai jelentőségű illékony szerves vegyületek

3.3.1. A gombák által termelt illékony szerves vegyületek („Volatile Organic Compounds”, „VOCs”) – a növényi egészségre ható anyagok

A növényekkel együtt élő baktériumok és gombák számos olyan illékony szerves vegyületet („VOCs”) termelnek, melyeknek jelentős élettani hatásuk van a növényi szervezetre nézve. Ezen illékony anyagok az elmúlt években fokozatosan az érdeklődés középpontjába kerültek, és számos összefoglaló közlemény született az érdekes, biotechnológiai szempontból is hasznosítható vegyületekről, pl. Bitas és munkatársai (2013) révén. Bár ez az összefoglaló munka a bakteriális illékony vegyületekre is kiterjed, ebben és a soron következő fejezetekben elsősorban a gombák vegyületeivel szeretnék foglalkozni a jegyzet célkitűzéseivel összhangban. Mindazonáltal, a vegyületek fontosságára tekintettel, később a talajlakó baktériumok illóanyagainak a legfontosabb tulajdonságait is bemutatom röviden a 3.3.20. fejezetben.

A gombák által termelt illékony anyagok élettani hatásai sokrétűek, vannak köztük olyanok, melyek fokozzák a növények növekedését illetve stressz rezisztenciáját (pl. β -kariofillén), vagy éppen fitotoxikus tulajdonságúak (pl. 1-oktén-3-ol, *transz*-2-oktenál). Mások antimikrobiális hatású vegyületek (pl. α -humulén, 1-butanol, metil-acetát), a termelő saját - vagy más mikrobák - szaporodását, fejlődését befolyásoló szignálmolekulák (pl. 3-oktanon, 1-oktén-3-ol), továbbá kemoattraktánsok rovarok számára {pl. metil-(Z)-3-metil-dodec-2-enoát, chokol K, 3-oktanol, oktán-1-ol} (Bitas és munkatársai, 2013).

A gombák által termelt illékony anyagok tehát a növényekre sokrétű hatással vannak (Bitas és munkatársai, 2013), pl. vannak közöttük - rövid és nagy távolságokra eljutni képes szignál molekulák, amelyek antagonizmust, mutualizmust mediálnak, részt vesznek sejtfolyamatok és átalakulások fajon belüli és fajok közötti szabályozásában, továbbá a gombák mikrobiális környezetének a megváltoztatásában,

- a *Trichoderma viride* illékony szerves anyagoknak kitett *Arabidopsis thaliana* növények magasabbra és nagyobbra nőnek, korábban virágoznak, több oldalgyökeret hoznak létre és több klorofillt szintetizálnak,
- az 1-oktén-3-ol a jázminsav/etilén által szabályozott patogén/sebzés védelmi rendszer számos elemét aktiválja,
- az *Alternaria alternata*, *Penicillium charlessii* és *Penicillium aurantiogriseum* illékony vegyületek serkentik egyes növények keményítő akkumulálását,
- a *Fusarium oxysporum* MSA35 törzs az ektoszimbionta baktériumaival együtt fokozza a saláta növekedését,
- egyes endofiton baktériumok és gombák, továbbá biotikus és abiotikus stresszhatások ellen nyújtanak védelmet, pl. a fűfélékkel társult endofiton *Epichloë* fajok gátolják számos növénypatogén és mikoparazita gomba csírázását és növekedését,
- az ektomikorhiza-képző *Tuber* fajok (szarvasgombák) illékony anyagaik (pl. 1-oktén-3-ol, *transz*-2-oktenál) révén gátolják a gazdanövényeik, pl. *Cistus incanus*, gyökérzetének és leveleinek a fejlődését,
- a *Trichoderma viride* és *Trichoderma aureoviride* illékony szerves vegyületek gátolják számos farontó gomba, pl. *Serpula lacrymans* növekedését,
- az gombák illékony anyagai (pl. 3-oktanon, 1-oktén-3-ol) lehetnek quorum jelző anyagok is, pl. csírázás gátlók („crowding effect”) és konídium képzést stimulálók,
- egyes gombák illékony vegyületeik (pl. a fűfélékkel társult endofiton *Epichloë* spp. által termelt metil-(Z)-3-metil-dodec-2-enoát és chokol K) révén beporzó rovarokat vonzanak, amelyek a gombaspórák propagációjában vesznek részt,
- végül, de nem utolsó sorban, az endofiton gombák által termelt illékony szerves vegyületek közül nagyszámú nematóda- és rovarrepellens és -ölő hatású anyag is van (Bitas és munkatársai, 2013).

A gombák illékony anyagai az ízeltlábúak számára lehetnek attraktánsok, pl. mikofág bogarak, szúnyogok (emberi bőr), beporzó rovarok (növényimitátor gombák), de lehetnek taszítóak, pl. banánevő csigák, molylepkék számára. Bizonyos endofiton gombák, pl. *Muscodor vitigenus*, naftalint is termelnek (Morath és munkatársai, 2012).

3.3.2. A gombák által termelt illékony szerves vegyületek a növényi patogének ellen

A mikroorganizmusok által termelt, nematocid, fungicid és inszekticid hatású illékony szerves vegyületek eredményesen felhasználhatók különféle növényi patogének elleni védekezésben (Campos és munkatársai, 2010, Schalchli és munkatársai, 2014). A gombák által termelt illékony vegyületeket ma nagy erővel kutatják, és lehetséges, hogy ezeken a környezetbarát anyagokon alapuló biopeszticidok a jövőben széles körben alkalmazásra kerülnek majd a növényvédelem számos területén.

Jelenlegi ismereteink szerint a következő gombák illóanyagai kerülhetnek szóba, mint potenciális növényvédőszer (Schalchli és munkatársai, 2014):

- Nematocid hatású gombák: pl. *Muscodor albus* endofiton *Paratrichodorus allius*, *Pratylenchus penetrans* és *Meloidogyne chitwoodi* ellen.
- Fungicid hatású gombák: pl. *Muscodor albus*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamoni*, *Rhizoctonia solani*, *Ustilago hordei*, *Stagnospora nodorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus fumigatus*, *Verticillium dahliae*, *Tapesia vallundae*, *Candida albicans* ellen (100 % védelem!), továbbá *Trichoderma* fajok *Colletotrichum capsici* ellen, *Williopsis mrakii* észtő *Ophiostoma piliferum* és *Aureobasidium pullulans* ellen.
- Inszekticid hatású gombák: pl. *Muscodor albus* endofiton *Phthorimaea operculella* (burgonya moly) ellen.

3.3.3. Gombák illékony szerves vegyületeinek szerepe a növény-mikroba kölcsönhatásokban

A gombák illékony anyagai mind a földalatti, mind a földfeletti növény-mikroba interakciókra jelentős hatással vannak (Morath és munkatársai, 2012).

Földalatti interakciók: Szerepük van a talajban megfigyelhető fungisztázisban, azaz a gombák csírázás- és növekedés-gátlásában. Pl. a vad típusú, antagonista *Fusarium oxysporum* és a baktérium konzorciuma gátolják a növénypatogén *F. oxysporum* szaporodását. Emellett aktiválják a növények gombaellenes védelmi rendszereit, továbbá stimulálhatják a

gazdanövények növekedését is (!). Pl. a fentebb említett *F. oxysporum* szerves illékony vegyületei, köztük a β -kariofillén, stimulálták a saláta növekedését (3.3.2. fejezet). Más gombák, pl. *Tuber* spp., illékony anyagai éppen gátolták az *Arabidopsis thaliana* növekedését.

Földfeletti interakciók: Az endofiták által termelt illékony anyagok korlátozzák sokféle kártevő, pl. gombák, baktériumok, nematódák, ízeltlábúak, szaporodását, továbbá káros hatással lehetnek más növények magvainak a csírázására és a csíranövények növekedésére is (allelokémiai hatás). A kártevők betakarítás utáni kontrollja lehetséges mikofumigációval (Morath és munkatársai, 2012; Yuan és munkatársai, 2012).

3.3.4. Gombák illékony szerves vegyületei – korai kutatások és környezeti egészségügyi aspektusok

A korai kutatások a gomba eredetű illékony szerves vegyületek területén főképpen ezen anyagok egészségügyi hatásainak a felderítésére irányultak (Morath és munkatársai, 2012). Ezen kutatások elsősorban az úgynevezett „beteg épület szindróma” („Sick building syndrome”, „SBS”) tüneteinek, pl. fáradtság, fejfájás, bőrgyógyászati tünetek, emésztőszervrendszeri problémák, termékenység gondok, reumatológiai és egyéb immunbetegségek, és a levegőben megjelenő illékony anyagok közötti esetleges ok-okozati összefüggések feltárását célozták. Bár ilyen összefüggéseket minden kétséget kizáróan nem sikerült megállapítani a tünetek nagy részére vonatkozóan, az valószínűsíthető, hogy bizonyos illékony anyagok összefüggésbe hozhatók felső légúti tünetekkel, asztmás tünetekkel és hiperszenzitivitáson alapuló tüdőgyulladás kialakulásával. Továbbá, kapcsolatot találtak a penészek jelenléte és gyermekkori alsó légúti megbetegedések között is (Morath és munkatársai, 2012). A gombák illékony szerves vegyületeinek a jelenléte összefüggésbe hozható bizonyos „beteg épület szindróma” tünetekkel, pl. letargia, fejfájás, szem- és nyálkahártya-irritáció, orrdugulás, torokgyulladás, köhögés, továbbá váladéktermelés a légzőszervrendszerben (Morath és munkatársai, 2012).

A kutatási eredmények értelmezésekor figyelembe kell vennünk, hogy az aktuális illékony vegyület koncentrációk számos műszaki paramétertől függenek, ilyen például a levegő áramlási sebessége, nedvességtartalom, elérhető szubsztrátok a gomba számára, a penész

populáció összetétele, az épület/szoba mérete. Az eddig épületben mért egyik legnagyobb illékony anyag koncentráció 16 ppm ($900 \mu\text{g}/\text{m}^3$) volt 1-oktén-3-olra nézve. A penészes épületekre jellemző dohos szagot éppen főleg 1-oktén-3-ol és 3-oktanon okozzák. Az 1-oktén-3-ol nagy koncentrációjú expozíció ($10 \text{mg}/\text{m}^3$) esetében szem-, orr- és torok-irritációt okoz, valamint igazoltan neurotoxikus *Drosophila melanogaster* modellben, és citotoxikus emberi embrionális őssejtekre nézve. Mindezek az eredmények várhatóan további intenzív kutatásokat fognak elindítani a beteg épület szindróma kiváltó okainak a tanulmányozásában.

A gombák illékony anyagainak a kutatása nem lehetséges a megfelelő analitikai kémiai háttér kialakítása és folyamatos fejlesztése nélkül (Zhang és Li, 2010; Morath és munkatársai, 2012; Yuan és munkatársai, 2012). Az illékony vegyület minták gyűjtése ma legtöbbször szilárd adszorbensekkel, pl. Tenax, szilárd fázisú mikroextrakcióval és aktívszén filterek segítségével történik. A minták analízisét különféle MS berendezésekkel és „elektromos orr” („E-nose”) eszközökkel végzik.

3.3.5. A gombák által termelt illékony szerves vegyületek biotechnológiai jelentősége

A gombák által termelt illékony anyagok eddig megismert tulajdonságai, biológiai hatásai alapján a következő jövőbeni biotechnológiai kutatási és felhasználási területek tűnnek reálisnak (Morath és munkatársai, 2012):

- Az illékony vegyületek egy része szignálmolekula funkciót tölt be, így pl. vonzó és taszító hatással vannak rovarokra és más gerinctelenekre. Ez lehetőséget nyújt repellens és attraktáns tulajdonságú készítmények kifejlesztésére.
- A mezőgazdaságban illékony vegyületeken alapuló biológiai kontroll anyagok kifejlesztése lehetséges, hiszen ezen vegyületek egy része a növényi kártevőket gátolja, míg mások a növények növekedését stimulálják, azaz a növényi biomassza produkció fokozására is lehetőség nyílhat.
- Az élelmiszeriparban a kártevők betakarítás utáni szaporodásának a gátolása tűzhető ki célul, pl. mikofumigációs technológiák kidolgozása révén.
- A jövőben a gomba eredetű illékony vegyületek az üzemanyaggyártásban is szerepet kaphatnak, pl. mikodízelek gyártásában.

- Egyes gombák által termelt illékony anyagok hozzájárulhatnak pl. fermentált élelmiszerek illatához és ízéhez. Így bizonyos vegyületek felhasználása íz- és illatanyagként szintén reálisnak tűnik.

3.3.6. Példák a gombák illékony szerves vegyületeinek a lehetséges biotechnológiai felhasználására

A legígéretesebb biotechnológiai alkalmazások a következők lehetnek (Morath és munkatársai, 2012; Yuan és munkatársai, 2012):

- Növényi biomassza és klorofill termelés stimulálása, pl. *Trichoderma*-eredetű illékony anyagokkal.
- Az *Ascocoryne* fajok által termelt alkánok, alkének, alkoholok, észterek, ketonok, savak és benzol származékok bioüzemanyagokként történő felhasználása. Ugyanezen fajok szeszkviterpéneket is termelnek, melyek dízel és repülőgép üzemanyagok összetevői lehetnek a jövőben. Az eddig kutatások alapján potenciális mikodízel termelő fajok az *Ascocoryne sarcoides*, *Gliocladium roseum*, *Phoma* sp., *Hypoxylon* sp., *Phomopsis* sp. és a *Myrothecium inundatum*. Emítést érdemel, hogy egy *Hypoxylon* sp. által termelt 1,8-cienol (egy oktán származék) szintén felhasználásra kerülhet üzemanyag additívumként. A fermentációs termelés mikroaerofil körülményeket igényel.
- Gomba lipidek (túl)termeltetése, szintén biodízel szintézishez.
- Íz- és illatanyagok, pl. metil-eugenol és 2-fenil-etanol (rózsaiilat) előállítása *Rosa damascena* *Alternaria* sp. és *Aspergillus niger* endofitákkal.

3.3.7. Mikodízel előállítás

A gombák által termelt illékony szerves anyagok közül ki szeretném emelni a jövőbeni lehetséges dízelolaj összetevőket a potenciális gazdasági jelentőségük miatt (lásd még a 2.2.6. fejezetet). Ezen anyagok között ugyanis több is van, amelyek kémiai szerkezetüket, továbbá fizikai és kémiai tulajdonságaikat tekintve eleve közel állnak a dízelolajat adó szénhidrogénekhez, vagy pedig könnyen átalakíthatók dízelolaj komponensekké. Említést érdemelnek például a különféle hexil-, heptil- és oktil-alkoholok ecetasav-észterei, melyek az észterek hidrolízisét és az alkoholok redukcióját követően a dízelolaj komponensekkel azonos

szerkezetű szénhidrogéneket adnak (Strobel, 2015). A bioüzemanyag gyártás szempontjából különösen fontos az a megfigyelés, hogy az endofiton gombák egy része biopolimer, mindenekelőtt cellulóz alapon képes különféle szénhidrogének, pl. benzolok, cikloalkánok, cikloalkének, közvetlen előállítására (Malette és munkatársai, 2014; lásd még a 2.2.6. fejezetet). Ezért nagy intenzitással kutatják ezen gombák szénhidrogén-termelő képességét. Ezen gombák, illetve a szénhidrogének termelését lehetővé gének, génklaszterek felderítése komplex mikrobiális élettani, biokémiai, genetikai és genomikai kutatásokat igényel (Strobel, 2014a, 2015; Shaw és munkatársai, 2015; Spakowitz és Strobel, 2015).

A szénhidrogének termelésének a megértése előfeltétele annak, hogy profitábilis mikodízel termelési technológiákat hozzunk létre. Ehhez további összetett fermentációs technológiai kutatások szükségesek (Strobel, 2015). Mindenesetre az örömteli, hogy jelenleg egy endofiton *Nodulisporum* fajjal már 1-2 %-os szénforrás→1,8-cineol konverziós rátát sikerült elérni (Strobel, 2014a, 2015), de ez mindenképpen további optimalizálást igényel.

A növekvő számú összehasonlító genomelemzések már meggyőzően igazolták, hogy az endofiton gombáknak, pl. köztük az *Ascocoryne sarcoides*nek, gazdag enzimmészlete van komplex szerkezetű biopolimerek, pl. a cellulóz, lebontására (Gianoulis és munkatársai, 2012), amely elvi lehetőséget ad cellulóz-hemicellulóz alapú szénhidrogén bioszintézis technológiák kidolgozására (Strobel, 2015). Ez lehetővé tenné olcsó szubsztrátumok, pl. mezőgazdasági hulladékok, közvetlen, szénhidrogénekké történő konverzióját is (Strobel, 2014b), ami igen jelentős paradigmaváltás az eddig preferált, lignocellulóz→etanol alapú technológia-fejlesztésekhez viszonyítva!

Nagyon fontos megfigyelés, hogy az endofiton gombák illékony szerves vegyület spektruma függ az izolátumoktól és a fermentációs körülményektől is. A gombák termékspektruma igen változatos, pl. egy nemrégiben izolált endofiton basidiomycota *Schizophyllum commune* törzs jelentős α -bergamotén és β -bizabolén termelőnek bizonyult (Strobel, 2015). Ezek a vegyületek szintén számba jöhetnek, mint potenciális bioüzemanyagok (Peralta-Yahya és munkatársai, 2011; Strobel, 2015).

Érdemes megjegyeznünk, hogy a jövőben egyre inkább szükséges lesz annak a pontos felmérése, hogy a gombák által termelt illékony szerves vegyületek milyen mértékben képesek helyettesíteni a megszokott fosszilis eredetű üzemanyagokat (Strobel, 2015). A fentiekben említett 1,8-cineol például 80 (v/v) %-ban benzinhoz keverve 95-ös oktánszámot eredményez, míg a dízelolajhoz (v/v) 10 %-ban adagolva annak kémiai és fizikai tulajdonságait kifejezetten javította (Strobel, 2015).

A közeljövő technológiai céljai között a jó termelő ipari törzsek létrehozása és a megfelelő fermentációs technológiai háttér kialakítása szerepelnek (Strobel, 2015).

3.3.8. Gombák illékony szerves vegyületei – analitikai felhasználás

A gombák illékony anyagainak egy része bizonyos koncentrációk fölött az ember számára közvetlenül is érzékelhető (Bennett és munkatársai, 2012)! Példák: geozmin: 150-200 ng/m³ koncentráció tartományban - földillat, 1-oktén-3-ol: 10 µg/m³ koncentráció esetén - gombaillat, 2-oktén-1-ol: 16 µg/m³ koncentrációban - dohos szag. A kéntartalmú illékony anyagok nagymértékben érezhetőek, pl. *Lentinula edodes* (shiitake), *Tricholoma*, *Marasmius* gombák esetében. A *Clitocybe*, *Lentinellus*, *Agaricus*, *Suillus* és *Tuber* fajok illatprofilja is tipikus és nagymértékben eltérő. A *Phallus* fajok kellemetlen szagát dimetil-oligoszulfidok okozzák. A gombák jelenlétének kimutatására, továbbá a szaganyagok alapján történő fajszintű identifikálásra már eddig is jelentős analitikai fejlesztések történtek, történnék.

3.3.9. Az élelmiszereken és takarmányon megjelenő penészek illékony szerves vegyületei

A terményeken és élelmiszereken megjelenő penészek illékony anyagokon alapuló meghatározásának nagy gyakorlati jelentősége van (Börjesson és munkatársai, 1989; Schnürer és munkatársai, 1999). A „VOCs” profilok eltérése szignifikáns, így a megfigyelések gyakorlati hasznosítása lehetséges.

Nedvesített búzán Börjesson és munkatársai (1989) a következő illékony anyagok termelését figyelték meg különféle penészgombák jelenlétében: *Aspergillus amstelodami*: 2-metil-furán, 2-metil-1-propanol, 2-pentanon, 3-oktén-2-ol, 1-oktén-3-ol, *Aspergillus flavus*: 2-metil-1-

propanol, 3-metil-1-butanol, *Fusarium culmorum*: 2-metil-1-propanol, monoterpének, szeszkviterpének, 2,4-dimetil-hexán, 2,3,5-trimetil-hexán, *Penicillium cyclopium*: 2-metil-furán, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 3-oktén-2-ol, 1-oktén-3-ol, szeszkviterpének.

Az élelmiszer- és takarmány-penészek által tipikusan termelt illékony szerves vegyületek Schnürer és munkatársai (1999) alapján:

- Alkoholok: 2-metil-1-propanol: *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti*, 3-metil-butanol: *Fusarium graminearum*, *Penicillium aurantiogriseum*, 1-oktén-3-ol: *Penicillium glabrum*, *Penicillium verrucosum*.
- Keton: 3-oktanon: *Fusarium sporotrichoides*, *Penicillium commune*
- Észter: etil-acetát: *Penicillium digitatum*, *Pichia anmala*
- Furán: 3-metil-furán: *Aspergillus flavus*, *Penicillium brevicompactum*
- Monoterpén: 2-metil-izoborneol: *Aspergillus niger*, *Penicillium solitum*
- Szeszkviterpén: geozmin: *Penicillium discolor*, *Penicillium expansum*

Ezen az illékony származékok alkalmasak a penészek detektálására és meghatározására. Az illékony szeszkviterpének alkalmasak a *Penicillium* fajok meghatározására, továbbá a mikotoxintermelés indikációjára *Fusarium* és *Aspergillus* fajokban. Az „E-nose” szenzorokkal nyert elektromos jelek számítógépes elemzése lehetővé tette a penészek jelenlétének a meghatározását, sőt a gabona ergoszterin tartalmának és a gomba telepképző egység értékeknek („colony-forming units”, CFU értékek) a becslését is. A további kutatások a fertőző fajok egyedi azonosítását és a mikotoxin kontamináció mértékének a megállapítását célozzák az illékony anyagok analízise alapján (Schnürer és munkatársai, 1999).

3.3.10. A *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* és *Trichoderma* fajok illékony szerves vegyület termelése

Takeuchi és munkatársai (2012) tovább bővítették a fonalas gombák illékony anyag termelésére vonatkozó ismereteinket néhány fontos *Aspergillus*, *Fusarium* és *Penicillium* faj tanulmányozásával. Szilárd-fázisú mikroextrakció („solid-phase microextraction”) – GC-MS technikával megállapították, hogy a *Fusarium solani* tenyészetekben egyes illékony

vegyületek a teljes inkubációs periódusban (1-10 nap) detektálhatók voltak, pl. 3-oktanon, 2-etil-1-hexanol, fenil-acetaldehid, 2-fenil-2-propanol, 2-undekanon, míg mások, pl. 3-oktanol, benzaldehid és 2-pentadekanon, csak idősödő tenyészetekben voltak megfigyelhetők. Azaz a gombák illékony vegyület profilja függ a tenyészet korától.

Sikerült néhány vegyület képződési optimumának az idejét is meghatározni, pl. *Aspergillus nidulans*, 1-oktén-3-ol: 10 nap, *Penicillium paneum*, benzaldehid: ≥ 7 nap, *P. paneum*, 2-undecanon: ≥ 8 nap, *Aspergillus fumigatus*, β -bergamotén: 4 nap, *P. paneum*, β -kariofillén: 5 nap, *A. nidulans*, α -farnezen: 6 nap (Takeuchi és munkatársai, 2012).

Mindenképpen említést érdemel, hogy *P. paneum* esetében a képződött 3-oktanon mennyisége arányos volt a termelt konídiumok számával (Takeuchi és munkatársai, 2012). Mindezek a megfigyelések előrevetítik, a fajmeghatározás mellett, a rendszerben lévő gombatelepek kora és élettani állapota elvi meghatározási lehetőségét is a termelt illékony vegyületek spektruma, mennyisége és mennyiségi arányai alapján.

Di Francesco és munkatársai (2015) vizsgálataikkal igazolták az *Aureobasidium pullulans* gomba jelentős illékony szerves vegyület termelését (pl. 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, fenetil-alkohol), illetve ezen vegyületek gombaellenes hatását, pl. *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* és *Penicillium italicum* ellen. Stoppacher és munkatársai (2010) pedig a biológiai védekezésben alkalmazható *Trichoderma artroviride* illékony metabolitjai határozták meg.

3.3.11. Humán patogén gombák által termelt illékony szerves anyagok

Ezen vegyületek spektrumának a meghatározása és elemzése hozzásegíthet minket a humán patogén gombák eddigieknél lényegesen gyorsabb detektálásához és identifikálásához, pl. a beteg leheletének a vizsgálata révén. Ehhez igen korszerű eszközök, pl. GC-MS berendezések, multikapilláris oszlop – ion mobilitás spektrometria („multi-capillary column – ion mobility spectrometry”, „CC-IMS”) állnak a rendelkezésünkre. Az eddig kifejlesztett eljárások egyelőre nemzetség, pl. *Candida*, *Aspergillus*, szintű identifikációt tesznek lehetővé,

de a klinikai szempontból jelentős fajszintű identifikációt lehetővé tévő módszerek kidolgozása még további kutatásokat igényelnek (Perl és munkatársai, 2011).

3.3.12. A *Muscodor* fajok sikertörténete

A nagyon hatékony antimikrobiális hatású illékony szerves vegyületeket, úgynevezett illékony antibiotikumokat termelő *Muscodor* fajok pézsmaillatú, elsősorban a trópusi monszun őserdőkben előforduló, nem spórázó, monofiletikus eredetű endofiton gombák. A *Muscodor* fajok kötelszerű micéliumot képeznek, melyekben a hifák jellegzetesen körbecsavarják egymást, mint a kötél szálai (Yuan és munkatársai, 2012). Mára számos *Muscodor* fajt vontak be a mikrobiális (mindenekelőtt gomba) növekedést gátló technológiai fejlesztésekbe.

3.3.13. A *Mucodor albus* története

A *Muscodor albust* ('stinky white') Prof. Dr. Gary Strobel fedezte fel Hondurasban mint a *Cinnamomum zeylanicum* endofitonját (Strobel és munkatársai, 2001; Strobel, 2006a, 2006b). Bár a *Muscodor albus* különféle izolátumai által termelt illékony szerves vegyületek nagymértékben különböznek egymástól, ezen anyagok antifungális és antibakteriális aktivitása példa nélkül álló. A *M. albus* a legalaposabban tanulmányozott *Muscodor* faj, és napjainkban számos növényvédelmi és épületmegóvó technológia alapját képezi. A teljesség igénye nélkül, a *M. albus* 100 %-ban, fungicid módon gátolja a következő gombák növekedését: *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Ustilago hordei*, *Stagnospora nodorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus fumigatus*, *Verticillium dahliae*, *Tapesia yallundae* és *Candida albicans* (Strobel és munkatársai, 2001). Továbbá, bár jelentősen gátolja, de nem pusztítja el a *Fusarium solani*, *Cercospora beticola* és *Xylaria* sp. gombákat. Ezen felül baktericid az *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* és *Micrococcus luteus* baktériumokkal szemben, de annak ellenére, hogy %-ban gátolja a *Bacillus subtilis* szaporodását, nem pusztítja el ezen Gram-pozitív mikroorganizmust (Strobel és munkatársai, 2001).

A vizsgálatok szerint a *M. albus* alkoholok, észterek, ketonok, savak és lipidek széles spektrumát termeli, melyek szinergizmusa hozza létre a kivételes fungicid/fungisztatikus és baktericid hatást. Ugyanakkor a meghatározott fő illékony szerves vegyületek mesterséges elegye is jó antimikrobiális hatékonyságot mutat (Strobel és munkatársai, 2001).

A biológiailag leghatékonyabb illóanyag komponensek szerves észterek, pl. 3-metil-1-butanol acetát. Az észterkomponensek mesterséges elegyei is 100 %-ban gátolták a *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Tapesia yallundae* és *Xylaria* sp., továbbá nagymértékben a *Sclerotinia sclerotiorum* és *Cercospora beticola* gombák növekedését (Strobel és munkatársai, 2001).

Említést érdemel, hogy más *M. albus* izolátumokban 1,1'-oxibisz-naphtalin is megfigyelhető volt, és a leghatékonyabb gombaellenes mesterséges illékony szerves vegyületegyek naftalint, propionsavat és 3-metil-1-butanol tartalmazzak (Strobel és munkatársai, 2006a).

Fontos megjegyeznünk, hogy bár a *Muscodor* illékony metabolitok antimikrobiális hatása látványos, ezen vegyületek hatásmechanizmusa egyelőre nem kellően ismert. Előkísérletek alapján valószínűsíthető, hogy érzékeny mikroorganizmusokban, pl. a *Bacillus subtilis* baktériumban, ezen vegyületek egy része, pl. a naftalén származékok DNS károsodást váltanak ki, amit a DNS-javító rendszerek indukciója jelez (Mitchell és munkatársai, 2010; Deshmukh és Verekar, 2012).

3.3.14. „Mikofumigációs” stratégiák és technológiák

Az utóbbi években nagyszámú *Muscodor*-alapú antifungális technológiát fejlesztettek ki, szabadalmaztattak és hoztak forgalomba (Strobel és munkatársai, 2006a, 2006b; Mercier és munkatársai, 2007). Ezek közül kiemelkednek az úgynevezett „mikofumigációs” technológiák (Mercier és Jiménez, 2004; Schnabel és Mercier, 2006; Mercier és munkatársai, 2010). A mikofumigációhoz általában tömbökbe formázott, kiszáritott, rozsszemeken létrehozott gombatenyészeteket használnak fel, amit szűrőpapírba csomagolnak. A tenyészet reaktiválása a tömbök, zacskók csapvízbe történő merítésével (15-30 s) történik, amit szobahőmérsékleten történő 2-6 h inkubáció követ. Nagyon fontos, hogy az eljárás a

hűtőkamrák hőmérsékletén is alkalmazható! Ígéretes, hogy az ismert kémiai (ózon, kén-dioxid) és biológiai fumigációs technológiák kombinálhatók is (Gabler és munkatársai, 2010)!

3.3.15. A mikofumigációs technológiák sikeres mezőgazdasági alkalmazásai

A kidolgozott *M. albus* alapú technológiákat már számos esetben alkalmazták sikerrel a mezőgazdaságban, például a kék és szürke penészek (*Penicillium* and *Botrytis* spp.), üszöggombák (*Tilletia* and *Ustilago* spp.), hervadást okozók (*Verticillium* spp.), barna rothasztók (*Monilinia* spp.) kontrolljára a termények tárolása és szállítása alatt, a palántadőlést okozó *Pythium* spp. ellen cserépben (pl. napraforgó), valamint a *Rhizoctonia solani* ellen üvegházi talaj keverékekben. A technológiát továbbá sikeresen alkalmazták a gyümölcsök megóvására a szállító kartonoktól kezdve egészen a hűtőházakig. Ami az illóanyag-összetételt illeti, rozsszem-kultúrákban *M. albus* által termelt fő illékony szerves vegyületek a 2-metil-1-butanol és az izovajsav (Mercier és munkatársai, 2007).

3.3.16. Az érlelő szobák mikofumigációja

A *M. albus* alapú mikofumigációs készítményeket sikeresen alkalmazták érlelő szobákban is. Az egyik alkalmazásban citrom érlelő szobába (dimenziók: 1,8x3,0x2,1 m) 10 kg szárított *M. albus* rozsszem-kultúrát helyeztek el. A rehidratációt műanyagtálcákon ionmentes vízzel 1:1 (w/w) arányban végezték el az érlelés kezdetén, ami 48 órán át tartott. A kezelt szobákban citromok zöldpenész fertőzöttsége 88,3 – 52,1 %-kal csökkent (Mercier és Smilanick, 2005)!

3.3.17. Az épületpenészek kontrollja mikofumigációval

Az épületpenészek kontrollja kivételesen nehéz feladat, ugyanakkor a *M. albus* készítmények erre is alkalmasnak bizonyultak (Mercier és Jiménez, 2007; Mercier és munkatársai, 2007). Először megelőző mikofumigációs stratégiát követve a kutatók száraz gipszkarton darabokat (5,0x7,5 cm) műanyagdobozokba zártak *M. albus* rozsszemkultúrával együtt (20 g 11,4 l térfogatban, 48 h időtartam). Ezt követően a víz károsító hatását a nedvesítő kamrákban (22,2x21,1x17.5 cm) szimulálták. Két hét elteltével a nem előkezelt gipszkarton darabokon

$1,4-2,1 \times 10^6$ cfu/cm² számot mértek, míg gombák egyáltalán nem voltak izolálhatók a mikofumigációval előkezelt faldarabokról!

Egy másik kísérleti elrendezésben már gombával kolonizált gipszkarton lapokon tanulmányozták a mikofumigáció gombaölő, azaz kuratív hatását (Mercier és Jiménez, 2007). A gipszkarton falakat különféle gombaszuszpenziók bedörzsölésével előfertőzték, majd egységesen 48 h mikofumigációs időt alkalmaztak. Az idő eltelte után *Cladosporium cladosporioides* telep nem volt kimutatható, miközben az *A. niger* és *S. chartarum* kolóniaszámok 3,7 és 2,4-4,8 log egységgel csökkentek! Amikor a mikofumigációs időt 96 órára növelték, az *Aspergillus niger*, sőt a természetes penészgomba populációk is látványosan, 5 log értékkel csökkentek! A telepszámok lényegében kimutathatósági határon voltak (Mercier és Jiménez, 2007)!

Az alkalmazott kuratív technológiában a kimutatott illékony szerves vegyületek és ezek koncentráció maximumai a következők voltak: izovajsav: 25 µg/l (m/v), 96 h mikofumigációs időnél, 2-metil-1-butanol és izobutanol: 10 and 5 µg/l (m/v), 6 h mikofumigációs időnél, utána a koncentrációk fokozatosan csökkentek (Mercier és Jiménez, 2007).

3.3.18. A felderített illékony szerves vegyületeket termelő gombák száma rohamosan nő!

Eddig számos gomba szerves illóanyag-termelését írták le nagy részletességgel, például:

Endofitonok:

Hypoxyylon sp. – 1,8-cineolt termel. Ez egy monoterpén, ami antifungális aktivitással is bír, és bioüzemanyagként is szóba jöhet (Tomsheck és munkatársai, 2010).

Phomopsis sp. – szabinént termel, amely illékony vegyület egy „növényi” monoterpén antifungális hatással, borsos illattal, és szintén bioüzemanyag potenciállal (Singh és munkatársai, 2011).

Élesztők:

A *Saccharomyces cerevisiae* pékélesztő (!) – két alkoholt (2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol) és észtereket (etil-acetát) termel, figyelemre méltó gombaellenes aktivitással, pl.

Guignardia citricarpa (citrus fekete foltosodás) és *Sclerotinia sclerotiorum* ellen (Fialho és munkatársai, 2010, 2011).

Általánosságban elmondhatjuk, hogy igen sok, különféle élőhelyről származó aszkomiceta és basidiomycota élesztőgomba termel változatos szerkezetű illékony szerves anyagokat, pl. trópusi ascomycota élesztők (Buzzini és munkatársai, 2003), élesztők ascomycota szarvasgomba termőtestekről (Buzzini és munkatársai, 2005a) és basidiomycota élesztők (Buzzini és munkatársai, 2005b).

3.3.19. Az élesztők által termelt illékony szerves vegyületek felhasználási lehetőségei

Számos élesztő teljes genomi szekvenciája ismert már, továbbá ezek a fajok étlettanilag és a metabolizmusukat tekintve is jól jellemzettek, továbbá a fermentációs technológiájuk is jól kidolgozott. Gyakran használják őket a metabolizmus genetikai átalakítására (metabolit technológia, „metabolic engineering”) és könnyen használható, hatékony genetikai eszközeink vannak erre a célra. Várható, hogy ezen élesztők illékony szerves anyag termelése (mintázat, mennyiség) is könnyen átalakítható.

Az utóbbi időszak érdekes megfigyelései közé tartozik, hogy a *Bulleromyces albus* (*Sporobolomyces albus*) élesztő allil-metil-szulfidot termel, ami a fokhagyma egyik íz- és illatanyaga (‘fokhagyma lehelet’), amikor L-metioninon, mint kizárólagos nitrogénforráson tenyésztjük (Buzzini és munkatársai, 2005b).

A fokhagyma illékony anyagok antimikrobiális és különösen antifungális hatása egyébként régről és igen jól ismert (Kyung, 2012). A fokhagyma antimikrobiális anyagai függenek a természetstől és feldolgozástól is, de főképpen tioszulfínatok, dialk(en)il szulfidok, heterociklikus kén vegyületek, allil-alkohol, 3-(allil-triszulfanil)-2-amino-propánsav. A vegyületek antibakteriális aktivitása nagyobb Gram-negatívok, mint Gram-pozitívok ellen, és különösen a diallil-szulfidok hatása tekintélyes. A fokhagyma szulfidok antifungális hatása meghaladja az antibakteriális hatást (Kyung, 2012).

3.3.20. A talajmikróbák által termelt illékony szerves vegyületek

Az analitikai eszközök fejlődésével lehetővé vált a talajban lévő mikroorganizmusok, mind baktériumok, mind gombák, által termelt illékony metabolitok azonosítása, sőt részben a kvantifikálása is. Kialakult egy új „omikai” terület, a „volatilomika” („volatilomics”; Insan és Seewald, 2010). Ezek a vegyületek túl azon, hogy befolyásolják a komplex baktérium-gombanövény kölcsönhatásokat (2.2.2., 2.2.3. és 5.3.1. fejezetek), lehetővé teszi az adott mikrobaközösség összetételének a felderítését is, ami a mikrobiális ökológia eszköztárát gyarapítja (Insan és Seewald, 2010).

A gombák illékony anyagaihoz hasonlóan a baktériumok által előállított vegyületek is számos biológiai hatással bírnak, pl. infokémiai anyagok organizmuson belüli és kívüli kommunikációban, a sejt-sejt között kommunikációban, lehetséges szénfőlösleg „kiengedő” szelepek valamint növekedést serkentő, vagy éppen gátló molekulák (Kai és munkatársai, 2009; Effmert és munkatársai, 2012). Ami a baktérium és gomba interakciókat illeti, a baktériumok egyes illékony anyagai stimulálhatják a gombák termőtestképzését, a spórák csírázását, a micélium növekedését és a spórák képződését míg mások, éppen ellenkezőleg, gátolhatják ezeket a folyamatokat (Kai és munkatársai, 2009; Effmert és munkatársai, 2012). A gombaellenes hatást tekintve a *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium* és *Agrobacterium* fajok a legnevezetesebbek. A rhizobaktériumok és fitopatogén baktériumok hatása a fitopatogén gombákra nézve általában fungisztatikus (Kai és munkatársai, 2009). Ezzel szemben a rhizoszféra baktériumok hatása a mikorrhiza képzésre általában pozitív (Effmert és munkatársai, 2012)! Baktériumok, pl. *Bacillus subtilis*, illékony anyagainak a hatására az *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* és *Phytium afertile* hifákon és a *Cladosporium oxysporum* spórákon különféle patológiás elváltozások voltak megfigyelhetők (Kai és munkatársai, 2009; Effmert és munkatársai, 2012). Érdekes, hogy baktérium-eredetű illó anyagoknak kitett *Phanerochate magnoliae* tenyészetekben a lakkáz aktivitás minden esetben eliminálódását, ugyanakkor a tirozináz aktivitás növekedését, csökkenését vagy stagnálását figyelték meg a tesztelt baktérium fajoktól függően (Mackie és Wheatley, 1999). A baktériumok nagyszámú illékony szerves vegyületet termelnek, és ezek közül soknak igazolták az antifungális hatását, bár ez erősen fajfüggő. A teljesség igénye nélkül, gombaellenesek a dimetil-dezulfid, az 1-undekén, valamint változatos kémiai

szerkezetű aminok, benzaldehid, ciklohexanol, dekanál, 2-etil-1-hexanol, nonanál, benzotiazol és dimetil-triszulfid (Kai és munkatársai, 2009).

A baktériumok által termelt illékony vegyületeknek a növényekre és állatokra is változatos hatása van. Nevezetes pl. a *Bacillus*-ok által termelt 2,3-butándiol és acetoin serkentő hatása az *Arabidopsis thaliana* növekedésére (Ryu és munkatársai, 2003). Ugyanakkor más baktériumok, pl. *Pseudomonas* és *Serratia* fajok, erős növekedésgátló hatása is jól ismert (Kai és munkatársai, 2009).

Az állatok esetében megemlíthetjük a protozoonok táplálkozására gyakorolt, leginkább negatív, hatásokat, ugyanakkor a baktériumok által termelt illékony metabolitok vonzzák, vagy éppen taszítják a fonálférgeket, befolyásolják a moszkítókat peterakását, továbbá, pl. a szájjüreg baktériumai, akadályozzák a limfociták proliferációját és citokin termelését (Kai és munkatársai, 2009).

A baktériumok által termelt illékony anyagoknak a baktérium sejtek közötti kommunikációban, a quorum érzékelésben, a biofilm képzésben, és a virulenciában is jelentős szerepük van (Kai és munkatársai, 2009).

A talajban lévő baktériumok illékony anyag termelésének a jobb megismerése (Fernando és munkatársai, 2005), ezen anyagok hatásmechanizmusának a mélyebb megismerése (Effmert és munkatársai, 2012), valamint a talaj mikróbaközösségének az alapos megismerése, pl. az illékony anyagok termelésén („volatile-wired interactions”; Effmert és munkatársai, 2012) keresztül, elvezethetnek új típusú biológiai védekezési eljárások kifejlesztéséhez.

3.3.21. Irodalomjegyzék a 3.3. fejezethez

Bennett J.W. és munkatársai (2012) Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents. *Fungal Association, 2nd Edition, The Mycota IX* (Hock B., Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 373-393.

Bitas V. és munkatársai (2013) Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**, 835-843.

- Börjesson T. és munkatársai (1989) Analysis of volatile compounds for detection of molds in stored cereals. *Cereal Chem.* **66**, 300-304.
- Buzzini P. és munkatársai (2003) A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**, 301-311.
- Buzzini P. és munkatársai (2005a) Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Arch. Microbiol.* **184**, 187-193.
- Buzzini P. és munkatársai (2005b) Production of volatile organic sulfur compounds (VOSCs) by basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* **5**, 379-385.
- Campos V.P. (2010) Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciênc. Agrotec., Lavras*, 34, 525-535.
- Deshmukh S.K. és Verekar S.A. (2012) Fungal endophytes: a potential source of antifungal compounds. *Front. Biosci.* **E4**, 2045-2070.
- Di Farnesco és munkatársai (2015) Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biol. Control* **81**, 8-14.
- Effmert U. és munkatársai (2012) Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J. Chem. Ecol.* **38**, 665-703.
- Fernando W.G.D. és munkatársai (2005) Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 955-964.
- Fialho M.B. és munkatársai (2010) Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 925-932.
- Fialho M.B. és munkatársai (2011) Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília* **46**, 137-142.
- Gianoulis T.A. és munkatársai (2012) Genomic analysis of the hydrocarbon-producing, cellulolytic, endophytic fungus *Ascocoryne sarcoides*. *PLoS Genet.* **8**, cikkazonosító: e1002558
- Gabler F.M. és munkatársai (2010) Integration of continuous biofumigation with *Muscodor albus* with pre-cooling fumigation with ozone or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biol. Technol.* **55**, 78-84.
- Insam H. és Seewald M.S.A. (2010) Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biol. Fertil. Soils* **46**, 199-213.
- Kai M. és munkatársai (2009) Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 1001-1012.
- Kyung K.H. (2012) Antimicrobial properties of allium species. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 142-147.

Mackie A.E. és Wheatley R.E. (1999) Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biol. Biochem* **31**, 375-385.

Mallette N. és munkatársai (2014) Evaluation of cellulose as a substrate for hydrocarbon fuel production by *Ascooryne sarcoides* (NRRL 50072). *J. Sustain. Bioener. Syst.* **4**, 33-49.

Mercier J. és Jiménez J.I. (2004) Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biol. Technol.* **31**, 1-8.

Mercier J. és Smilanick J.L. (2005) Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biol. Control* **32**, 401-407.

Mercier J. és Jiménez, J.I. (2007) Potential of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* for control of building molds. *Can. J. Microbiol.* **53**, 404-410.

Mercier J. és munkatársai (2007) Development of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a novel antimicrobial biofumigant. *Rev. Mex. Fitopatol.* **25**, 173-179.

Mercier J., Lego S.F. és Smilanick J.L. (2010) In-package use of *Muscodor albus* volatile-generating sachets and modified atmosphere liners for decay control in organic table grapes under commercial conditions. *Fruits* **65**, 31-38.

Mitchell A.M. és munkatársai (2010) Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **156**, 270-277.

Morath S.U., Hung R. és Bennett J.W. (2012) Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.* **26**, 73-83.

Peralta-Yahya P.P. és munkatársai (2011) Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nat. Commun.* **2**: cikkazonosító: 483

Perl T. és munkatársai (2011) Detection of characteristic metabolites of *Aspergillus fumigatus* and *Candida* species using ion mobility spectrometry – metabolic profiling by volatile organic compounds. *Mycoses* **54**, 828-837.

Ryu C.M. és munkatársai (2003) Bacterial volatiles promote the growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **100**, 4927-4932.

Schalchli H. és munkatársai (2014) Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Crit. Rev. Biotechnol.*, nyomtatásban, doi: 10.3109/07388551.2014.946466

Schnabel G. és Mercier J. (2006) Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. *Postharvest Biol. Technol.* **42**, 121-123.

Schnürer J., Olsson J. és Börjesson T. (1999) Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genet. Biol.* **27**, 209–217.

Shaw J.J. és munkatársai (2015) Identification of a fungal 1,8-cineole synthase from *Hypoxyylon* sp. with specificity determinants in common with the plant synthases. *J. Biol. Chem.* **290**, 8511-8526.



- Singh és munkatársai (2011) An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microb. Ecol.* **61**, 729-739.
- Spakowicz D.J. és Strobel G.A. (2015) Biosynthesis of hydrocarbons and volatile organic compounds by fungi: bioengineering potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4943-4951
- Stoppacher N. és munkatársai (2010) Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma artroviride* by HS-SPME-GS-MS. *J. Microbiol. Methods* **81**, 187-193.
- Strobel G.A. és munkatársai (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology-UK* **153**, 2613-2620.
- Strobel G.A. (2006a) *Muscodor albus* and its biological promise. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 514-522.
- Strobel G.A. (2006b) Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 240-244.
- Strobel G.A. (2014a) Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 259-272.
- Strobel G. (2014b) The use of endophytic fungi for the conversion of agricultural wastes to hydrocarbons. *Biofuels* **5**, 447-455.
- Strobel G.A. (2015) Bioprospecting – fuels from fungi. *Biotechnol. Lett.* **37**, 973-982.
- Takeuchi T. és munkatársai (2012) Analysis of volatile metabolites emitted by soil-derived fungi using head space solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry: I. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani* and *Penicillium paneum*. *Surface Interface Anal.* **44**, 694-698.
- Tomscheck A.R. és munkatársai (2010) *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microb. Ecol.* **60**, 903-914.
- Yuan Z.L. és munkatársai (2012) Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**, 363-373.
- Zhang Z. és Li G. (2010) A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.* **95**, 127-139.

4. Az orvosi biotechnológia legújabb eredményei

4.1. Az orvosi biotechnológia tárgya, jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái

4.1.1. Az orvosi biotechnológia tárgya

Az orvosi biotechnológia („medical biotechnology”) új humán diagnosztikai és terápiás eszközök fejlesztésével és előállításával foglalkozó tudományág. „Az orvosi biotechnológia élő sejteket és sejtanyagokat használ annak érdekében, hogy az emberi betegségek kezelését és megelőzését segítő gyógyszer- és diagnosztikai készítményeket kutasson és állítson elő.” (wiseGEEK; <http://www.wisegeek.com/what-is-medical-biotechnology.htm>) A gyógyszer-biotechnológia (vagy gyógyszerészi biotechnológia, „pharmaceutical biotechnology”) hasonló területeket fed le, de eszköztárával elsősorban a gyógyszer-biotechnológiai termékek („biopharmaceuticals”, pl. terápiás fehérjék) előállítását, beleértve ezek kinyerését és formulázását, valamint a farmakológiai tulajdonságainak a vizsgálatát végzi (Walsh, 2003, 2007; Crommelin és munkatársai, 2008). A szöveti sebészet („tissue engineering”) és a regeneratív (helyreállító) orvoslás („regenerative medicine”) pedig a sejtek, szövetek, sőt egész szervek helyreállítását, fenntartását vagy éppen kicserélését végző, a mérnöktudomány és az élettudományok (pl. molekuláris biológia, biotechnológia, orvostudomány) közötti határterületek (Langer and Vacanti, 1993; Mason és Dunnill, 2008; Salgado és munkatársai, 2013). (Az utóbbi területekkel kapcsolatos bővebb ismeretekért lásd a 4.1.2.3.4. fejezetet.)

4.1.2. Az orvosi biotechnológia jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái

Az orvosi biotechnológia jelenlegi fő tevékenységi területei a következők: (i) Terápiás ágensek előállítása, pl. heterológ fehérjetermelés prokarióta és eukarióta rendszerekben, beleértve a növényekben történő terápiás ágens előállítást („molecular farming”) és az ehhez vakcinák kifejlesztését. (ii) Molekuláris diagnosztikai (immunokémiai, DNS-alapú és RNS-alapú) eljárások kidolgozása. (iii) Terápiás fehérjék előállítása. (iv) Génterápiás eszközök kifejlesztése és (v) vakcinák (alegység-, peptid-, dendritikus sejt, DNS-, attenuált és vektorvakcinák) előállítását (Glick és munkatársai, 2014). Emellett külön ki szeretném emelni

a szöveti sebészet és regeneratív orvoslás határterületeken zajló innovációs aktivitásokat (Salgado és munkatársai, 2013).

Annak érdekében, hogy a patogén mikrobákkal szemben a jövőben orvosi biotechnológiai eszközökkel is felvehessük a küzdelmet szükséges a mikrobiális patogenezis minél mélyebb szintű megértése, beleértve a gazdaszervezet sejtjeihez történő kapcsolódást, az inváziót és disszeminációt, az emberi védelmi rendszerek kikerülését és a mikrobák elszaporodását, az emberi szövetekben történő károkozást, a virulenciafaktorok azonosítását és végül, de nem utolsósorban, a patogén mikroorganizmus evolúcióját (Glick és munkatársai, 2014).

Az utóbbi években éppen a korszerű orvosi mikrobiológiai kutatások nyomán fejlődnek ki és kerülnek széleskörű alkalmazásra RT-PCR („real-time polymerase chain reaction”; valós idejű polimeráz láncreakció) módszerek a patogén mikrobák kimutatására, DNS- és RNS-alapú eljárások az antibiotikum rezisztencia hátterének a feltárására, humanizált monoklonális antitestek fertőzések leküzdésére, pl. antrax ödéma toxin ellen, valamint korszerű vakcinák különféle, akár antibiotikum rezisztens, mikroorganizmusok ellen (Glick és munkatársai, 2014). Mindezen kutatások alapján remélhetjük hatékony vakcinák kidolgozását olyan hírhedt betegségekkel szemben, mint amilyen malária (Agnandji és munkatársai, 2011) és az Ebola (Agnandji és munkatársai, 2015).

Az orvosi biotechnológia jövőbeni fejlődési lehetőségei minden várakozást felülmúlóak lehetnek. Az elért látványos eredmények és a jövőbeni biztató lehetőségek közül szeretnék néhányat részletesebben bemutatni a következő alfejezetekben.

4.1.2.1. Heterológ fehérjetermelés emlős sejtes és növényi rendszerekben

A heterológ fehérje előállítását tekintve például már jelentős eredményeket értek el és további jelentős eredmények várhatók a termelő sejtvonalak, pl. CHO („Chinese hamster ovary”; kínai hörcsög petefészek) sejtek, és vektorok fejlesztésében (Kim és munkatársai, 2012; Xiao és munkatársai, 2014). Mára a célzott génmódosításoknak az eszköztára igen gazdag, pl. ilyenek a Cre/*loxP* és Flp/*FRT* rekombinációs rendszerek (Bouabe és Okkenhaug, 2013), melyek a CHO sejtek esetében is kiválóan alkalmazhatók (Kim és munkatársai, 2012).

Említést érdemel különféle *cisz* reguláló elemek („scaffold/matrix attachment regions”, „S/MARs”; „ubiquitous chromatin opening elements”, „UCOEs”) felhasználása a génextpresszió és fehérjetermelés stabilitásának a fokozása érdekében (Kim és munkatársai, 2012; Chang és munkatársai, 2014; Liu és munkatársai, 2015).

A jelenleg is intenzíven folyó sejtmérnöki munkák például a nagy sejtsűrűségű tenyészetekben megfigyelhető apoptózis jelenségek visszaszorítására irányulnak antiapoptotikus (Bcl-2 szerű) fehérjék aktiválása/túltermeltetése illetve proapoptotikus (Bax-szerű és csak BH3 domént tartalmazó, „BH3 only”) fehérjék szuppressziója/eliminálása révén (Adams és Cory, 2001; Kim és munkatársai, 2012). További sejtmérnöki törekvések még (i) az autofágia korlátozása, (ii) a sejtproliferációs képesség fokozása, (iii) a sejtciklus megállításának („cell cycle arrest”, ami gyakran előfordul az ipari termelő körülmények változása, pl. az ozmolaritás növekedése esetében) a kiküszöbölése, (iv) az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz kivédése, pl. chaperonok, valamint az XBP-1 transzkripciós faktor („X-box binding protein 1”, a fehérjeszerkeció fontos regulátora) túltermeltetése révén, továbbá (v) a fehérjeszerkeció fokozása. Ezen túlmenően említést érdemel még az ammónia- és tejsav-termelés csökkentése metabolikus mérnöki munkával (Kim és munkatársai, 2012; Glick és munkatársai, 2014). A sejtmérnöki tevékenységet már ma is nagymértékben segítik különféle „omikai” eszközök, és a jövőben ez a tendencia erősödni fog (Kim és munkatársai, 2012).

A fehérje gyógyszerek jövőbeni előállításában nagy szerepet játszhatnak a különféle molekuláris gazdálkodási („molecular farming” vagy „molecular pharming”) formák a mezőgazdaságban (Schillberg és munkatársai, 2003). Definíció szerint, a molekuláris gazdálkodás („molecular farming”) értékes rekombináns fehérjék transzgenikus szervezetekben, mezőgazdasági léptékben történő előállítását jelenti („Molecular farming' is the production of valuable recombinant proteins in transgenic organisms on an agricultural scale.”; Schillberg és munkatársai, 2003). Ezen belül kiemelkedő jelentőségű a gyógyszeranyagok, pl. terápiás fehérjék, növényekben történő előállítása (Ma és munkatársai, 2003; Ma és Wang, 2012; Stoger és munkatársai, 2014).

A növényi biotechnológiai eredményeken alapuló molekuláris gazdálkodás új lendületet kapott azt követően, hogy az FDA („Food and Drug Administration”, USA, <http://www.fda.gov/>) 2012-ben engedélyezte az első növényben előállított gyógyszer, a taliglucéraz alfa használatát az 1-es típusú Gaucher betegség kezelésére. A „taliglucérase alpha” egy sárgarépa sejtekben expresszált humán rekombináns β -glukocerebrozidáz, amit a Protalix BioTherapeutics „ElelysoTM” néven forgalmaz (Zimran és munkatársai, 2011; Fischer és munkatársai, 2013; Grabowski és munkatársai, 2014; Sack és munkatársai, 2015a; Mor, 2015). További, különféle klinikai vizsgálati és engedélyeztetési fázisokban lévő növényi „molecular pharming” termékekről olvashatunk Stroger és munkatársai (2014) közleményében. Ilyenek például a sáfrányos szeklicében (*Carthamus tinctorius*) expresszált emberi inzulin (SemBioSys Genetics; Nykiforuk és Boothe, 2012), a dohányban (*Nicotiana tabacum*) termelt HIV-ellenes emberi monoklonális antitest (2G12; EU 6th Framework Programme Integrated Project „Pharma-Planta”; Ma és munkatársai, 2015; Sack és munkatársai, 2015b), a dohányban (*Nicotiana benthamiana*) előállított madárinfluenza elleni vakcina (Medicago; Landry és munkatársai, 2010), valamint a rizs (*Oryza sativa*) magvakban termelt emberi laktoferrin (Ventria Bioscience; Nandi és munkatársai, 2005).

Külön említést érdemel a ZMapp készítmény, amely három anti-Ebola antitestből álló koktél (Sack és munkatársai, 2015a), és amely rhesusmakákó majmokban 100 %-ban megakadályozta az Ebola vírusos vérzéses láz kialakulását (Qiu és munkatársai, 2014). Így ezek a dohányban (*Nicotiana benthamiana*) kifejezett antitestek jó eséllyel a jövő Ebola-ellenes terápiájának a részévé válhatnak (Lyon és munkatársai, 2014; Murin és munkatársai, 2014).

A transzgénikus növények molekuláris gazdálkodásban („molecular farming”) történő felhasználása a jövőben minden bizonnyal teret fog nyerni, mivel a növényi expressziós rendszereknek számos előnyük van más rendszerekhez képest. Például a fehérjetermékek glikozilezettsége (így akár immunogenitása is, ami vakcinák esetében előnyös is lehet), tervezhető, másrészt az emberi fehérjékre jellemző glikozilezettségi mintázat is kialakítható, továbbá a fehérjék sejten belüli akkumulálódása (ER, vakuólum, kloroplasztisz), vagy éppen szekréciója is kivitelezhető (Kermode, 2012; Stoger és munkatársai, 2014). A magvak kivételesen alkalmasak rekombináns fehérjék raktározó sejtorganellekben való

felhalmozására, ami növeli a fehérjék stabilitását, eltarthatóságát és, táplálkozást követően, a magok alkotói védik a rekombináns fehérjét a denaturálódástól valamint az emésztő enzimek hatásától is (Kermode, 2012; Stoger és munkatársai, 2014). Ezen kívül az antigének növényi sejtekbe való zárása segíti az expresszált antigének felismerését az immunrendszer effektor sejtjei által, ami erősebb immunválaszt eredményez (Chikwamba és munkatársai, 2002; Stoger és munkatársai, 2014). A magmátrixba történő kapszulázás különösen szájon át alkalmazott vakcinák esetében lehet effektív. Ezek a készítmények legtöbbször csak toxin alegységeket, elsődleges antigén epitópokat tartalmaznak (Stoger és munkatársai, 2014). A másik hatékony lehetőség az antigének kloroplasztiszban való expressziója, ami nagyon jó fehérjekihozatalt biztosít (Tregoning és munkatársai, 2004; Nicholson és munkatársai, 2006; Twyman és munkatársai, 2012; Cardi és munkatársai, 2010; Lössl és Waheed, 2011; Maliga és Tungsuchat-Huang, 2014).

Amennyiben rövid időn belül nagy mennyiségű fehérjére van igény, pl. vakcinákra jövőbeni pandémiák, vagy biológiai fegyverekkel történő terrorista támadások miatt, akkor tranziens expressziós platformok válnak szükségessé növényekben is. Ezek a rendszerek mindig növényi patogéneken alapulnak, melyek biztosítják a növényi szövetek gyors fertőzését és a megfelelő fehérjekihozatalt. A jelenlegi tranziens rendszerek vagy *Agrobacterium tumefaciens*, vagy növényi vírus (*Tobacco mosaic virus*, *Potato X virus*, *Cowpea mosaic virus*) alapúak, vagy ezek kombinációit alkalmazzák (hibrid vektorok, amelyekben a vírus genomot *Agrobacterium tumefaciens* szállítja) (Menassa és munkatársai, 2012; Wang, 2012; Stoger és munkatársai, 2014). Ma már megfelelő GMP technológiák léteznek influenza hemagglutinin alegységek gyors és jó kihozatalú expressziójára lucernában és dohányban (D'Aouts és munkatársai, 2008, 2010; Stoger és munkatársai, 2014). A jövőben ezen technológiák további kiterjesztése várható más patogének elleni vakcinák készítésre is (Nicholson és munkatársai, 2006; Yusibov és munkatársai, 2011; Menassa és munkatársai, 2012; Rybicki, 2014).

Ami a növényekben termelt fehérjék tisztítását („down-stream processing”) illeti, a fehérjék kapcsolása olajos növények olajtest fehérjeihez (oleozinokhoz, pl. sáfrányos szeklicében; *Carthamus tinctorius*) kényelmes és hatékony elválasztási lehetőségeket biztosíthat pl. centrifugálással, melynek révén az olajtestek flotáció révén elkülönülnek (Nykiforuk és munkatársai, 2011; Kermode, 2012; Stoger és munkatársai, 2014).

A molekuláris gazdálkodás jövőbeni lehetőségeit szélesítheti, hogy a genetikailag módosított, fehérjét expresszáló növények gazdaságos megoldást jelenthetnek a nagy tömegben felhasznált rekombináns fehérjék (emberi szérum albumin, inzulin, HIV-t neutralizáló antitestek, lektinek) gyártására, ami egyúttal jelentős fermentációs kapacitást szabadíthatna fel más termékek előállítására. Ugyanakkor ezek a technológiák lehetőséget nyújtanak olyan fehérjetermékek előállítására is, amelyeknek csak igen kis volumenű felhasználása várható, pl. ilyenek a személyre szabott rákellenes vakcinák (Stoger és munkatársai, 2014). Nagyon fontos szempont, hogy a „molecular farming” technológiák lényegében nem igényelnek nagy számban szakképzett munkaerőt, így a fejlődő országok relatíve könnyebben bevonhatók a technológiafejlesztésekbe és a termelésbe is. Elvileg elérhető az is, hogy a termékeket, pl. HIV-t neutralizáló antitesteket, a felhasználás helyén, vagy ahhoz közeli régióban állítsák elő (Fischer és munkatársai, 2013; Stoger és munkatársai, 2014).

Fontos további szempont, hogy a növényi molekuláris gazdálkodási platformokon megtermelhetők olyan fehérjetermékek is, melyek előállítása más rendszerekben nem lehetséges, vagy körülményes, ilyenek pl. az IgA antitestek. Mivel a termékek, pl. humán rekombináns fehérjék, a növények sejtbiológiai folyamataival általában nem interferálnak, így a biológiailag aktív fehérjeformák közvetlenül megtermelhetők, nincs szükség pl. inaktív fúziós proteinek expressziójára, és ezek proteolitikus aktiválására sem (Stoger és munkatársai, 2014).

A jövőben mindenképpen szükséges a GMP („good manufacturing practice”; helyes gyártási gyakorlat) szabályozásoknak megfelelő molekuláris gazdálkodási technológiák kifejlesztése mind a növényi mag mind a levél alapú rendszerek esetében. Ezekben a technológiákban különös tekintettel kell lenni a nem-GMP környezetben zajló termelés (még üvegházak esetében sem) és elsődleges feldolgozás, valamint a GMP környezetben zajló „down-stream processing” folyamat közötti anyag-, pl. nyers extraktum, átadásra a termékminőség biztosítása érdekében (Fischer és munkatársai, 2012; Sabalza és munkatársai, 2014; Stoger és munkatársai, 2014). További erőfeszítések szükségesek a fehérjekihozatalt befolyásoló genetikai tényezők (transzkripciós szabályozás, a mRNA stabilitás és transzláció kontrollja) és epigenetikai faktorok (géncsendesítési folyamatok, a transzgén kópiaszám, szerkezet és

épség hatásai, episzomális expressziós rendszerek működése) jobb megismerésére és ezek eredményes befolyásolására is (Twyman és munkatársai, 2013; Sabalza és munkatársai, 2014). Várható a jövőben az *in vitro* növényi sejtkultúrás rendszerek elterjedése és további növényi expressziós platformok pl. moha (pl. *Physcomitrella patens*), békalencse (pl. *Spirodela oligorrhiza*) és mikroalga alapú rendszerek kifejlesztése és tökéletesítése is (Griesbeck és Kirchmayr, 2012; Xu és munkatársai, 2012). Fontos kihangsúlyoznunk a megfelelő kockázatbecslési eljárások alkalmazását és a szükséges kockázatkezelési eljárások kidolgozását is a transzgénikus növényeket felhasználó molekuláris gazdálkodási technológiákra (Breyer és munkatársai, 2012).

4.1.2.2. Molekuláris diagnosztikumok

A molekuláris diagnosztikumok különféle betegségek molekuláris markereit detektálják. Ezek a biomarkerek olyan specifikus molekulák (proteinek, DNS és RNS szekvenciák, metabolitok), melyek a beteg szövetekben jelennek meg, illetve a mennyiségük szignifikánsan megváltozik (csökken vagy növekszik) ezekben a szövetekben az egészséges szövetekhez viszonyítva (Glick és munkatársai, 2014). A biomarkerek megfigyelhetők és kvantifikálhatók is pl. vérben, vizeletben vagy szövetmintákban.

A molekuláris diagnosztikumok közül most csak a leggyakrabban használt, immunokémiai és nukleinsav alapú tesztek emelem ki.

Az enzimköttöt immunoszorbens tesztek („enzyme-linked immunosorbent assay”, ELISA) alkalmazásával különféle, betegségekkel kapcsolatos fehérjéket (pl. tumor marker fehérjéket), az autoimmunbetegségekre jellemző autoantitesteket és a fertőző betegségekért felelős kórokozók széles skáláját tudjuk kimutatni (Glick és munkatársai, 2014). Korunkban zajlik az immunokémiai eljárások „multiplexálása” (Tighe és munkatársai, 2015), ami megkönnyíti például a poligénus betegségek (rák, kardiovaszkuláris betegségek) diagnózisát, valamint az allergének egyidejű azonosítását (Glick és munkatársai, 2014). Gyakoriak a fehérje array (pl. antigén tesztek), a reverz fázisú fehérje mikroarray (a betegektől származó minták kerülnek immobilizálásra) és a mikroyöngy alapú technológiai megoldások különféle komplex rendszerek, pl. a vér és egyéb szövetminták (biopsziát illetve lézereres mikrokimetszést –

„laser capture microdissection” - követően) vizsgálatára (Glick és munkatársai, 2014; Tighe és munkatársai, 2015). Mindenképpen említést érdemel a patológiás protein konformáció változással és aggregálódással jellemezhető betegségek (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, prion betegségek) korai diagnózisára alkalmas antitestek kifejlesztése. Ilyen antitesteket már kifejlesztettek az Alzheimer-kór kimutatására. Az antitestek az amiloid β protein ($A\beta$) $A\beta_{42}$ variánsából 6-12 aminosavat tartalmaznak a CDR3 komplementaritást meghatározó régióban (V_H -domén), éppen azokat, amelyek az amiloid plakkok kialakításában szerepet játszanak. Ezek a rekombináns antitestek $A\beta$ oligomereket és amiloid szálakat nM-os affinitással képesek kimutatni (Perchiccia és munkatársai, 2012).

Ami a nukleinsav alapú diagnosztikumokat illeti, a legegyszerűbb, ugyanakkor az egyik legpotensebb alkalmazás bizonyos marker tulajdonságú DNS szakaszok jelzett próbákkal történő kimutatása hibridizáció révén. Ezzel az eljárással számos emberi patogén, pl. a maláriáért felelős *Plasmodium falciparum*, vagy egyes genetikai betegségeket okozó allélok, pl. a cisztás fibrózisért felelős hibás transzmembrán konduktancia szabályozó („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”, „CFTR”) gén változatok, nagy biztonsággal kimutathatók (Glick és munkatársai, 2014).

Napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő területe az SNP („single nucleotide polymorphism”, egy pontos nukleotid-polimorfizmus) mintázatok megállapítása, és ezen mintázatok összekapcsolása emberi betegségekkel (Musunuru és Kathiresan, 2008; Kelemen és munkatársai, 2009; Parkes és munkatársai, 2013; Pirie és munkatársai, 2015). Az SNP detektálásnak ma már számos kidolgozott módszere van, ilyenek például az oligonukleotid ligációs teszt („oligonucleotide ligation assay”, „OLA”), a „padlock” próba, allél-specifikus és TaqMan PCR technikák, SNP microarray eszközök, továbbá DNS fragmentumok MALDI-TOF MS analízise (Meyer és Ueland, 2011; Sato-Otsubo és munkatársai, 2012; Batra és munkatársai, 2014; Glick és munkatársai, 2014).

Mindenképpen ki kell emelnünk a PCR-alapú diagnosztikai eljárások jelentőségét az emberi kórokozók kimutatásában. Szép példa erre a meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus*, amely a sejtfalában MecA penicillin-kötő fehérjét tartalmaz, kimutatása. Ezen veszélyes kórokozó jelenlétét például a *mec* *Staphylococcus* kazetta kromoszómán („*mec* staphylococcal

cassette chromosome”, *SCC_{mec}* - egy patogenicitás sziget) található *mecA* gén MALDI-TOF MS (Clerc és munkatársai, 2013) vagy RT-PCR (Glick és munkatársai, 2014; Livorsi és munkatársai, 2015) módszerekkel történő detektálásával igazolhatjuk. Az RT-PCR-alapú eljárások segíthetnek egyes fertőzőes megbetegedések, pl. a közösségben szerzett tüdőgyulladás („community-acquired pneumonia”, CAP; Holter és munkatársai, 2015; Farida és munkatársai, 2015) kórokozóinak az azonosításában is (Edin és munkatársai, 2015). Ma már lehetőség van a jelenlévő baktériumok adott 16S rDNS szekvenciáinak a felszaporítására univerzális primerekkel és ezek teljes szekvenálására is, ami a potenciális kórokozó baktériumok teljes spektrumáról információt ad (McCann és munkatársai, 2015). Ezen kívül a jelenlévő kórokozókról (baktériumokról, vírusokról) DNS chipek alkalmazásával is gyorsan átfogó képet kaphatunk (McLoughlin, 2011; Rosenstierne és munkatársai, 2014; Jaing és munkatársai, 2015). Bár a szisztémás gombafertőzések egyre gyakoribbak, a fertőző gombák kimutatásában egyelőre a mikroszkópi megfigyeléseken, tenyésztésen, hisztopatológiai vizsgálaton és képalkotó eljárásokon alapuló módszerek a meghatározóak (Morace és Borghi, 2010; Bašková és Buchta, 2012). A problémát egyelőre mind az immunokémiai, mind a PCR-alapú kimutatásoknál a megfelelő standardizálás és validáció hiánya jelenti (Bašková és Buchta, 2012). PCR-alapú diagnosztikum fejlesztések már számos humán patogén gombafajra, pl. *Candida* és *Aspergillus* fajok, történtek (pl. Chen és munkatársai, 2002; Tuon, 2007; Morace és Borghi, 2010; Bašková és Buchta, 2012), illetve zajlik ezen eljárások klinikai validálása is (Fortún és munkatársai, 2014; White és munkatársai, 2015). Így remélhető, hogy ezen molekuláris diagnosztikai eszközök a jövőben jobban elterjednek majd a klinikai gyakorlatban.

Napjainkban egyre nagyobb igény mutatkozik az epigenetikai módosítások, mindenképp a DNS metilezettségi mintázatok megbízható kimutatására. Ennek számos lehetősége van, pl. (i) a metilezettségre érzékeny endonukleázok alkalmazásával, (ii) 5-metil-citozin specifikus antitestek felhasználásával, továbbá (iii) a nem-metilezett citozinok nátrium-biszulfitos dezaminálással uracillá történő átalakításával (Glick és munkatársai, 2014). Ez utóbbi eljárás értelemszerűen megváltoztatja a DNS szekvenciát, ami sokféleképpen, pl. PCR-rel, szekvenálással vagy akár DNS chipek alkalmazásával is vizsgálhatók (Glick és munkatársai, 2014). A dinamikusan fejlődő, különféle epigenetikai markerek azonosítására alkalmas molekuláris diagnosztikai eszközök a jövőben számos betegség, pl. rosszindulatú daganatos

betegségek diagnózisában játszhatnak majd igen fontos szerepet (Marzese és Hoon, 2015; Williamson és munkatársai, 2015).

A mRNS ujjlenyomat meghatározási lehetőségek, pl. DNS microarray és RT-PCR technikák segítségével, segíthetik a klinikusokat az egyes betegségekben bekövetkező globális génexpresszió változások feltérképezésében (Glick és munkatársai, 2014). Ezek a változások indikatívak lehetnek rákos megbetegedések, pl. a mellrák (MammaPrint microarray; Slodkowska és Ross, 2009; Kim és Paik, 2010), progressziójára vonatkozóan is. A patogén baktériumok antibiotikum expozíciókat követő mRNS mintázat változásai révén megállapítható, hogy a vizsgált izolátumokban milyen szerek ellen alakult ki rezisztencia, ami a gyógykezelés hatékonyságát jelentősen megnöveli (Glick és munkatársai, 2014). Napjainkban egyre nagyobb jelentőségre tesz szert a microRNS-ek szintjének a vizsgálata, mert egyes miRNS molekulák expresszió változásai információt adhatnak a vizsgált betegségek, pl. krónikus limfoid leukémia („chronic lymphocytic leukemia”, CLL), prognózisára és progressziójára vonatkozóan (Calin és munkatársai, 2005; Glick és munkatársai, 2014; Kminkova és munkatársai, 2014).

4.1.2.3. Terápiás eszközök

4.1.2.3.1. Terápiás fehérjék

A terápiás fehérjék előállítását és felhasználását számos kiváló gyógyszer-biotechnológiai és orvosi biotechnológiai szakkönyv tárgyalja (Walsh, 2003, 2007; Crommelin és munkatársai, 2008; Glick és munkatársai, 2014). Ez teljesen érthető, mert 2013-ban a humán rekombináns fehérjealapú gyógyszerek becsült globális piaci értéke horribilis összeg, 160 milliárd USD volt (Glick és munkatársai, 2014). A jól ismert termékek, pl. interferonok, hormonok, citokinek, rekombináns antitestek mellett több olyan fehérjetermék megjelenése prognosztizálható, melyek jelentősen javíthatják egy-egy adott betegségben szenvedő emberek életminőségét és gyógyulási esélyeit. Ezen jegyzet keretében sajnos csak kisszámú izgalmas kutatás, jövőbeni terápiás lehetőség bemutatására nyílik lehetőség.

Az első terület, amit meg szeretnék említeni, az antitest fragmentumok, pl. a rekombináns antigént kötő egyláncú antitest fragmentumok („single-chain antibody”, scFv; csak variábilis V_L és V_H doméneket tartalmaznak linker peptiddel összekapcsolva) terápiás felhasználása (Ahmad és munkatársai, 2012; Glick és munkatársai, 2014). Ezek a fragmentumok kis méretük ($M_r \approx 27$ kDa) révén könnyebben és hatékonyabban érnek el mély szöveti rétegeket, pl. a tumorok belső rétegeiben lévő sejtek felületén lévő fehérjéket, pl. növekedési faktor receptorokat, is. Ezek a rekombináns fehérjék kiválóan alkalmasak még kemoterápiás szerek, toxinok, izotópok, pro-drogokat aktiváló enzimek, továbbá immunocitokinek hatékony célba juttatására szintén rákellenes terápiák részeként (Ahmad és munkatársai, 2012; Scott és munkatársai, 2012; List és Neri, 2013; Glick és munkatársai, 2014). Meg kell említenünk, hogy a linkerek hosszának megfelelő megválasztásával bivalens dimerek, „diabodies” (sőt trimerek és tetramerek, azaz „triabodies” és „tetrabodies” !) is kialakíthatók. Ezen túlmenően lehetőség van bispecifikus (két antigént felismerő) „diabody” szerkezetek létrehozására is. A zöld fluoreszkáló fehérjével („green fluorescence protein”, GFP) konjugált scFv szerkezetek („fluorobodies”) pedig immunokémiai diagnosztikai eljárásokban, pl. fluorofór-kötött immunoszorbens tesztekben („fluorophor-linked immunosorbent assay”, FLISA), kerülhetnek felhasználásra (Oelschlaeger és munkatársai, 2002).

A rákterápiás alkalmazások mellett lehetőség van az éhséghormon ghrelint („growth hormone releaser”) kémiaiilag inaktiváló katalitikus antitest elhízás elleni felhasználására (Mayorov és munkatársai, 2008; Glick és munkatársai, 2014), valamint antiantrax antitestek (a *Bacillus anthracis* által termelt exotoxin ellen) létrehozására és terápiás alkalmazására is (Glick és munkatársai, 2014).

Ami a rekombináns enzimek terápiás alkalmazási lehetőségeit illeti, új alkalmazási területet jelent a bakteriális, pl. *Pseudomonas aureginosa*, biofilmek megbontása, ami életmentő lehet pl. cisztás fibrózisban szenvedő betegek esetében. A problémát az jelenti, hogy a komplex összetételű poliszacharid-fehérje-DNS mátrixba ágyazott, annak védelmét élvező baktériumtömeget antibiotikumokkal egyáltalában nem, vagy csak nagyon nehéz elérni és elpusztítani. További problémát jelent, hogy a tüdőben az alveoláris epitéliumon kialakuló vastag biofilm mátrix nyákanyag súlyosan akadályozza a beteg légzését is. Ekkor segíthet a biofilm megbontása hidrolázokkal, pl. rekombináns emberi DNáz I-el és ugyancsak

rekombináns *Flavobacterium* eredetű alginát (a baktériumok által termelt egyik fontos szekretált nyákképző poliszacharid) liázzal (Høiby és munkatársai, 2010a, 2010b; Glick és munkatársai, 2014).

Szintén érdekes és ígéretes kísérletek folynak a heterológ fehérjét expresszáló és szekretáló tejsavbaktériumok humán gyógyászati felhasználásával kapcsolatban (Glick és munkatársai, 2014). A szóba jöhető alkalmazások *Lactococcus lactis*ban történő heterológ expresszió révén Glick és munkatársai (2014) munkája alapján összefoglalva: (i) Interleukin 10 (a szabályozó T-sejtek működését modulálja) expresszió gyulladáscsökkentő bélbetegségek, pl. a Crohn betegség, kezelésére (orális alkalmazás; Bermúdez-Humarán, 2009; Bahey-El-Din és Gahan, 2010). (ii) Leptin (jóalakosság hormon) expresszió az elhízás ellen (intranazális alkalmazás; Bermúdez-Humarán és munkatársai, 2007). (iii) Inzulin expresszió a cukorbetegség kezelésére (orális alkalmazás; Robert és Steidler, 2007). Ezen túlmenően az AIDS kialakulását gátolhatja meg a cianovirin N (*Nostoc ellipsosporum* cianobaktériumból származó vírus-, köztük HIV-ellenes hatású fehérje) expressziója *Lactobacillus jensenii*ben, ami hüvelyi alkalmazás révén a HIV heteroszexuális transzmisszióját akadályozhatja meg (Liu és munkatársai, 2006; Glick és munkatársai, 2014; Lagenaur és munkatársai, 2015).

4.1.2.3.2. Terápiás nukleinsavak, emberi génterápia

A fehérjét nem-kódoló nukleinsavak, illetve a fehérjéket kódoló gének, mint gyógyszerek koncepcionálisan több évtizede jelen vannak a gyógyszerfejlesztők gondolkodásában (Croyle és munkatársai, 2008; Kay, 2011; Giacca és Zacchigna, 2012). Giacca és Zacchiaga (2012) összefoglaló munkája alapján a terápiás nukleinsavak a következőképpen csoportosíthatók:

(1) DNS szekvenciák (gének), melyek a következő terápiás fehérjéket kódolhatják: (i) Hiányzó fehérjék, vagy mutáció miatt nem megfelelően működő fehérjék, pl. Duchenne-féle izomdisztrófia, lizoszomális tárolási betegségek és hemofília kezelésekor. (ii) Sejtfunkciókat moduláló fehérjék, pl. citotoxikus T-sejteket stimuláló és HIV-1 replikációt blokkoló proteinek. (iii) Szekretált citokinek és növekedési faktorok, pl. a vaszkuláris endotélium növekedési faktor („VEGF”, „vascular endothelial growth factor”; pl. érrendszeri iszkémiás betegségek esetén), továbbá a neurotrofikus faktorok, köztük az agyi eredetű és glia sejtvonal

eredetű neurotrofikus faktorok („BDNF” és „GDNF”, „brain-derived neurotrophic factor” és „glial cell line-derived neurotrophic factor”, pl. a Parkinson és Alzheimer kórok kezelésére). (iv) A sejtek túlélését és apoptózisát szabályozó fehérjék, pl. prodrug aktivációs (öngyilkos gén) terápiákban (pl. HSV-1 timidin kináz – ganciclovir terápiák; Fecci és munkatársai, 2002). (v) Antigének vakcinálásra (antitumor és antivirális vakcinák). (vi) Antitestek és intracelluláris antitestek, pl. virális replikációt fenntartó proteinek (HIV) és antiapoptotikus fehérjék (tumorok) ellen. (vii) Módosított T-sejt receptor alegységek, melyek „újratargetálják” az immunválaszt, pl. rákos sejtek ellen.

(2) Fehérjéket nem-kódoló terápiás nukleinsavak csoportosítása (Giacca és Zacchigna, 2012):

(i) Oligonukleotidok, módosított, pl. foszforotioát („első generációs”) oligonukleotidok, 2'-ribóz módosított, pl. alkilezett („második generációs”) oligonukleotidok, valamint „harmadik generációs” oligonukleotidok, melyek lehetnek pl. zárt nukleinsavak („locked nucleic acid”, LNA), etilénhidakat tartalmazó nukleinsavak („ethylene-bridged nucleic acid”, ENA), morfolino-RNS („phosphorodiamidate morpholino oligo”, PMO) és peptid nukleinsavak („peptide nucleic acid”, PNA). Ezeket a nukleinsavakat gyakran vírusellenes és rákellenes antiszenz-RNS terápiákban alkalmaznak, és a kémiai módosítások a stabilitásnövelést szolgálják, pl. akadályozzák az RNS molekulák nukleázok általi lebontását (Schiffelers és Mastrobattsita, 2008; Glick és munkatársai, 2014). (ii) Katalitikus RNS-ek és DNS-ek, azaz ribozimek („ribozymes”) és DNS enzimek („DNAzymes”), valamint kis szabályozó RNS-ek, pl. kis interferáló RNS-ek („small interfering RNA”, siRNA) és kis hajtú RNS-ek („small hairpin RNA”, shRNA), pl. domináns örökletes betegségekben a patológiás allélok kifejeződésének a gátlására (gének „csendesítésére”) és vírusfertőzések blokkolására (Davidson és McCray, 2011). (iii) MikroRNS-ek (miRNS-ek) sejtfunkciók modulálására, pl. a szívizomsejtek proliferációjának a stimulálása szívinfarktust követően. (iv) Hosszú antiszenz RNS-ek, virális génexpresszió gátlására. (v) Nukleinsav csali („decoy”) egy adott faktor, pl. replikációs faktorok, lekötése, „kimerítése”, pl. vírus replikáció gátlása érdekében. (vi) Aptamerek, azaz olyan nukleinsavak, melyek specifikusan, nagy affinitással kötődnek egy adott target-molekulához, pl. növekedési faktorokhoz, ezzel meggátolva a biológiai aktivitásukat. Jó példa erre az időskori makuladegenerációért (a szem ideghártyájának lokális elfajulása) felelős VEGF₁₆₅ VEGF izoforma funkciógátlása pegaptanib aptamerrel (Freund és munkatársai, 2013).

A nukleinsavak célba juttatására számos eszközt használhatunk. Ezek közül kiemelkednek a virális vektorok, melyek leginkább gammaretrovírus, lentivírus, adenovírus, herpes simplex vírus 1-es típus (HSV-1) és adeno-asszociált vírus (AAV) eredetűek (Giacca és Zacchigna, 2012). Emellett alkalmazásra kerülhetnek még a közvetlen injektálás, a lipidekhez, pl. koleszterinhez, való kémiai kapcsolás, baktérium vektorokkal (nem-patogén *Escherichia coli*, attenuált *Salmonella*) történő célba juttatás, dendrimerek és antitestek alkalmazása (Glick és munkatársai, 2014). Egyre inkább elterjed a transzpozonok, pl. *Sleeping Beauty*, SB100X, alkalmazása is génterápiás szállító vektorokként (Izsvák és munkatársai, 2010; Swierczek és munkatársai, 2012).

A különféle nukleinsav készítmények humán génterápiás alkalmazásai a jövőben várhatóan dinamikusan bővülnek majd, hiszen 2012-ig ilyen készítményekkel a világ 31 országában 1843 klinikai vizsgálatot kezdtek el, illetve fejeztek be (Ginn és munkatársai, 2013). Az emberi génterápia területén abszolút világelső az USA a vizsgálatok 63,7 %-ával, míg második és harmadik az Egyesült Királyság és Németország a vizsgálatok 11 és 4,4 %-ával. A génterápiás klinikai vizsgálatok elsősorban a rákos megbetegedések (64,4 %), egyénes betegségek (8,7 %) és kardiovaszkuláris betegségek (8,4 %) leküzdésére irányultak. A bevitt gének funkció szerinti eloszlása már egyenletesebb eloszlást mutat, de az antigének (20,5 %), citokinek (18,4 %), tumor szuppresszorok (8,3 %) és az öngyilkos gének (8,1 %) aránya a legjelentősebb. Nem meglepő módon az alkalmazott vektorok leggyakrabban adenovírus (23,3 %) és retrovírus (19,7 %) alapúak, valamint csupasz/plazmid DNS-ek. Jelenleg a vizsgálatok döntő hányada, 78,6 %-a, van klinikai I-es és I/II-es vizsgálati fázisokban, míg klinikai II/III-as és III-as fázisban jelenleg mindösszesen a készítmények 4,5 %-a van, de a klinikai I-es fázison túljutott készítmények száma 2004 óta dinamikusan emelkedik (15→21,2 %) (Ginn és munkatársai, 2013).

4.1.2.3.3. Vakcinák

A 21. században a vakcinálás jelentősége tovább növekszik a bakteriális, virális és parazita fertőzések leküzdésében, továbbá az autoimmun és a rákos megbetegedések elleni védekezésben is (Glick és munkatársai, 2014). A hagyományos vakcinák lehetnek élő,

attenuált kórokozókat, inaktivált (hőkezeléssel vagy kémiai úton) kórokozókat, vagy alegységeit, pl. patogén extraktumokat, megtisztított proteinek, vagy poliszacharidokat, illetve ezek megfelelően módosított és/vagy kombinált formáit, tartalmazó készítmények (Jiskoot és munkatársai, 2008). A modern vakcinák genetikailag fejlesztett (genetikailag attenuált) élő kórokozókat, genetikailag fejlesztett alegységeket (genetikailag detoxifikált, gazdasejtekben expresszált, valamint rekombináns fehérjék), szintetikus peptideket (lineáris, vagy ciklikus, többszörös antigén peptidek, valamint peptid-protein konjugátumok), továbbá nukleinsavakat (az antigént kódoló DNS-t vagy RNS-t) tartalmaznak (Jiskoot és munkatársai, 2008).

A modern vakcinák genetikailag módosított és így gyengített (attenuált) élő kórokozókat, genetikailag fejlesztett alegységeket (genetikailag detoxifikált, gazdasejtekben expresszált, valamint rekombináns fehérjék), szintetikus peptideket (lineáris, vagy ciklikus, többszörös antigén peptidek, valamint peptid-protein konjugátumok), továbbá nukleinsavakat (az antigént kódoló DNS-t vagy RNS-t) tartalmaznak (Jiskoot és munkatársai, 2008).

Az attenuált vagy avirulenssé tett kórokozók alkalmasak, tulajdonképpen vektorokként, más kórokozók antigénjeinek a kifejezésére és szállítására is. Ezek a vektor vakcinák, melyek több kórokozó elleni egyidejű vakcinációt tesznek lehetővé (Jiskoot és munkatársai, 2008; Glick és munkatársai, 2014). Az eddig elért számos kísérleti eredmény közül a vaccinia vírussal (pl. hepatitis B, rabies, influenza és vezikuláris stomatitis vírusok antigénjeit expresszáló vírusokat állítottak elő), és az attenuált *Salmonella* baktériumokkal (kolera és tetanusz toxin fragmentumokat, valamint *Helicobacter pylori* ureáz enzim alegységeket expresszáltattak bennük) szeretném kiemelni (Glick és munkatársai, 2014).

A vakcinafejlesztés másik dinamikus terület a genetikailag fejlesztett alegységekkel történő vakcinálás. Az újonnan kifejlesztett alegység vakcinák a következő rekombináns fehérjéket tartalmazzák: herpes simplex vírus 1-s típus „envelope” glikoprotein D (gD), kolera toxin B alegység, SARS („severe acute respiratory syndrome”; súlyos akut légzőszervi szindróma) vírus S protein illetve humán papillomavírus kapszid fehérje variánsok (Glick és munkatársai, 2014).

A peptid vakcinák mind fertőző betegségek ellen, pl. malária, mind rákellenes terápiákban, továbbá az autoimmun és allergiás betegségekkel szemben is alkalmazást nyerhetnek (Glick és munkatársai, 2014). Ami a maláriát illeti, eredményes vakcinálási kísérletek folytak a merozoita felszíni fehérje 3 (MSP3) C-terminális peptidjével (Sirima és munkatársai, 2007; Nebie és munkatársai, 2009), továbbá befejeződtek egy új maláriaellenes vakcina, az RTS,S/AS01 jelű, klinikai III-as fázisú vizsgálatai. A kutatók megállapították, hogy az utóbbi vakcina 3 dózisban alkalmazva 65 %-ban volt hatékony 6-12 hetes újszülöttek esetében, és 80 %-ban 5-17 hónapos gyerekeknél egy éves felezési idővel (Penny és munkatársai 2015). Az RTS,S/AS01 vakcina, egyéb összetevők mellett, a *Plasmodium falciparum* circumsporozoita protein (CSP) ismétlődő és T-sejt epitóp régióit tartalmazza hepatitis B vírus felületi antigénjéhez (HBsAg) kapcsolva (Duffy és munkatársai, 2012; Glick és munkatársai, 2014).

A különféle rosszindulatú daganatok kezelésére számos peptid vakcinát állítottak elő, melyek általánosságban a CD8⁺ citotoxikus T limfocita (CD8⁺ CTL) válaszokat kívánják felerősíteni. Például a hasnyálmirigy rák kezelésére már mucin 1, telomeráz, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor (VEGFR), K-Ras, mesotelin és survivin peptid vakcinákat fejlesztettek ki egyelőre mérsékelt sikerekkel (Glick és munkatársai, 2014; Mizuguchi és munkatársai, 2015). A különféle autoimmun betegségek és allergiák kezelésében is szerepet kaphatnak az autoantigén és antigén peptid vakcinák, ekkor azonban a regulatórikus T sejtek aktivitásának a fokozása a cél (Glick és munkatársai, 2014).

A CD8⁺ CTL válasz erősítése lehetséges dendritikus sejt („dendritic cell”, DC) vakcinákkal is (Palucka és Banchereau, 2013). Ezek az antigént prezentáló sejtek felhasználhatóak a CD8⁺ T sejt immunitás kialakítására. Ez elérhető tumor antigének, illetve ezek megfelelő epitóp peptidjeinek a célzott, dendritikus sejtekbe történő juttatásával, pl. az antigének/epitópok anti-DC antitestekhez való kapcsolása és ezen konjugátumok alkalmazása révén. Ezek a konjugátumok általában DC felületi antigén felvételi receptorokat, pl. DEC-205, céloznak meg (Palucka és Banchereau, 2013; Glick és munkatársai, 2014). Ilyen konstrukciók elvileg alkalmasak fertőző betegségek, pl. a HIV, elleni vakcinálásra is (Glick és munkatársai, 2014).

A DNS vakcinák fejlesztése terén jelentős az előrelépés az elmúlt két évtizedben, de ezek a készítmények egyelőre nem kompetitívek a fehérje és szénhidrát alapú vakcinákhoz

viszonyítva (Li és munkatársai, 2012). Említést érdemel, hogy az elmúlt időszakban ezen vakcinák immunogenitását sikerült növelni, pl. biológiai adjuvánsok (citokinek, bakteriális toxin fragmentumok, immunmodulátorok) és elektroporáció (intramuszkuláris injekciót követően elektromos impulzus generátorral) alkalmazásával (Sahota és munkatársai, 2005; Li és munkatársai, 2012; Glick és munkatársai, 2014). A DNS vakcinák jövőbeni fejlesztését az „omikai” eszközökkel kapott eredmények és ezek bioinformatikai kiértékelése nagyban elősegíthetik. Például proteomikai kutatások révén sikerült megtalálni a humán szérum amiloid P (SAP) fehérjét, ami felelős lehet a hatékony plazmid transzfekció gátlásáért és a plazmidok eliminálásáért. Így ezen fehérje expressziójának a gátlása siRNS segítségével elősegítheti a DNS vakcinák hatékonyságának a növelését (Wang és munkatársai, 2011; Li és munkatársai, 2012).

A jövőben az „omikai” eszközök segíthetnek minket új, hatékony antigének azonosításában is, ami megkönnyíti effektív vakcinák kifejlesztését („reverz vakcinológia”; Li és munkatársai, 2012).

4.1.2.3.4. Szöveti sebészet, regeneratív orvoslás

A szöveti sebészet vagy szövettechnológia („tissue engineering”, „TE”) eredeti definíció szerint „egy olyan interdiszciplináris terület, amely a mérnöktudomány és az élettudományok törvényszerűségeinek az alkalmazásával biológiai szubsztituenseket fejleszt ki annak érdekében, hogy ezek szöveti funkciókat vagy akár egy egész szervet helyreállítsanak, fenntartsanak vagy kijavítsanak” („an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ”; Langer and Vacanti, 1993; Salgado és munkatársai, 2013). A regeneratív orvoslás („regenerative medicine”, „RM”) pedig „az a folyamat, amelyben emberi sejtek, szövetek és szervek kerülnek kicserélésre vagy regenerálásra annak érdekében, hogy a normál funkciót visszaállítsuk vagy kialakítsuk” („the process of replacing or regenerating human cells, tissues and organs to restore or establish normal function”; Mason és Dunnill, 2008; Salgado és munkatársai, 2013).

Újabb definíciók (Orlando és munkatársai, 2011) szerint, „a regeneratív orvoslás (RM) az egészségtudományok azon területe, amely emberi sejtek, szövetek vagy szervek kicserélését vagy regenerálását célozza annak érdekében, hogy a normál funkciót visszaállítsa, vagy kialakítsa. A test részeinek a regenerálási folyamata *in vivo* vagy *ex vivo* történhet, és ehhez sejtekre, természetes vagy mesterséges állványozó anyagokra („scaffolding materials”), növekedési faktorokra, génmanipulációra, vagy mindezen előbb említett elemek kombinációjára lehet szükség”. Ugyanakkor „a szöveti sebészet (TE) a regeneratív orvoslás (RM) olyan részterülete, amely a hatáskörében szűkebb, ugyanakkor, szigorúan definiálva, a test részeinek *ex vivo*, sejtek támogató állványzatokra vagy állványzatokba történő ültetésével állítunk elő”.

A legújabb kutatások tükrében az TE és RM közötti határvonalak elmosódni látszanak, ezért nem csoda, ha gyakran egymás szinonimáiként is használják őket, sőt a fogalmakat sokszor kombinálják is, és egyetlen kutatási területként kezelik őket („TERM”; Fisher és Mauck, 2013; Salgado és munkatársai, 2013; Katari és munkatársai, 2015). Mindenesetre a két terület koncepcionálisan még megkülönböztethető, tekintve, hogy a RM a szövetkicserélés sejtes (sejtszintű) regeneratív aspektusát, míg a TE a szövetkicserélés mérnöki és gyártási aspektusait hangsúlyozza ki (Katari és munkatársai, 2015a).

A szöveti sebészet és regeneratív orvoslás aktuális kutatási területei igen sokrétűek, a teljesség igénye nélkül Salgado és munkatársai (2013) alapján és irodalmi példákkal kiegészítve: (i) Különböző szövetek előállítására megfelelő állványzatok és sejtípusok felhasználásával (pl. csont – kerámia állványzat, csontvelő stroma sejtek; porc – gellángumi hidrogélek, kondrociták, Oliveira és munkatársai, 2010; meniszkusz – selyem, fibroblaszt és kondrocita sejtek, Mandal és munkatársai, 2011; csigolyaközötti porckorong – kémiaiilag módosított hidrogélek, őssejtek, kondrociták; idegszövet – gerincvelő – módosított gellángumi hidrogél, emberi idegi ős-/elődsejtek („neural stem/progenitor cells”, „NSPCs”), szaglóiidegeket burkoló gliasejtek („olfactory ensheathing glia” – „OEG” sejtek) Silva és munkatársai, 2012). (ii) Új típusú állványzatok előállítására (pl. polimeralapú 3D nyomtatással, Wu és Hsu, 2015). (iii) Különböző pluripotens és multipotens őssejtek felhasználása a TERM kutatási területeken. Jelenleg nagy erővel tanulmányozzák a mezenchimális (elsősorban

csontvelőből és köldökzsinórvérből származó) őssejtek és az indukált pluripotens őssejtek TERM fejlesztésekben való felhasználhatóságát (Salgado és munkatársai, 2013).

A TERM kutatási területek közül igen izgalmas és a közvélemény várakozása is övezi a teljes szervek transzplantációs célból történő létrehozását (Jain és Bansal, 2015; Peloso és munkatársai, 2015; Scarritt és munkatársai, 2015). Erre több lehetőség van, pl. szervekből történő „bioállványzat” előállítás (teljes szervi decellularizáció detergenssekkel, sókkal, enzimekkel, fizikai kezelésekkkel), majd ezen állványzatok, melyek 3D szerkezete és biológiai tulajdonságai megfelelőek, valamint érrendszerük és növekedési faktoraik is vannak, alkalmas sejtekkel történő kolonizációja (cellularizációja) révén. Természetesen más állványzatok alkalmazása is lehetséges, de ekkor az angiogenezis megfelelő indukcióját biztosítani kell, pl. artéria-véna hurkok („AV-loops”) kialakításával és/vagy fibrin gélben immobilizált angiogenetikus növekedési faktorok alkalmazásával (Horch és munkatársai, 2012). Említést érdemel, hogy már eddig is jelentős eredményeket értek el számos szerv, pl. vese, hasnyálmirigy, tüdő és szív, TERM technológiákkal történő előállításában (Ohashi és Okano, 2014; Cheung és munkatársai, 2015; Jain és Bansal, 2015; Katari és munkatársai, 2015b; Peloso és munkatársai, 2015; Prakash és munkatársai, 2015; Scarritt és munkatársai, 2015).

A legújabb technológiák közül ki kell emelnünk a szervek sejtekből történő 3D bionyomatásának („bioprinting”) a lehetőségét (Jain és Bansal, 2015). Az eljárás három fázisból áll: (i) A nyomtatni kívánt szerv vázlatának, azaz digitalizált képi rekonstrukciójának az elkészítése. (ii) Maga a nyomtatás, melynek révén sejtrétegeket, vagy sejtaggregátumokat nyomtatunk, azaz helyezünk el 3D környezetben a vázlatnak megfelelően. (iii) A nyomtatott szerv perfúziója és érésének a gyorsítása. Remélhetően ezen új technológia alkalmazásával lehetőség nyílik számos szerv és szövet, pl. véréredények és szívbillentyűk, előállítására és humán transzplantációs felhasználására (Mironov és munkatársai, 2009; Hoch és munkatársai, 2014; Seol és munkatársai, 2014; Jana és Lerman, 2015).

Az „TERM” technológiák forradalmasíthatják a fogorvostudományt is, és regeneratív fogorvoslási („regenerative dentistry”, „RD”) technikák sora jöhet létre, pl. a fogpótlások biztosítására, elsősorban a fogak őssejtjeinek a felhasználásával (Ikeda és munkatársai, 2009; Wei és munkatársai, 2014; Bansal és Jain, 2015; Jain és Bansal, 2015)

Az emberi életkor hosszabbodásával előtérbe kerültek az életminőség megőrzésével kapcsolatos kutatások (Horch és munkatársai, 2012). Ezen belül talán éppen a „TERM” kutatások eredményessége befolyásolhatja leginkább az idős emberek életminőségét és azt, hogy ne legyenek az egészségügyi ellátórendszerre ráutalva. A kétségtelen előrehaladás ellenére egyelőre nehéz megjósolni, hogy az egyes kutatási területeken mikor következnek be áttörések, és pontosan mikor jelennek meg nyereséges termékek és szolgáltatások (Polykandriotis és munkatársai, 2010; Horch és munkatársai, 2012; Jaklenec és munkatársai, 2012). A kutatásokat nagymértékben befolyásolhatják előre nem látott felfedezések, pl. ilyen lehet a szív telocita sejtek szerepe a parenchimális őssejtek túlélésében, proliferációjában, differenciálódásában, érésében és a sejtek közötti pozíciójának az elfoglalásában (Polykandriotis és munkatársai, 2010; Horch és munkatársai, 2012; Maria-Guiliana és munkatársai, 2015).

Nagyon fontos megjegyeznünk, hogy 2011-ben a szöveti sebészeti és őssejt terápiai termékek és szolgáltatások piacán az összes kiadások, azaz a fejlesztési és kereskedelmi ráfordítások együttesen, értéke (3,6 milliárd USD), másfélszeresen meghaladta a 2007-ben számított értéket (2,4 milliárd USD). Továbbá, a 2011-es összes árbevétel, ami 3,461 milliárd USD volt, majdnem elérte az összes kiadások volumenét (Jaklenec és munkatársai, 2012). Bár az egyes klinikai vizsgálati fázisokban az őssejt terápiai termékek dominálnak (73 %, a kiadások alapján számolva), a kereskedelmi forgalomban lévő termékek között egyelőre a biológiai anyagok („biomaterials”) érnek el nagyobb forgalmat (76 %, az árbevételek alapján kalkulálva). Az eladott termékek fele értékben ortopédiai felhasználásra kerülnek (Jaklenec és munkatársai, 2012). Ezen a területen is igen nyomasztó az USA fölénye, hiszen 2011-ben a kiadások 81 %-a (2,9 milliárd USD) történt a tengerentúlon, miközben az Európai Unió kiadásai jóval szerényebbek (0,4 milliárd USD, globálisan 11 %) voltak (Jaklenec és munkatársai, 2012).

4.1.2.3.5. Természetes eredetű hatóanyagok

Az utóbbi évtizedekben a gyógyszeripar a gyógyszerhatóanyagok tervezésekor egyre inkább a kombinatorikus kémia eszközeivel élt, és kevesebbet investált a teljesen új kémiai

szerkezetek felfedezésébe (Demain és Zhang, 2005; Demain, 2014). A természetes eredetű hatóanyagok felfedezésére és jellemzésére pedig kiváló eljárásaink, pl. nagy áteresztőképességű szűrés/tesztelés („high throughput screening”, „HTS”), vannak. A jövő gyógyszeriparának a sikere függ attól, hogy sikerül-e revitalizálnia a természetes hatóanyagok felfedezését illetve hatékonyan kombinálnia a természetes hatóanyag felfedezési, HTS, integratív és rendszerbiológiai, kombinatorikus bioszintetikus és kombinatorikus kémiai technológiákat (Demain és Zhang, 2005; Demain, 2014).

Napjainkban az új szerkezetű mikrobiális hatóanyagok felfedezését számos új eljárás segíti. Ilyenek például (i) az eddig laboratóriumban nem tenyészthető mikrobák tenyésztését lehetővé tévő új technikák és tápközegek kifejlesztése (Zengler, 2008), (ii) a környezeti DNS (metagenom) expressziója megfelelő mikroorganizmusokban, (iii) ko-kultivációs technológiák fejlesztése, (iv) kombinatorikus bioszintetikus, úgynevezett „génkeverési” („gene mixing”, pl. természetes és genetikailag módosított bioszintetikus génekkel) technikák alkalmazása, valamint (v) a legjobb tulajdonságú kémiai analógok kiválasztása és előállítása kémiai és kombinatorikus kémiai eszközökkel (Zhang, 2005).

A jövőben különösen ígéretesnek tűnik a metagenomokban fellelhető genetikai információ kiaknázása új típusú hatóanyagok, pl. antibiotikumok, előállítására. A metagenomi szekvenciák expressziója többféle baktériumban lehetséges, ezek közül az egyik leggyakrabban használt a *Streptomyces albus* alapú rendszer (Feng és munkatársai, 2011; Chang és Brady, 2013).

A kombinatorikus bioszintézisekben rejlő lehetőségeket jól példázza a különféle, részben nem-természetes, benzoldiol-lakton származékok előállítása pékésztőben a termelő gombák poliketid szintáz alegységeinek a heterokombinációja révén (Xu és munkatársai, 2014).

A természetes eredetű hatóanyagok között kiemelkednek a rák kezelésében felhasznált mikrobiális és növényi szekunder metabolitok (Newman és Cragg, 2005; Gordaliza, 2007). A jövőben külön érdeklődésre tarthatnak számot a növényi szövetekben élő endofiton gombák (Kharwar és munkatársai, 2011) és a tengeri élőlények (Russo és munkatársai, 2011) által termelt antitumor hatású vegyületek.

A következő fejezetekben (4.2. és 4.3. fejezetek) napjaink két igen fontos, szintén nagy érdeklődést vonzó területét, a humán patogén gombák kialakulásának evolúciós folyamatát, illetve a gombaellenes hatóanyagok jövőbeni fejlesztési lehetőségeit szeretném részletesebben áttekinteni.

4.1.3. Irodalomjegyzék a 4.1. fejezethez

Adams J.M. és Cory S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 61-66.

Agnandji ST és munkatársai (2011) First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1863-1875.

Agnandji ST és munkatársai (2015) Phase 1 trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe - preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, nyomtatásban, doi: 10.1056/NEJMoa1502924

Ahmad Z.A. és munkatársai (2012) scFv antibody: principles and clinical application. *Clin. Develop. Immunol.* **2012**, cikkazonosító: 980250

Bahey-El-Din M. és Gahan C.G. (2010) *Lactococcus lactis*: from the dairy industry to antigen and therapeutic protein delivery. *Discov. Med.* **9**, 455-461.

Bansal R. és Jain A. (2015) Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* **6**, 29-34.

Bašková L. és Buchta V. (2012) Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiol. (Praha)* **57**, 421-430.

Batra J., Srinivasan S. és Clements J. (2014) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). *Molecular Testing in Cancer*, Szerkesztők: Yousef G.M. és Jothi S., Springer Science+Business Media, New York, 55-80. oldalak

Benítez J.A. és munkatársai (1999) Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX Φ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect. Immun.* **67**, 539-545.

Bermúdez-Humarán L.G. és munkatársai (2007) Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5300-5307.

Bermúdez-Humarán L.G. (2009) *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Hum. Vaccin.* **5**, 264-267.

Bouabe H. és Okkenhaug K. (2013) Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol. Biol.* **1064**, 315-336.

- Breyer D. és munkatársai (2012) Biosafety of molecular farming in genetically modified plants. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Szerkesztők: Wang A. és Ma S., Springer, Dordrecht, 259-274. oldalak
- Calin G.A. és munkatársai (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1793-1801.
- Cardi T., Lenzi P. és Maliga P. (2010) Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **9**, 893-911.
- Chang F.Y. és Brady S.F. (2013) Discovery of indolotryptoline antiproliferative agents by homology-guided metagenomic screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 2478-2483.
- Chang M. és munkatársai (2014) Scaffold/matrix attachment regions from CHO cell chromosome enhanced the stable transfection efficiency and the expression of transgene in CHO cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **61**, 510-516.
- Chen S.C., Halliday C.L. és Meyer W. (2002) A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med. Mycol.* **40**, 333-357.
- Cheung D.Y., Duan B. és Butcher J.T. (2015) Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions. *Expert Opin. Biol. Ther.* **15**, 1155-1172.
- Chikwamba R. és munkatársai (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res.* **11**, 479-493.
- Clerc O. és munkatársai (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 355-360.
- Crommelin D.J.A., Sindelar R.D. és Meibohm B. (2008) *Pharmaceutical Biotechnology*, Informa Healthcare USA, New York
- Croyle M.A. (2008) Gene therapy. *Pharmaceutical Biotechnology*, Szerkesztők: Crommelin D.J.A., Sindelar R.D. és Meibohm B., Informa Healthcare USA, New York, 175-210. oldalak
- D'Aoust M.A. és munkatársai (2008) Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol. J.* **6**, 930-940.
- D'Aoust M.A. és munkatársai (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 607-619.
- Davidson B.L. és McCray P.B. Jr. (2011) Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 329-340.
- Demain A.L. (2014) Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 185-201.

Demain A.L. és Zhang L. (2005) Natural products and drug discovery. *Natural Products*, Szerkesztők: Zhang L. és Demain A.L., Humana Press, Totowa, 3-29. oldalak

Duffy P.E. és munkatársai (2012) Pre-erythrocytic malaria vaccines: identifying the targets. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 1261-1280.

Edin A. és munkatársai (2015) Development and laboratory evaluation of a real-time PCR assay for detecting viruses and bacteria of relevance for community-acquired pneumonia. *J. Mol. Diagn.* **17**, 315-324.

Farida H. és munkatársai (2015) Viruses and Gram-negative bacilli dominate the etiology of community-acquired pneumonia in Indonesia, a cohort study. *Int. J. Infect. Dis.*, nyomtatásban, doi: 10.1016/j.ijid.2015.07.023

Fecci P.E., Gromeier M. és Sampson J.H. (2002) Viruses in the treatment of brain tumors. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **12**, 553-570.

Feng Z., Kallifidas D. és Brady S.F. (2011) Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 12629-12634.

Fischer R. és munkatársai (2012) GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol. Adv.* **30**, 434-439.

Fischer R. és munkatársai (2013) Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants. *Curr. Pharmaceut. Design.* **19**, 5471-5477.

Fisher M.B. és Mauck R.L. (2013) Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue Eng. Part. B Rev.* **19**, 1-13.

Fortún J. és munkatársai (2014) Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 3134-3141.

Freund K.B., Mrejen S. és Gallego-Pinazo R. (2013) An update on the pharmacotherapy of neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin. Pharmacother.* **14**, 1017-1028.

Giacca M. és Zacchigna S. (2012) Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Contr. Release* **161**, 377-388.

Ginn S.L. és munkatársai (2013) Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. Gene Med.* **15**, 65-77.

Glick B.R., Delovitch T.L. és Patten C.L. (2014) *Medical Biotechnology*, ASM Press, Washington

Gordaliza M. (2007) Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* **9**, 767-776.

Grabowski G.A., Golembo M. és Shaaltiel Y. (2014) Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol. Genet. Metab.* **112**, 1-8.

Griesbeck C. és Kirchmayr A. (2012) Algae: an alternative to the higher plant system in gene farming. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Szerkesztők: Wang A. és Ma S., Springer, Dordrecht, 125-143. oldalak

Hoch E., Tovar. G.E. Borchers K. (2014) Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **46**, 767-778.

Horch R.E. és munkatársai (2012) Tissue engineering and regenerative medicine -where do we stand? *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 1157-1165.

Høiby N., Ciofu O. és Bjarnsholt T. (2010a) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* **5**, 1663-1674.

Høiby N. és munkatársai (2010b) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322-332.

Holter J.C. és munkatársai (2015) Etiology of community-acquired pneumonia and diagnostic yields of microbiological methods: a 3-year prospective study in Norway. *BMC Infect. Dis.* **15**, cikkazonosító: 64

Horch R.E. és munkatársai (2012) Tissue engineering and regenerative medicine -where do we stand? *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 1157-1165.

Ikeda E. és munkatársai (2009) Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13475-1380.

Izsvák Z. és munkatársai (2010) Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: victories and challenges. *Bioessays* **32**, 756-767.

Jain A. és Bansal R. (2015) Applications of regenerative medicine in organ transplantation. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **7**, 188-194.

Jaing C.J. és munkatársai (2015) Application of a pathogen microarray for the analysis of viruses and bacteria in clinical diagnostic samples from pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **27**, 313-325.

Jaklenec A. és munkatársai (2012) Progress in the tissue engineering and stem cell industry "are we there yet?". *Tissue Eng Part B Rev.* **18**, 155-66.

Jana S. és Lerman A. (2015) Bioprinting a cardiac valve. *Biotechnol. Adv.*, nyomtatásban, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.006.

Jiskoot W., Kersten G.F.A. és Mastrobattista E. (2008) Vaccines. *Pharmaceutical Biotechnology*, Szerkesztők: Crommelin D.J.A., Sindelar R.D. és Meibohm B., Informa Healthcare USA, New York, 405-427. oldalak

Katari R., Peloso A. és Orlando G. (2015a) Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, cikkazonosító: 57

Katari R. és munkatársai (2015b) Tissue-engineering approaches to restore kidney function. *Curr. Diab. Rep.* **15**, cikkazonosító: 643

Kay M.A. (2011) State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 316-328.

- Kelemen A., Vasilakos A.V. és Liang Y. (2009) Computational intelligence in bioinformatics: SNP/haplotype data in genetic association study for common diseases. *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.* **13**, 841-847.
- Kermonde A.R. (2012) Seed expression systems for molecular farming. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Szerkesztők: Wang A. és Ma S., Springer, Dordrecht, 89-123. oldalak
- Kharwar R.N. és munkatársai (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 1208-1228.
- Kim C. és Paik S. (2010) Gene-expression-based prognostic assays for breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 340-347.
- Kim J.Y., Kim Y.G. és Lee G.M. (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 917-930.
- Kminkova J. és munkatársai (2014) Identification of novel sequence variations in microRNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Carcinogenesis* **35**, 992-1002.
- Lagenaur L.A. és munkatársai (2015) Robust vaginal colonization of macaques with a novel vaginally disintegrating tablet containing a live biotherapeutic product to prevent HIV infection in women. *PLoS One* **10**, cikkazonosító: e0122730
- Landry N. és munkatársai (2010) Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One* **5**, cikk azonosító: e15559
- Langer R. és Vacanti J.P. (1993) Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926.
- Li L., Saade F. és Petrovsky N. (2012) The future of human DNA vaccines. *J. Biotechnol.* **162**, 171-182.
- List T. és Neri, D. (2013) Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **5**, 29-45.
- Livorsi D.J. és munkatársai (2015) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal real-time PCR: a predictive tool for contamination of the hospital environment. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, 34-39.
- Liu X. és munkatársai (2006) Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3250-3259.
- Liu H. és munkatársai (2015) Efficient production of FAM19A4, a novel potential cytokine, in a stable optimized CHO-S cell system. *Protein Expr. Purif.* **113**, 1-7.
- Lössl A.G. és Waheed M.T. (2011) Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 527-539.
- Lyon G.M. és munkatársai (2015) Clinical care of two patients with Ebola virus disease in the United States. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2402-2409.

- Ma J.K., Drake P.M. és Christou P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 794-805.
- Ma J.K. és munkatársai (2015) Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol. J.*, nyomtatásban, doi: 10.1111/pbi.12416.
- Ma S. és Wang A. (2012) Molecular farming in plants: and overview. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Szerkesztők: Wang A. és Ma S., Springer, Dordrecht, 55-80. oldalak
- Maliga P. és Tungsuchat-Huang T. (2014) Plastid transformation in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana sylvestris* by biolistic DNA delivery to leaves. *Chloroplast Biotechnology*, Szerkesztő: Maliga P., Springer Science+Business Media, New York, 147-163. oldalak
- Mandal B.B. és munkatársai (2011) Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 639-651.
- Maria-Giuliana V., Daniele B. és Maria-Simonetta F.P. (2015) Telocytes contribute as cell progenitors and differentiation inductors in tissue regeneration. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, nyomtatásban, PMID: 26018235
- Marzese D.M. és Hoon D.S. (2015) Emerging technologies for studying DNA methylation for the molecular diagnosis of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **15**, 647-664.
- Mason C. és Dunnill P. (2008) A brief definition of regenerative medicine. *Regen. Med.* **3**, 1-5.
- Mayorov A.V. és munkatársai (2008) Catalytic antibody degradation of ghrelin increases whole-body metabolic rate and reduces refeeding in fasting mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 17487-17492.
- McCann C.D. és munkatársai (2015) Evaluation of real-time PCR and pyrosequencing for screening incubating blood culture bottles from adults with suspected bloodstream infection. *Diagn. Microbiol Infect. Dis.* **81**, 158-162.
- McLoughlin K.S. (2011) Microarrays for pathogen detection and analysis. *Brief. Funct. Genomics* **10**, 342-353.
- Menassa R., Ahmad A és Joensuu J.J. (2012) Transient expression using agroinfiltration and its applications in molecular farming. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Szerkesztők: Wang A. és Ma S., Springer, Dordrecht, 183-198. oldalak
- Meyer K. és Ueland P.M. (2011) Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for multiplex genotyping. *Adv. Clin. Chem.* **53**, 1-29.
- Mironov V. és munkatársai (2009) Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* **30**, 2164-2174.
- Mizuguchi T. és munkatársai (2015) Trials of vaccines for pancreatic ductal adenocarcinoma: Is there any hope of an improved prognosis? *Surg. Today*, nyomtatásban, doi: 10.1007/s00595-015-1120-8
- Mor T.S. (2015) Molecular pharming's foot in the FDA's door: Protalix's trailblazing story. *Biotechnol. Lett.*, nyomtatásban, doi: 10.1007/s10529-015-1908-z

Morace G. és Borghi E. (2010) Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anesthesiol.* **76**, 950-956.

Murin C.D. és munkatársai (2014) Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 17182-17187.

Musunuru K. és Kathiresan S (2008) HapMap and mapping genes for cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **1**, 66-71.

Nandi S. és munkatársai (2005) Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain. *Transgenic Res.* **14**, 237-249.

Nebie I. és munkatársai (2009) Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. *Parasite Immunol.* **31**, 474-480.

Newman D.J. és Cragg G.M. (2005) The discovery of anticancer drugs from natural sources. *Natural Products*, Szerkesztők: Zhang L. és Demain A.L., Humana Press, Totowa, 129-168. oldalak

Nicholson L., Cañizares M.C. és Lomonosoff, G.P. (2006) Production of vaccines in GM plants. *Plant Biotechnology*, Szerkesztő: Halford N., John Wiley & Sons, Chichester, 164-192. oldalak

Nykiforuk C.L. és munkatársai (2011) Expression and recovery of biologically active recombinant Apolipoprotein AI_{Milano} from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *Plant Biotechnol J.* **9**, 250-263.

Nykiforuk C.L. és Boothe J.G. (2012) Transgenic expression of therapeutic proteins in *Arabidopsis thaliana* seed. *Methods Mol. Biol.* **899**, 239-264.

Oelschlaeger P. és munkatársai (2002) Fluorophor-linked immunosorbent assay: a time- and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. *Anal. Biochem.* **309**, 27-34.

Ohashi K. és Okano T. (2014) Functional tissue engineering of the liver and islets. *Anat. Rec. (Hoboken)* **297**, 73-82.

Oliveira J.T. és munkatársai (2010) Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **93**, 852-863.

Palucka K. és Banchereau J. (2013) Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* **39**, 38-48.

Parkes M. és munkatársai (2013) Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 661-673.

Peloso A. és munkatársai (2015) Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, cikkazonosító: 107

Penny M.A. és munkatársai (2015) The public health impact of malaria vaccine RTS,S in malaria endemic Africa: country-specific predictions using 18 month follow-up Phase III data and simulation models. *BMC Med.* **13**, cikkazonosító: 170

Perchiacca J.M. és munkatársai (2012) Structure-based design of conformation- and sequence-specific antibodies against amyloid β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 84-89.

Pirie A. és munkatársai (2015) Common germline polymorphisms associated with breast cancer-specific survival. *Breast Cancer Res.* **17**, cikkazonosító: 58

Polykandriotis E., Popescu L.M. és Horch R.E. (2010) Regenerative medicine: then and now - an update of recent history into future possibilities. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 2350-2358.

Prakash Y.S., Tschumperlin D.J. és Stenmark K.R. (2015) Coming to TERMS with tissue engineering and regenerative medicine in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, nyomtatásban, doi: 10.1152/ajplung.00204.2015.

Qiu X. és munkatársai (2014) Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* **514**, 47-53.

Robert S. és Steidler L. (2014) Recombinant *Lactococcus lactis* can make the difference in antigen-specific immune tolerance induction, the Type 1 Diabetes case. *Microb. Cell Fact.* **13 Suppl 1**, cikkazonosító: S11

Rosenstierne M.W. és munkatársai (2015) The microbial detection array for detection of emerging viruses in clinical samples—a useful panmicrobial diagnostic tool. *PLoS One* **9**, cikkazonosító: e100813

Russo P., Nastrucci C. és Cesario A. (2011) From the sea to anticancer therapy. *Curr. Med. Chem.* **18**, 3551-3562.

Rybicki E.P. (2014) Plant-based vaccines against viruses. *Viol. J.* **11**, cikkazonosító: 205

Sabalza M., Christou P. és Capell T. (2014) Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. *Biotechnol. Lett.* **36**, 2367-2379.

Sack M. és munkatársai (2015a) The increasing value of plant-made proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**, 163-170.

Sack M. és munkatársai (2015b) From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol. J.*, nyomtatásban, doi: 10.1111/pbi.12438

Sahota S.S., Townsend M. és Stevenson F.K. (2005) Identification and assembly of V genes as idiotype-specific DNA fusion vaccines in multiple myeloma. *Methods Mol. Med.* **113**, 105-119.

Salgado A.J. és munkatársai (2013) Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future. *Int. Rev. Neurobiol.* **108**, 1-33.

Sato-Otsubo A., Sanada M. és Ogawa S. (2012) Single-nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when, and how? *Semin. Oncol.* **39**, 13-25.

Scarritt M.E., Pashos N.C. és Bunnell B.A. (2015) A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, cikkazonosító: 43

- Scott A.M., Wolchok J.D. és Old L.J. (2012) Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278-287.
- Schiffelers R.M. és Mastrobattista E. (2008) Oligonucleotides. *Pharmaceutical Biotechnology*, Szerkesztők: Crommelin D.J.A., Sindelar R.D. és Meibohm B., Informa Healthcare USA, New York, 211-224. oldalak
- Schillberg S., Fischer R. és Emans N. (2003) 'Molecular farming' of antibodies in plants. *Naturwissenschaften* **90**, 145-55.
- Seol Y.J. és munkatársai (2014) Bioprinting technology and its applications. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **46**, 342-348.
- Silva N.A. és munkatársai (2012) The effects of peptide modified gellan gum and olfactory ensheathing glia cells on neural stem/progenitor cell fate. *Biomaterials* **33**, 6345-6354.
- Sirima S.B. és munkatársai (2007) Safety and immunogenicity of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa. *Vaccine* **25**, 2723-2732.
- Slodkowska E.A. és Ross J.S. (2009) MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**, 417-422.
- Stoger E. és munkatársai (2014) Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 743-768.
- Swierczek M., Izsvák Z. és Ivics Z. (2012) The Sleeping Beauty transposon system for clinical applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **12**, 139-153.
- Talavera A. és munkatársai. (2006) Process development for a Cuban cholera vaccine based on the attenuated strain *Vibrio cholerae* 638. *Vaccine* **24**, 3746-3749.
- Tighe P.J. és munkatársai (2015) ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin. Appl.* **9**, 406-422.
- Tregoning J. és munkatársai (2004) New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC. *Phytochemistry* **65**, 989-994.
- Tuon F.F. (2007) A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev. Iberoam. Micol.* **24**, 89-94.
- Twyman R.M., Schillberg S. és Fischer R. (2012) The production of vaccines and therapeutic antibodies in plants. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Szerkesztők: Wang A. és Ma S., Springer, Dordrecht, 145-159. oldalak
- Twyman R.M., Schillberg S. és Fischer R. (2013) Optimizing the yield of recombinant pharmaceutical protein in plants. *Curr. Pharmaceut. Design* **19**, 5486-5494.
- Walsh G. (2003) Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **55**, 3-10.

Walsh G. (2007) *Pharmaceutical Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester

Wang A. (2012) Plant virus-mediated expression in molecular farming. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Szerkesztők: Wang A. és Ma S., Springer, Dordrecht, 199-216. oldalak

Wang Y. és munkatársai (2012) Serum amyloid P component facilitates DNA clearance and inhibits plasmid transfection: implications for human DNA vaccine. *Gene Ther.* **19**, 70-77.

Wei F. és munkatársai (2013) Functional tooth restoration by allogeneic mesenchymal stem cell-based bio-root regeneration in swine. *Stem Cells Dev.* **22**, 1752-1762.

White P.L. és munkatársai (2015) *Aspergillus* polymerase chain reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clin. Infect. Dis.*, nyomtatásban, doi: 10.1093/cid/civ507

Williamson J.S. és munkatársai (2015) Review of the development of DNA methylation as a marker of response to neoadjuvant therapy and outcomes in rectal cancer. *Clin. Epigenetics* **7**, cikkazonosító: 70

Wu G.H. és Hsu S.H. (2015) Review: polymeric-based 3D printing for tissue engineering. *J. Med. Biol. Eng.* **35**, 285-292.

Xiao S., Shiloach J. és Betenbaugh M.J. (2014) Engineering cells to improve protein expression. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **26**, 32-38.

Xu J. és munkatársai (2012) Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1171-1184.

Xu Y. és munkatársai (2014) Diversity-oriented combinatorial biosynthesis of benzenediol lactone scaffolds by subunit shuffling of fungal polyketide synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 12354-12359.

Yusibov V. Streatfield S.J. és Kushnir N. (2011) Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Hum. Vaccin.* **7**, 313-321.

Zengler K. (2008) *Accessing Uncultivated Microorganisms*, ASM Press, Washington

Zhang L. (2005) Integrated approaches for discovering novel drugs from microbial natural products. *Natural Products*, Szerkesztők: Zhang L. és Demain A.L., Humana Press, Totowa, 33-55. oldalak

Zimran A. és munkatársai (2011) Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood* **118**, 5767-5773.

4.2. A humánpatogén gombák evolúciója

4.2.1. Patogének a gombavilágban

Annak érdekében, hogy hatékony gyógyszereket fejleszthessünk ki a humánpatogén gombák ellen, meg kell ismernünk a patogénné válás evolúciós mechanizmusát. Vajon vannak-e az evolúciós értelemben egymástól távol álló gombacsoportokon átívelő közös motívumok, amelyek hasznosíthatók új támadáspontok kijelölésében? Milyen gyors ez a folyamat? Az immunrendszer működési zavarai, az immunszuppressziót igénylő orvosi beavatkozások terjedése nyomán nő a mikózisok száma, vagy a gombavilág napjainkban felgyorsuló evolúciós folyamatai eredményezik a növekvő esetszámokat? Ez mind izgalmas kérdés, és éppen mára éri el a biológia azt a fejlettségi szintet, hogy ezeket a kérdéseket érdemben meg tudjuk válaszolni! A patogén gombák evolúciójával számos kiváló munka foglalkozik. Jelenlegi ismereteinket először Heitman (2011) összefoglaló munkája alapján szeretném bemutatni.

Kétségtől, az emberiség létére nézve a legfenyegetőbbek a fertőző betegségek. Napjainkban számos irodalmi adat támasztja alá azt a megfigyelést, hogy a gombafertőzések száma dinamikusan nő, sőt terjed az antifungális szerek elleni rezisztencia, továbbá a gyógyszerek és vakcinák száma jóval kevesebb, mint a bakteriális fertőzések esetében (Heitman, 2011).

A hatékonyan (és súlyos mellékhatások nélkül) felhasználható gombaellenes gyógyszerek számát nagymértékben korlátozza és a gyógyszerfejlesztést jelentős mértékben megnehezíti az a tény, hogy a gomba- és állatvilág közötti evolúciós távolság jóval kisebb, mint azt előzőleg gondoltuk. A két regnum közös őse a ma élő choanoflagellátákra emlékeztet és kb. 1 milliárd évvel ezelőtt élt. A ma élő choanoflagelláta *Monosiga brevicolis* genommérete kb. 40 Mb, ami megközelítőleg 9000 fehérjét kódol. Ez nagyjából megegyezik a mai gombák genom méretével (Heitman, 2011).

Az evolúcióbiológiai kutatások igazolták, hogy a patogén életmód számos, egymástól független alkalommal alakult ki a gombák törzsfajlódása alatt. Gombatörzsenként megvizsgálva a kérdést:

A Chytridiomycota törzsben említést érdemel a *Batrachochytrium dendrobatidis* faj, ami a kétéltűek jelenlegi világjárványáért felelős, és ami bőrfertőzést, a vízgyengensúly felborulását okozza. A megbetegedés gyakran halálos kimenetelű. Itt érdekes megemlíteni, hogy Casadeval (2005) modellje szerint a gombák hozzájárulhattak a dinoszauruszok kipusztulásához is.

A Zygomycota törzsben (a phylum mára egy törzsre és négy *incertae sedis* altörzsre bomlott fel) a *Rhizopus* és *Mucor* fajok végzetes szisztémás fertőzéseket okozhatnak emberben is, mivel sok ma használatos gombaellenes szerrel szemben rezisztensek. Említést érdemel, hogy ezek a fajok dimorfizmusra is képesek (Heitman, 2011).

A Basidiomycota törzsben két fajt célszerű kiemelni, és ezek a *Cryptococcus neoformans* és a *Cryptococcus gattii*. Madár (pl. galamb) ürülékben, továbbá fákon figyelhetők meg. A kicsi spóráik eléri az alveolusokat, majd később akár halálos kimenetelű agyhártya- és agyvelőgyulladást is okozhatnak. Világszerte az esetszám kb. 1 millió/év, ebből több mint 620 ezer halálos kimenetelű fertőzés, és az AIDS-es halálesetek kb. 1/3-áért felelősek, és Afrikában több halálesetet okoznak, mint a TBC (Park és munkatársai, 2009; Heitman, 2011)! Bár az 1999-es Vancouver-szigeti járványban, amit a *C. gattii* okozott, a megbetegedettek több, mint 50 %-a egészséges volt, a halálozás mégis 20-33 % között mozgott (Heitman, 2011).

A *Malassezia* fajok, így a *M. restricta* és a *M. globosa*, bőrbetegségeket, pl. ekcéma, hajkorpásodás, okoznak. Mivel ezek a fajok nem tudnak lipideket szintetizálni, ezért ezeket a faggyúból nyerik. Emberről emberre könnyen terjednek, kommenzalistáknak és kórokozóknak is tekinthetjük őket. Az üszöggombák, pl. *Ustilago maydis*, közeli rokonai, jelentős lipáz és proteáz termelők (Heitman, 2011).

Az Ascomycota törzs evolúciósan igen sikeres törzs, és több hullámban alakultak ki benne emberi patogének. Példaként megemlíthetjük az archiascomyceták között a *Pneumocystis* fajokat, melyek gazdaspecifikusak, a hemiascomyceta *Candida* fajokat, melyek hatékonyan képeznek biofilmeket, továbbá az euascomyceta dermatofiton és *Aspergillus* fajokat (Heitman, 2011).

Általánosságban elmondható, hogy a legsikeresebb emberi patogéneknek (*Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*) van ivaros alakjuk, de sok esetben aszexuális és paraszexuális folyamatok, valamint késleltetett szexuális reprodukció figyelhető meg populációikban. Mivel a szexuális folyamatok ritkák vagy rejtettek, így általában klónokkal találkozunk a gyakorlatban, amelyeknek korlátozottak a rekombinációs lehetőségeik (Heitman, 2011).

A dimorfizmus nagyon gyakori, és közvetlenül befolyásolja a virulenciát. Nevezetes kivétel az *A. fumigatus*, ami kizárólagosan hifa morfológiájú. Nem mondható ki, hogy mindig a hifa forma patogén, például a szervezetben a *C. neoformans* kizárólagosan élesztő morfológiájú, azon kívül viszont legtöbbször fonalas (Heitman, 2011).

Az emberi patogén gombák kialakulásának folyamata alapvetően háromféle lehet:

1. Kommenzalistából lesz patogén, pl. a *Candida* fajok, melyek a bőrön és nyálkahártyákon figyelhetők meg, sikerrel adaptálódtak az immunrendszerhez, továbbá emberről emberre terjednek.
2. Széles körben kolonizálják és fertőzik az embert, ugyanakkor kérdéses, hogy az emberi mikrobiom részei-e, vagy sem, pl. a *Malassezia* és *Pneumocystis* fajok, melyek emberről emberre terjednek vagy vektorok viszik át őket vagy esetleg aeroszol belélegzésével jutnak be a gazdaszervezetbe.
3. Környezeti patogének, melyek emberről emberre nem terjednek, ilyenek például a *Cryptococcus* és az *Aspergillus* fajok. Ezek a gombák általában véletlenszerű („accidental”) patogének (Casadevall és Pirofski, 2007), melyek a gazdaszervezetek evolúciós olvasztótégelyében, pl. amóbák, nematódák, rovarok, sőt növények patogénjeiként, szerzik meg a fertőzőképességüket. Ezek a gombák részt vehetnek komplex állat-környezet-állat, vagy éppen kriptikus állat-állat ciklusokban is. A *Coccidioides immitis* esetében megfigyelhető a proteáz gének expanziója a növényi biomasszát lebontó enzimek rovására, miközben a gomba képessé vált holt és élő állati szöveteken növekedni. Ezért ez a faj inkább evolúció révén kialakult („evolved”) és nem véletlenszerű („accidental”) patogénnek tekinthető (Heitman, 2011).

4.2.2. Az *Aspergillus* nemzetség

Az *Aspergillus* fajok evolúciója több szempontból is tanulságos és nagy gyakorlati jelentőségű, hiszen mind orvosi mind ipari szempontból fontos fajok tartoznak ide (Gibbons és Rokas, 2012). Igazi „Dr. Jekyll és Mr. Hyde” genusról van tehát szó! Az eddigi vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az *Aspergillus* genomok nem plasztikusak, hanem meglehetősen stabilak (Gibbons és Rokas, 2012). Az *Aspergillus* genomok evolúciójában némi szerepet játszhatnak horizontális géntranszfer események, főképpen a szekunder metabolitok szintézis útvonalaira vonatkozóan (lásd a génklaszterek meglétét és szabályozását) (Gibbons és Rokas, 2012). Az *Aspergillus* fajok patogenezisének a megértése szempontjából kiemelkedő jelentőségű volt az *Aspergillus fumigatus* genomjának a megszekvenálása, és a nem patogén *Neosartorya fischeri* (Niermann és munkatársai, 2005; Fedorova és munkatársai, 2008) és *Aspergillus clavatus* (Fedorova és munkatársai, 2008) fajok genomjaival való összevetése.

4.2.3. A patogén gombáink evolúciója

A gomba kórokozók evolúciója specifikus elemek mellett általános vonásokat is mutat (Fedorova és munkatársai, 2008). A leghatékonyabb eszközöket a kórokozó képesség megértéséhez az összehasonlító genomikai kutatások szolgáltatják. A kórokozásban fontos szerepet játszó gének megtalálásához nagyon fontos a megfelelő, az evolúciót tekintve közeli, apatogén referenciaszervezet megtalálása. Ilyenek az *Aspergillus fumigatus* esetében a *Neosartorya fischeri* (és *Aspergillus clavatus*), a *Candida albicans* esetében pedig a *Candida dubliniensis*. Vigyázat, a „közeli” fajok közötti evolúciós távolság is meglepően nagy lehet! Például ha összehasonlítjuk a fajok divergenciáját az átlagos ortológ fehérje szekvencia azonosságok alapján a penészek, élesztők és gerincesek között, akkor megállapíthatjuk, hogy az *A. fumigatus* és *N. fischeri* evolúciós távolság az élesztők között a *Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces paradoxus*, a gerincesek között pedig az ember és egér közötti távolságnak felel meg! Gyakran használják még az összehasonlító genomikai munkákban az *A. fumigatus* és *Aspergillus clavatus* genom összevetéseket is, de ekkor már a fajok közötti távolság majdnem az ember és madarak közötti távolságnak felel meg. Még távolabb menve, az *A. fumigatus* és *Aspergillus oryzae/Aspergillus terreus/Aspergillus nidulans/Aspergillus niger* távolságok már majdnem elérik az ember-halak közötti távolságot, ami éppen

megegyezik a *S. cerevisiae* és *Candida glabrata* közötti távolsággal (Fedorova és munkatársai, 2008).

Az összehasonlító genomikai kutatások mellett további értékes információkat adhat az opportunistá patogén gombák evolúciójára vonatkozóan az adott faj (pl. *Aspergillus fumigatus*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*) különböző törzsei genomjának a szekvenálása és összehasonlítása is (Fedorova és munkatársai, 2008; Prysycz és munkatársai, 2013; Strobe és munkatársai, 2015).

Összességében megállapítható, hogy a genomikai és összehasonlító genomikai vizsgálatok kivételes jelentőséggel bírnak, és a jövőben is nagy jelentőségű eszközök maradnak, a patogén gombák virulencia mechanizmusának a megértésében (Perez-Nadales és munkatársai, 2014). Az összehasonlító genomikai (és transzkriptomikai) adatok különösen értékesek az újonnan megfigyelt opportunistá emberi paraziták, pl. egyes *Saccharomyces cerevisiae* klinikai izolátumok, virulencia faktorainak a felderítésében (Llopis és munkatársai, 2012; Strobe és munkatársai, 2015).

4.2.4. Az *Aspergillus fumigatus* összehasonlító genomikai elemzése

Fedorova és munkatársai (2008) *A. fumigatus* klinikai izolátumok továbbá az *A. clavatus* és *N. fischeri* genomjának az összehasonlító elemzése révén megállapították, hogy a patogén *A. fumigatus*ra jellemző a fajspecifikus gének genomi szigetekben való tömörülése, melyek nagy valószínűséggel található meg a szub-telomerikus régiókban. Ezekre a szigetekre jellemző a pszeudogének, transzpozonok és más ismétlődő régiók dúsulása. A genomi szigetek gén lerakóhelyekként („gene dumps”) illetve gén gyárakként („gene factories”) funkcionálnak. Az *A. fumigatus* esetében a fajspecifikus gének legalább 20 %-a funkcióképes, és fontos szerepet játszanak a szénhidrát- és kitin lebontásban, transzportfolyamatokban, detoxifikációs folyamatokban és a másodlagos anyagcserében. A fajspecifikus gének evolúciója főképpen duplikáción, diverzifikáción és differenciális génvesztésen alapul („duplication, diversification and differential gene loss”; „DDL”), míg a horizontális géntranszfer (Mallet és munkatársai, 2010) jelentősége a vártnál kisebb.

4.2.5. A *Coccidioides* fajok összehasonlító genomikai elemzése

A kutatók a patogén *Coccidioides immitis* és *Coccidioides posadasii* fajokat az apatogén *Uncinocarpus reesii*vel hasonlították össze (Sharpton és munkatársai, 2009). A genomelemzések nyomán megállapították, hogy 93 *Coccidioides* specifikus gén van, amelyek a szferulaképzésben vesznek részt, és amelyek metabolikus fehérjéket, integráns membrán és sejtfelszíni proteineket kódolnak. Továbbá a *Coccidioides* fajokban hemkötő fehérjék figyelhetők meg, és a szubtelomerikus régiókban itt is faj-specifikus genomi szigetek találhatóak. Nem meglepő módon nincsenek a növényi biomassza lebontását lehetővé tevő enzimek, ugyanakkor nagy proteáz családok azonosíthatók mind a három vizsgált fajban, ami egyértelműen az állati szervezetekhez való alkalmazkodást jelzi.

4.2.6. Az *Arthroderma benhamiae* és *Trichophyton verrucosum* dermatofita gombák genomjának elemzése

Az egymással és a *Coccidioides* fajokkal (szintén az Onygenales rendbe tartozik) valamint az *Aspergillus fumigatus*sal való genom összehasonlítás eredményeképpen Burmester és munkatársai (2011) megállapították, hogy a dermatofita gombákban megfigyelhető szekretált proteáz családok amplifikálódtak, és a proteázok egy része a keratin bontásán túlmenően valószínűleg más élettani funkciókat is ellát a gazdaszervezethez történő adaptációban. Említést érdemel, hogy a többi emberi patogén gombához viszonyítva ezen dermatofita fajok genomjai nagyszámban tartalmaznak szekunder metabolit bioszintézis génklasztereket, mégpedig az *Arthroderma benhamiae* 26-ot, míg a *Trichophyton verrucosum* 25-öt. Bár további vizsgálatok szükségesek a vizsgált gombák szekunder metabolit termelésének a felderítésére, de az feltételezhető, hogy a gombák által termelt pigmentek összefüggésbe hozhatók a virulenciájukkal (Burmester és munkatársai, 2011).

4.2.7. A *Candida albicans*

A *C. albicans* Saccharomycetales rend Saccharomycetales *incertae sedis* családjának a CTG kládjába tartozik, azaz a CUG kodont leucin helyett szerinnek fordítja (McManus és Coleman, 2014). A *C. albicans* és *C. dubliniensis* testvérfajok a *C. tropicalis* ősről kb. 20

millió évvel ezelőtt váltak le. A *C. albicans* gomba genomja rendkívül plasztikus, ami a paraszexualis ciklusának, heterozigóta genotípusának, aneuploid magok jelenlétének és a repetitív DNS szekvenciáknak tulajdonítható (McManus és Coleman 2014). A *C. albicans* evolúciós sikeréhez a kiemelkedő élesztő↔hifa, pszeudohifa átalakulási képesség (Lackey és munkatársai, 2013; Wartenberg és munkatársai, 2014) és a „white-opaque” fenotipikus átmenetre való képesség (Xie és munkatársai, 2013) is nagymértékben hozzájárultak.

4.2.8. *Candida albicans* – molekuláris epidemiológia

McManus és Coleman (2014) diploid szekvencia típusok („DST”) meghatározását végezte el 2244 *C. albicans* izolátum esetében. Az izolátumok különféle testtájokról és különféle földrajzi helyekről származtak mind az öt kontinensre kiterjedően. A kutatóknak végül multilókusz szekvencia tipizálás („MLST”) révén 18 kládot sikerült elkülöníteni és jellemezni.

Áttekintve az egyes kládokat megállapítható, hogy a felületi és vaginális infekciókat okozó 1. kládbeli izolátumok az egész világon elterjedtek, míg más kládok földrajzi elterjedése, pl. az ugyancsak vaginális fertőzést okozó 13. kládé (afrikai elterjedés), sokkal korlátozottabb. A 3-as (USA), 5-ös (Európa/UK) és 6-os (UK) kládok izolátumai főképpen oropharyngeális fertőzéseket okoznak, míg a 2-es (UK), 4-es (Közép-Kelet, Afrika) és 8-as (Dél-Amerika) kládok kandidémiát (vérből tenyésztették ki őket). Érdeemes megemlíteni, hogy a 8-as kládban vadállatokból származó izolátumok és feldúsultak (McManus és Coleman 2014).

4.2.9. A *Candida albicans* genom evolúciója

Nem meglepő módon, az evolúciót tekintve az *Aspergillus*októl nagyon távoli (Wang és munkatársai, 2009) *C. albicans* dimorf gomba virulenciához kapcsolódó génjeinek kialakulása az ott megismertekkel rokon mechanizmusok révén történt (Moran és munkatársai, 2011). Ebben az esetben is a géncsaládok duplikációk révén expandáltak, emellett génvesztések és pszeudogenizáció is megfigyelhetők. Az *Aspergillus*okhoz hasonlóan a horizontális géntranszfer ritka esemény (Moran és munkatársai, 2011).

Moran és munkatársai (2011) összefoglaló közleménye alapján a patogén gombák kialakulásában szerepet játszó legfontosabb folyamatok a következők: gén duplikáció és expanzió, pl. *ALS* és *SAP* gének *C. albicans*ban, a metalloproteázok *Coccidioides*ekben, expanzió a telomer régióban, pl. szekunder metabolit génklaszterek az *Aspergillus* fajokban, *EPA* gének *C. glabrata*ban, *TLO* gének *C. albicans*ban, génvesztés és pszeudogenizáció, pl. galaktóz metabolikus gének *C. albicans*ban, *HYRI* *C. dubliniensis*ben, horizontális géntranszfer (ritka), pl. prolin racemáz *C. parapsilosis*ban.

4.2.10. A filogenetikailag rokon *Candida albicans* és *Candida dubliniensis* összehasonlító élettani és genomikai vizsgálata

A *Candida* genomok összehasonlító elemzését számos adatbázis és bioinformatikai eszköz, pl. a „Candida Gene Order Browser” („CGOB”) teszi hatékonyvá (Maguire és munkatársai, 2013).

A *C. albicans* sokkal virulensebb a *C. dubliniensis*nél, bár az utóbbi fenotipikusan is nagyon hasonló a *C. albicans*hoz. A két élesztő virulencia faktor készlete is nagyon hasonló, pl. adhéziós faktorok, dimorfizmus, „phenotype switching”, *SAP* („secreted aspartyl proteinase”; szekretált aszpartil proteináz) termelés. Nevezetes különbségek: két hifaspecifikus *SAP* génnel kevesebb van a *C. dubliniensis* genomban, továbbá szintén nincsenek jelen az *ALS3* és *ALS5* adhezin gének, valamint a *HYRI* felületi fehérje gén, továbbá kevesebb van a nem ismert funkciójú *IFA* (31 vs. 21) és *TLO* (15 vs. 2) génekből is (Jackson és munkatársai, 2009; Moran és munkatársai, 2011, 2012). Ráadásul a *C. dubliniensis*ben az *IFA* gének hanyatlása (mutációk révén) is megfigyelhető (Moran és munkatársai, 2011). Eközben a *C. dubliniensis* genomban jelen van a Cd36_64800 lókuszt, ami viszont adhezint kódolhat (Jackson és munkatársai, 2009).

Mivel a *C. dubliniensis* genomjában jelentős génvesztést, génromlást valamint pszeudogenizációt (*HYRI*, fonalas gomba növekedést szabályozó elemek, *IFA* gének) figyelhetünk meg, minden valószínűség szerint ez az élesztő éppen reduktív evolúción megy át, ami révén lehetséges, hogy egy még nem azonosított anatómiai niche-hez alkalmazkodik.

A *C. albicans* ezzel szemben számos anatómiai niche-t sikerrel tud kolonizálni (Jackson és munkatársai, 2009).

4.2.11. A filogenetikailag rokon *Candida albicans* és *Candida dubliniensis* összehasonlító transzkriptomikai vizsgálata

A két közeli rokon gombafaj között jelentős transzkriptombeli eltérések is vannak mindkét morfológiai állapot esetén (Grumaz és munkatársai, 2013). Ami a hifaszpecifikus géneket illeti, 84 mindkét faj élesztő→hifa morfológiai átalakulásánál indukálódik, míg 42 gén csak a *C. albicans* esetében (Grumaz és munkatársai, 2013).

4.2.12. A *Candida albicans* és *Candida glabrata* eltérő fertőzési stratégiája

A *Candida* fajok genombeli különbségei különböző élettani tulajdonságokban és fertőzési stratégiákban is megnyilvánulnak (Brunke és Hube, 2012). Pl. a *C. glabrata* jellemző a rejtőzködés, nincs kiterjedt epitélium sérülés, nem vált ki erős immunválaszt, makrofágokban hosszú ideig életben marad, autofágia a fő táplálkozási mód, nincs kiterjedt szövet-pusztulás. A gomba sok metabolikus útvonalat, pl. Gal, allantoin hasznosítás, és piridoxin szintézis, elveszített. Ezzel ellentétben a *C. albicans* „shock and awe” stratégiát követ, amikor patogén életmódra vált át. Érdekes módon a *C. albicans* támadásból a *C. glabrata* is profitálhat, pl. a szájüregi ko-infekciók esetében (Brunke és Hube, 2012).

4.2.13. A *Candida albicans* és *Saccharomyces cerevisiae* eltérő stressz adaptációs stratégiái

A két gomba stresszérzékelő, -szignalizációs és stresszválasz rendszerei hasonlóak, de más ezek szerveződése, működési mechanizmusa (Brown és munkatársai, 2014). A fő különbségek abban rejlenek, hogy a *C. albicans* környezeti stresszválasz („Environmental Stress Response”, „ESR”) génjeinek a száma nagyságrendileg kisebb, továbbá a glükóz hasznosítás és oxidatív stresszválasz szabályozása esetében szimmetrikus adaptív predikciót figyelhetünk meg kizárólag a *C. albicans* esetében. Azaz mind az oxidatív stressz, mind a glükóz jelenléte, ami jellemző a vérben szaporodó *C. albicans* környezetére, egyidejűleg

készíti fel a gombát az oxidatív stressz kivédésére és a glükóz hasznosítására (Brown és munkatársai, 2014).

Ezen túlmenően a *C. albicans* igen jól reagál olyan kombinatórikus stresszhatásokra, melyek háttérében a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK-ok, pl. Hog1 - ozmotikus stresszválasz, Mkc1 – sejtfal integritás stresszválasz, Cek1 – párosodás és invazív növekedés MAPK-ok) közötti párbeszéd, biológiai „tranzisztorok” (pl. Hsp90, modulálja a hőstressz válasz transzkripciós faktor Hsf1 és a Hog1, Mkc1 és Cek1 aktivitásokat a hőmérséklet fluktuálása esetén), továbbá kémiai „cross-talk” (a génexpresszió változásokra a reaktív oxigén, nitrogén és klór részecskék különböző módon hatnak) állnak. Ezen „párbeszéd-effektusok” miatt a stresszadaptációs mechanizmusok nagymértékben interferálhatnak is egymással. Például együttes kation (Na^+) és oxidatív stressz esetén a szignál transzdukciós útvonalak (Hog1 MAPK és Cap1 transzkripciós faktor) interferenciája miatt a gomba pusztulása szinergizmust mutat (Brown és munkatársai, 2014).

A dinamikus változó környezet, pl. az elérhető szénforrások, is nagymértékben hatnak a stressz elleni védelmi rendszerre, pl. a tejsavon nőtt *C. albicans* ellenállóbb ozmotikus és sejtfal integritás stresszekkel szemben (Brown és munkatársai, 2014)!

4.2.14. Két új patogén a *Candida glabrata* kládban: *Candida nivariensis* és *Candida bracarensis*

Egy nemzetközi konzorcium (Gabaldón és munkatársai, 2013) elvégezte hat, a *Candida glabrata* kládba tartozó élesztőgomba összehasonlító genomikai vizsgálatát. A vizsgálatba bevont mikróbák a *C. glabrata* mellett az újonnan leírt opportunistá humán patogén *Candida nivariensis* és *Candida bracarensis* voltak, míg a másik három faj, a *Nakaseomyces delphensis*, a *Candida castellii* és a *Nakaseomyces bacillisporus* emberi kórokozóként nem ismertek. Meglepő módon a filogenetikai elemzések kimutatták, hogy a két új patogén (*C. nivariensis* és *C. bracarensis*) az evolúciós távolságokat tekintve közelebb van a nem-patogén *N. delphensis*hez, mint a szintén patogén *C. glabrata*hoz. Érdeemes megjegyeznünk, hogy míg a *C. glabrata* jól ismert kommenzalistánk, addig a két új patogén közül a *C. nivariensis* biztosan nem, hiszen virágzó növényeken találták meg először Ausztráliában. Az emberi

fertőzőképesség nem az életmóddal, hanem a jelenlévő *EPA* adhezin gének számával korrelál. Az *EPA* génszám fajonként: *C. glabrata*: 18, *C. bracarensis*: 12, *C. nivariensis*: 9, *N. delphensis*: 1 (plusz 4 *EPA*-szerű gén!), *C. castellii*: 3 valamint *N. bacillisporus*: 1 csak távoli *EPA* homológ van. Tekintettel arra, hogy a *C. glabrata* valamint a *C. bracarensis*/*C. nivariensis* *EPA* gén expanziók evolúciós eredete más, így látható, hogy akár egy kládon belül is az emberi infekció képessége többször, egymástól függetlenül is kialakulhat. A vizsgálatok alapján azt is megállapították, hogy a *C. bracarensis* és *C. nivariensis* fajokban az *EPA* gén expanziók evolúciója közös, ugyanakkor a hozzájuk filogenetikailag legközelebb álló *N. delphensis*-ben valószínűleg nagymértékű *EPA* génvesztés következett be, és ennek relikviája a 4 *EPA*-szerű gén (Gabaldón és munkatársai, 2013).

4.2.15. Összehasonlító genomika - olyan esszenciális gének kiválasztása, melyek jövőbeni antimikotikumok célpontja lehet

Ezekben a kalkulációkban elsőrendűen fontos a megfelelő modellszervezet kiválasztása, különösen akkor, ha az adott mikroorganizmusra nincs kellő mennyiségű kísérleti adat, pl. még nem konstruáltak delectom könyvtárat (Lu és munkatársai, 2014). Az *A. fumigatus* szempontjából ma a filogenetikailag hozzá legközelebbi alkalmas modell a *Neurospora crassa*. Az esszenciális gének elemzése (génszekvenciák tulajdonságainak összevetése, pl. sejten belüli lokalizáció, transzmembrán hélixek, domének, a gén evolúciós állandósága, stb.) továbbá funkcionális genomikai adatok (pl. génexpresszió-változások) alapján a gének esszenciális voltát leginkább előre jelző modell kidolgozása lehetséges volt *N. crassa*-ban (Lu és munkatársai, 2014). Ezen modell alkalmazásával az esszenciális gének várható száma *A. fumigatus*-ban 1674. A modell érvényességét 4 potenciálisan esszenciális gén kiütésével validálták, és minden esetben jelentősen csökkent növekedési rátájú mutánsokat kaptak, amely a *N. crassa* modell alkalmazhatóságát *A. fumigatus*-ban nagymértékben alátámasztja (Lu és munkatársai, 2014).

Az esszencialitáson túl a másik fontos kritérium a jövőbeni target génekkel szemben a faji szintű kellő specifikusság (Tripathi és munkatársai, 2014). Például *C. albicans*-ban az emberi és a *S. cerevisiae* proteomokkal való összevetést követően 1618 unikális fehérje szekvenciát azonosítottak, amelyek tehát potenciális antifungális szer célpontok lehetnek (Tripathi és

munkatársai, 2014). Érdeklődéssel várjuk az unikális és esszenciális target gének meghatározását a legfontosabb humán patogén gombák esetében.

4.2.16. További „omikai” lehetőségek a gombadiagnosztikában és új támadáspontok kijelölésében

Előljáróban fontos megjegyeznünk, hogy a patogén gomba fajok genombeli változásainak (pl. antimikotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulása) és SNP (single nucleotide polymorphism”) mintázatainak a leírására, továbbá a patogén gombafajok gyors azonosítására és jellemzésére a megfelelő DNS chippek illetve DNS szekvenáló módszerek rendelkezésre állnak, illetve kifejleszthetők (Garaizar és munkatársai, 2006). Ugyanakkor a genomikai és összehasonlító genomikai mellett más „omikai” eszközökkel is értékes, gyakran kiegészítő információkhoz juthatunk egyes patogén gombák, pl. *Candida* és *Aspergillus* fajok, potenciális új gombaellenes targetjeinek a meghatározásában. A transzkriptomban, proteomban és metabolomban bekövetkező változások követése számos módszerrel lehetséges (Aguilar-Pontes és munkatársai, 2014).

A transzkriptomban bekövetkező változásokat általában teljes genomi DNS microarray és teljes RNS szekvenálási módszerekkel állapíthatjuk meg (Aguilar-Pontes és munkatársai, 2014). A transzkriptomikai vizsgálatokkal elsődleges céljai a következők: (i) A gombafertőzések patogenezisének a vizsgálata, pl. a gomba transzkriptom változások megfigyelése makrofágok, neutrofil granulociták jelenlétében (Fradin és munkatársai, 2005). (ii) Morfológiai átalakulások és a biofilm képzés génjeinek az azonosítása (Kadosh és Johnson, 2005; Murillo és munkatársai, 2005). (iii) Környezeti stresszválasz gének meghatározása (Enjalbert és munkatársai, 2007). (iv) A hőmérsékleti adaptáció elemeinek a felderítése (Niermann és munkatársai, 2005). (v) A gombaellenes hatásért és a szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásáért felelős gének meghatározása (Tsai és munkatársai, 2010). (vi) A gazdaszervezet sejtjeiben bekövetkező génexpresszió-változások meghatározása (Mullick és munkatársai, 2004).

Proteomikai eszközök (Aguilar-Pontes és munkatársai, 2014) például segíthetnek bennünket a virulenciadetermináns fehérjék azonosításában (Kniemeyer, 2011; Kniemeyer és munkatársai,

2011). A jelenlegi proteomikai kutatások a következő területekre összpontosítanak (Kniemeyer, 2011; Kniemeyer és munkatársai, 2011): (i) A sejtfal és sejtmembrán fehérjék fehérjetartalmának vizsgálata (adhezinek, enzimek, allergének, immunmodulátorok azonosítása). (ii) A szekretált fehérjék (szekretom) vizsgálata. (iii) A környezeti stressz (oxidatív stressz, hipoxia) válasz elemeinek az azonosítása. (iv) A vaslimitáció következményeinek a vizsgálata. (v) A hőmérsékleti adaptáció elemeinek a felderítése. (vi) Az antifungális szerek jelenlétében megfigyelhető proteomváltozások kiértékelése. (vii) A biofilm képzés proteomikai tanulmányozása. (viii) A gomba – gazdaszervezet interakciók vizsgálata.

Az immunoproteomikai vizsgálatokban (Singh és munkatársai, 2010; Kniemeyer és munkatársai, 2011) mind IgE, mind IgG antitesteket (pl. allergiás bronchopulmonális aszpergillózisos betegekből vérszérumban lévő antitesteket) felhasználnak az antigének kimutatására és azonosítására, ami például parallel végrehajtott Western blottal, illetve tömegspektrometriás analízissel történik. A gomba allergének azonosítása két ok miatt is igen fontos. Az egyik a megfelelő vakcinák kifejlesztésének az igénye, a másik a gombafertőzések és allergiák kimutatására alkalmas diagnosztikai eszközök előállítására (Bhetariya és munkatársai, 2011).

A metabolomikai adatok (Aguilar-Pontes és munkatársai, 2014) jelentősége szintén óriási, hiszen különösen a szekunder anyagcsere termékei, pl. mikotoxinok, sziderofórok és pigment anyagok (Bhetariya és munkatársai, 2011; Inglis és munkatársai, 2013), melyek közül a mikotoxinok igen fontos szerepet játszhatnak a gazdaszervezet inváziójában, pl. a neutrofil granulociták migrációjának a gátlása (Berthier és munkatársai, 2013) és a gomba-gazda szervezet határfelületen az angiogenezis gátlása (Ben-Ami, 2013) révén. Fontos megjegyeznünk, hogy a metabolomikai eszközök, pl. 2D NMR spektroszkópia, megfelelő gomba genetikai eszközökkel (pl. gén deléciós mutánsok előállítására) nagy fontossággal bírnak a szekunder metabolit bioszintézis útvonalak feltárásában is (Forseth és munkatársai, 2013).

A következő fejezetben (4.3. fejezet) az antimikotikum kutatás legújabb eredményei kerülnek bemutatásra.

4.2.17. Irodalomjegyzék a 4.2. fejezethez

Aguilar-Pontes M.V., de Vries R.P. és Zhou M. (2014) (Post-)genomics approaches in fungal research. *Brief. Funct. Genomics* **13**, 424-439.

Ben-Ami R. (2013) Angiogenesis at the mold-host interface: a potential key to understanding and treating invasive aspergillosis. *Future Microbiol.* **8**, 1453-1462.

Berthier E. és munkatársai (2013) Low-volume toolbox for the discovery of immunosuppressive fungal secondary metabolites. *PLoS Pathog.* **9**, cikkazonosító: e1003289

Bhetariya P.J. és munkatársai (2011) Allergens/antigens, toxins and polyketides of important *Aspergillus* species. *Indian J. Clin. Biochem.* **26**, 104-119.

Brown A.J.P. és munkatársai (2014) Stress adaptation in pathogenic fungus. *J. Exp. Biol.* **217**, 144-155.

Brunke S. és Hube B. (2012) Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell. Microbiol.* **15**, 701-708.

Burmester A. (2011) Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biol.* **12**, cikkazonosító: R7

Casadevall A. (2005) Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet. Biol.* **42**, 98-106.

Casadevall A. és Pirofski L.A. (2007) Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. *Eukaryot. Cell* **6**, 2169-2174.

Enjalbert B. és munkatársai (2007) Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **75**, 2143-2151.

Fedorova N.D. és munkatársai (2008) Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* **4**, cikkazonosító: e1000046

Forseth R.R. és munkatársai (2011) Identification of cryptic products of the gliotoxin gene cluster using NMR-based comparative metabolomics and a model for gliotoxin biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9678-9681.

Fradin C. és munkatársai (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **56**, 397-415.

Gabaldón T. (2013) Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics* **14**, cikkazonosító: 623

Garaizar J. és munkatársai (2006) Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **6**, 987-998.

Gibbons J.G. és Rokas A. (2012) The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol.* **21**, 14-22.

Grumaz C. és munkatársai (2013) Species and condition specific adaptation of the transcriptional landscapes in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Genomics* **14**, cikkazonosító: 212

Heitman J. (2011) Microbial pathogens in the Fungal Kingdom. *Fungal Biol. Rev.* **25**, 48-60.

Inglis D.O. és munkatársai (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* **13**, cikkazonosító: 91

Jackson A.P. és munkatársai (2009) Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* és *Candida albicans*. *Genome Res.* **19**, 2231-2244.

Kadosh D. és Johnson A.D. (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 2903-2912.

Lackey E. és munkatársai (2013) Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida* species. *Eukaryot. Cell* **12**, 1356-1368.

Llopis S. és munkatársai (2012) Transcriptomics in human blood incubation reveals the importance of oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains. *BMC Genomics* **13**, cikkazonosító: 419

Lu Y. és munkatársai (2014) Predicting essential genes for identifying potential drug targets in *Aspergillus fumigatus*. *Comput. Biol. Chem.* **50**, 29-40.

Maguire S.L. és munkatársai (2013) Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 1281-1291.

Mallet L.V., Becq J. és Deschavanne P. (2010) Whole genome evaluation of horizontal transfers in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics* **11**, cikkazonosító: 171

McManus B.A. és Coleman D.C. (2014) Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 166-178.

Moran G.P., Coleman D.C. és Sullivan D.J. (2011) Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. *Eukaryot. Cell* **10**, 34-42.

Moran G.P., Coleman D.C. és Sullivan D.J. (2012) *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why is *C. albicans* more pathogenic? *Int J Microbiol.* **2012**, cikkazonosító: 205921

Mullick A. és munkatársai (2004) Gene expression in HL60 granulocytoids and human polymorphonuclear leukocytes exposed to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **72**, 414-429.

Murillo L.A. és munkatársai (2005) Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **4**, 1562-1573.

Niermann W.C. és munkatársai (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151-1156.

Park B.J. és munkatársai (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* **23**, 525-530.

Pryszcz L.P. és munkatársai (2013) Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol. Evol.* **5**, 2382-2392.

Singh B. és munkatársai (2010) Novel cytosolic allergens of *Aspergillus fumigatus* identified from germinating conidia. *J. Proteome Res.* **9**, 5530-5541.

Strope P.K. és munkatársai (2015) The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome Res.* **25**, 762-774.

Tsai H.F. és munkatársai (2010) Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3308-3317.

Tripathi H. és munkatársai (2014) Genomic identification of potential targets unique to *Candida albicans* for the discovery of antifungal agents. *Curr. Drug Targets* **15**, 136-149.

Wang H. és munkatársai (2009) A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evol. Biol.* **9**, cikkazonosító: 195

Wartenberg A. és munkatársai (2014) Microevolution of *Candida albicans* in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. *PLoS Genet.* **10**, cikkazonosító: e1004824

Xie J. és munkatársai (2013) White-opaque switching in natural *MTLa/a* isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. *PLoS Biol.* **11**, cikkazonosító: e1001525

4.3. Az antimikotikumkutatás legújabb eredményei

4.3.1. Az antimikotikumok rövid története

Az emberi gombafertőzések nyilvánvalóan egyidősek az emberiséggel, így a gyógyszergyártás hőskorától kezdve történtek egyébként sikeres próbálkozások ezen fertőzések kezelésére. Például már a 20. század elején alkalmazták a bőrgombásodás és szájpenész kezelésére a következő anyagokat: jód, higany, benzoésav, szalicilsav, fenol származékok, metilibolya, szulfonamid származékok, kálium-permanganát, terpentín (Negri és munkatársai, 2014). Az első antimikotikumok a griseofulvin és a nisztatin voltak, majd 1955-től kezdődően az amfotericin B (AMB), amely mindmáig gyakran használt gyógyszer a jelentős dózis-függő citotoxicitás (vesekárosodás, hipokalémia) ellenére. A ma használt készítményekben liposzómás formulát használnak, ami kevésbé nefrotoxikus, ugyanakkor viszont eléggé drága. 1961 óta használják az 5-fluoro-citozint, amit ma elsősorban a *Cryptococcus neoformans* ellen alkalmaznak, majd 1981-től a ketokonazol és 1985-től a flukonazol azoltípusú vegyületek kerültek a bevezetésre a gombafertőzések gyógyítására. A későbbi azolszármazékok közül az itrakonazol pl. *Aspergillus*ok ellen használják (Negri és munkatársai, 2014)

A 21. század elején új azolok, pl. vorikonazol, jelentek meg a gyógyászatban pl. *Aspergillus*, *Fusarium* és *Scedosporium* fertőzések ellen. Bár vannak triazol-típusú vegyületek is a piacon, pl. ravukonazol és pozakonazol, az esetükben nem beszélhetünk jelentős terápiás áttörésről (Negri és munkatársai, 2014).

Ugyanebben az időszakban jelentek meg az (1,3)- β -D-glükán szintáz inhibitor echinokandinok, pl. kaszopofungin, anidalfungin, mikafungin, melyek igazi áttörést jelentenek, mert biztonságosak, jól tolerálhatók, minimális interakció figyelhető meg más gyógyszerekkel, emellett kedvezőek a farmakokinetikai tulajdonságok is. Mára az echinokandinok elsővonalbeli gyógyszerek invazív kandidiázis kezelésében, mert igen hatékonyak pl. flukonazol-rezisztens *Candida* fajok ellen (Negri és munkatársai, 2014).

Az antibakteriális szerekhez hasonlóan az új kémiai szerkezetek megtalálása és gyógyszerként való alkalmazása pénz- és időigényes feladat, hiszen minden 5000-10000 tesztelt vegyületből egy lesz végül FDA által engedélyezett gyógyszer, és egy új gyógyszer kifejlesztéséhez kb. 10-15 év kutatás szükséges (Negri és munkatársai, 2014).

4.3.2. Az antifungális szerek elleni rezisztencia – hatások a klinikai gyakorlatra

Napjainkban gyorsan terjedő rezisztencia kialakulásnak és terjedésnek lehetünk szemtanúi számos antimikotikum esetében, így az általánosságban használt kifejezések pl. „szenzitív” és „rezisztens” pontos definíciója minden patogén fajra és minden használt antimikotikumra nézve elsőrendűen fontossá vált. Alcazar-Fuoli és Mellado (2014) munkája alapján a klinikailag érzékeny („susceptible”, S), közbenső („intermediate”, I) és rezisztens („resistant”, R) törzsek, és a klinikai töréspontok („breakpoints”) definíciói a következők: $S \leq x$ mg/L; $I > x$, $\leq y$ mg/L; $R > y$ mg/L. Ezek az értékek hivatalosan közlésre kerülnek az EUCAST („European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”) által. A rezisztencia típusok lehetnek elsődleges, eredendő („primary, innate”) vagy másodlagos, szerzett („secondary, acquired”). Példaként a *C. albicans*ra nézve a következő $S \leq$ és $R >$ értékek kerültek megállapításra mg/l-ben kifejezve: flukonazol: 2 és 4, vorikonazol: 0,12 és 0,12, micafungin: 0,016 és 0,016, anidalfungin: 0,03 és 0,03, míg ugyanezek az értékek a flukonazol-rezisztens *C. glabrata*ra, flukonazol: 0,002 és 32, mikafungin: 0,03 és 0,03, anidalfungin: 0,06 és 0,06 (Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014).

Fungémiát okozó *Candida* fajok esetében a leggyakoribb vérből izolált faj a *C. albicans*, majd ezt követi a *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és ritka fajokként a *C. krusei*, *C. guilliermondii* és *C. lusitaniae*. Egy spanyolországi tanulmányban a flukonazol érzékenységi tartományok és a MIC₉₀ (az az antimikotikum koncentráció, amely az adott faj izolátumai 90 %-nak a növekedését gátolja) értékek fajonként a következők voltak mg/ml koncentrációban kifejezve: *C. albicans*: 0,12 - >64, MIC₉₀=0,25, *C. parapsilosis*: 0,12 - >64, MIC₉₀=2, *C. glabrata*: 0,5 - >64, MIC₉₀=16, *C. tropicalis*: 0,12 - >64, MIC₉₀=>64, *C. krusei*: 16 - >64, MIC₉₀=64, *C. guilliermondii*: 0,12 - 32, MIC₉₀=16 és *C. lusitaniae*: 0,12 - 34, MIC₉₀=32. Összességében a vérből származó *Candida* izolátumok 21 %-a volt flukonazol rezisztens az

elsődleges és másodlagos rezisztenciák következtében (Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014; Puig-Asensio és munkatársai, 2014).

A szisztémás (mélyszöveti, vér és légzőszervi) fonalas gomba fertőzések esetén az izolátumok fajonkénti eloszlása a következő volt egy másik spanyol tanulmányban: 86,3 % *Aspergillus*, 4,7 % *Scedosporium*, 2,5 % *Mucorales*, 2,2 % *Penicillium*, 1,2 % *Fusarium*. Ezen belül az egyes *Aspergillus* fajok előfordulási gyakorisága a következő volt: *A. fumigatus*: 48,5 %, *A. flavus*: 8,4 %, *A. terreus*: 8,1 %, *A. tubingensis*: 6,8 % és *A. niger*: 6,5 % (Alastruey-Izquierdo és munkatársai, 2013; Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014).

A fonalas gomba izolátumok között AMB (amfotericin B) rezisztencia 10,8 %-ban míg triazol-rezisztencia 10-12,7 %-ban volt megfigyelhető (Alastruey-Izquierdo és munkatársai, 2013; Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014). A tanulmányban a vorikonazol érzékenységi tartományok és a MIC₉₀ értékek *Aspergillus* fajonként a következők voltak mg/ml koncentrációban kifejezve: *A. fumigatus*: 0,12 - 2, MIC₉₀=1, *A. flavus*: 0,12 - 4, MIC₉₀=1, *A. terreus*: 0,5 - 2, MIC₉₀=2, *A. tubingensis*: 0,25 - 2, MIC₉₀=2 és *A. niger*: 0,25 - 2, MIC₉₀=1. A fonalas gombák esetén szintén megfigyelhető a használt antifungális szerekkel szemben rezisztenciát mutató patogének egyre gyakoribb megjelenése (Alastruey-Izquierdo és munkatársai, 2013; Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014).

Az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia leküzdése a jövőben fokozottan igényli a rezisztencia-mechanizmusok mélyebb megértését, amihez az „omikai” eszközökkel nyert adatok (2.1. fejezet) nagymértékben hozzásegíthetnek minket (Srinivasan és munkatársai, 2014). Szükséges ezen kívül a gomba biofilmek képződési mechanizmusának az alaposabb vizsgálata is annak érdekében, hogy ezek kialakulását hatékonyan gátolni tudjuk az antimikotikumok megfelelő hatásának a biztosítása céljából (Pierce és munkatársai, 2013).

4.3.3. Rezisztencia mechanizmusok a *Candida* fajokban

A leggyakrabban használt antimikotikumokkal szemben a következő rezisztencia mechanizmusokat figyelték meg (Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014): (i) Poliének, pl. amfotericin B, amelyek ergoszterint kötnek: ergoszterin hiány vagy csökkent ergoszterin

tartalom a sejtmembránokban, keresztrezisztencia azokkal. (ii) Azolok, pl. flukonazol, amelyek gátolják az Erg11p 14- α -lanoszterin-demetiláz enzimet: multidrog transzporterek indukálódnak, mutációk alakulnak ki a transzporterek expresszióját kontrolláló transzkripciós faktorokban, az antimikotikumok kötődését gyengítő mutációk figyelhetők meg a Erg11p célponti („target”) enzimben, az *ERG11* gén felül-regulálódik, az ergoszterin bioszintetikus útvonal megváltozik, pl. mutációk miatt az Erg3p C-5 szterin deszaturáz enzimben. (iii) Echinokandinok, amelyek gátolják a β -1,3-glükán szintáz (FKS1 és/vagy FKS2) enzimeket: az echinokandinok kötődési erőssége megváltozik a célenzimekhez, pl. a *C. glabrata* FK1 és FK2 β -1,3-glükán szintázokhoz.

4.3.4. Rezisztencia mechanizmusok az *Aspergillus* fajokban

Ezt a területet igen intenzíven kutatják a leggyakrabban aszpergillózist okozó *A. fumigatus*-ban (Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014). A triazolok esetén pontmutációk figyelhetők meg a célenzimekben (14- α -lanoszterin-demetiláz), valamint további lehetőség a drog transzporterek túltermelése („overexpressziója”). A triazolokkal szemben elsődleges rezisztenciát figyeltek meg az *A. lentulus*-ban. Az amfotericinB alkalmazásakor szekunder rezisztenciát még nem észleltek, de elsődlegest igen, pl. *A. terreus*, *A. flavus* és *A. ustus* esetében. Az *A. terreus* esetében kiemelkedő a magas kataláz szint, ami magyarázhatja az elsődleges rezisztenciát. Az echinokandinok esetén target enzim (β -1,3-glükán szintáz) mutációk, illetve „overexpresszió” észlelhetők. Ezekkel a vegyületekkel szemben is elsődleges rezisztenciát mutat az *A. lentulus*.

4.3.5. Az antimikotikumokkal szembeni rezisztencia klinikai jelentősége

Klinikai konzekvenciák (Alcazar-Fuoli és Mellado, 2014):

1. *Candida* fajok: *C. glabrata* és *C. krusei* terjedőben vannak, minden azokra egyaránt rezisztens *C. glabrata* áttörés lehetséges.
2. *Aspergillus* fajok: Az AMB-re kevésbé érzékeny *A. terreus* komoly gondot jelent.
3. A *Fusarium* és *Scedosporium* fajok a forgalomban lévő gombaellenes hatóanyagokra még kevésbé érzékenyen, ami megmutatkozik a magas halálozási rátákban.

Technológiai érdekességként megemlítenéd, hogy az echinokandin B-t termelő *A. nidulans* var. *roseus* gombának se mutat elsődleges rezisztenciát az antimikotikummal szemben, amit a sejtfal módosításával, konkrétan a kitintartalom növelésével ér el (Tóth és munkatársai, 2012; Emri és munkatársai, 2013).

4.3.6. A biofilmképzés problematikája, gátlása

Az emberi szervezetben a patogének biofilmeket képeznek mind biotikus (érfal, bélfelszín), mind abiotikus (pl. orvosi eszközök, katéterek, implantátumok, protézisek) felületeken (Delattin és munkatársai, 2014). A biofilmekben a patogén gombasejtek extracelluláris mátrixban (ECM) vannak összetapadva, ezért antimikotikumokkal való elérésük komoly problémát jelent. Ezen biofilmeket képző kórokozók antimikotikumokkal szembeni rezisztenciája számos tényezőtől függ, pl. az ECM jelenléte, összetétele, a sejtdenzitás mértéke, efflux pumpák aktiválása és perzisztens (nyugvó, multidrog-rezisztens, nem-osztódó sejtek, melyek aránya *C. albicans* esetében 0,01-1,93 %) gombasejtek jelenléte (Delattin és munkatársai, 2014).

A biofilmekben lévő sejtek elleni küzdelem nehéz, ugyanis a legtöbb antimikotikum velük szemben hatástalan (Delattin és munkatársai, 2014). A megfigyelések szerint a mikonazol, a kaszopfungin és a liposzómákba csomagolt amfotericin B lehetnek megfelelő hatékonyságú, és a megfigyelések szerint ezen ágensek mindegyike oxidatív stresszt vált ki az érzékeny gombákban. Az azolok esetén a MIC értékek 1000-szeresek a biofilmben lévő *C. albicans* sejtekre a szabadon élő planktonikus formákkal való összehasonlításban (0,25-2 µg/ml a planktonikus, míg ≥ 256 µg/ml a biofilmekeben lévő sejtekre). Az azolokat az ECM β -1,3-glükán tartalma köti meg, így azok nem érik el a sejtmembránt. A mikonazol bifázisos ölési mintázatot mutat a biofilmben lévő *C. albicans* sejtekkel szemben, mivel a perzisztens sejtek jelentős SOD (szuperoxid dizmutáz) aktivitással, azaz robosztusabb oxidatív stressz elleni védelemmel bírnak. Nem meglepő módon a SOD gátlószer, pl. *N,N*-dietyl-ditiokarbamát („DDC”), jelenlétében a mikonazol perzisztens sejtek száma jelentősen csökken.

Az amfotericin B növeli a ROS („reactive oxygen species”) szinteket biofilmben lévő *C. albicans* sejtekben is, bár a MIC értékek kb. nyolcszor nagyobbak ($MIC_{\text{planktonikus}}=0,06-0,5$

$\mu\text{g/ml}$; $\text{MIC}_{\text{biofilm}}=0,5\text{-}32 \mu\text{g/ml}$). Említést érdemel, hogy exogén kataláz és SOD aktivitásokkal meg lehetett gátolni a *C. albicans* sejtek AMB kiváltotta líziséét. A biofilmekben lévő *C. albicans* AMB rezisztenciája függ a növekedési körülményektől, de a perzisztens sejtek száma itt is csökkenthető DDC kezeléssel (Delattin és munkatársai, 2014).

Érdekes módon, jelenleg az echinokandinok a leghatékonyabbak a *Candida* biofilmek ellen, bár ROS halmozódást ezekben biofilmekben lévő sejtekben még nem figyeltek meg (a planktonikus sejtekben viszont igen) (Delattin és munkatársai, 2014). A kaszopfungin MIC értékek alig térnek el a planktonikus és biofilmben lévő *C. albicans* sejtekkel szemben ($\text{MIC}_{\text{planktonikus}}\leq 0,03\text{-}1 \mu\text{g/ml}$; $\text{MIC}_{\text{biofilm}}=0,03\text{-}4 \mu\text{g/ml}$).

A biofilmekben lévő *Candida* sejtek elleni küzdelemben előrelépést jelenthetnek az új típusú, ROS-képzést kiváltó ágensek, illetve ezek kombinációi a hagyományosan használt, oxidatív stresszt kiváltó antimikotikumokkal. Az eddigi kutatások alapján a következő vegyületek ilyen célú felhasználása tűnik lehetségesnek:

- Már forgalomban lévő hatóanyagok, pl. metergolin (szerotonin-receptor antagonist).
- Dihidro-szfingozin, fitoszfingozin, melyek apoptózist váltanak ki.
- Növényi metabolitok, pl. sikonin (*Lithospermium erythrorhizon*), mediorezinol (*Sambucus williamsii*), styraxjaponizid C (*Styrax japonica*, japán hóvirágfa).
- Antimikrobiális peptidok (lásd ezek későbbi részletes tárgyalását).
- 2-amino-nonil-6-metoxil-tetralin: az Y→H átalakulást és az ECM szintézist gátolja.
- Tengeri politelítetlen zsírsavak, pl. sztearidonsav és eikozapentánsav, melyek ROS szinteket növelnek és apoptózist váltanak ki.
- Fotodinamikus inaktiváció, melynek elve az, hogy egy nem toxikus festék fényrel megvilágítva ROS-t generál, mint pl. polifenol-kurkumin.
- Nem-termikus plazma módszer –nemesgázok által generált ROS atmoszferikus nyomáson.
- A meglévő ROS generáló szerek hatékonyságának a fokozása baikalein, allicin, parakvat, kurkumin és dihidroxi-benzaldehidek hozzáadásával. Megemlítendő, hogy a berberin és a kurkumin az azolok hatását is fokozzák ROS generálás révén!
- *N,N*-dietil-ditiokarbamát („DDC”) – fokozza a biofilmek elleni antimikotikus hatást.

4.3.7. Új megközelítések a *Candida albicans* elleni terápiákban

A szisztémás kandidiázisok előfordulási aránya az USA-ban 20 eset 100 000 lakosra, azaz összesen 60 000 beteget kezelnek évente (Pierce és Lopez-Ribot, 2013). Az esetszám a súlyos, nagy kockázatú („high-risk”) kórházi betegek között 50-szer nagyobb. A szisztémás kandidiázisok mortalitása 30-50 % közötti.

Gyermekgyógyászati osztályokon a kandidiázisok esetén +10,0 % növekedés figyelhető meg a halálozásban és +21,1 nap növekedés a kórházi tartózkodásban. A költségek növekedése pedig rendkívül jelentős, + 92 266 USD per fő. A felnőtt osztályokon bekövetkező kandidiázisok esetén +14,5 % halálozás, +10,1 nap bent tartózkodás továbbá + 39 331 USD kezelési költség per fő állapíthatók meg (Pierce és Lopez-Ribot, 2013).

A klinikumban égető problémát jelent, hogy kevés antimikotikum van, és nem látható új kémiai szerkezetű anyagok megjelenése a közeljövőben! Ugyanakkor, mint azt az előzőekben már láthattuk, a jelenlegi szerek elleni rezisztencia sok esetben igen jelentős mértékű.

A *Candida*-ellenes gyógyszerek fejlesztésben azonban számos új célpont jelent meg, pl. a hifaképzés, melyet a következő környezeti paraméterek válthatnak ki: 37 °C, vérszérum, neutrális pH, aminosavak és/vagy N-acetil-glükózamin jelenléte, mikroaerofil környezet továbbá bizonyos emberi hormonok (Pierce és Lopez-Ribot, 2013). Számos hifaképzést gátló szer ismert pl. a quorum érzékelésben szerepet játszó farnezol, de ellentmond a várakozásoknak az, hogy *in vivo* állatmodellben ez a vegyület éppen növelte a *C. albicans* virulenciáját!

A *Candida*-ellenes szerek kutatásában nélkülözhetetlenek a kényelmesen és jól reprodukálhatóan használható tesztrendszer. Egy újonnan kidolgozásra került tesztrendszer pl. tetraciklinnel indukálható promotereket tartalmazó *C. albicans tet-UME6* és *tet-NRG1* törzseket használ egér modellben (Pierce és Lopez-Ribot, 2013).

A kutatások kitüntetett irányát jelenti a biofilmképzés gátlása. A kipróbálásra kerülő vegyületek között pl. kalcineurin inhibitorok (pl. ciklosporin, FK506) és hsp90 inhibitorok (pl. geldanamycin) is vannak (Pierce és Lopez-Ribot, 2013).

A *Candida* fertőzések kezelésére alkalmas új szerek kutatására számos új megközelítést is alkalmaznak, pl. vegyületkönyvtárak „screeningje”, pl. a Prestwick Chemical Library (1200 szabadalommal már nem védett, „off-patent” vegyület), *Candida albicans* Biofilm Chip (CaBChip), amely 768 nano-biofilmet tartalmaz 50 nl-es kultúrákban, ami 2000-szeres miniatürizálást jelent a 96-lyukú mikrotiter plate-hez viszonyítva (Pierce és Lopez-Ribot, 2013).

4.3.8. Személyre szabott gyógyászat a gombaellenes terápiákban

A gombaellenes terápiáknak ma már létezik farmakogenomikai megközelítése is, ugyanis igen jelentős egyéni különbségek vannak/lehetnek az antimikotikumok abszorpciójában, eloszlásában, metabolizmusában és eliminációjában (Ashbee és Gilleece, 2012).

Abszorpció: Gyomorban való feloldódás függ a pH értéktől és az élelmiszerek jelenlététől. Például a gyomor pH savasabb férfiakban és kritikusan beteg páciensekben, és elősegíti néhány gyógyszer, pl. az itrakonazol abszorpcióját. A gyomor pH növekszik éhezéskor, valamint H₂-receptor antagonisták és proton pumpa inhibitorok használatakor, ami gátolja, pl. a pozakonazol abszorpcióját. A gasztrointesztinális traktusból való felszívódás lehet passzív, amit a gyógyszerek kémiai természete jelentősen befolyásol, pl. a lipofilek (pl. itrakonazol, pozakonazol) átdiffundálnak a sejtmembránon, míg a hidrofilek (pl. flukonazol) vizes csatornákon („aqueous channel”) át kerülnek felvételre. Aktív transzport szükséges az amfipatikus hatóanyagok felvételére (itrakonazol P-glikoproteinen át).

Ami a szervezetben történő eloszlást illeti, a szövetekbe való belépést befolyásolja a hatóanyag szérumfehérjékhez való kötődési képessége. Például a flukonazol és vorikonazol kevésbé fehérjekötötték a vérben (11-20 % a flukonazolra és 58 % a vorikonazolra, míg pl. 99 % a pozakonazolra nézve), így könnyebben lépnek be a szövetekbe, pl. a központi idegrendszerbe is. A transzporterek jelenléte és aktivitása az egyes szövetekben jelentősen eltér, amit esetleg tovább árnyalhatnak bizonyos SNP-k a genomban.

Szájon át adott gyógyszerek esetében jelentős lehet a felszívódást követő metabolizmus a májban („first-pass metabolism”), illetve a későbbi metabolizmus is. Ezek a folyamatok függenek citokróm P450 enzimek és P-glikoproteinek eloszlásától és aktivitásától is a gasztrointesztinális traktusban és a májban, ami kor, nem és etnikai hovatartozás alapján is jelentősen eltérő lehet az egyéneknél. A gombaellenes gyógyszerek közül a vorikonazol és itraconazol extenzív kölcsönhatásba kerülnek a máj citokróm P450 enzimrendszerével, ami alapvetően hozzájárul az aktív metabolizmusukhoz (Ashbee és Gilleece, 2012).

A hatóanyagok akár változatlan, akár metabolizált formában döntő mértékben a vizeletbe és, az epén át, a székletbe választódnak ki. Az arányok persze széles határokon belül változhatnak, pl. 20 %-ban a vizeletbe és 43 %-ban az epébe választódik ki nagyrészt változatlan formában az amfotericin B-dezoxikolát, ugyanakkor 80 %-ban a vizeletben jelenik meg szintén változatlan formában a flukonazol. Míg a mikafungin metabolitok >90 %-ban a székletben és 8 %-ban a vizeletben mutathatók ki, addig a < 1 % nem metabolizált mikafungin a vizeletbe kerül kiválasztásra (Ashbee és Gilleece, 2012).

4.3.9. Antifungális hatású természetes származékok

Az utóbbi időszakban a kémiai szintetikus termékek előállításával mellett megindult a természetes anyagok, pl. fenolos származékok, esszenciális olajok és extraktumok, mint gombaellenes hatóanyagok tudományos igényű kutatása is. Ráadásul a szerkezeti biológiai, orvosi kémiai és *in silico* technológiák fejlődése lehetővé tette gombaspecifikus támadáspontok („targetek”) elleni természetes vegyületek kiválasztását (Negri és munkatársai, 2014). Fontos megjegyezni, hogy a természetes származékok gombaellenes hatásának igazolását körültekintő módon, standard eljárások (pl. CLSI, „Clinical and Laboratory Standards Institute”, protokollok) alkalmazásával szükséges elvégeznünk. A legérdekesebb potenciális természetes hatóanyagok a következők Negri és munkatársai (2014) munkája alapján:

1. Növényi extraktumok – igen nagyszámú növényi extraktum mutat *Candida*-ellenes hatást, pl. *Curcuma zedoaria* (pompás kurkuma), *Psidium guajava*, *Plectranthus amboinicus*, *Aristolochia cymbifera*, *Lippia alba*, *Hydrocotyle bonariensis*, *Ocimum gratissimum* (indiai

bazsalikom, eugenolt tartalmaz), *Cinnamomum zeylanicum* (ceyloni fahéj), *Citrus limon* (közönséges citrom), *Eucalyptus citriodora* (citromillatú eukaliptusz), *Eugenia uniflora*, *Peumus boldus* (boldófa) és *Rosmarinus officinalis* (rozsmaring). Nevezetes példa még a grépfrút („grapefruit”; *Citrus paradisi*) extraktumok antimikrobiális hatása (Cvetnić és Vladimir-Knežević, 2004).

2. Esszenciális olajok – vízgőz-desztillációval vagy sajtolással nyerhetők ki, főképpen mono- és szeszkviterpéneket és fenil-propanoidokat tartalmaznak. Régen tanulmányozott terület, a fahéj, muskátli és kakukkfű jó fungisztikus hatást mutatott, de általánosságban a tiszta komponensek (terpenoidok, citrál, geraniol és citronellol) jobb aktivitást mutattak, mint maguk az esszenciális olajok.

3. *Cymbopogon citratus* (indiai citromfű) sampon és krém 60 %-ban hatékony a „pityriasis versicolor” (*Malassezia globosa* és *Malassezia furfur* okozzák) ellen.

4. Szaponinok: rovarölő, antibiotikum és fungicid hatásúak. A *Phytolacca tetramera* szaponinok különösen hatékonyak *Trichophyton mentagrophytes* bőrgomba ellen. Más szaponinok *Candida* fajok ellen is hatékonyak.

5. További gombaellenes hatású vegyületcsoportok: alkaloidok, fenolos vegyületek és flavanoidok, kumarinok, xanthonok, lignánok, tanninok és növényi másodlagos anyagcsere termékek.

4.3.10. Kis molekulatömegű antifungális fehérjék, defenzinek

A kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag defenzinek az első védelmi vonal részei a patogén mikrobák, így gombák ellen (Silva és munkatársai, 2014). Az antimikrobiális hatású fehérjék/peptidek minden gombában, növényben és állatban megtalálhatók. Amellett, hogy a vele született immunrendszer részei, immunmoduláns hatással is bírnak. Általában három vagy négy diszulfid hidat tartalmaznak, erős pozitív töltésűek, kompakt a 3D szerkezetük. A hasonló szerkezeti jegyek ellenére a gombaellenes hatásmechanizmusuk sokrétű, így kötődnek a sejtfalhoz (kitin), sejtmembránt permeabilizálnak, receptor-mediálta

internalizációs folyamatok révén bejuthatnak a sejtekbe, szignalizációs útvonalakat aktiválnak, sejten belüli támadáspontokkal léphetnek kölcsönhatásba, ROS termelést fokoznak, apoptózist váltanak ki.

Jelenleg számos antifungális fehérjét tanulmányoznak intenzíven a későbbi biomedikai felhasználás reményében (Silva és munkatársai, 2014). Ezek közül gomba eredetűek a *Penicillium chrysogenum* PAF, *Aspergillus giganteus* AFP és a *Penicillium brevicompactum* „bubble protein” {a gomba sárgászöld színnel fluoreszkáló exudátum cseppeket („bubble”) választ ki}. Növényi eredetű antifungális fehérjék például a Psd1 (*Pisum sativum*), RsAFP2 (*Raphanus sativus*) és HsAFP1 (*Heuchera sanguinea*). Rovar eredetűek a coprisin (*Copris tripartitus*; koreai trágyabogár), juruin (*Avicularia juruensis*; amazoniai rózsaszín lábú pók), míg a hullókben előforduló fehérjékre példa a crotamine (*Crotalus durissus terrificus*; dél-amerikai csörgőkígyó).

4.3.11. Gomba eredetű kis molekulatömegű antifungális fehérjék; a *Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje (PAF)

A gomba eredetű antifungális fehérjék közül az egyik legalaposabban tanulmányozott a *P. chrysogenum* gomba által termelt PAF („*Penicillium chrysogenum* antifungal protein”; Marx és munkatársai, 2008; Hegedűs és munkatársai, 2011). Említést érdemel, hogy a kis molekulatömegű, igen stabil, három diszulfid-kötést tartalmazó szerkezetű, kompakt, bázikus izoelektromos pontú fehérje érzékeny gombákban, pl. *Aspergillus nidulans*ban apoptózist vált ki (Leiter és munkatársai, 2005). A fehérje háromdimenziós, oldatban megfigyelhető szerkezetét Batta és munkatársai (2009) határozták meg NMR spektroszkópia segítségével.

A PAF programozott sejthalált kiváltó hatásának a mechanizmusát több kutatócsoport is kutatja, hiszen ez elvezethet a fonalas gombák apoptózisának a mélyebb megértéséhez, és így akár új, gombaellenes támadáspontok kijelöléséhez is.

*A. nidulans*ban a FadA-SfaD-GpgA-FlbA és GanB-SfaD-GpgA-RgsA heterotrimer G-protein szignalizációs útvonalak (a FadA és GanB G-protein α -alegységek, az SfaD G-protein β -alegység, a GpgA G-protein γ -alegység, míg az FlbA és RgsA G-protein szignál regulátor

fehérjék) részt vesznek a sejthalál szignálok kialakításában az intracelluláris glutation tartalékok mennyiségének (FadA és FlbA szabályozzák egymással ellentétes módon) és a ROS koncentrációk nagyságának (az RgsA aktivitása növeli ezeket) a modulálása révén (Molnár és munkatársai, 2004, 2006). Fontos megjegyeznünk, hogy a rövidtávú éhezés makroautofágiát vált ki, ami a lényegét tekintve antiapoptotikus hatású folyamat (Szilágyi és munkatársai, 2013).

Vizsgálataink szerint a FadA útvonal működésének felfüggesztése teljes mértékben megakadályozza a sejthalál szignál kialakulását PAF jelenlétében, míg a FadA, SfaD, GpgA, illetve RgsA fehérjéket kódoló deléciók jelentősen megnövelik az *A. nidulans* PAF-toleranciáját (Hegedűs és munkatársai, 2011). A FadA-FlbA rendszer mediálja az *A. nidulans* farmezol (*Candida* fajokban a quorum érzékelésért felelős vegyület) által kiváltotta apoptózist is (Semighini és munkatársai, 2006). A sejthalál szignál kialakításában és továbbításában más útvonalak is szerepet játszanak, pl. a NikA-SrrA kétkomponensű rendszer, a cAMP-PKA (protein kináz A) útvonal (a FadA-SfaD-GpgA heterotrimer G-proteintől „down-stream” helyezkedik el) továbbá a Ca²⁺-kalmódulin rendszer (Hegedűs és munkatársai, 2011). Binder és munkatársai (2010) eredményei szerint a sejthalál szignál a cAMP-PkaA útvonalon haladhat *A. nidulans*ban PAF expozíciók alatt, továbbá a RhoA (GTP-áz)-PkcA (protein kináz C)-MpkA (MAPK)-RlmA („MADS-box” típusú transzkripció faktor) sejtfalintegritás szignalizációs útvonallal is kölcsönhatás lehetséges. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy ezekben a kísérletekben a PAF nem növelte meg a MpkA MAPK foszforilezettségét és nem indukált sejtfalat újjáalakító („remodelling”) enzimeket sem, ugyanakkor represszálta az aktin gént és deregulálta a kitin depozíciót a hifacsúcsoknál (Binder és munkatársai, 2010).

4.3.12. További lehetséges alternatívák a gombaellenes terápiákban

Reményeink szerint, alapos kutatásokat követően, a jövő antimikotikumai között szerepelhetnek majd fehérje biotechnológiai termékek, pl. emberi antifungális fehérjék és peptidok is. A jól ismert defenzinek mellett ezek is általánosan elterjedtek, azonban gyakran szövet- és szervspecifikusak (Mehra és munkatársai, 2012)

Az igazoltan gombaellenes hatású emberi fehérjék a következők:

- RNase-7 a „callus stratum corneum”-ból, *C. albicans* ellen.
- Lizozim – *C. albicans*, továbbá *A. fumigatus* és *Penicillium* fajok ellen. Az emberi tej lizozim pepszinnel emésztett fragmentumai szintén *Candida*-ellenes hatásúak.
- Emberi kitotriozidáz.
- Laktoferrin *C. krusei* és *C. albicans* ellen. Egy pepszines emésztés után kapott kationos peptid különösen aktív.
- Antileukoproteáz szerin proteáz inhibitor a genitourinális és respiratorikus traktusokból. *C. albicans* és *A. fumigatus* ellen.
- Kalprotektin (kalgranulin) emberi bőrből. *C. albicans*-ellenes hatás a Zn^{2+} és Mn^{2+} ionok kötése révén.
- Hisztatinok a nyálból a legerősebb fungicid aktivitású fehérjék. A hisztatin-5 a *Candida* Hst-5 kötő fehérjéhez kapcsolódik és ATP-effluxot vált ki.
- Kathelicidinek – antimikrobiális bőr peptidek. A kathelin domén antimikrobiális peptid és proteáz inhibitor, a C-terminus antimikrobiális peptid funkciójú. Aktívak *Malassezia*, *Trichophyton* és *Candida* fajok ellen.
- A dermcidin emberi izzadságmirigyekben szintetizálódik, *C. albicans* elleni hatás.
- hGAPDH emberi placentából *C. albicans* ellen.

Említést érdemel, hogy gombaellenes hatással bírnak egyes szintetikus peptidek is, melyek általában kationos peptidek, és amelyek *Candida* fajok membránját permeabilizálják, illetve a gombasejteket nekrotizálják ROS akkumulálása révén.

Szóba jöhet még a *Candida* fajok esetében azok proteázainak, valamint gombák biofilm-képzésének a gátlása:

- Vírusellenes proteázgátlók, pl. a HIV-ellenes Ritonavir, csökkentik a *Candida* infekciókat is a SAP 1-3 aktivitások gátlása révén.
- Klasszikus SAP gátlók, pl. pepsztatin A, szintén hatásosak *Candida* fajok ellen.
- Biofilmek kialakulásának a gátlása antimikrobiális peptidekkel, pl. a *Trapa natans* (sulyom) TN-AFP-1 fehérjével.

4.3.13. Irodalomjegyzék a 2.3. fejezethez

- Alastruey-Izquierdo A. és munkatársai (2013) Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3380-3387.
- Alcazar-Fuoli L. és Mellado E. (2014) Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br. J. Haematol.* **166**, 471-484.
- Ashbee H.R. és Gilleece M.H. (2012) Has the era of individualised medicine arrived for antifungals? A review of antifungal pharmacogenomics. *Bone Marrow Transpl.* **47**, 881-894.
- Batta G. és munkatársai (2009) Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF - a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *FEBS J.* **276**, 2875-2890.
- Cvetnić Z. és Vladimir-Knežević S. (2004) Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm.* **54**, 243-250.
- Delattin N., Cammune B.P.A. és Thevissen K. (2014) Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med. Chem.* **6**, 77-90.
- Emri T. és munkatársai (2013) Echinocandins: production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3267-3284.
- Hegedűs N. és munkatársai (2011) The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* - a mechanism of action oriented review. *J. Basic Microbiol.* **51**, 561-571.
- Léiter É. és munkatársai (2005) Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2445-2453.
- Marx F. és munkatársai (2008) The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 445-454.
- Mehra T. és munkatársai (2012) Alternative approaches to antifungal therapies. *Exp. Dermatol.* **21**, 778-782.
- Molnár Z. és munkatársai (2004) Influence of *fadA^{G203R}* and *ΔflbA* mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**, 349-360.
- Molnár Z. és munkatársai (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.* **46**, 495-503.
- Negri M. és munkatársai (2014) Early research on antifungal natural products. *Molecules* **19**, 2925-2956.
- Pierce C.G. és munkatársai (2013) Antifungal therapy with emphasis on biofilms. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 726-730.

Price C.G. és Lopez-Ribot J.L. (2013) Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin. Drug Discov.* **8**, 1117-1126.

Puig-Asensio M. és munkatársai (2014) Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 245-254.

Semighini C.P. és munkatársai (2006) Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol. Microbiol.* **59**, 753-764.

Silva P.M., Gonçalves S. és Santos N.C. (2014) Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front. Microbiol.* **5**, cikkazonosító: 97

Srinivasan A., Lopez-Ribot J.L. és Ramasubramaniam A.K. (2014) Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today Technol.* **11**, 65-71.

Szilágyi M. és munkatársai (2013) Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-UK* **159**, 176-190.

Tóth V. és munkatársai (2012) The echinokandinB producer fungus *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 113-122.

5. A környezet-biotechnológia legújabb eredményei

5.1. A környezet-biotechnológia tárgya, jelene és jövőbeni fejlődési tendenciái

5.1.1. A környezet-biotechnológia tárgya

A környezet-biotechnológia biológiai, mindenekelőtt mikrobiológiai ismereteket használ fel különféle környezeti feladatok megoldásához. Ilyenek fontos feladatok például az ipari és kommunális szennyvizek tisztítása, az ivóvíz minőségének a javítása, a veszélyes anyagokkal szennyezett területek resztaurációja, a folyók, tavak és tengerek védelme a szennyező anyagoktól, a patogének vízben és levegőben történő terjedésének a megakadályozása, környezetbarát kémiai anyagok, pl. etanol, metanol, metán, előállításuk valamint az ipari maradékanyagok, mint depozícióra kerülő szennyezőanyagok, mennyiségének a csökkentése (Bhattacharyya és Banerjee, 2007).

Az emberek számának robbanásszerű növekedése, a városok méretének az expanziója, továbbá a gyors ipari fejlődés mind-mind különféle szennyezők megjelenéséhez vezetett a környezetben. Az egyik legfenyegetőbb folyamat az elmúlt ötven évben az igen toxikus, nehezen lebomló, ugyanakkor jó bioakkumuláló és biomagnifikációs tulajdonságú xenobiotikus kémiai anyagok megjelenése a környezetben. Gyakori ezen anyagok kölcsönhatása különféle sejtekkel, szervekkel és szövetekkel, ami az élőlények élettani állapotát igen hátrányosan befolyásolja (Thakur, 2011). Mindezen problémák kezelése, divatos szóval „menedzselése” tartozik a környezet-biotechnológia tárgyköréhez (Thakur, 2011).

Hasonlóan a biotechnológia többi területéhez a környezet-biotechnológia művelése is multidiszciplináris megközelítéseket igényel és mára ez a szakterület is interdiszciplinárisá vált, ahol hatékonyan ötvöződnek a hagyományos és az alapvetően molekuláris szemléletű új („new biotechnology”) technológiai elemek. Mindamelllett kétségtelen ma a mikrobiológiai tudás felhasználásának a dominanciája a környezet-biotechnológiai fejlesztésekben. Ehhez

elengedhetetlen a mikróbák szaporodásának, tápanyag-preferenciáinak, bioenergetikai sajátosságainak, valamint az adott élőhelyen megfigyelhető többi mikróbával való kölcsönhatásainak (lásd például a biofilmek kialakulását) a mélyebb megismerése (Rittmann és McCarthy, 2001).

5.1.2. A környezet-biotechnológia jelene

A környezet-biotechnológia jelenkori tevékenységi területe tehát igen széles spektrumú és dinamikusan változó az aktuális környezeti problémákkal, kihívásokkal összhangban. A jelenlegi főbb tevékenységi területek Thakur (2011) alapján: (i) a levegő-, víz- és talajszennyezések kontrollja, (ii) a hulladékok kezelése, (iii) természetes anyagok, pl. biopolimerek, biodegradációja és biokonverziója (pl. a lignocellulóz lebontása; biofinomítás), (iv) a környezetbe kikerülő xenobiotikumok lebontása, (v) a nehézfém-szennyezők eltávolítása, bioszorpciója, (vi) a biotechnológiai eljárások felhasználása a környezetgazdálkodás területén (pl. bioremediáció, bioenergia előállítása, komposztálás, biopolimerek és bioműanyagok gyártása, biológiai bányászat, nanoanyagok gyártása és alkalmazása) továbbá (vii) az ipari környezetszennyezések kezelése (pl. papírgyártás, bőripar, textilipar, gyógyszeripar, olajipar, élelmiszeripar, bioenergia előállítás).

A jelen környezeti biotechnológiájának tehát egyszerre két kérdésre is hatékony választ kell találnia: (i) hogyan tudjuk biztonságosan elhelyezni a jelenleg is termelődő nagy mennyiségű hulladékot, továbbá (ii) hogyan tudjuk majd eltávolítani azokat a mérgező anyagokat, amelyek az elmúlt évtizedekben halmozódtak fel a szemétkerakó helyeken, a talajban és a vízrendszerben (Jain és munkatársai, 2011a).

Az utóbbi években látványosan bővült a környezet-biotechnológia eszköztára, pl. bioszenzorok alkalmazása a biomonitorozásban (Ivanov és Hung, 2010), DNS-alapú eszközök (pl. amplifikált fragmentum hosszúság polimorfizmus, „AFLP”; terminális restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus, „T-RFLP”; riboszomális RNS intergénikus szakaszainak analízise, „RISA”) és a metagenomikai megközelítés (Thakur, 2011) elterjedése a mikróbaközösségek összetételének a jellemzésében, valamint genetikailag módosított mikroorganizmusok (Jain és munkatársai, 2011b) és új típusú bioreaktorok, pl. membrán

bioreaktorok (Guglielmi és Andreottola, 2010), megjelenése egyes környezet-biotechnológiai eljárásokban.

Napjainkban szemléletváltás is tapasztalható a környezet-biotechnológiai fejlesztésekben, hiszen fokozatosan előtérbe kerülnek azok a megközelítések, melyek a szerves hulladékok lebontását összekapcsolják az akár jelentős hozzáadott értékkel bíró biotechnológiai termékek, pl. enzimek, szerves savak, poliszacharidok, bioműanyagok, takarmányok, kémiai ipari alapanyagok, biológiai üzemanyagok, sőt gyógyszerek előállításával (Stabnikova és munkatársai, 2010). Külön említést érdemelnek a környezet-biotechnológiai eljárások értékes melléktermékei, pl. a komposzt, továbbá a bioremediációs eljárásokban visszanyerhető fémek (Stabnikova és munkatársai, 2010). Az utóbbi évek egy kétségkívül legérdekesebb fejleménye a nanoeszközök, pl. vas-oxid nanorészecskék (Braunschweig és munkatársai, 2013), felhasználása különféle környezet-biotechnológiai, pl. bioremediációs, fejlesztésekben.

Az utóbbi években egyre nagyobb teret nyernek az emberiség energiaellátásának a fedezésében a biológiai üzemanyagok, pl. bioetanol, biodízel, biogáz, biohidrogén, (Wall és munkatársai, 2008; Gupta és munkatársai, 2014) továbbá ígéretes kutatások folynak a mikrobiális üzemanyagcellák fejlesztésének a területén is (Aeltermann és munkatársai, 2008; Zhou és munkatársai, 2014).

Éppen most alakulnak azok a biofinomító rendszerek (lásd még a 2.2.6. fejezetet), melyek várhatóan képesek lesznek biológiai alapanyagok felhasználásával biológiai üzemanyagok, bioenergia (hő és áram), valamint biológiai alapú kémiai anyagok hatékony előállítására (Gavrilescu, 2014). A biológiai alapanyagok négy generációját különböztetjük meg (Brennan és Owende, 2010; Dragone és munkatársai, 2010; Gavrilescu, 2014): 1. generáció: ehető biomassza (pl. keményítőben dús gabonafélék, olajos növények), 2. generáció: nem ehető biomassza, a takarmánynövények nem ehető részei, 3. generáció: algák főképpen növényi olaj és biodízel előállításra, 4. generáció: GM növények, melyek több CO₂-t kötnek, mint amennyi a későbbi elégetésükkor felszabadul (Demirbas, 2011), továbbá növényi olajok és biodízelek benzin előállítására. A biofinomítók csoportosítása többféleképpen lehetséges, például a felhasznált nyersanyag, a környezetbarát karakter és a folyamatok integráltságának a foka alapján megkülönböztetünk lignocellulóz alapú, teljes gabona alapú, zöld (természetes, friss,

„nedves” biomassát, pl. fűvet, lóherét, éretlen gabonanövényeket hasznosít), termokémiai (pirolízis, gázosítás, pörkölés, hidrotermikus konverzió, stb. termékei) és tengeri (mikroalga és makroalga felhasználás) biofinomítókat (Gavrilescu, 2014). A leggyakrabban használt biofinomító platformok: (i) biokémiai (cukor) (biokémiai nyersanyag konverzió, pl. enzimekkel), (ii) termokémiai és (iii) mikroorganizmus alapú (pl. fotobioreaktorokban algák) platformok (Gavrilescu, 2014).

5.1.3. A környezet-biotechnológia jövőbeni fejlődési tendenciái

Várható, hogy a jövőben a kémiai alapú környezeti technológiákat felváltják a biológiai alapú technológiák (Jain és munkatársai, 2011a). A jelenlegi fizikai és kémiai alapú technológiák gyakran hatékonyak pl. a környezeti szennyezők ártalmatlanításában, de ugyanakkor gyakran képződnek olyan termékek, melyek toxikusak az immunrendszerre, sőt rákkeltők is lehetnek. Mint azt már fentebb említettem, várható genetikailag módosított organizmusok alkalmazása bizonyos környezet-biotechnológiai fejlesztésekben (Jain és munkatársai, 2011b) valamint a mezőgazdaságban is (Hokanson és munkatársai, 2014), különös tekintettel baktériumokra és mikroszkopikus gombákra. Várható pl. a GM cianobaktériumok felhasználása biológiai üzemanyag, pl. biohidrogén, termelő technológiákban (Leite és Hallenbeck, 2014):

A mikroorganizmusok felhasználása bioremediációs technológiákban, pl. szénhidrogének lebontásában, nehézfém-szennyezők kontrolljában és xenobiotikumok ártalmatlanításában már ma is jelentős, és ezen technológiák további fejlesztése várható (Jain és munkatársai, 2011a).

Ugyancsak tartós tendenciának tűnik a hulladékok, mint szubsztrátumok felhasználása bizonyos biotechnológiai folyamatokban a mikroorganizmusok biomasszájának a gyarapítására, illetve ezen anyagok biológiai konverziója nagy értékű, piacképes termékekké (Stabnikova és munkatársai, 2010).

Teljesen bizonyos, hogy folytatódni fog a biofinomítás technológiai platformjainak a kiépítése, valamint az integrált technológiai folyamatok közötti kapcsolat erősítése (Gavrilescu, 2014; lásd még az 5.1.2. fejezetet).

Ami a jövő üzemanyag-ellátását illeti, egyes mikroorganizmusok, pl. bizonyos endofiton gombák (3.3. fejezet), képesek szénhidrogének bioszintézisére, aminek kutatása különféle biokémiai, genetikai és bioinformatikai eszközök segítségével nagy erővel folyik (Strobel, 2014a, 2015; Spakowitz és Strobel, 2015; Yamada és munkatársai, 2015). Remélhetően, ezen felfedezések elvezethetnek minket cellulóz-hemicellulóz alapú szénhidrogén bioszintézis technológiák kidolgozásához. Ebben az esetben a mezőgazdasági hulladékok nagy részét közvetlenül szénhidrogénekké tudnánk konvertálni pusztán biotechnológiai eszközök felhasználásával (Strobel, 2014b). Az endofiton gombák szénhidrogén termeléséről, illetve az ebben rejlő lehetőségekről az 3.3. fejezetben (3.3.5., 3.3.6. és 3.3.7. alfejezetek) már részletesen beszámoltam.

A továbbiakban két olyan szűkebb szakterületre szeretnék koncentrálni az 5. fejezetben, melyek környezet-biotechnológiai jelentősége már ma is nagy, és ezek a megfigyelések akár forradalmasíthatják is a környezetbe kikerülő illetve kikerült xenobiotikumok, illetve nehézfém-szennyezők ártalmatlanítását. Az 5.2. fejezetben ismertetni szeretném a fehér korhasztó gombák unikális potenciálját különféle veszélyes kémiai anyagok, pl. aromás szénhidrogének, robbanóanyagok, peszticidek, xenoösztrogének és gyógyszer-alapanyagok lebontására. Továbbmenve, az 5.3. fejezetben a gombák említésre méltó nehézfém-toleranciájának a molekuláris hátterét és az ezeken a megfigyeléseken alapuló környezeti technológiai fejlesztési lehetőségeket szeretném bemutatni.

5.1.4. Irodalomjegyzék az 5.1. fejezethez

Aaltermann P. és munkatársai (2008) Microbial fuel cell as an engineered ecosystem. A következő könyvben: *Bioenergy*, Szerkesztők: Wall J.D., Harwood C.S. és Demain A., ASM Press, Washington, 307-320. oldalak

Bhattacharyya B.C. és Banerjee R. (2007) *Environmental Biotechnology*, Oxford University Press, Oxford

Braunschweig J., Bosch J. és Meckenstock R.U. (2013) Iron oxide nanoparticles in geomicrobiology: from biogeochemistry to bioremediation. *New Biotechnol.* **30**, 793-802.

Brennan L. és Owende P. (2010) Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energy Rev.* **14**, 557-577.

Demirbas M.F. (2011) Biofuels from algae for sustainable development. *Appl. Energy* **88**, 3473-3480.

Dragone G. és munkatársai (2010) Third generation biofuels from microalgae. A következő könyvben: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Szerkesztő: Méndez-Vilas A., Formatex Research Center, Badajoz, 1355-1366. oldalak

Gavrilescu M. és munkatársai (2014) Biorefinery systems: and overview. A következő könyvben: *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Szerkesztők: Gupta V.K., Tuohy M.G., Kubicek C.P., Saddler J. és Xu F., Elsevier, Amsterdam, 219-241. oldalak

Guglielmi G. és Andreottola G. (2010) Selection and design of membrane bioreactors in environmental biotechnology. A következő könyvben: *Environmental Biotechnology*, Szerkesztők: Wang L.K., Ivanov V., Tay J.H. és Hung Y.T., Human Press, New York, 439-516. oldalak

Gupta V.K., Tuohy M.G., Kubicek C.P., Saddler J. és Xu F. (2014) *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Elsevier, Amsterdam

Hokanson K.E. és munkatársai (2014) Not all GMOs are crop plants: non-plant GMO applications in agriculture. *Transgen. Res.* **23**, 1057-1068.

Ivanov V. és Hung Y.T. (2010) Applications of environmental biotechnology. A következő könyvben: *Environmental Biotechnology*, Szerkesztők: Wang L.K., Ivanov V., Tay J.H. és Hung Y.T., Human Press, New York, 1-17. oldalak

Jain P.K., Gupta V.K. és Bajpai V. (2011a) *Recent Advances in Environmental Biotechnology*, Lambert Academic Publishing, Saarbrücken

Jain P.K. és munkatársai (2011b) GMOs: in perspective of bioremediation. A következő könyvben: *Recent Advances in Environmental Biotechnology*, Szerkesztők: Jain P.K., Gupta V.K. és Bajpai V., Lambert Academic Publishing, Saarbrücken

Leite G.B. és Hallenbeck P.C. (2014) Engineered cyanobacteria: research and application in bioenergy. A következő könyvben: *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Szerkesztők: Gupta V.K., Tuohy M.G., Kubicek C.P., Saddler J. és Xu F., Elsevier, Amsterdam, 389-406. oldalak

Rittmann B.E. és McCarthy P.L. (2001) *Environmental Biotechnology*, The McGraw-Hill Companies, New York

Spakowicz D.J. és Strobel G.A. (2015) Biosynthesis of hydrocarbons and volatile organic compounds by fungi: bioengineering potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4943-4951.

Stabnikova O., Wang J.Y. és Ivanov V. (2010) Value-added biotechnological products from organic wastes. A következő könyvben: *Environmental Biotechnology*, Szerkesztők: Wang L.K., Ivanov V., Tay J.H. és Hung Y.T., Human Press, New York, 343-394. oldalak

Strobel G.A. (2014a) Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 259-272.

Strobel G. (2014b) The use of endophytic fungi for the conversion of agricultural wastes to hydrocarbons. *Biofuels* **5**, 447-455.



Strobel G.A. (2015) Bioprospecting – fuels from fungi. *Biotechnol. Lett.* **37**, 973-982.

Thakur I.S. (2011) *Environmental Biotechnology*, I.K. International Publishing House, New Delhi

Wall J.D., Harwood C.S. és Demain A. (2008) *Bioenergy*, ASM Press, Washington

Yamada Y. és munkatársai (2015) Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* **112**, 857-862.

Zhu M. és munkatársai (2014) Bioelectrochemistry of microbial fuel cells and their potential applications in bioenergy. A következő könyvben: *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Szerkesztők: Gupta V.K., Tuohy M.G., Kubicek C.P., Saddler J. és Xu F., Elsevier, Amsterdam, 131-152. oldalak

5.2. A fehér korhasztó gombák környezet-biotechnológiai felhasználása

5.2.1. A gombák felhasználása veszélyes kémiai anyagok ártalmatlanítására

A legveszélyesebb környezetet károsító kémiai anyagok a szénhidrogének, halogénezett szerves oldószerek, a hormonrendszert megzavaró ágensek, robbanóanyagok, mezőgazdasági kemikáliák és a nehézfémek (Harms és munkatársai, 2011). A káros környezetszennyezők ártalmatlanításához szükséges az, hogy a lebontó/hatástalanító mikrobák hozzáférjenek ezekhez az anyagokhoz, ami sokszor nem lehetséges, mivel például a mikroélőhelyen nincs víz, ami limitált biológiai hasznosíthatóságot eredményez az adott szennyezőre nézve. Az ideális lebontó organizmusok a szennyezőket kedvezőtlen körülmények között, pl. víz- és tápanyaghiány, is megtalálják (pl. a talajszemcsék pórusaiban) és hatástalanítják. Ennek a kritériumnak jól megfelelnek a növényekkel és baktériumokkal együtt élő és együttműködő gombák, és mind szárazföldi, mind vízi gombák alkalmasak lehetnek bioremediációs technológiák kidolgozására. A szárazföldi és vízi gombák tipikus élőhelyei, és néhány ökológiai jellemzője megtalálható Harms és munkatársai (2011) összefoglaló közleményében.

5.2.2. A gombák előfordulása és ökológiai sajátosságai

A fonalas gombák sejtszerveződése az apikális növekedést szolgálja (Harms és munkatársai, 2011). Bár a hifák vékonyak (2-10 μm), több száz hektárt is behálózhatnak, azaz a gombák „mikroszkopikus egységekbe csomagolt makroorganizmusok”. A gombák biotechnológiai alkalmazását, beleértve a bioremediációs technológiákat is, jelentősen korlátozza az a tény, hogy a hifák nyíróerővel szembeni ellenállóság rossz.

Érdeemes megemlíteni, hogy a micéliumtömeg adja a talaj biomassza tartalmának akár 75 %-át! A konkrét érték 50-1000 μg per g talaj száraztömeg, ami átszámolva 2-45 t/ha érték! Az összesített hifahossz pedig 10^2 , 10^3 vagy akár 10^4 m per g szántóföldi művelés alatt álló talajban, illetve legelők vagy erdők talajában.

A gombák által tolerált környezeti paraméter-tartományok a következők:

Hőmérséklet: -5 – 60 °C; pH: 1-9; vízaktivitás: > 0,65; O₂ tenzió: > 0,2 %.

Nagyon fontos, hogy a baktériumokkal szemben a gombák a terjedésükhöz nem igényelnek folyamatos vízréteget, a hifák ugyanis át tudnak hatolni folyadék-levegő határrejtegeken, be tudnak nőni még a 2 µm-es talajpórusokba is, sőt behatolnak a szikla mátrixokba is (Harms és munkatársai, 2011). Így nem meglepő, hogy a gombák módosítják a talajszerkezetet elektrosztatikus, adhézions és hálózatképző sajátosságaik, továbbá szervesanyag-lebontó képességük révén.

A gombák hidrofobinokat, hidrolázokat és oxidatív exoenzimeket szekretálnak, és ennek révén ők a legfontosabb cellulóz és lignin lebontó organizmusok (Harms és munkatársai, 2011). A lignin lebontására képes gombák a fehér korhasztók.

A hifákban mind diffúziós, mind aktív kémiai anyag transzlokációk megfigyelhetők. Arbuskuláris mikorrhizákban a növényi lipidek áramlási sebessége az extraradikális micélium irányába 11 mm/s, 1,3 mg/h/db hifa fluxussal (Harms és munkatársai, 2011), a hidrofób szerves szennyezők felvételi sebessége pedig 5 ng/h/db hifa. Közismert, hogy a növény által fixált szén 10-30 %-át ezek a gombák használják fel, miközben a növény tápelem-szükségletének a jelentős részét a gombák fedezik, melynek mértéke elemenként N: 20 %, P: 80 %, K: 10 %, Zn: 25 %, Cu: 60 %.

A különféle gombataxonok környezeti szennyező lebontó potenciálja jelentősen eltér (Harms és munkatársai, 2011):

Kickellomycotina: policiklikus aromás szénhidrogének („polycyclic aromatic hydrocarbons”; „PAHs”)

Entomophthoromycotina: policiklikus aromás szénhidrogének

Mucoromycotina: benzokinolin, bifenil, policiklikus aromás szénhidrogének, peszticidek, szintetikus festékek, 2,4,6-trinitro-toluol (TNT)

Chytridiomycota: policiklikus aromás szénhidrogének

Glomeromycota: policiklikus aromás szénhidrogének, peszticidek

Ascomycota:

Pezizomycotina: alkánok, alkil-benzolok, bifenil, klór-fenolok, kátrányolaj, a hormonrendszert megzavaró kémiai anyagok („endocrine disrupting chemicals”; „EDCs”), illatszerek, policiklikus aromás szénhidrogének, poliklórozott dibenzo-*p*-dioxinok („polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins”; „PCDDs”), peszticidek, szintetikus festékek, TNT és toluol.

Saccharomycotina: alkánok, alkil-benzolok, bifenil, nyersolaj, EDCs, PAHs és TNT

Más ascomycoták: alkánok, dieselolaj, kátrányolaj, nyersolaj, metil-*tert*-butil-éter („methyl-*tert*-butylether”; „MTBE”), PAHs, peszticidek, „Royal Demolition Explosive” („RDX”) robbanóanyag, toluol és szintetikus festékek

Basidiomycota:

Agaricomycotina: alkánok, „BTEX” vegyületek („benzene, toluene, ethyl-benzene, xylene” azaz benzol, toluol, etil-benzol, xilol), klórozott alifás vegyületek, lignolok és fenolok, nyersolaj, kátrány, EDCs, PAHs, poliklórozott bifenilek („polychlorinated biphenyls”; „PCBs”), PCDDs, poliklórozott dibenzo-furánok („polychlorinated dibenzofurans”; „PCDFs”), testápoló szerek összetevői („personal care products ingredients”), peszticidek, gyógyszer hatóanyagok, RDX, szintetikus festékek, szintetikus polimerek, TNT és más nitro-aromás vegyületek.

Pucciniomycotina: krezolok, nyersolaj, dibenzo-tiofének, PAHs, RDX

5.2.3. A környezet-biotechnológiai szempontból érdekes taxonok, fajok

A legjobb lebontó potenciállal bíró gombafajok (Harms és munkatársai, 2011):

Ascomycota, Pezizomycotina:

Cladophialophora és *Exophiala* fajok: toluol

Aspergillus és *Penicillium* fajok: alifás szénhidrogének, klór-fenolok, PAHs, peszticidek, szintetikus festékek, TNT

Cordiceps, *Fusarium* és *Pseudallescheria* fajok: PCDDs

Acremonium fajok: PAHs, RDX

Graphium fajok: MTBE

Ascomycota, Saccharomycotina:

Candida, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* és *Yarrowia* fajok: alifás szénhidrogének, nyersolaj, EDCs, PAHs, TNT

Basidiomycota, Agaromycotina:

Fehér korhasztók: *Phanerochaete chrysosporium*, továbbá *Nematoloma*, *Pleorotus* és *Trametes* fajok: klórozott szénhidrogének, PAHs, TNT

Barna korhasztók: *Gloeophyllum* fajok: klór-fenolok, dikloro-difenil-triklór-etán („DDT”), fluor-kinolon antibiotikumok

Basidiomycota, Pucciniomycotina:

Rhodotorula élesztők: krezolok, nyersolaj-származékok, PAHs, RDX.

Mucormycotina:

Cunninghamella, *Mucor* és *Rhizopus* fajok: PAHs, peszticidek, textil festékek, TNT

5.2.4. A környezetszennyezők lebontásának mechanizmusai

A gomba katabolikus enzimek egy része kis specificitású, így sok környezeti szennyező lebontására alkalmasak (Harms és munkatársai, 2011): Pl. *Phanerochaete chrysosporium*: BTEX, nitro-aromás és N-heterociklikus robbanóanyagok (TNT, RDX), klórozott szerves vegyületek (klórozott alifások, klór-lignolok, klór-fenolok, PCDDs), PAHs, peszticidek, szintetikus festékek, szintetikus polimerek. Ezekben a lebontásokban kiemelkedő az extracelluláris oxidoreduktázok, így a lakkázok és a peroxidázok, szerepe. Lakkázok – réztartalmú oxidázok, melyek O₂-t használnak oxidálószerként. Lignint módosító peroxidázok

a szerkezetüket tekintve hem peroxidázok, konkrétan mangán-peroxidáz, lignin-peroxidáz és sokoldalú („versatile”) peroxidázok, melyek H_2O_2 -t használnak oxidálószerként.

Harms és munkatársai (2011) alapján a szerves környezetszennyezők vagy extracelluláris oxidációval (lakkáz és peroxidáz aktivitások, továbbá hidroxil-gyök támadás által) vagy intracelluláris mechanizmusok (kezdeti támadás pl. citokróm P450 monooxigenázok és nitro-reduktázok révén, majd további katabolikus lépések, konjugátumok képzése illetve lebomlási termékek szekréciónja következnek) által kerülnek lebontásra. A sejten kívüli oxidációkban éter-hasítások, kinoid terméképzés, hidroxilezés, az aromás gyűrűk felnyílása, CO_2 -felszabadulás, oxidatív kapcsolódási reakció termékek képződnek, melyek beléphetnek a sejtekbe, ahol tovább metabolizálódhatnak, vagy lebomlási maradványok a talajban megkötődnek („bound residues”). Az intracelluláris lebomlási termékek lehetnek CO_2 (mineralizáció), szekretált metabolitok, vagy ugyancsak szekréciónra kerülő *O*-glükózid, *O*-glükuronid, *O*-xilozid, *O*-szulfát és *O*-metil konjugátumok.

Napjaink egyik érdekes és fontos feladata a gombák P450 monooxigenázainak („P450om”) a felderítése és az élettani funkciójának felderítése. Ez a folyamat előrehaladott a *Phanerochaete chrysosporium* fehér korhasztó gombában. Ezek az enzimek fontos szerepet játszanak a ligninlebontási termékek, valamint különféle xenobiotikumok lebontásában, ami remélhetőleg kiaknázható lesz különféle bioremediációs, ipari és gyógyszeripari biokonverziós folyamatokban (Syed és Yadav, 2012).

5.2.5. A lignint lebontó enzimek, extracelluláris hidrogén-peroxid termelés gombákban

A lakkázok (EC 1.10.3.2.; Arora és Sharma, 2010; Desai és Nityanand, 2011) számos gombacsoportban megfigyelhetők. Ismert termelők pl. a *Trametes*, *Neurospora*, *Rhizoctonia* és a *Coprinus* fajok.

A lignin peroxidáz és mangán peroxidáz enzimeknek redoxaktív hemjük van az aktív centrumaikban; ilyenek például a *Phanerochaete chrysosporium* és a *Pleurotus* fajok peroxidázai (Leonowicz és munkatársai, 2001). Ezeknek a peroxidázoknak a működéséhez extracelluláris H_2O_2 szükséges.

Az extracelluláris H_2O_2 -termeléshez glükóz-1-oxidáz, aril-alkohol oxidáz vagy glioxál oxidáz enzimaktivitásokra van szükség (Leonowicz és munkatársai, 2001).

5.2.6. Oxidáció lakkázokkal

A lakkázok jellegzetességei (Arora és Sharma, 2010): (i) Egy elektronos oxidációt hajtanak végre. (ii) Kicsi szubsztrátspecifitás, fenolok esetében a standard redox potenciál általában 0,5-0,8 mV. (iii) A szubsztrátspecifitás tovább szélesíthető mediátor vegyületek jelenlétében. Ilyenek lehetnek pl. 2,2'-azino-bisz-(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) („ABTS”), 1-hidroxi-benzotriazol („HBT”), vagy 3-hidroxi-antranilsav. Meg kell viszont jegyeznünk, hogy a mediátorok általában drágák, nem használhatók fel újra és toxikus melléktermékek is képződhetnek a működésük közben (Harms és munkatársai, 2011).

A lakkázok legtöbbször fenolokat támadnak gyökképződés közben, majd a kialakuló instabil gyökök nem-enzimatikus diszproporcionálódása figyelhető meg változatos szerkezetű termékek képződése közben.

5.2.7. A lakkázok biotechnológiai felhasználása

A lakkázok a biotechnológiában kedvelt és sokoldalúan felhasznált enzimek (Asgher és munkatársai, 2008; Arora és Sharma, 2010; Maciel és munkatársai, 2010; Desai és Nityanand, 2011; Harms és munkatársai, 2011, Gasser és munkatársai, 2014). A megvalósult alkalmazások a teljesség igénye nélkül, és nemcsak a környezet-biotechnológiai alkalmazásokat érintve:

- Poliklórozott bifenilek („PCBs”) és klórozott fenolok lebontása.
- Textilfestékek dekolorizációja.
- Papírgyártás, lignin lebontás a faanyag pépesítésekor, illetve a papír fehéritésekor.
- Lignocellulóz alapú etanol gyártáskor a lignin lebontása.
- A must és bor fenoltartalmának (fahéjsav származékok és katechinek), a csökkentése.
- Szén bioszolubilizációja.

- Fosszilis üzemanyagok deszulfurizációja.
- Herbicidek lebontása, pl. fenil-karbamid alapú szerek esetén.
- PAHs degradációja.
- A szennyvíztisztítókat elhagyó (effluens) tisztított vízben egyre gyakrabban megfigyelhető, kis koncentrációban jelenlévő, ugyanakkor káros élettani hatással bíró szerves szennyezők („emerging organic contaminants”, „EOCs”, „feljövőben lévő szerves szennyezők”) lebontása.
- Élelmiszergyártás, pl. a színek módosítása a fenolok polimerizációja révén, lásd a repce olaj esetében. A gyümölcslevek, sörök, borok fenoltartalmának oxidálása meggátolja a barnulási, opálosodási és zavarosodási folyamatokat.
- A mérges szömörce bőrgyulladást okozó toxikus fenolos anyagának, a katekol származék urusiolnak a közömbösítése.
- Biokonverziós folyamatok kivitelezése (gyógyszergyártás).
- Bioszenzorok fejlesztése O₂, aromás aminok, fenolok és C-vitamin kimutatására.
- Szerves kémiai szintézisekben különféle reakciók végrehajtása, pl. funkciós csoportok oxidálása, polimerek képzése, szén-nitrogén kötések kialakítása, fenolok és szteroidok átalakítása. A lakkázok szerves kémiai felhasználásával kapcsolatban lásd pl. Kunamneni és munkatársai (2008) közleményét.

A lignin és mangán peroxidázok felhasználása még elmarad a lakkázokétól, de már ma is sok területen használják fel őket, pl. az élelmiszeriparban (aromás illatanyagok, pl. vanillin, előállítás), a papíriparban (a papír fehéritése), bioremediációs technológiákban (festékek dekolorizációja, xenobiotikumok és peszticidek lebontása, policiklikus aromás szénhidrogének lebontása) és szerves kémiai reakciókban (pl. a mangán peroxidázt akrilamid polimerizációjában és a sztirol polimerek lebontásában) (Maciel és munkatársai, 2010).

5.2.8. A gombák lehetséges felhasználása bioremediációs technológiákban

Harms és munkatársai (2011) összefoglaló munkája alapján a gombák felhasználása akkor lehet a baktériumokkal szemben előnyös, ha a szennyező ritka szerkezeti elemet tartalmaz (a baktériumok ugyanis jól definiált, kis specificitású biokémiai útvonalakat használnak a degradációkra, amelyek evolúciója lassú, vagy a lebontás horizontális géntranszfert igényel),

a biológiai hasznosíthatóság kicsi (pl. nagy molekulatömegű PAHs), kevés a szennyező energiataralma (pl. nagymértékben oxidált – klórozott, nitrált – kémiai anyagok), illetve permanensen kis koncentrációban (pl. EDCs) van jelen. A baktériumok körében nehezen találni olyanokat, amelyek jól bontanak gyógyszer-alapanyagokat, mezőgazdasági kémiai szereket, illetve a fogyasztási cikkek adalékanyagait (kozmetikumok, festékek, detergenssek). Kiválóak viszont az egyszerű szerkezetek, pl. egyszerű szerkezetű alifás és aromás szénhidrogének, gyors lebontásában.

Fontos megjegyeznünk, hogy a különféle, a környezetben nyomnyi mennyiségben jelenlévő szerves vegyületek fehér korhasztók, illetve ezek ligninhasító enzimeivel való lebonthatósága nagymértékben függ az adott vegyület kémiai szerkezetétől (Yang és munkatársai, 2013). Általánosságban elmondható, hogy az elektronszívó csoportok, pl. amid (-CONR₂), karboxil (-COOH), halogén (-X) és nitro (-NO₂) csökkentik a vegyületek oxidálhatóságát, míg az elektrondonor csoportok, mint pl. amin (-NH₂), hidroxil (-OH), alkoxi (-OR), alkil (-R) és acil (-COR) növelik azt. Ezzel magyarázható, hogy a fehér korhasztók általában kiválóan bontják a fenolos vegyületeket, pl. a nonil-fenolt, a biszfenol A-t és az ösztrogén jellegű szerkezeteket (-OH csoport jelenléte), míg gyengébben, vagy egyáltalában nem az elektronszívó csoportokat tartalmazó kémiai szerkezeteket, pl. a gyógyszermolekulák közül ilyen a karbamazepin (antiepileptikum), ami amid csoportot tartalmaz (Yang és munkatársai, 2013). Amennyiben a kémiai szerkezetek elektronszívó és elektrondonor csoportokat egyaránt tartalmaznak, akkor a lebonthatóság a megfigyelések szerint tág határok között mozog, és mindenképpen kiterjedt kísérletek szükségesek egy adott fehér korhasztó gombafaj esetén a lebonthatóság pontos mértékének, és a lebontáshoz szükséges idő a megállapításához. Például általában jól lebonthatók, bár az időigény jelentősen eltérő lehet, a tetraklór-biszfenol (gyulladásgátló, klórozott), az antibakteriális hatású triklozán (klórozott fenol), a naproxén (nem-szteroid gyulladáscsökkentő, éter- és karboxil-csoportokat tartalmaz), ibuprofén (nem-szteroid gyulladáscsökkentő, metil- és karboxil-csoportokat tartalmaz), diklofenák („diclofenac”; nem-szteroid gyulladáscsökkentő, amin- valamint klór- és karboxil-csoportokat tartalmaz) valamint a szulfonamid antibiotikumok (szulfonamid- és amin-csoportokat tartalmaznak) (Yang és munkatársai, 2013). Ugyanakkor igen nehezen vagy egyáltalában nem lebonthatók fehér korhasztókkal, pl. a fluoxetin (antidepresszáns, a „Prozac” hatóanyaga), a

klofibrinsav („clofibric acid”; herbicid), a terbutilazin (herbicid), a metalaxil (fungicid), az atrazin (herbicid) és a diuron (herbicid) (Yang és munkatársai, 2013).

A megfigyelések szerint a fehér korhasztó gombák által legtöbbször jól lebontható szerves környezet-szennyezők (Harms és munkatársai, 2011) közé tartoznak a hormonrendszert megzavaró kémiai anyagok („EDCs”, pl. nonil-fenol, biszfenol A, 17α -etinil-ösztadiol), a poliklórozott dibenzo-*p*-dioxinok („PCDDs”, pl. a különösen toxikus 2,3,7,8-tetraklór-dibenzo-*p*-dioxin, „2,3,7,8-TCDD”), a poliklórozott dibenzofuránok („PCDFs”), a TNT, a nagy molekulatömegű policiklikus aromás szénhidrogének („PAHs”), a fájdalomcsillapítók, az epilepszia elleni szerek, a nem-szteroid gyulladáscsökkentők, a röntgen kontrasztanyagok, továbbá a policiklikus illatszer (pl. pézsmá) illatanyagok.

Összegzésképpen megállapítható, hogy a gombák a kiterjedt micélium rendszerük segítségével nagytávolságú transzport, pl. víz, tápanyagok, sőt maguk a környezetszennyezők, lebonyolítására képesek a talajban. A hifákon lévő vízrétegben pedig a talajlakó baktériumok is könnyen mozognak, ami a lebontás hatékonyságát tovább növeli. Mindezek ellenére, és meglepő módon, lényegében nincsenek még a piacon sikeres gomba alapú környezet-biotechnológiai módszerek (Harms és munkatársai, 2011)!

5.2.9. A gombák potenciális környezet-biotechnológiai alkalmazási lehetőségei

Mint arra Harms és munkatársai (2011) rámutattak, a jelenlegi bioremediációs technológiák döntően baktérium alapúak, mert ezek a mikróbák sokféle élőhelyen megélnek, a reakcióik bár szűkebb specificitásúak, de nagyon hatékonyak, nem igényelnek extra szénforrást, gyorsabb a biomassza gyarapodásuk, sokkal mozgékonyabbak, különösen vízi élőhelyeken.

A gombák ezzel szemben O_2 -t igényelnek, de nem bírják a talaj homogenizálását, keverését hifák nyírása miatt, továbbá a gombák teljesítménye természetes körülmények között visszaesik, mert a baktériumok felélik az általuk is elérhető tápanyagforrásokat. A gombák viszont szerepet kaphatnak akkor, ha az élőhely túlságosan szennyezett, a baktériumok nem tudnak a szennyezőkhöz hozzáférni, illetve nem tudják azokat lebontani, mivel megfelelően hatékony lebontó útvonalak még nem alakultak ki bennük (pl. kis koncentrációban jelenlévő

szennyezők, vagy ritkán előforduló és teljesen új kémiai szerkezetű anyagok esetében; Harms és munkatársai, 2011).

A gombák potenciális jövőbeni környezet-biotechnológiai alkalmazásai a következők lehetnek Harms és munkatársai (2011) alapján: (i) Szerves anyagok és toxikus fémek eltávolítása felszíni talajrétegekből. Különösen ígéretesek a növények mikorrhizáján alapuló passzív és szemi-passzív technológiák (rhizoremediáció). A gombák jelenléte az általános biológiai aktivitást stimulálja, ami segíti a baktériumok elszaporodását is. (ii) Nagy koncentrációjú szennyezők (pl. olívaolaj sajtológok nagy fenol és lipid koncentrációjú szennyvize, textilipari, cukoripari és papíripari szennyvizek) eltávolítása szennyezett vízből. (iii) Kis koncentrációjú szennyezők (pl. EDCs, gyógyszer hatóanyagok, agrokemikáliák, illatszer-összetevők) eltávolítása szennyvízből. (iv) Izolált, illetve expresszált extracelluláris oxidázok felhasználása technológiai folyamatokban. (v) Légszennyezők, pl. illékony kémiai anyagok, eltávolítása gombákat tartalmazó filterekkel.

5.2.10. A szintetikus festékek biológiai lebontása

A legfontosabb szintetikus festék felhasználók a textilipar, nyomtatás, színes fotográfiai készítése, valamint a gyógyszer-, élelmiszer-, kozmetikai és a bőripar. 1856 óta 100 000-féle festéket gyártottak, míg a jelenlegi éves termelés 700 000 t fölött (Ali, 2010).

A textiliparban 1 kg textil festéséhez körülbelül 100 l víz kell, miközben a bázikus festékeknél kb. 2 %, a reaktív festékeknél pedig kb. 50 % a veszteség. A szennyvízbe kerülő festék mennyisége globálisan 280 000 t/év körüli érték (Ali, 2010).

A vízben lévő festékek zavarják a fotoszintézist, az O₂ beoldódását, ugyanakkor növelik a kémiai oxigénigényt („chemical oxygen demand”, „COD”). Különösen a tartós festékek gyaníthatóan karcinogének, hiszen sokszor olyan részekből állnak, pl. benzidin, amelyek már ismertek rákkeltőek (Ali, 2010).

A festékek lebontására a hagyományos szennyvíztisztítási technológiák legtöbbször nem használhatók, mert a festékek túl stabilak. A jelenleg használt festékeltávolítási technológiák a következőképpen csoportosíthatók Ali (2010) munkája alapján:

- Fizikai-kémiai eljárások, pl. adszorpció, kémiai oxidáció, precipitáció, koaguláció, szűrés, elektrolízis, fotodegradáció. Ezek a technológiák általában drágák, kevésbé hatékonyak, limitált a hatásspektrumuk, ráadásul interferálhatnak más szennyvíz-összetevőkkel.

- Biológiai módszerek, amelyekben gombákat, élesztőket, baktériumokat és algákat használnak fel. Gyakori a sikeres dekolorizáció, sőt a teljes mineralizáció is. Az eljárások relatíve olcsók, és a végtermékek legtöbbször nem toxikusak.

A leggyakrabban használt festékcsoportok a kémiai szerkezet alapján a nitro-, nitrózó-, azo-, trifenil-metán-, ftalein-, indigó- és az antrakinon-festékek (Ali, 2010). Ezek mikrobiális dekolorizációja lehet adszorptív és lehet degradatív.

A festékek bioszorpciója a mikrobák alkotói általi festékkötést jelenti, ami metabolikus energiát és transzport folyamatokat nem igényel, így bioszorpcióra mind az élő mind a holt sejtek képesek. A biodegradáció ezzel szemben a festékmolekulák enzimekkel történő, metabolikus, energiatülszórásos lebontását jelenti. A bioakkumuláció szintén energiatülszórásos; ekkor a festékeket a növekvő sejttömeg aktív folyamatban felveszi és felhalmozza (Kaushik és Malik, 2009).

A bioszorpció hatékony lehet, de gondot jelenthet a színes mikroba biomassza elhelyezése. Ugyanakkor olyan technológiák is kifejleszthetők, melyek révén visszanyerhetjük a megkötött festékeket (Ali, 2010).

A gombákkal történő biodegradáció alapvetően a fehérkorhasztók oxidáló extracelluláris enzimein alapul. A bakteriális degradáció tipikusan gyorsabb, és anaerob körülmények között az azofestékek színtelen aromás aminokká alakulnak át. Mivel ezek karcinogének, így egy plusz aerob lebontási fázis is feltétlenül szükséges. Az élesztőkkel történő festékeltávolítási

adatok gyarapodnak, ugyanakkor az algák lebontó képességéről még nem tudunk sokat (Ali, 2010).

A jövőben kidolgozásra kerülhetnek kevert mikroba (gomba és baktérium) kultúrák technológiák is. Elvi lehetőség van továbbá immobilizált sejtes és mikrobiális üzemanyagcellás („microbial fuel cell”, „MFC”) technológiák kidolgozására is (Ali, 2010).

A festékek mikrobiális lebontását befolyásoló paraméterek Ali (2010) alapján:

- pH: gomba és élesztő esetén savas, neutrális, baktériumoknál neutrális, bázikus optimum van.
- Hőmérséklet: bizonyos határig nő a hőmérséklet növelésével.
- Kezdeti festékkoncentráció: a festék koncentráció növelésével csökken az effektivitás.
- Nitrogén: az azofestékek esetén hasznos lehet a nitrogénlimitáció.
- Sók: sótoleráns (15-20 %-ig) mikroorganizmusokra van szükség.
- Rázás: ellentmondásos eredmények, sokszor a statikus kultúrák jobb eredményt adnak.
- O₂: legtöbbször jobb az aerob kultúra.

A dekolorizáció ipari körülmények között, igazi szennyvízben általában problematikus a nagy és ingadozó só-, keláló ágens-, prekursor-, melléktermék- és felületaktív anyag tartalom miatt (Ali, 2010). A pH ráadásul legtöbbször szintén ingadozik. Ebben a változó környezetben stressztűrő gombák alkalmazása előnyösebbnek tűnik, mint a baktériumoké. Egy másik érv a gombák használata mellett az, hogy csak nagyon kevés baktérium tudja a festékeket, mint egyedüli szén- és energiaforrásokat hasznosítani, ugyanakkor többféle gombafaj is (pl. fehér korhasztók) képes bizonyos festékek szénforrásként való hasznosítására (Kaushik és Malik, 2009; Ali, 2010).

A degradációt követően nagyon fontos a lebontási termékek meghatározása és alapos jellemzése, hiszen a színtelen intermedierek toxikusak, rákkeltők lehetnek. Fontos még a festék és a lebontási termékek fitotoxicitási (csírázás és növekedés) és mikrobiális toxicitási vizsgálata is (Ali, 2010).

A különféle gombák festékkötő tulajdonságairól, a környezeti paraméterek hatásairól, tovább arról, hogy a gomba biomassza fizikai és kémiai előkezelése miképpen befolyásolja a festékek bioszorpcióját, valamint a festékek lehetséges deszorpciójáról és a biomassza regenerációs lehetőségeiről, a biodegradációs folyamatok termékeiről, az alkalmazott bioreaktor típusokról további részletek találhatóak Kaushik és Malik (2009) kiváló összefoglaló munkájában.

Említést érdemel, hogy a jövő festék eltávolító/lebontó biotechnológiai fejlesztéseiben jelentős szerepet játszhatnak akár rekombináns baktériumok, pl. *Bacillus latrosporus* azoreduktázt expresszáló *Escherichia coli*, vagy éppen fonalas gomba lakkázokat expresszáló élesztők is, pl. *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* vagy *Kluyveromyces lactis* (Kaushik és Malik, 2009). Ezen túlmenően várható élő vagy holt baktérium (pl. *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* és *Corynebacterium* fajok) biomassza, algák (pl. *Spirogyra*, *Azolla* és *Chlorella* fajok), töltéssel bíró biopolimerek, pl. kitozán, sőt akár tőzeg felhasználása is a festékek eltávolítására (Srinivasan és Viraraghavan, 2010).

5.2.11. Az azofestékek lebontása fehér korhasztókkal

Az azofestékek környezetkárosító hatásai igen sokrétűek, pl. nagyon nehezen bomlanak le, a vizeket tartósan megszínezik, a fitoplankton színe megváltozik, a fotoszintézis lecsökken az intenzív fényabszorpció miatt, a pH eltolódik, a biológiai és kémiai oxigénigények (a BOD és COD értékek) megnövekednek, továbbá bizonyos festékek, festék prekursorok és aromás amin lebontási termékek rákkeltő hatása igazolást nyert (Chacko és Subramaniam, 2011). A jelenleg alkalmazott fizikai (adszorpció, membránszűrés, reverz ozmózis, desztillálás) és kémiai (Fenton reagens, ózon, NaOCl, fotokémiai vagy elektrokémiai lebontások) eljárások gyakran elégtelenek és igen drágák (Chacko és Subramaniam, 2011). A gombák által termelt lakkázok és peroxidázok viszont hatékonyan bontják az azofestékeket. A lakkázok, pl. a *Trametes villosa* enzime, az azofestékeket fenoxi-gyök és karbónium-ion intermedierek képződése közben hasítja meg, amit polimerizáció, aggregátumképzés követ. A lignin peroxidázok, pl. a *Phanerochaete chrysosporium* enzime, az azokötéseket szimmetrikus vagy aszimmetrikus hasítások révén bontják meg, és a kettős kötések polikonjugációjának a megszűnése általában színtelen hasítási termékeket eredményez (Chacko és Subramaniam, 2011).

5.2.12. A festékek eltávolítása immobilizált fehér korhasztó gombával

A fehér korhasztó gombák immobilizációjára számos hatékony technológiát dolgoztak már ki (Couto, 2009). Példaként említhető az alginát gélbe zárt *Phanerochaete chrysosporium*, valamint a narancshéjon és banánhéjon, továbbá nylon szivacson és rozsdamentes acél szivacson immobilizált *Trametes pubescens*. Egy további szép gyakorlati példa a Sella Solid Blue festék folyamatos dekolorizációja rozsdamentes acél szivacson immobilizált *Trametes hirsutaval*, mikor az immobilizált gombát a mátrixszal együtt a reaktortérben lévő acélkosarakban helyezték el (Couto, 2009).

5.2.13. A hormonrendszert megzavaró kemikáliák („Endocrine disrupting chemicals”, „EDCs”)

A hormonrendszert megzavaró kémiai anyagok („EDCs”) olyan ember által létrehozott kemikáliák, vagy emberi hormonok, melyek a környezetbe jutva már kis mennyiségben megzavarják a fogadó ökoszisztémákban lévő élőlények hormonrendszerét (Cabana és munkatársai, 2007). A vegyületek lehetnek hormon agonisták vagy antagonisták, interferálhatnak az endogén hormonok szintézisével, szekréciójával, transzportjával, receptorokhoz való kötődésével, a hatásuknak a kialakulásával, illetve ezek eliminálásával. Ennek következtében zavarok támadnak az élőlény homeosztázisában, reprodukciójában, fejlődésében és integritásában. Különös jelentőséggel bírnak a vízi élőlények szexuális fejlődését és viselkedését megzavaró kémiai anyagok, pl. xenoösztrogének (Cabana és munkatársai, 2007).

5.2.14. EDCs koncentrációk és hatások a természetben

Cabana és munkatársai (2007) alapján a természetben leggyakrabban megjelenő EDCs és ezek hatásai a következők:

Bisfenol A: Polikarbonátok és epoxi műgyanták előállítására használják. A felszíni vizekben és a tengervízben a koncentrációja lokálisan elérheti a 21000 µg/l-t, a szedimentumokban pedig akár 191 ng/l koncentráció is mérhető. Tisztított szennyvízben a koncentrációja elérheti

a 2,2 µg/l-t, a szennyvíziszapban pedig a 2,89 µg/g-ot. Baktériumok képesek a lebontására. A biszfenol A ösztrogén, androgén és tiroid receptorokkal hathat kölcsön, morfológiai és ezek következményeként funkcionális változások lehetségesek a genitáliákon és az emlőmirigyeken.

Triklozán: Széles spektrumú antimikrobiális ágens, mely gyakran jelen van fogkrémekben, szappanokban, golyós dezodorokban és kézmosószerekben. A triklozán gyenge ösztrogén, androgén és tiroid hormon aktivitással bírhat. A tisztított szennyvízben a koncentrációja 4,1 µg/l, a szennyvíziszapban pedig akár 55 µg/g is lehet. Felszíni vizekben <0,2-től 431 ng/l-ig értékek lehetségesek.

Nonil-fenolok: A legkevésbé lebontható xenoösztrogének. Nem-ionos detergensok, kenőanyagok, emulziókat stabilizáló készítmények fontos alkotói. A tisztított szennyvízben 0,2-1000 µg/l, az iszapban pedig 500 µg/g koncentrációk lehetségesek, a felszíni vizekben pedig akár 6,86 µg/l koncentráció is mérhető.

Ftálsav-észterek: Szerves oldószerek (lágyítószer) a kémiai iparban, amelyek szteroid hormon funkciókkal interferálnak. Koncentrációik a tisztított szennyvizekben 10 µg/l, az iszapban pedig 10 µg/g nagyságrendű lehet.

Természetes és szintetikus emberi ösztrogének: A tisztított szennyvizekben a mérhető koncentrációk ng/l koncentrációkban: ösztroin (E1): 1-147, 17β-ösztradiol (E2): 0,2-158, ösztriol (E3): 10-30 és 17α-etenil-ösztradiol (EE2): 10-78.

Az EDCs különféle, pl. vízi élőlényekre gyakorolt hatásairól alapos és részletes összefoglaló található Cabana és munkatársai (2007) összefoglaló munkájában.

5.2.15. A nonil-fenol probléma

A nonil-fenolok felhalmozódását és lebontását a környezetben részletesen tárgyalja Soares és munkatársai (2008) összefoglaló munkája. Eszerint a környezetben megfigyelhető leggyakoribb és legtoxikusabb hormonrendszeret megzavaró vegyületek a nonil-fenolok

(leggyakrabban a 4-nonil-fenol elágazó alifás oldalláncú izomereinek az elegyéről van szó; Kim és munkatársai, 2004; Soarres és munkatársai, 2008), amelyek a nonil-fenol-etoxilátok lebomlási termékei. Ezek az anyagok a felületaktív ipari, kereskedelmi és háztartási detergenssek, emulziót stabilizáló ágensek, továbbá nedvesítő, síkosító, diszpergáló, szolubilizáló és antisztatikus ágensek szintézisekor kerültek nagy mennyiségben előállításra. A 90-es években az USA 154200, az EU 75300, Japán 16500, Kína 16000 t-t állított elő ezekből évente! Az évek múlásával a nonil-fenol-etoxilátokkal kapcsolatos aggasztó jelek szaporodtak, hiszen a szakemberek megállapították, hogy a szennyvíztisztítókból igen hosszú féléletidejű nonil-fenol származékok alakulnak ki, amelyek a hormonrendszert súlyosan károsítják, mivel a 17β -ösztadiol receptorokhoz kötődnek.

Bár a nonil-fenolok szerkezete igen sokféle lehet (Kim és munkatársai, 2004; Soarres és munkatársai, 2008), különösen a *para*-helyzetű hidroxil és elágazó alifás oldalláncot tartalmazó izomerek, pl. 4-(1,1,4-trimetil-hexil)-fenol, ösztogén aktivitása jelentős (Kim és munkatársai, 2004). Az egyszerűség kedvéért a fejezet további részében „nonil-fenol” alatt a nonil-fenol változatos szerkezetű izomereinek a komplex elegyét (Kim és munkatársai, 2004; Soarres és munkatársai, 2008) értem.

A nonil-fenolnak az ösztrogén aktivitásával összefüggő toxicitása látványos, hiszen vízi élőlényeken, pl. halakon feminizációt, emberi szövettenyészeteken pedig tumorokat, pl. mellrákot stimuláló hatásokat figyeltek meg. További kísérletekben megállapították, hogy a nonil-fenol megváltoztatja a mitokondrium membrán permeabilitását, gátolja a Ca^{2+} -ionok szarkoplazmatikus retikulumba való beáramlását nyugvó izmokban, inhibálja a neuron összejtek differenciálódását miközben az apoptózisukat indukálja, továbbá megzavarja a sejtciklust és kromoszóma aberrációkat is kivált (Soares és munkatársai, 2008).

Ami a nonil-fenol-etoxilátok lebomlását illeti, laboratóriumi („bench-scale”) biodegradációs kísérletekben aerob körülmények között csak részleges lebomlást észleltek, és a képződő termékek stabilabbak voltak, mint az eredeti vegyületek (Soares és munkatársai, 2008). Érdekes módon, bár nonil-fenol nem képződött ezekben az aerob laboratóriumi szimulációkban, ugyanakkor nagy mennyiségben megfigyelhető aerob élőhelyeken. Anaerob körülmények között a lebomlás lassúbb, ellenben a nonil-fenol a nonil-fenol-etoxilátok fő

lebomlási terméke, ami nem alakul tovább, hanem az üledékek szilárd szemcséihez tapad. Nem meglepő módon, a nonil-fenol várható félléletideje a szedimentumokban kb. 60 év. Megfigyelések szerint a nonil-fenol-etoxilát biodegradációját a környezetben segíti a magasabb hőmérséklet, pl. 25 °C vs. 7 °C (Manzano és munkatársai, 1999).

Érdeemes megemlíteni, hogy a szennyvíztisztító művekben sok nonil-fenol képződhet, pl. egy átlagos üzemben a belépő etoxilát 60-65 %-a került ki a környezetbe 19 % nonil-fenol-karboxilát, 11 % rövidláncú nonil-fenol-etoxilát, 25 % nonil-fenol és 8 % etoxilát formában (Soares és munkatársai, 2008).

A mérések szerint a környezetben a következő nonil-fenol koncentrációk figyelhetők meg: felszíni vizek (0,7 ng/l-15 µg/l, folyókban), talaj (1,4-1,6 mg/kg, eleveniszap felhasználás esetén a mezőgazdaságban; eleveniszap nélkül 0,01-0,98 µg/l), talajvíz (0,1-0,8 mg/l), levegő (2,2-70 ng/m³), esővíz (0,099-0,534 µg/l), ivóvíz (15-85 ng/l) (Soares és munkatársai, 2008). A mérhető koncentráció emberi tevékenység és évszak (hőmérséklet) függő, ugyanis a nonil-fenol „szemi-illékony”. Sajnos jelentős a nonil-fenol bioakkumulációja is a táplálékláncban. Például élelmiszerekben 0,1-19,4 µg/kg értékek mérhetők, a becsült emberi fogyasztás pedig kb. 7,5 µg/nap. A nonil-fenol félléletideje az emberi vérérszékben 2-3 óra.

Hogy a természetben megfigyelt nonil-fenol koncentrációk mekkora veszélyt hordozhatnak? A nonil-fenol hatása következtében a halakban feminizáció, illetve a hím nemi jelleg elsorvadása volt megfigyelhető a 0,1-20,3 mg/l koncentráció-tartományban fajtól függően (Soares és munkatársai, 2008). Halak esetén embriótotoxicitást is észleltek már 8,2-17,7 µg/l koncentráció-tartományban. A megfigyelések szerint biológiai hatások (az emlőmirigy sejteji proliferációjának a fokozódása) már 0,01 mg/nap expozíciótól kezdve várhatók (Soares és munkatársai, 2008).

Ami magának a nonil-fenolnak a biológiai lebonthatóságát illeti, aerob körülmények között ez jelentős lehet az alkalmazott technológiai eljárástól függően. O₂ távollétében a szulfátredukáló körülmények a legkedvezőbbek és a nitrát redukáló körülmények a legkevésbé hatékonyak. A lebomlást segítik pl. a szennyvíztisztítóknál a magas hőmérséklet, az anoxigenikus zónák kialakítása, továbbá az aktív szén, UV és ózonos kezelések. Ivóvíz esetében ózonozás majd

aktívszenes szűrés klórozással a nonil-fenolt 95 %-ban eltávolítja (Soares és munkatársai, 2008).

5.2.16. A nonil-fenolok mikrobiális lebontása

A nonil-fenolok biológiai lebontásának konkrét lépéseiről szinte semmilyen biztos információ sincs, de a lebomlási termékeket detektálhatjuk, pl. anaerob és aerob szennyvíztisztítási lépésekben (Corvini és munkatársai, 2006). A kutatások szerint a baktériumok közül a *Sphingomonas* fajok képesek a nonil-fenol aromás gyűrű lebontására (70 %-os mineralizáció) és részbeni beépítésére a biomasszába (15 %). Ezek a baktériumok a nonil-fenolt kizárólagos szénforrásként is tudják hasznosítani. A nonil-fenol bakteriális lebontáskor a képződő 3,5-dimetil-3-heptanol ráadásul illékony vegyület és kipárolog a rendszerből.

Ami a fehér korhasztó gombákat illeti, nem tudni, hogy az exooxidázaik támadása után teljes mineralizáció következik-e be (CO₂ felszabadulás), vagy biotranszformációs folyamatokban szerves vegyületek halmozódnak-e fel. A fenolos szerkezet felbomlása (pl. lakkázok általi támadását követően) valószínűsíthető (Corvini és munkatársai, 2006).

5.2.17. Xenoösztrogének lebontása fehér korhasztókkal

Az ösztrogének és xenoösztrogének lebontását számos fehér korhasztó gomba jó határfokkal képes végrehajtani (Cajthaml és munkatársai, 2009). A jó xenoösztrogén lebontók közé tartoznak: *Bjerkandera adusta*, *Dichomitus squalens*, *Irpex lacteus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete magnoliae*, *Pleurotus ostreatus* és *Trametes versicolor*. Ami a nonil-fenol készítményeket (technikai nonil-fenol elegy, 4-*n*-nonil-fenol) illeti, az *Irpex lacteus* és a *Pleurotus ostreatus* már 3 nap alatt teljesen lebontotta ezeket a xenoösztrogéneket statikus folyékony kultúrában (a nonil-fenol koncentráció 3 mg/l volt), de 14 nap alatt mindegyik tesztelt gombafaj 100 %-ban lebontotta ezeket a készítményeket. Az *Irpex lacteus* és a *Pleurotus ostreatus* kiváló és gyors lebontást mutatott más „ECDs” esetén is, pl. biszfenol és 17 α -etinil-esztradiol (fogamzásgátlók hatóanyaga) (Cajthaml és munkatársai, 2009). Hatékony és gyors triklózán lebontó aktivitással bírtak a *Dichomitus*

squalens, *Irpex lacteus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phanerochaete magnoliae* és *Trametes versicolor* (Cajthaml és munkatársai, 2009). Egy másik tanulmányban Castellana és Loffredo (2014) igazolták a *Trametes versicolor* és *Stereum hirsutum* gombák hatékonyságát a szeméttlerakók szennyvizei ECDs tartamának a degradációjában.

5.2.18. A DDT lebontása gombákkal

Az inszekticid hatású DDT-t a második világháború idején kezdték alkalmazni a malária és tifusz megbetegedések megakadályozása céljából. Bár mára a világ legtöbb országában betiltották a használatát, de egyes harmadik világbeli országokban máig alkalmazzák a malária szúnyogok ellen, illetve a talajban és az üledékekben lévő DDT lassú lebomlása miatt még a többi, DDT-t ma már nem használó országban is egészségügyi problémákat okozhat (Johnson és munkatársai, 1988; Eskenazi és munkatársai, 2009; Purnomo és munkatársai, 2011). A DDT negatív élettani hatásai emberen függenek a dózistól és az expozíciós időktől. Direkt expozíció már kis dózisok esetében is fejfájást, hasmenést, hányást, zavarodottságot és remegést vált ki, míg hosszú távú akkumuláció a szervezetben idegrendszeri problémákat, tumorképzést, pl. hasnyálmirigy rákot, okoz (Purnomo és munkatársai, 2011).

A DDT környezetből való eltávolítása lehetséges fizikai-kémiai és biológiai módszerekkel. Az utóbbiak közül a legfontosabbak a baktériumokkal, továbbá barna korhasztó gombákkal, ilyenek pl. a *Gloeophyllum trabeum*, *Fomitopsis pinicola* és a *Daedalea dickinsii* fajok, megvalósított biodegradáció; ezek a DDT szerkezetét vasfüggő Fenton reakciókkal, hidroxil-szabadgyökökkel támadják. Említést érdemelnek még azok a biotechnológiai folyamatok, melyekben a DDT lebontása szarvasmarha trágya komposzttal, illetve az ebben található *Mucor* és *Galactomyces* fajokkal, továbbá a gombatermesztés kimerített tápközegével, ami jelentős oxidáz aktivitással bír, pl. *Pleurotus ostreatus* termesztése után, történik (Purnomo és munkatársai, 2011).

5.2.19. Gyógyszeripari és testápolási termékek („PPCPs”) lebontása fehér korhasztókkal

A környezetben, pl. tisztított szennyvizekben ng/l – µg/l koncentrációkban vannak jelen gyógyszeripari és testápolási termékek („pharmaceutical and personal care products”,

(„PPCPs”) hatóanyagai (Rodarte-Morales és munkatársai, 2011). Bár ezen anyagok esetén az adott koncentrációknál akut toxicitás kevéssé valószínű, ugyanakkor krónikus hatások valószínűsíthetők. Ezek az anyagok általában jól eltávolíthatók ózonnal, aktív szénnel, membránszűréssel, de ezek az eljárások igen drágák. A probléma jelentőségét az adja, hogy a vizsgálatok szerint bizonyos PPCPs származékok ellenállóak mindenféle biológiai lebontással szemben!

A kutatók már számos tanulmányban megvizsgálták a PPCP hatóanyagok fehér korhasztó gombák általi lebonthatóságát és igen változatos lebontási spektrumokat figyeltek meg az egyes vegyületcsoportok és gombafajok esetében. Rodarte-Morales és munkatársai (2011) például megállapították, hogy a fluoxetin antidepresszáns és a diazepam szorongásgátló teljesen ellenálltak a *Bjerkandera adusta* és *Phanerochaete chrysosporium* lebontó aktivitásainak, miközben a gombák számos egyéb hatóanyagot, pl. antibiotikumokat, gyulladásgátlókat, anti-epileptikum vegyületeket továbbá illatanyagokat hatékonyan lebontottak.

Mint azt az 5.2.8. fejezetben már tárgyaltuk, a xenobiotikumok lebontása nagymértékben függ attól, hogy a molekulák oxidálhatóságát milyen mértékben befolyásolják elektronszívó és elektrondonor csoportok (Yang és munkatársai, 2013). Említést érdemel, hogy Marco-Urrea és munkatársai (2010) kiváló gyógyszer-hatóanyag lebontási eredményeket értek el *Trametes versicolor* alkalmazásával, mikor 2,6-dimetoxi-1,4-benzokinon és Fe^{3+} -oxalát adagolásával olyan redox körfolyamatokat indukáltak, melyben az intracelluláris kinon reduktáz valamint az extracelluláris ligninolítikus enzimek részvételével továbbá Fenton-szerű reakciók eredményeképpen hidroxil-gyökök is ($\cdot\text{OH}$) képződhettek. Az így kialakuló nagy erejű oxidálószerke képesek voltak még az olyan nehezen lebontható szerves molekulák, mint a karbamazepin (Yang és munkatársai, 2013), hatékony támadására is (Marco-Urrea és munkatársai, 2010).

Az 5.2.7. fejezetben már jeleztem, hogy a tisztított szennyvizekben megfigyelhető PPCP hatóanyagok lebontása lehetséges lakkázok alkalmazásával is. Jelenleg kiterjedt kutatások folynak a lakkázok immobilizálásával (kovalens rögzítés szilárd hordozón, mikrokapszulázás,

fehérje keresztkötés), a transzformációs folyamatok optimalizálásával és a tisztítási folyamatok megfelelő technikai kivitelezésével kapcsolatban (Gasser és munkatársai, 2014)

5.2.20. A fehér korhasztók legperspektivikusabb környezet-biotechnológiai felhasználásai

A fehér korhasztó gombák tehát számos organikus környezeti szennyezőt le tudnak bontani, és ennek alapja a jelentős peroxidáz és lakkáz aktivitásuk (Gao és munkatársai, 2010). Technológiai szempontból kiemelkedően fontos, hogy elméletileg a gombák szilárd, folyékony és gázfázisban egyaránt felhasználhatók.

A fehér korhasztó gombákkal kapcsolatos rendkívül szerteágazó kutatások összefoglalása és értékelése igen nehéz feladat, de következő területeken valósultak meg, illetve várhatók piacképes technológiák kidolgozása ezen gombák felhasználásával (Gao és munkatársai, 2010):

Szennyvíztisztítás: szintetikus festékek és TNT lebontása, papírgyári szennyvizek továbbá cukorgyári és bioetanol gyári szennyvizek tisztítása.

Szennyezett talaj bioremediáció: policiklikus aromás szénhidrogének („PAHs”) lebontása pl. szennyezett talaj+szalma+gomba kevert rendszerekben.

TNT: a lebontás folyékony tápközegben legvalószínűbben *Phanerochaete* és *Phlebia* fajokkal valósítható meg.

Poliklórozott benzol származékok („PCBs”): *Phanerochaete*, *Lentinus* és *Trametes* fajokkal hajtható végre talaj extraktumokból (Gao és munkatársai, 2010).

Előrevivő lehet a jövőben az a megfigyelés is, hogy a fákon élő, lignolitikus aktivitású bazídiumos gombák egy része, pl. egyes *Phanerochaete*, *Pleurotus* és *Trametes* fajok, megfelelő szubsztrátumok jelenlétében képesek a talaj kolonizációjára is, ahol enzimeik révén részt vehetnek a szennyezők lebontásában (Baldrian, 2008). Sajnos a szennyezők sokfélesége

gyakorlatilag minden esetben egyedi gombakiválasztást és technológia-fejlesztést tenne szükségessé, ami az eljárás költségeit nagyon megnövelné (Baldrian, 2008). Ezért ma a környezeti biotechnológiában a talajok esetében előnyben részesítik a természetes lebomlási folyamatokat, illetve a bioaugmentációs technológiákat, ahol a mikroorganizmusok aktivitását megfelelő tápanyagok talajba juttatásával fokozzák (Baldrian, 2008; Mancera-López és munkatársai, 2008).

Másik érdekes lehetőség a gomba lakkázok talajba juttatása, pl. policiklikus aromás szénhidrogének („PAHs”) lebontása érdekében (Wu és munkatársai, 2008). Ezen a területen is további kutatások szükségesek.

Ugyancsak lehetséges a jövőben a gombatermesztés kimerített tápközegén (lásd az 5.2.18. fejezetet) („spent mushroom compost”, „SMC”) alapuló bioremediációs technológiák további térhódítása (Magan és munkatársai, 2010).

Ami a felhasználásra kerülő fehér korhasztókat illeti, nagyon sok információ található a szakirodalomban a *Phanerochaete chrysosporium*, a *Pleurotus ostreatus* és a *Trametes versicolor* ligninbontásával és technológiai alkalmazhatóságával kapcsolatban. Ugyanakkor tovább folyik a kutatás új, hatékony ligninbontó gombák után, melyek jó hatásfokkal képesek a környezetszennyezők széles skálájának a lebontására különféle technológiai folyamatokban. Egy lehetséges jövőbeni sikertörténet lehet az *Irpex lacteus* (Basidiomycota, Basidiomycetes, Agaricomycetidae, Polypolares, Steccherinaceae) felhasználása szennyvíztisztítási és talajremediációs eljárásokban (Novotný és munkatársai, 2009). Ez a gombafaj ugyanis a szerves környezeti szennyezők széles spektrumát tudja lebontani, nagyszámú hidrolázt és ligninolitikus enzimet termel, mind statikus, mind rázott folyadék kultúrákban alkalmazható, továbbá jól immobilizálható (Novotný és munkatársai, 2009). Mint azt az 5.2.17. fejezetben már láttuk, az *Irpex lacteus* kiválóan alkalmas xenoösztrogén biodegradációjára is (Cajthaml és munkatársai, 2009).

5.2.21. Irodalomjegyzék az 5.2. fejezethez

Ali H. (2010) Biodegradation of synthetic dyes – a review. *Water Air Soil Pollut.* **213**, 251-273.

- Arora D.S. és Sharma R.K. (2010) Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1760-1788.
- Asgher M. és munkatársai (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* **19**, 771-783.
- Baldrian P. (2008) Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecol.* **1**, 4-12.
- Cabana H., Jones J.P. és Agathos S.N. (2007) Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a review. *Eng. Life Sci.* **7**, 429-456.
- Cajthaml T. és munkatársai (2009) Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* **75**, 745-750.
- Castellana G. és Loffredo E. (2014) Simultaneous removal of endocrine disruptors from a wastewater using white rot fungi and various adsorbents. *Water Air Soil Pollut* **225**, cikkazonosító: 1872
- Chacko J.T. és Subramaniam K. (2011) Enzymatic degradation of azo dyes – a review. *Int. J. Environ. Sci.* **1**, 1250-1259. <http://www.ipublishing.co.in/jesvol1no12010/EIJES2075.pdf>
- Corvini P.F.X., Schäffer A. és Schlosser D. (2006) Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols – our evolving view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 223-243.
- Couto S.R. (2009) Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol. Adv.* **27**, 227-235.
- Desai S.S. és Nityanand C. (2011) Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J. Biotechnol.* **3**, 98-124.
- Eskenazi B. és munkatársai (2009) The Pine River statement: human health consequences of DDT use. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1359-1367.
- Gao D. és munkatársai (2010) A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 70-77.
- Gasser C.A. és munkatársai (2014) Laccases to take on the challenge of emerging organic contaminants in wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 9931-9952.
- Harms H., Schlosser D. és Wick L.Y. (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 177-192.
- Johnson A, Norton D. és Yake B. (1988) Persistence of DDT in the Yakima River drainage, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**, 289-297.
- Kaushik P. és Malik A. (2009) Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environ. Internat.* **35**, 127-141.
- Kim Y.S. és munkatársai (2004) Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* **54**, 1127-1134.
- Kunamneni A. és munkatársai (2008) Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb. Cell Fact.* **7**, cikkazonosító: 32

Leonowicz A. és munkatársai (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* **41**, 185-227.

Maciel M.J.M., e Silva A.C. és Ribeiro H.C.T. (2010) Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electr. J. Biotechnol.* **13**, cikkazonosító: 6

Magan N., Fragoeiro S. és Bastas C. (2010) Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi. *Mycobology* **38**, 238-248.

Mancera-López M.E. és munkatársai (2008) Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* **61**, 151-160.

Manzano M.A. és munkatársai (1999) The effect of temperature on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Water Res.* **33**, 2593–2600.

Marco-Urrea E. és munkatársai (2010) Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res.* **44**, 521-532.

Novotný Č. és munkatársai (2009) *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential – review. *Folia Microbiol.* **54**, 375-390.

Purnomo A.S. és munkatársai (2011) Basic studies and applications on bioremediation of DDT: a review. *Intern. Biodeter. Biodegr.* **65**, 921-930.

Rodarte-Morales A.I. és munkatársai (2011) Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1839-1846.

Soares A. és munkatársai (2008) Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Internatl.* **34**, 1033-1049.

Srinivasan A. és Viraraghavan T. (2010) Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *J. Environ. Management* **91**, 1915-1929.

Syed K. és Yadav J.S. (2012) P450monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Crit. Rev. Microbiol.* **38**, 339-363.

Wu Y. és munkatársai (2008) Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 789-796.

Yang S. és munkatársai (2013) Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review. *Bioresour. Technol.* **141**, 97-108.

5.3. Gombák a nehézfém-szennyezők mentesítésében

5.3.1. Növényekkel társult mikrobák a nehézfém szennyezések fitoremediációval történő kezelésében

Napjainkban a fitoremediációs technológiák kiaknázzák a növényekkel kapcsolatban lévő mikroorganizmusok diverzitását is, és ezen új technológiák piacra kerülésének lehetünk a szemtanúi (Rajkumar és munkatársai, 2012). A rhizoszférában számos olyan biogeokémiai folyamat zajlik, melyekben igen jelentős szerepet játszanak az ott lévő mikroorganizmusok, melyek pl. növényi hormonokat, sziderofórokat, szerves savakat termelnek. A mikrobák hatása sokrétű, megkönnyítik a növények számára bizonyos tápanyagokhoz való hozzáférést, stimulálják a növények növekedését, részt vesznek a nehézfémek detoxifikálásában, továbbá enyhítik a növényekre ható abiotikus és biotikus stresszhatásokat (Rajkumar és munkatársai, 2012; lásd a 3.3.1., 3.3.2., 3.3.3., 3.3.20. és az 5.2.2. fejezeteket is).

A növényekkel társult mikrobák befolyásolják a nehézfém-felvételt számos biogeokémiai folyamat modulálásán keresztül, ilyenek pl. nehézfém ionok transzlokációja, transzformációja, kelációja, immobilizációja, szolubilizációja, precipitációja, volatilizációja és komplexálása (Rajkumar és munkatársai, 2012). A mikrobák szerves savakat, kelátképző (kelátoló) és fémredukáló ágenseket szekretálnak, így direkt módon elősegíthetik a nehézfémek bioakkumulálódását a növényi szövetekben. Ezen túlmenően a mikrobák stimulálhatják a növényi biomassza gyarapodását is (3.3.1., 3.3.3. és 3.3.20. fejezetek).

A gombák szerepének a tárgyalása előtt a fitoremediációs technológiákban először néhány fogalmat szeretnék definiálni Rajkumar és munkatársai (2012) összefoglaló közleménye alapján:

Fitoremediáció: Növényeken alapuló dekontaminációs, illetve detoxifikációs technológiák.

Fitoextrakció: Nehézfém-eltávolító technológiák, melyek fémakkumuláló (hiperakkumuláló) növényeken alapulnak. A fémek a növények kitermelhető részeiben koncentrálnak.

Fitostabilizáció: A nehézfémek kioldódásának a gátlása a növényi gyökerek és társult mikrobák által.

A növényeket felhasználó bioremediációs technológiák sikere szempontjából kulcsfontosságú a rhizoszféra megfelelő rekonstrukciója. Ennek keretében szükség van a rhizoszféra fizikai szerkezetének és a hidraulikus funkcióinak helyreállítására, valamint a talaj mikrobaközösségek regenerálására is, hiszen ezek a tényezők alapvetően fontosak a rhizoszféra hidrogeokémiai környezetének a stabilizálása szempontjából (Huang és munkatársai, 2012).

A jövő bioremediációs technológiák fejlesztése szempontjából alapvető fontosságú a nehézfémekkel szennyezett (akár geogén akár antropogén eredetű szennyezőkről is legyen szó) környezetben élő mikroorganizmusok tulajdonságainak a mélyebb megértése. Ezek az ismeretek elvezethetnek minket egyrészt a környezetszennyezéshez vezető biogeokémiai folyamatok alaposabb megismeréséhez (pl. lásd a szivárgó bányavizek által okozott súlyos környezetszennyezéseket!), és ezzel együtt, a nehézfém bioremediációs technológiai eljárások hatékonyságának a növeléséhez (Haferburg és Kothe, 2007).

Például, napjaink egyik érdekes technológiai fejleménye a rézfelhasználás dinamikus növekedése az élelmiszeriparban, a vízellátó rendszerekben, a légszűrőkben és az egészségügyben, hiszen a különféle rézötvözetek kiváló antimikrobiális hatást mutatnak antibiotikumokkal szemben rezisztens kórokozók ellen is (Elguindi és munkatársai, 2011). A növekvő rézigény egyszerre követeli meg a mikrobiális rézbányászat korszerűsítését (genetikailag módosított, fokozottan termotoleráns és réztoleráns baktériumok alkalmazása révén), valamint réztoleráns mikroorganizmusok, mindenekelőtt rhizobaktériumok felhasználását a rézzel szennyezett környezet (pl. bányaterületek, meddőhányók) növényekkel történő biostabilizációjában, fitoremediációjában és fitoextrakciójában (Elguindi és munkatársai, 2011).

5.3.2. Növényekkel társult mikrobák elősegítik a nehézfémek mobilizációját és immobilizációját

A rhizoszféra mikroorganizmusai nagymértékben hozzájárulhatnak mind a nehézfémek szolubilizációjához mind azok immobilizációjához (Rajkumar és munkatársai, 2012). Attól

függően, hogy adott körülmények között melyik előnyös, fejlesztenek a kutatók fitoextrakciós vagy fitostabilizációs technológiát. A mikrobák a növények fémion-felvételét a fémionokat mobilizáló kelátképző ágensek termelésével fokozhatják, ugyanakkor jelentősen csökkenthetik is a növények fémfelvételét vagy transzlokációját (gyökérszövet→hajtások) a fémionokat immobilizáló ágensek termelésével, valamint a fémionok redukciójával és bioszorpciójával. Definíció szerint a bioszorpció a fémeknek mikrobák általi adszorpciója akár szerves, akár szervetlen formában, továbbá akár passzív, akár a metabolizmustól függő, aktív módon (Rajkumar és munkatársai, 2012).

A rhizoszféra növény-mikróba interakciói közül kiemelkednek a mikorrhiza növény-gomba szimbiózisok. A mikorrhiza gombák szűrőként is funkcionálnak, hiszen meggátolják a fémek transzlokációját a gyökerektől a hajtásokba. Mivel a mikorrhizáló gombák felszíne igen nagy, ez önmagában is jelentős fémmegkötést eredményez (Rajkumar és munkatársai, 2012).

5.3.3. Növényekkel társult mikrobák elősegítik a növények növekedését

A növényekkel asszociált mikroorganizmusok többféleképpen elősegítik a növények növekedését (Rajkumar és munkatársai, 2012). Például, (i) a mikroorganizmusok javítják a növények tápanyag- és vízfelvételét, (ii) mikrobiális metabolitok csökkentik a fémszennyezők toxicitását fémbioszorpció, fémredukció és komplexképzés révén, (iii) növelik a növények oxidatív stressz elleni védelmét, (iv) stimulálják a növény amino-ciklopropán-1-karboxilát dezamináz aktivitását, így gátolják az etilén hormon szintézisét, továbbá (v) stimulálják a növény növekedését szabályozó vegyületek, pl. indol-3-ecetsav, azaz auxin, termelésével.

5.3.4. Nehézfém hiperakkumulátor növények

A nehézfémeket nagymértékben felvenni és akkumulálni képes növények nagy technológiai jelentőséggel bírnak (Memon és Schröder, 2009; Miransari, 2011).

Kevés növény képes a nehézfémek jelentős felvételére (Miransari, 2011). A zárva termők kb. 0,2 %-a képes erre, ami 450 faj, és ezek 75 %-a Ni(II) hiperakkumulátor. Különösen

kiemelkednek a keresztesvirágúak rendjébe tartozó *Thlaspi* (tarsóka) fajok, ezen belül például a *Thlaspi caerulescens* (havasi tarsóka) faj. A legjobb akkumuláló fajok 30 g/kg Zn(II) és 1 g/kg Cd(II) megkötésére képesek. Csak összehasonlításképpen, a Zn(II) toxikus koncentráció növényekre 0,3-0,5 g/kg, míg a Cd(II)-re nézve ez az érték 1 mg/kg! A hiperakkumuláló növények kivételes abszorpcióját lehetővé tevő élettani tulajdonságok: (i) hatékony fémkomplexálási képesség szerves savakkal, ciszteinnel, glutationnal, nikotinammal és hisztidinnel, (ii) effektív fémfelvevő transzport rendszerek, (iii) fémkompartmentalizációs potenciál, és (iv) fémtárolás vakuólumokban, pl. levél epidermisz sejtekben. Általában a hiperakkumuláló növények nem képesek jelentős biomassza-produkcióra, ami a technológiai folyamatok szempontjából hátrányt jelenthet.

A hiperakkumulátor növények fémtoleranciáját növelő intracelluláris molekulák a metallothioneinek, fitokelatinok, glutation és az antioxidáns rendszerek. A hiperakkumulátorok nehézfém-tűrése tovább javítható megfelelő mikorrhizálással.

5.3.5. Transzgénikus növények, mint a jövő bioremediátorai

A jövőben elvileg lehetséges genetikailag módosított növények felhasználása a fitoremediációs technológiai fejlesztésekben, amivel kapcsolatban már sok kísérleti adat és megfigyelés került közlésre (Kotrba és munkatársai, 2009; Pócsi, 2011). A géntechnológiai („génmérnöki”) munka jelenlegi leggyakoribb célpontjai („targetjei”) a következők: (i) a fitoextrakciós képesség javítására metallothioneinek, fitokelatinok, továbbá a glutation szintézisének a fokozása révén, amit bakteriális, gomba, növényi és állati (emberi) gének termékeinek a túltermeltetésével érnek el, (ii) a cisztein és szelenocisztein bioszintetikus útvonalak genetikai modulálása, és (iii) különféle fémion transzporterek overexpressziója.

Példák már létrehozott nehézfém-akkumuláló és -toleráló transzgénikus növényekre:

Az egyik kedvelt módszer a gomba nehézfém ion transzporterek heterológ expressziója növényekben, pl. a *Saccharomyces cerevisiae* Ycf1p vakuoláris glutation S-konjugátum transzporter termeltetése *Arabidopsis thaliana*-ban jelentősen megnövelte annak Pb(II) és Cd(II) toleranciáját.

A GSH szintézis fokozása molekuláris genetikai eszközökkel szintén javíthatja a növények nehézfém- és félfém-toleranciáját. Például, amikor az élesztő *GSH1* γ -glutamil-ciszteinszintetázát és fokhagyma *AsPCSI* fitokelatin szintetázát expresszáltak akár külön, akár együtt *Arabidopsis thaliana*-ban, a transzgenikus növény remekül tolerálta a Cd-ot és As-t. Továbbá az a transzgenikus dohány (*Nicotiana tabacum* cv. LA Burley 21), amelybe *E. coli* szerin acetiltranszferáz (Cys bioszintézis enzime), *E. coli* γ -glutamil-ciszteinszintetázát (a glutation bioszintézis első enzime) és *S. pombe* fitokelatin szintáz géneket vittek be, jelentősen több nem-protein tiolt termelt és szignifikánsan több Cd(II)-ot akkumulált a gyökerekben (de nem a hajtásokban!).

Magyar kutatók (Bittsánszky és munkatársai, 2005) igazolták, hogy a bakteriális (*E. coli*) γ -glutamil-ciszteinszintetáz túltermelő transzgenikus nyárfák a vadtypushoz mérten jobban alkalmasak nagy Zn(II)-tartamú szennyezett talajok fitoremediációjára.

5.3.6. Fitovolatizáció

A fitovolatizáció egy nehézfém vagy félfém felvételét és illékony anyaggá való átalakítását jelenti növényi szervezetben (Kotrba és munkatársai, 2009). A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy reális lehetőség van higany és szelén fitovolatizációjára. A higany esetében bakteriális Hg(II) reduktáz és organomercuri liáz gének beültetése szükséges. Eddig a következő növények genetikai módosítása történt meg: *Nicotina tabacum* (dohány), *Arabidopsis thaliana* (lúdfű), a halofita *Spartina alterniflora* és a *Liliodendron tulipifera* (amerikai tulipánfa). A szelén volatizációja érdekében pedig szelenocisztein-metiltranszferáz (*Astragalus bisukatus*, csüdfű-féle) és cisztationin- γ -szintetáz (*Arabidopsis thaliana*, lúdfű) túltermelése szükséges például *Brassica juncea* (barna mustár vagy szareptamustár) növényben. Ekkor a szelén illékony dimetil-diszelenid formában szabadul fel.

5.3.7. Nehézfém-mentesítés gombákkal

A nehézfém-mentesítő technológiák kifejlesztését többféleképpen elősegítheti a nehézfém/félfém toleráns gombák kifejlesztése molekuláris genetikai eszközökkel (Pócsi, 2011).

A lehetséges megoldások között szerepel (i) az extracelluláris kelátképző vegyületek szekréciónak a fokozása, (ii) a nehézfémek/félfémek felvételét lehetővé tevő transzporterek eliminálása, (iii) olyan transzporterek túltermeltetése, melyek a nehézfémeket/félfémeket, illetve ezek komplexeit vagy kipumpálják a sejtekből, vagy sejtorganellumokba, pl. a vakuólumokba juttatják ezeket, (iv) intracelluláris fémkeláló molekulák túltermeltetése, (v) a nehézfém/félfém stressz elleni védekező rendszer genetikai átalakítása, valamint (vi) a nehézfémek/félfémek által kiváltott apoptotikus sejtpusztulás gátlása.

A géntechnológiai munka nem lehet hatékony a gombák nehézfémekkel szembeni stresszválaszának, illetve védelmi rendszerének a részletekbe menő megismerése nélkül. A védelmi rendszer három vonalból áll, amelyek (i) extracelluláris fémkomplexálás, illetve a nehézfémek/félfémek sejtfal általi kötése, (ii) transzport, sejten belüli komplexálás és kompartmentalizáció valamint (iii) az antioxidatív védelmi rendszer elemei (Pócsi, 2011).

A első védelmi vonal: Extracelluláris fémkomplexálás, illetve a nehézfémek/félfémek sejtfal általi kötése.

Nagyon fontos és hatékony a fémionok szekretált kis molekulatömegű metabolitokkal, illetve nyákanyagokkal történő megkötése. Erre jó példa a glutation szekréciónak (pl. As(III) megkötése élesztő esetén), az oxalát szekréciónak (pl. Cd(II) és Cu(II) megkötése fehér és barna korhasztók esetén), valamint nyákanyagok („extracellular mucilaginous materials” – „ECMM” vagy “emulsifier”) termelése számos gomba által (pl. Pb(II), Cu(II) és Zn(II) megkötése *Curvularia lunata*val). A sejtfal alkotók jelentős része, pl. glomalinnak („soil glycoprotein”), kitin, melanin, kiválóan köti a fémeket és félfémeket (pl. a Cu(II) megkötése *Glomus* és *Gigaspora* fajokkal).

A második védelmi vonal: Transzport, sejten belüli komplexálás és kompartmentalizáció.

Ezekben a kísérletekben *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt használtak eddig leggyakrabban, mint modell organizmust. Az eddigi megfigyelések a következő pontokba foglalhatjuk össze (Pócsi, 2011):

(a) Fém- és félfém-tolerancia elérése transzporterek eliminálása révén, pl.

As(V): Pho84p nagyaffinitású és Pho87p kisaffinitású foszfát transzporterek,

As(III) és Sb(III): Fps1p akvagliceroporin csatorna,

Cd(II): Zrt1p Zn(II) továbbá Smf1p és Smf2p Mn(II) transzporterek,

Cr(VI) és Se(VI): Sul1p és Sul2p szulfát transzporterek.

Alternatív lehetőség, az esszenciális ionok, pl. Zn(II) adagolása nagy koncentrációban, ami kompetíció révén meggátolja a toxikus fémionok bejutását a sejtekbe.

(b) Nehézfémionokat, illetve ezek komplexeit és félfémeket pumpáló transzporterek túltermeltetése, pl.

As(III): Acr3p plazma membrán transzporter és, némileg paradox módon, Fps1p akvagliceroporin csatorna, amely valószínűleg részt vesz az As(III) és Sb(III) exportjában is,

Cd(II) és Cu(II): Pca1p plazma membrán P-típusú ATPáz,

Co(II), Rh(II) és Zn(II): Cot1p vakuoláris Zn(II) transzporter,

Fe(II) és Mn(II): Ccc1p vakuoláris transzporter,

Se(IV): Ssu1p plazma membrán szulfit pumpa,

Zn(II) és Co(II): Zrc1p vakuólum membrán Zn(II) transzporter.

A Cd(II), As(III), Hg(II) és Pb(II) GSH komplexei az Ycf1p „ATP-binding cassette” („ABC”) családba tartozó vakuoláris GSH S-konjugátum transzporter révén lépnek be az élesztő vakuólumokba. Az *YCF1* gén erős indukcióját elérhetjük a Yap1p transzkripció faktor, amely a gomba oxidatív stresszválaszának a mesterregulátora, túltermeltetésével.

A Cd(II) fitokelatin komplexei az HMT1 ABC családba tartozó vakuoláris membrán transzporter segítségével jutnak a vakuólumokba a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő sejtekben, bár lehetséges, hogy itt lényegében egy vakuoláris GSH S-konjugátum transzporterről van szó.

Jó hír, hogy vakuoláris Zn(II) GintZnT1 és vakuoláris Cu(II)/Cd(II) GintABC1 transzportereket azonosítottak *Glomus intraradices* endomikorrhiza-képző gombában is! Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy az élesztő modellek tanulmányozásakor szerzett információ jelentős része hasznosítható a nagy gyakorlati jelentőséggel bíró fonalas gombák géntechnológiai átalakításának a tervezésekor is.

A 2. védelmi vonal elemeinek a genetikai manipulációja már eddig is igen értékes genetikailag módosított gombatorzseket és megfigyeléseket eredményezett (Pócsi, 2011). Példaként említhetjük a nehézfém toleráns transzgénikus gombák előállítását különféle mikrobiális gének bevitelével (Pócsi, 2011).

Kézenfekvő cél például a génmodosításokban a fitokelatin túlermelletése gombákban, illetve a bioszintézis útvonal bevitele olyan gombába, amely eredetileg nem képes fitokelatin előállítására (pl. *S. cerevisiae*, *Paxillus involutus*). Ezek a módosítások várhatóan megnövelik az organizmusok nehézfém és félfém toleranciáját. Az eddigi kísérletek szerint *S. pombe*, növényi, alga vagy nematóda eredetű fitokelatin szintáz gének bevitele valóban, jelentősen megnövelte az *S. cerevisiae* Cd(II), Cu(II), As(III) és Sb(III) toleranciáját!

A metallotioneinek olyan kis molekulatömegű fémkeláló fehérjék, melyek nagy affinitással kötnek Cu(II), Zn(II) és Cd(II) ionokat. Az *S. cerevisiae* által termelt Cup1p fehérje heterológ expressziója dohányban elősegítette a Cu(II) felvételét szennyezett talajból. Továbbá, a *P. involutus* PiMT1 metallotionein sikerrel komplementálta az *S. cerevisiae* metallotionein hiánymutáns Cu(II) és Cd(II) hiperszenzitivitását, sőt megnövelte a *Hebeloma cylindrosporum* ektomikorrhozaképző gomba Cu(II) toleranciáját!

A harmadik védelmi vonal: Az antioxidatív védelmi rendszer

A gombasejtek az antioxidánsok széles skáláját termelik, melyekkel sikeresen küzdenek le különféle eredetű oxidatív stresszeket (Pócsi, 2011). Alapjában véve GSH-függő és GSH-független rendszerek biztosítják a reaktív oxigén részecskék (ROS) igen hatékony lebontását. Tekintve, hogy számos nehézfém, illetve félfém generál oxidatív stresszt, így ezen védelmi rendszer erősítése várhatóan megnövekedett nehézfém/félfém toleranciát eredményezhet. Az

irodalmi adatok alapján azok az antioxidáns fehérjék, melyek túltermelése eredménnyel járhat: pl. Cu/Zn szuperoxid dizmutáz, GSH bioszintetikus enzimek, glutation reduktáz, továbbá génszintű regulátorok, pl. a pékélesztő Yap1p transzkripciós faktorának a funkcionális ortológjai.

Bár a 3. védelmi vonalat érintő genetikai módosításoknál a kapott eredmény gyakran jó összhangban van a várttal, de vigyázat!, paradox hatások bizony lehetségesek, pl. (i) a glutation reduktáz enzim gyorsítja a Cr(VI)→Cr(V) átalakulást, ami a sejtek jelentős károsodásához vezet Cr(VI) jelenlétébe, (ii) a mitokondriális flavohemoglobin 2 (az NO hatástalanításában játszik szerepet) túltermeltetése H₂O₂ hiperérzékenységhez vezetett *Aspergillus oryzae*ban, (iii) az antioxidánsok (aszcorbinsav, melatonin) túladagolása elősegítheti a fémek, félfémek sejten belüli redukcióját, azaz redox körfolyamatok indulhatnak be, és végül (iv) bizonyos transzkripciós faktorok és szignál transzdukciós útvonal elemek eliminálása vagy túltermeltetése jelentős kompenzációs (sőt túlkompenzációt eredményező) mechanizmusokat indíthat be. Pl. toxikus nehézfém/félfém expozíciónak kitett *S. cerevisiae*ben az Msn2p/Msn4p transzkripciós faktorok aktiválódnak, és az antioxidáns enzimek széles skálája indukálódik. Ennek ellenére az *MSN2* és *MSN4* eliminálása váratlanul As(III)-toleráns fenotípust eredményezett élesztőben!

5.3.8. „Omikai” eszközök alkalmazása a jövő nehézfém-toleráns gombáinak a géntechnológiai megalkotásában

Az „omikai” (genomikai, transzkriptomikai, deletomikai, proteomikai, metabolomikai és interaktomikai) eszközök egyre inkább teret nyernek a korszerű biológiai kutatásokban (bővebb információért lásd a 2. fejezetet és a YouTube web oldalon meghallgatható előadásomat; Pócsi, 2014). A robotszerű „omikai” eszközök révén már eddig is olyan fontos adatok birtokába jutottunk egyes gombák nehézfém stresszválaszának az elemeit és ezek szabályozását illetően, amely jelentős mértékben megkönnyítik majd a jövőben nehézfém-toleráns gombák géntechnológiai megalkotását (Pócsi, 2011). A legfontosabb „omikai” eredményeket ezen a területen Pócsi (2011) összefoglaló közleménye alapján mutatom be.

Érdeemes megemlíteni, hogy Jin és munkatársai (2008) összehasonlították a péklesztőben Ag(I), As(III), Cd(II), Cr(VI), Co(II), Hg(II) és Zn(II) expozíciókra bekövetkező transzkriptom változásokat és azt találták, hogy a nehézfémek kémiai tulajdonságai alapvetően hatással voltak globális transzkriptom változásokra. Így az elvégzett főkomponens és hierarchikus klaszter analízisek egymáshoz közel helyezték el az Ag(I)-Zn(II), Cd(II)-Hg(II) és As(III)-Cu(II) fémion párok által kiváltott expresszióváltozásokat, míg távolabb a Cr(VI) transzkriptomra gyakorolt hatásait. Ezek az információk különösen jelentősek akkor, mikor olyan gombatorzseket szeretnénk kifejleszteni, melyek többféle, egyidejű nehézfém stresszhatással szemben kell, hogy ellenállóak legyenek. A természetben ritkán szembesülünk egy adott nehézfém által okozott környezetszennyezésekkel, sokkal gyakrabban többféle nehézfém egyidejű jelenlétével és károsításával (lásd például a felszíni szivárgó bányavizeket).

Nagy jelentőséggel bír, hogy Jin és munkatársai (2008) kimutatták *Saccharomyces cerevisiae*-ben az általános nehézfém reszponzív („Common Metal Responsive”, „CMR”) gének létezését, melyek egyformán reagálnak a különféle nehézfém stresszhatásokra. A CMR gének létezése reményt ad arra, hogy a jövőben általános nehézfémstressz toleráns gombatorzseket tudunk majd megkonstruálni. Konkrétan sor kerülhet a CMR gének által kódolt, pozitív hatású poliamin és vasion transzporterek, ion hoemosztázis stabilizáló fehérjék valamint antioxidáns védelmi rendszer elemek túltermeltetésére, valamint a negatív hatású protein kináz alegységek, átmeneti fémion és szénhidrát transzporterek eliminálására (Jin és munkatársai (2008)). A jövő kutatásainak választ kell adniuk arra a fontos kérdésre is, hogy a péklesztő modell alkalmazásával nyert információk mennyire alkalmazhatók az evolúciósan távoli, jóval komplexebb és robusztusabb stresszválasz rendszerekkel jellemezhető fonalas gombákra (3.2.9-3.2.12. fejezetek; Miskei és munkatársai, 2009; Karányi és munkatársai, 2014; Emri és munkatársai, 2015). Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a transzkriptom vizsgálatokkal egy időben elvégzett deletom könyvtár (az adott gomba minden egyes, nem esszenciális génjének a deléciós mutánsait tartalmazó szisztematikusan kialakított törzsgyűjtemény) analízisek rámutattak arra, hogy a fémtolerancia és fémérzékenység gének inkább fémspecifikusak voltak. Ilyen módon a nehézfémstresszre reagáló (transzkriptom adatok), illetve annak kivédésében fontos szerepet játszó (deletom adatok) gének között igen kicsi, mindösszesen 22 génre kiterjedő átfedés volt (Jin és munkatársai, 2008). Ennek alapján

néhány nevezetes fémtolerancia gén a pékélesztőben: a *CYS3* cisztationin γ -liáz gén {As(III), Cd(II) és Cu(II) toleranciában fontos}, az *ADH1* alkohol dehidrogenáz gén {As(III) és Cu(II) tűrőképességben fontos} továbbá a *RNR1* ribonukleotid-difoszfát redukáz gén {fontos a Cd(II) és Cr(VI) toleranciában}.

Jin és munkatársai (2008) vizsgálataival közel egy időben Ruotolo és munkatársai (2008) deletom és interaktom vizsgálatok révén megállapították, hogy Cd(II) és Ni(II) expozíciók esetén az élesztősejtek nehézfém-tűrésében számos funkcionális alrendszer játszott egyidejűleg szerepet. Ilyenek voltak pl. a proteaszóma, a vakuólumok, v-ATPáz összeszerelődés és szabályozás, a sejtfalintegritás szignalizációs útvonal, ion homeosztázis elemek, az ERG útvonal, a magpórus komplex és a kromatin átalakítása („chromatin remodelling”) (Ruotolo és munkatársai, 2008). Számos „omikai” tanulmány rámutatott az élesztő kénmetabolizmusának és a glutation bioszintézisének a rendkívüli fontosságára az As(III) és, különösen, a Cd(II) stresszhatások kivédésében (Momose és Iwahashi, 2001; Vido és munkatársai, 2001; Haugen és munkatársai, 2004; Thorsen és munkatársai, 2007, 2009). A *Saccharomyces cerevisiae*ben a Cr(VI) kezelések által kiváltott kénéhezésre Pereira és munkatársai (2008), míg a *Hansenula polymorpha*ban (egy metilotróf élesztő) a Cu(II) és a V(V) kezelések által kiváltott oxidatív stresszválaszok közötti átfedésekre Mannazzu és munkatársai (2000) mutattak rá.

Pócsi (2011) összefoglaló munkájában további „omikai” kutatási eredmények találhatóak döntően a pékélesztő Al(III), As(III), Cd(II), Co(II), Cu(II), Fe(II), Ni(II), Se(III) és Zn(II) stresszválaszára vonatkozóan.

A többi gomba nehézfém-stresszválasz rendszerére és ezek szabályozására vonatkozóan a jelenleg elérhető információ meg sem közelíti a pékélesztő vizsgálatok felhalmozott adatokat. Mindamellet aránylag nagy számban található „omikai” adatok különféle, nagy jelentőségű gombafajok, pl. *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Blastocladiella emersoni* (Blastocladiomycota), *Ganoderma lucidum* (pecsétviaszgomba; Basidiomycota, Basidiomycetes, Polypolares) és *Cadophora finlandica* (Ascomycota) Cd(II) toleranciájára vonatkozóan (Pócsi, 2011). Érdeemes megemlíteni, hogy különféle gombafajok Cd(II)

stresszválasz-rendszerei között számos hasonlóságot találtak, de a fajspecifikus különbségek is jelentősek voltak (Pócsi, 2011).

Az ektomikorrhiza képző gombák közül a *Suillus luteus* (barna gyűrűstinóru) hősokkfehérjék, fémion-transzporterek, hidrofobinok és az ubiquitinfüggő proteolízis elemeinek a túltermelésével reagált Zn(II) expozíciókra (Muller és munkatársai, 2007). Ez a megfigyelés azért is érdekes, mert a *Suillus* fajokkal történő mikorrhizálást gyakran használják fel nehézfémekkel, pl. Cd(II), Cu(II) és Zn(II), szennyezett talajok fenyőfákkal történő újratelepítésének az elősegítésére (Adriensen és munkatársai, 2005, 2006; Krznicaric és munkatársai, 2009).

A nehézfém-mentesítő biotechnológiai lehetőségeket a jövőben várhatóan nagymértékben kiszélesíti majd a növény-gomba mikorrhiza szimbiózisok kialakulásának és fennmaradásának nehézfémekkel szennyezett környezetben történő tanulmányozása „omikai” eszközök segítségével (Ouziad és munkatársai, 2005; Aloui és munkatársai, 2009). Nem kétséges, hogy a növény-gomba együttes stresszválaszok mélyebb megértése (Schützendübel és Polle, 2002) alapvetően fontos szerepet játszik majd a nehézfém-szennyezők elleni küzdelemben (Pócsi, 2011).

5.3.9. Bioszorpció, a gomba bioszorbensek a jövő nehézfém-eltávolító technológiáiban

A gombák sejt-alkotói számos olyan funkciós csoportot tartalmaznak nagy mennyiségben, amelyek különféle kémiai tulajdonságú nehézfémek kiváló bioszorpcióját teszik lehetővé (Gadd, 2009; Wang és Chen, 2009; Dhankhar és Hooda, 2011). Definíció szerint a bioszorpció különféle anyagok oldatokból való eltávolítását jelenti biológiai eredetű anyagok felhasználásával („Biosorption may be simply defined as the removal of substances from solution by biological material.”; Gadd, 2009). Az bioszorpcióval eltávolításra kerülő anyagok lehetnek szerves vagy szervetlen eredetűek, illetve gázneműek, valamint oldódóak és nem oldódóak. A bioszorpció komplex fizikai-kémiai folyamat, amely adszorpció, abszorpció, ioncsere, felületi komplexképzés és csapadékképzés, illetve ezek kombinációja révén valósulhat meg (Gadd, 2009; Dhankhar és Hooda, 2011). Mind az élő, mind a holt gomba biomassza képes fémionok effektív megkötésére (Gadd, 2009; Wang és Chen, 2009)!

A bioszorpció alkalmazása a szennyezők megkötésére és/vagy visszanyerésére számos biotechnológiai folyamatban lehetséges, hiszen egyszerű, hatékony, hasonló a hagyományos ioncserés technológiákhoz, és a felhasznált biomassa könnyen megtermelhető illetve elérhető (Gadd, 2009). Jelenleg a legtöbbször felhasznált biomassa mikrobiális (baktérium, mikroalga, gomba) eredetű, és a leggyakoribb alkalmazási területek a nehézfém-mentesítés továbbá a radioaktív anyagok megkötése (Gadd, 2009). A szerves biomasszában fellelhető fémionkötő funkciós csoportok legtöbbször a hidroxil, karboxil, amino, észter, szulfhidril, karbonil és a foszfát (Wang és Chen, 2009). A gombák esetében ki kell emelnünk a kitint, illetve a kitin eredetű kitozánt, továbbá a gomba sejtfalban megfigyelhető pigmenteket (fenolos polimerek és melaninok nagyszámú karboxil-, fenolos és alkoholos hidroxil-, karbonil- és metoxil-csoporttal) (Gadd, 2009). A biomassa bioszorpciós kapacitása kémiai módosításokkal (pl. extra karboxil- és etil-diamino csoportok kialakítása), illetve géntechnológiai munkával (pl. metallothioneinek és más fémkötő peptidek beépítése a sejtfalba) nagymértékben fokozható. Amennyiben élő biomasszát használunk, akkor a hatékony bioszorpcióhoz élettani folyamatok (pl. transzport és raktározás) is jelentősen hozzájárulhatnak (Gadd, 2009).

Mindenképpen ki kell emelnünk, hogy mind a fonalas gombák (*Aspergillusok*, *Penicilliumok*) mind az élesztők (*Saccharomycesek*) között kiváló fémkötő sajátosságú, biztonságos, GRAS („generally recognised as safe”, FDA minősítés) fajokat találunk (Wang és Chen, 2009)! A fermentációs ipar egyébként is nagy mennyiségben állít elő gomba biomasszát, amit fel lehet használni bioszorbens készítésre. Ráadásul, mint azt már említettük, mind az élő, mind a holt gomba biomassa kiválóan felhasználható nehézfém kötésre!

Az irodalomban rendkívül sok adat van a különféle mikroorganizmusok, köztük gombák nehézfémkötő kapacitására vonatkozóan. Például Wang és Chen (2009) összefoglaló munkájában a következő értékek (mg fém/g száraz biomassa) és fajsorrendek olvashatók a *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel való összevetésben:

Zn(II): *Ascophyllum nodosum* tengeri alga (25,6) > *Penicillium chrysogenum* > (19,2) > *Fucus vesiculosus* tengeri alga (17,3) > eleveniszap (9,7) > *Streptomyces rimosus* (6,63) > *S. cerevisiae* (3,45)

Cu(II): *S. rimosus* (9,07) > *P. chrysogenum* (8,62) > *F. vesiculosus* (7,37) > eleveniszap (5,54) > *S. cerevisiae* (4,93) > *A.nodosum* (4,89)

Ni(II): *F. vesiculosus* (2,85) > *S. rimosus* (1,63) > *S. cerevisiae* (1,47) > *A. nodosum* (1,11)

Pb(II): *Phanerochaete chrysosporium* (419,4) > *Rhizopus nigricans* (403,2) > *Micromonospora purpurea* (279,5) > *S. cerevisiae* (211,2) > *A. terreus* (201,1) > *Micromonospora inyoensis* (159,2) > *Streptomyces clavulgerus* (140,2)

Cd(II), Cu(II): protonált biomassza: *Bacillus lentus* (≈ 30) > *Aspergillus oryzae* > *S. cerevisiae* (< 5)

Cu(II): növekvő tenyészetek: *S. cerevisiae* (7,11) > *Kluyveromyces marxianus* (6,44) > *Candida* sp. (4.80) > *S. pombe* (1.27)

Említést érdemel, hogy számos *Aspergillus* és *Penicillium* faj kiváló nehézfémkötő tulajdonsága ismert (Wang és Chen, 2009):

Aspergillus fajok: *A. niger* (a leginkább tanulmányozott), *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. awamori*

Penicillium fajok: *P. canescens*, *P. chrysogenum* (a leginkább tanulmányozott), *P. digitatum*, *P. griseofulvum*, *P. italicum*, *P. janthinellum*, *P. purporogenum*, *P. spinulosum* és más *Penicillium* izolátumok.

Érdekes megemlíteni, hogy biomassza különféle kezelése, pl. a *Penicillium chrysogenum* esetén felületaktív anyagokkal, jelentősen megnöveli a nehézfémkötés, a *P. chrysogenum* esetében konkrétan az As(V)-kötés hatékonyságát szennyvizek nehézfém-tartalmának a bioszorpciója esetében (Loukidou és mukatársai, 2003).

5.3.10. Ipari szennyvizek tisztítása fonalas gomba és élesztő biomasszával

A gomba biomasszával történő bioszorpciós eljárások fejlesztése nagy intenzitással kutatott terület. A kutatásokat nagymértékben ösztönzik a jelentős nehézfém-tartalmú ipari szennyvizek, pl. bányavizek, fémmegmunkálás, galvanizálás, súlyos környezetkárosító hatásai (Dhankhar és Hooda, 2011). Mind az élő, mind a holt biomassza alkalmas bioszorpcióra, de a halott sejtek felhasználása előnyösebb lehet a szennyvíztisztításban, hiszen ekkor nincsenek toxicitási limitációk, nem szükséges tápközeg, könnyű a fémionok bioszorpciója és visszanyerése, a halott sejten könnyen immobilizálhatók, nem kell tartani a sejttömeg hirtelen pusztulásától és könnyű a holt biomasszát felhasználó reaktorok matematikai modellezése (Ahluwalia és Goyal, 2007). Bár mind a fonalas gombák, mind az élesztők bioszorpciós tulajdonságaival és technológiai felhasználhatóságával kapcsolatban gazdag szakirodalom áll a rendelkezésünkre (Dhankhar és Hooda, 2011), a továbbiakban a pékélesztő lehetséges felhasználásra koncentrálnunk.

A többi bioszorbenshez hasonlóan mind az élő mind a holt élesztő (*S. cerevisiae*) biomassza képes nehézfémionokat megkötni (Soares és Soares, 2013). Továbbá mind a nehézfémek, mind a biomassza újrahasznosítása lehetséges technológiailag.

A nehézfémek megkötése élő *S. cerevisiae* biomasszával bioszorpciós és bioakkumulációs lépéseket foglal magába (Soares és Soares, 2013). A bioszorpció alapvetően sejtfelületi jelenség, mely csapadékképződést (precipitáció), ioncserét, adszorpciót és komplexképzést foglalhat magába. Ezzel szemben a bioakkumuláció sejten belüli, metabolizmusfüggő folyamata, pórusokon és csatornákon át, legtöbbször aktív transzporttal valósul meg.

A nehézfémek megkötése hőkezelt, halott *S. cerevisiae* biomasszával a sejtmembrán diszrupcióját követően sejtfelületen történő bioszorpcióval és a fémionok sejten belüli, ebben az esetben a metabolikus folyamatoktól független akkumulálódásával történik.

A technológiai folyamatokban cél a biomassza többszöri felhasználása, de a biomassza recirkuláltatása gyakran problémás lehet, mert a fémionok leoldása általában savval történik, ami az élesztő fémion kötő kapacitását lecsökkentheti. A megvalósult élesztőalapú

technológiára példa a galvanizációs szennyvízből Cr és Sn kinyerése (Soares és Soares, 2013). A technológia a fémek pH-függő kicsapásával (pl. Cu(II) és Cr(III) hidroxidok leválása pH=6 értéken) is kombinálható (Soares és Soares, 2012).

Lehetőség van az élesztők felületének a géntechnológiai átalakításra is (Kuroda és Ueda, 2010). Például az *E. coli* ModE transzkripció faktor C-terminális molibdát-kötő doménjének a felületi expressziójával, amit α -agglutinin-alapú display rendszerrel hajtottak végre, és a rekombináns baktérium törzssel jó molibdát-kötést értek el! Jelenleg különféle fémionokra, pl. értékes ritkaföldfémekre specifikus peptidek kialakítása és display technikával a felszínre való kijuttatása van folyamatban (Kuroda és Ueda, 2010).

Végezetül meg szeretném jegyezni, hogy az ipari szennyvizek tisztításában fontos szerepet kapnak a baktériumokkal, gombákkal és algákkal történő biofiltrációs eljárások is. Ebben az esetben a mikroorganizmusok nagy fajlagos felületű porózus hordozóhoz kapcsolódnak és a szennyezők eltávolítása aktív folyamat. A biofiltrációban kiemelt jelentőséggel bírnak a hordozók felületén kialakuló biofilmek (Srivastava és Majumder, 2008).

5.3.11. Az emberi szervezet „bioremediációja” nehézfémektől

A táplálékkal az emberi szervezetbe jutó nehézfémek számos súlyos egészségügyi problémát okozhatnak. Ezen problémakör orvoslása lehetséges probiotikus baktériumok, pl. tejsavbaktériumok, segítségével (Monachese és munkatársai, 2012). Ezeknek a baktériumoknak ugyanis kiváló nehézfémkötő képességük (ioncsere a sejtfal peptidoglikánal és tekoinsavakkal, precipitáció elősegítése göcképzés révén, komplexképzés nitrogén- és oxigéntartalmú funkciós csoportokkal) és toleranciájuk (az antibiotikum- és nehézfém-rezisztencia gének gyakran ugyanazon a plazmidon helyezkednek el!) van. Nagyszámú irodalmi adatot találhatunk a probiotikus baktériumok kiváló As(III), Pb(II), Cd(II), Cr(III) és Hg(II)-kötő képességével kapcsolatban. Említést érdemel, hogy a tápcsatornába bejutó Cr(VI) vegyületeket a tápcsatorna baktériumai gyorsan Cr(III) vegyületekké alakítják. Mindezek alapján javasolható a probiotikus baktériumok bevonása az emberi szervezet nehézfémekkel szembeni bioprotekciójába, illetve a tápcsatornán keresztül bejutó nehézfémek detoxifikálásba (Monachese és munkatársai, 2012).

5.3.12. A nanorészecskék csoportosítása

Kurwadkar és munkatársai (2014) összefoglaló munkája alapján a nanorészecskék sokféleképpen csoportosíthatók és a morfológia alapján lehetnek szférikusak, pehelyszerűek, lemezkék, dendritikus szerkezetűek, csövek és pálcikák. Kémiai összetétel szerint alapvetően négy csoportba sorolhatók, így szénelapúak (fullerének, szén nanocsövek), szervesetlen nanorészecskék (cink-oxid, vas-oxid, titán-dioxid, cérium-dioxid), elemi fémek (arany, ezüst, vas) és „quantum dotok” („kvantumpontok”; kadmium-szulfid, kadmium-szelenid nanokristályok pl. LED gyártásban). 2004-ben már 321-féle terméktípus tartozott a „nano” kategóriába a 1-100 nm közötti mérettartományban, pl. nanorészecskék, nanocsövek, nanoporózus anyagok, fullerének, „quantum dotok”, nanoszerkezetű anyagok, nanoszálak, nanokapszulák, nanodrótok, dendrimerek, stb., melyek között a nanorészecske termékek domináltak. 2013-ban már kb. 1600-féle termékben használtak fel „nano” anyagokat, és ezek száma további dinamikus növekedést mutat. A nanotechnológián alapuló fogyasztói termékeknek az összértéke világviszonylatban 2015-ben elérheti az 1000 milliárd dollárt! Jelenleg a világon a legtöbb „nano” terméket az USA (> 700), Németország (> 300) és Korea (> 100) állítják elő. A „nano” termékek felhasználása szektoronként: orvosi és gyógyszerészeti: 30 %, kémiai anyagok és fejlett anyagok („advanced materials”): 29 %; információs és kommunikációs technológia: 21 %; energiaipar: 10 %; autóipar: 5%; repülőgépek és űrjárművek („aerospace”): 2 %; textilipar: 2 %; mezőgazdaság: 1 % (Kurwadkar és munkatársai, 2014).

5.3.13. Szervesetlen nanorészecskék előállítása mikroorganizmusokkal, ezen belül kiemelten gombákkal

Számos mikroorganizmus, köztük baktériumok és gombák képesek nanorészecskék hatékony, biogén előállítására (Sweet és munkatársai, 2012). Érdekes módon, magáról a nanorészecske képzés mechanizmusáról kevés információval bírunk. Feltételezhetjük, hogy a mikroorganizmusok a geokémiai folyamataikban gyakran találkoznak toxikus formájú és koncentrációjú nehézfémekkel, és a nanorészecske-képzés a fémek toxikus hatása kivédésének az egyik speciális módja. Ezekben a folyamatokban minden bizonnyal iontranszporterek és redukáló enzimek játszanak meghatározó szerepet (Sweet és munkatársai, 2012). Talán a

leginkább felderített folyamat a magnetotaktikus baktériumok mágneses ferrit (Fe_2O_3) képzése, melynek részfolyamatai a citoplazmamembrán betüremkedése, vezikulaképzés, Fe^{2+} -transzport a vezikulumokba, majd az Fe^{2+} -ionok oxidálása oxidációs-redukciós rendszerek révén (Sweet és munkatársai, 2012).

Érdekes módon a gombák nanorészecske képző mechanizmusairól sem tudunk sokat (Sweet és munkatársai, 2012), bár mind fonalas gombákkal mind élesztőkkel kiváló minőségben gyárthatók nanorészecskék (Faramarzi és Sadighi, 2013). Ezek az eljárások a kihozatal és minőséget tekintve összevethetők a kémiai és baktérium alapú módszerekkel! A gombák esetében tipikusan extracelluláris nanorészecske-képzés figyelhető meg, de lehetséges intracelluláris folyamat is. A *Fusarium oxysporum* különösen jó nanorészecske-képző, ami a felületi hidrogenáz és NADH-dependens reduktázainak tulajdonítható. A gombák Bi_2O_3 , Sb_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 és ZrO_2 fénoxid nanorészecskék létrehozására is képesek (Durán és Seabra, 2012; Faramarzi és Sadighi, 2013).

A *F. oxysporum* mellett kiváló nanorészecske-képző gombafajok még a teljesség igénye nélkül (Faramarzi és Sadighi, 2013): fonalas gombák: *Rhizopus oryzae*, *Verticillium luteoalbum*, *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Volvariella volvacea*, *Bipolaris nodulosa*, *Helminthosporium solani*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma reesei*; élesztők: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida utilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Torulopsis* fajok.

A gombák kivételes extracelluláris nanorészecske-képző tulajdonsága a kitűnő szekréción tulajdonságával magyarázható (Narayanan és Sakthivel, 2010; Hulkoti és Taranath, 2014). Főképpen a szekretált fehérjék (oxidoreduktázok), glutation és fitokelatin teszik lehetővé a fémek redukcióját és a burkolását („capping”).

Az eddigi kutatások szerint a következő biomolekulák mediálják a gombák különféle nanorészecske képzését (Narayanan és Sakthivel, 2010): fonalas gombák - extracelluláris: *Fusarium oxysporum*: 66 és 10 kDa proteinek (Au), α -NADPH-dependens szulfid reduktáz (35,6 kDa) és fitokelatin (Au), α -NADPH-dependens nitrát reduktáz (44 kDa) és fitokelatin

(Ag), 24–28 kDa protein (Zr), dimer hidrogenáz (44,5 és 39,4 kDa) (Pt); *Colletotrichum* faj: glutation (Au); *Aspergillus niger*: nitrát reduktáz (Ag); *Penicillium brevicompactum*: kompaktin (Ag); *Verticillium* faj: 55 és 13 kDa proteinek (magnetit); élesztők – intracelluláris: *Schizosaccharomyces pombe*: a peptidoglikánok redukáló cukrai (Au); *Saccharomyces cerevisiae*: membránkötött kinonok vagy membránkötött/citoszolikus pH-dependens oxidoreduktázok (Sb₂O₃).

A fém nanorészecskék biogén előállítására, a hagyományos kémiai eljárások mellett, már ma kiemelt gazdasági jelentőségű. A ma felhasznált legfontosabb fém nanorészecskék ma leggyakrabban a következő fémekből készülnek: Ag, Au, Se, Te, Cd, Si, Ti, Zr, és Pt (Sweet és munkatársai, 2012). A legtöbb fém nanorészecske esetében mind gombákon, mind baktériumokon alapuló gyártási technológiák kidolgozásra kerültek. (Sweet és munkatársai, 2012).

A fém nanorészecskék előállítására felhasznált gombák Sweet és munkatársai (2012) alapján: *Verticillium* faj (Ag, Au), *Fusarium oxysporum* (Ag, Cd, Au, Si, Ti, Zr, Pt), *Fusarium solani* (Ag), *Fusarium semitectum* (Ag), *Aspergillus fumigatus* (Ag), *Aspergillus flavus* (Ag), *Phanerochaete chrysosporium* (Ag), *Trichoderma* faj (Ag), *Trichoderma asperellum* (Ag), *Trichoderma viride* (Ag), *Coriolus versicolor* (Ag), *Phoma glomerata* (Ag), *Penicillium brevicompactum* (Ag), *Cladosporium cladosporioides* (Ag) és *Volvariella volvacea* (Ag).

Az eddig felhasznált baktériumok pedig Sweet és munkatársai (2012) összefoglaló munkáját véve alapul: *Pseudomonas stutzeri* (Ag), *Thermomonospora* faj (Ag), *Lactobacillus* faj (Ag, Au, Ti), *Bacillus* faj (Ag, Au), *Shewanella algae* (Au, Pt), *Plectonema boryanum* (Au), *Escherichia coli* (Au), *Rhodobacter capsulatus* (Au), *Corynebacterium* faj (Ag), *Pseudomonas aeruginosa* (Se, Au), *Desulfovibrio desulfuricans* (Pd), *Shewanella oneidensis* (Pd), *Klebsiella pneumoniae* (Ag), *Rhodopseudomonas capsulate* (Au), *Bacillus megaterium* (Au), *Bacillus licheniformis* (Ag), *Acetobacterium xylinum* (Ag), *Morganella* faj (Ag), *Sulfurospirillum barnesii* (Se, Te), *Bacillus selenitireducens* (Se, Te), *Selenihalanaerobacter shriftii* (Se) és *Pseudomonas boryanum* (Pt).

Gyakorlati szempontból kiemelt jelentőségű az ezüst nanorészecskék biogén előállítása (Sintubin és munkatársai, 2012). Ma a nanoezüstöt elsősorban antimikrobiális ágensként használják a textiliparban, a víztisztításban, továbbá orvosi eszközök, kozmetikumok, elektronikai eszközök és háztartási gépek előállításakor. Az ipar a nanoezüst kiváló optikai (biológiai érzékelés és képalkotás), kiemelkedő vezetőképességét (vezető tinták és ragasztók) és katalitikus tulajdonságait (pl. sztirol oxidálása) is kiaknázza (Sintubin és munkatársai, 2012). A tendenciákat tekintve, a fém, így ezüst, nanorészecskék egyre nagyobb volumenű felhasználása várható a mezőgazdaságban, pl. a növényi betegségek kontrolljában, továbbá a betakarítás utáni betegségek megakadályozásában (Alghuthaymi és munkatársai, 2015; 3.3.14. fejezet). A nanoezüst részecskék előállításakor mind a gombák, mind a baktériumok esetében redukáló enzimek (pl. NADPH-dependens reduktázok, nitrát reduktázok) játszanak meghatározó szerepet (Sintubin és munkatársai, 2012). Emellett számottevő egyes biomolekulák, pl. szénhidrátok és terpenoidok (az utóbbiak főképpen növények esetében) nem-enzimatikus redukáló hatása is. Extracelluláris nanoezüst képzés esetében a nanorészecskék gyakran sejtmertes extraktumokkal és létrehozhatók (Sintubin és munkatársai, 2012).

Említést érdemel, hogy a közelmúltban ígéretes munkák jelentek meg a biogén úton előállított szelén nanorészecskéknek a krónikus szelénhiány kezelésében való alkalmazhatóságáról. Pusztahelyi és munkatársai (2015) különféle probiotikus baktérium (*Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus casei* és *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) mutánsokat használtak fel a nonoszelen előállítására, és megfigyelték, hogy a jó termelő mutánsokban megnövekedett a glutation koncentráció és a glutation reduktáz aktivitás. Nagy jelentőséggel bír, hogy egér modellben a tejsav baktériumokkal előállított szelén nanorészecskék toxicitása kisebb volt, mint más készítményeké (Benkő és munkatársai, 2012; Nagy és munkatársai, 2015), továbbá a szelén nanorészecskékkel kiegészített étrenden tartott juh húsa védett a tesztelt policiklikus aromás szénhidrogén vegyület immunotoxikus hatásával szemben (Ungvári és munkatársai, 2014)

A fém-oxid nanorészecskék biogén előállítása szintén nagy gazdasági jelentőséggel bír, hiszen ezen termékek piaca is rohamosan bővül. A teljesség igénye nélkül a biogén úton ma már gyártható fém-oxid részecskék, továbbá ezek legfontosabb felhasználási területei és a

legfontosabb termelő mikroorganizmusok a következők (Durán és Seabra, 2012): Bi_2O_3 : optoelektronikus anyag, melyeket üzemanyagcella elektrolitként és szenzorokban lehet felhasználni, előállítás: *Fusarium oxysporum*mal. Co_3O_4 : alkalmazás: gázérezékelőkben, krakkolási folyamatokban katalizátorként és színyanyagként üvegekben és kerámiákban, előállítás: *Brevibacterium casei*vel. CuO és Cu_2O : változatos felhasználások, pl. nanodrótok gyártásában, előállítás: *Serratia* és *Lactobacillus* fajokkal, továbbá *Saccharomyces cerevisiae*vel. Fe_3O_4 : felhasználás igen sokrétű, pl. katalizátorként, antimikrobiális bevonatokban, elektronikai eszközökben, NMR kontraszt ágensek, stb., előállítás: *Actinobacter* fajjal, *Verticillium* fajjal, *Fusarium oxysporum*mal. TiO_2 : a leggyakrabban használt fotokatalizátor, előállítás: *Fusarium oxysporum*mal, *Lactobacillus* fajokkal és *Saccharomyces cerevisiae*vel. Sb_2O_3 : gyakran használt félvezető anyag, a polietilén tereftalát műanyag gyártásakor katalizátor, gyulladásgátlók, festékek és ragasztók alkotója, előállítás: *Saccharomyces cerevisiae*vel. SiO_2 : igen sokrétű felhasználása van, pl. pigment anyagokban, gyógyszerekben, az elektronikában, elektromos és termikus szigetelő anyagokban továbbá nedvességérezékelőkben, előállítás: *Fusarium oxysporum*mal és *Actinobacter* fajjal. UO_2 : lehetséges bioremediációs alkalmazás, előállítás: *Shewanella putrefaciens*sel. ZnO : igen sokrétű, változatos felhasználás, pl. félvezetőként, elektrolumineszcens anyagként, UV abszorbensként, stb., előállítás: *Lactobacillus sporogea*val. ZrO_2 : előnyös fizikai és kémiai tulajdonságai miatt gyakran használják csiszolóanyagként, vágóélek bevonatában, magas hőmérsékletű motorokban és katalizátorként is, előállítás: *Fusarium oxysporum*mal (Durán és Seabra, 2012).

5.3.14. A mikonanotechnológia a mezőgazdaságban

Mint azt az előzőekben már részben bemutattam, a nanorészecskéket kialakító enzimek és metabolitok a gombák stresszválaszának részeként kerülnek ki a környezetbe, illetve a sejtfalba, ahol redukálják a toxikus nehézfém ionokat (Kashyap és munkatársai, 2013; Alghuthaymi és munkatársai, 2015).

A nanorészecskék jelenlegi és jövőbeni mezőgazdasági felhasználása igen sokrétű és igen ígéretes, és magába foglalja a következő területeket: (i) Antimikrobiális nanorészecskék, pl. ezüst részecskék beépítését a ruházatba, továbbá felhasználását gombaellenes szerként

Sphaerotheca és *Colletotrichum* fajok ellen. (ii) Nanodrótok előállítását, amelyeket *Aspergillus* és *Neurospora* fajokkal hoztak létre, s amelyeket olaj- és szerves szennyezők eltávolítására használnak például öntözővízből, valamint felhasználnak gyorsdiagnosztikai eszközök kifejlesztésére is környezetszennyezők kimutatására. (iii) „Quantum dot” filmek gyártását, amelyeket optikai szenzorokban, pl. peszticidek kimutatására használnak fel. (iv) Nanoszállító rendszerek kifejlesztését pl. agrokémiai anyagok hatékony célba juttatása („targetelése”) céljából, ilyen például a transzformáció hatékonyságának növelése GM növények előállításakor (génpuska). Továbbá (v) nanoszenzorok kifejlesztését és felhasználását az egyes növények és a tárolt élelmiszerek („nanonyelvek”), továbbá termények minősége változásának a megfigyelésében (Kashyap és munkatársai, 2013). A jövőben várható a nanotechnológiával előállított hordozóeszközök, pl. nanokapszulák, fokozott térnyerése peszticidek, fungicidek, herbicidek, műtrágyák és más agrokémiai anyagok kontrollált célbajuttatására intelligens szállító rendszerek („smart delivery systems”) részeként (Alghuthaymi és munkatársai, 2015).

5.3.15. A vas-oxid nanorészecskék felhasználása a bioremediációban

A vas-oxid nanorészecskék számos, a talajban zajló biogeokémiai folyamatban vesznek részt, pl. elektron-akceptorok mikrobák légzési láncában, elektronokat szállítanak különböző mikrobák között, redox körfolyamatok résztvevői, akár ezek hajtóerői lehetnek, továbbá szennyezőkkel, nehézfémekkel léphetnek kapcsolatba (Braunschweig és munkatársai, 2013). A vas-oxid nanorészecskék jóval reaktívabbak, mint a makrorészecskék, továbbá a természetben kialakuló vas-oxid (ferri-hidrit) nanorészecskék aktívabbak, mint a szintetikusak a jelen lévő szerves anyagokkal való kölcsönhatások miatt. A vas-oxid nanorészecskék mind a vastartalmú kioldódások kicsapódásával, mind a nagyobb ásványi makrorészecskék oldódásával/aprózódásával kialakulhatnak. A vas-oxid nanorészecskék lehetséges bioremediációs alkalmazásai igen jelentősek és igen sokrétűek lehetnek szennyezők, pl. klórozott szénhidrogének, aromás nitrovegyületek, továbbá nehézfémek, pl. As, Cu, Hg, Pb, eltávolításában a talajvízből („permeable reactive barriers”; lásd például a következő web oldalt: <https://www.newcastle.edu.au/research-and-innovation/centre/cgmm/research/georemediation>) (Braunschweig és munkatársai, 2013).

5.3.16. Nanorészecskék a természetben

A nanorészecskék mára a természetben sok helyen és jelentős koncentrációban előfordulnak és kölcsönhatásba is lépnek az adott helyen egyidejűleg jelenlévő egyéb anyagokkal (Kurwadkar és munkatársai, 2014). Például a nanorészecskék levegőbe kerülhetnek (10000-40000 per cm^3) a gyártásukkor, aeroszolok használatakor, a közlekedés révén, és ismert, hogy megköthetik, besűrűsíthetik a felületükön a légszennyezőket. Nanorészecskék bekerülhetnek a szennyvizekbe is mind a gyártásukkor (ipari szennyvizek) mind a felhasználásukkor (gyógyászati és háztartási felhasználáskor is) és stabilizálják a vízben lebegő anyagokat, továbbá interferálnak a szennyvíztisztítás biológiai lépéseivel. A nanorészecskék végül a talajba kerülnek, ahol ennek következtében megváltozhat a mikrobiom összetétele. Emellett nanorészecskék megjelenhetnek az ivóvízben, pl. víztisztító készülékekből. A víztisztításban felhasznált nanoeszközök értéke egyébként 2010-ben 1,4 milliárd USD volt, míg 2015-ben a becsült értékük 2,2 milliárd USD.

5.3.17. A nanorészecskék veszélyei

Nagyon nehéz a nanorészecskék környezeti és az egészségügyi kockázatairól beszélni, mert jelenleg nincsenek kidolgozva a kockázatbecslés módszerei (Kurwadkar és munkatársai, 2014). Még a toxikusság mérése, kvantifikálása sem megoldott! Jelenleg bizonytalanság van abban a tekintetben, hogy miképpen hatnak ezek a részecskék az élő szervezetekre, így az emberre. Az bizonyos, hogy inhalálás a fő bejutási útvonal a szervezetbe, és tekintettel arra, hogy a nanorészecskék gravitációsan nem ülepednek, így igen nagy távolságokra jutnak el. A nanorészecskék bejuthatnak a szervezetbe a tápcsatornán és bőrön át is, pl. ivóvízzel, szennyezett táplálékkal és tárgyakkal. Fontos megjegyeznünk, hogy nanorészecskék egészségkárosító hatása függhet a részecske felületének bevonatától is.

A nanorészecskék emberi egészségre gyakorolt káros hatásai tehát nem tisztázottak kellően, de a terhelés mértéke kb. 5×10^{12} per fő per nap, és a belélegzett nanorészecskék más szervekbe is transzlokálódhatnak a tüdőből (Kurwadkar és munkatársai, 2014)!

A nanorészecskék a környezetben különösen a vízi élővilágra jelenthetnek veszélyt, hiszen genotoxikusság, membrán diszrupció, az energia háztartás zavara, fehérje oxidáció, toxikus anyagok felszabadulása általában előfordulhatnak. A nanorészecskék a vízi élőlényekben fel is dúsulhatnak (biomagnifikáció). Az antimikrobiális hatású nanoezüst részecskék megváltoztathatják az adott élőhely mikrobiomját, pl. rezisztens baktériumok szelektálódhatnak, de egyelőre alapvető ökotoxikológiai vizsgálatok és adatok hiányoznak ezen veszély korrekt becsléséhez (Kurwadkar és munkatársai, 2014).

A nanorészecskék esetleges káros mezőgazdasági hatásai sem tisztázottak kellően, de vannak adatok az Al_2O_3 és ZnO nanorészecskék csírázást és gyökérnövekedést gátló hatására vonatkozóan (Kashyap és munkatársai, 2013). Ugyancsak közölték a TiO_2 és ZnO nanorészecskék földigilisztákra gyakorolt káros hatását, ugyanis DNS és mitokondrium sérüléseket okoznak ezekben az állatokban.

Nagyon érdekes és fontos jövőbeni várható tendencia a nanorészecskék biomedikai felhasználásának a dinamikus növekedése, pl. diagnosztikai eljárásokban, termoablációs kezelésekben, a sugárkezelések hatékonyságának a növelésében, valamint gyógyszer- és génszállító eszközökként való alkalmazásokban. Ma még sajnos keveset tudunk a nanorészecskék farmakokinetikai, biodisztribúciós és immunotoxicitási tulajdonságairól, de jelenleg is nagy intenzitással kutatják a nanorészecskék immunológiai hatásait, beleértve ezek immunotoxicitását, továbbá esetleges immunmoduláns és gyulladáskeltő hatásait is (Luo és munkatársai, 2015).

5.3.18. Irodalomjegyzék az 5.3. fejezethez

Adriaensen K. és munkatársai (2005) Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7279–7284.

Adriaensen K., Vangronsveld J. és Colpaert, J.V. (2006) Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* **16**, 553–558.

Ahluwalia S.S. és Goyal D. (2007) Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour. Technol.* **98**, 2243–2257.

Alghuthaymi M.A. és munkatársai (2015) Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnol. Biotechnologic. Equip.* **29**, 221–236.

Aloui A. és munkatársai (2009) On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics* **9**, 420–433.

Benkő I. és munkatársai (2012) Subacute toxicity of nano-selenium compared to other selenium species in mice. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 2812-2820.

Bittsánszky A. és munkatársai (2005) Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc(2+) stress. *Environ. Int.* **31**, 251-254.

Braunschweig J., Bosch J. és Meckenstock R.U. (2013) Iron oxide nanoparticles in geomicrobiology: from biogeochemistry to bioremediation. *New Biotechnol.* **30**, 793-802.

Dhankhar R. és Hooda A. (2011) Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environ. Technol.* **32**, 467-491.

Durán N. és Seabra A. B. (2012) Metallic oxide nanoparticles: state of the art in biogenic synthesis and their mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 275-288.

Elguindi J. és munkatársai (2011) Advantages and challenges of increased antimicrobial copper use and copper mining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 237-249.

Emri T. és munkatársai (2015) Core oxidative stress response (COSR) in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* **16**, cikkazonosító: 478

Faramarzi M.A. és Sadighi A. (2013) Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Adv. Coll. Interface Sci.* **189-190**, 1-20.

Gadd G.M. (2009) Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 13-28.

Haferburg G. és Kothe E. (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* **47**, 453-467.

Haugen A.C. és munkatársai (2004) Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks. *Genome Biol.* **5**, cikkazonosító: R95

Huang L., Baumgartl T. és Mulligan D. (2012) Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine tailings? *Ann. Bot.* **110**, 223-238.

Hulkoti N.I. és Taranath T.C. (2014) Biosynthesis of nanoparticles using microbes – a review. *Coll. Surf. B: Biosurf.* **121**, 474-483.

Jin Y.H. és munkatársai (2008) Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet.* **4**: cikkazonosító: e1000053

Karányi Z. és munkatársai (2013) FSRD: fungal stress response database. *Database (Oxford)* **2013**, cikkazonosító: bat037

Kashyap P.L. és munkatársai (2013) Myconanotechnology in agriculture: a perspective. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 191-207.

- Krznaric E. és munkatársai (2009) Cd-tolerant *Suillus luteus*: a fungal insurance for pines exposed to Cd. *Environ. Pollut.* **157**, 1581–1588.
- Kurwadkar S. és munkatársai (2014) Nanoparticles in the environment: occurrence, distribution, and risks. *J. Hazard. Toxic Radioact. Waste*, doi: 10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000258
- Kotrba P. és munkatársai (2009) Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnol. Adv.* **27**, 799-810.
- Kuroda K. és Ueda M. (2010) Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 53-60.
- Loukidou M.X. és munkatársai (2003) Removal of As(V) from wastewaters by chemically modified fungal biomass. *Water Res* **37**, 4544-4552.
- Luo Y.H., Chang L.W. és Lin P. (2015) Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation, and potential applications. *BioMed Res. Internat.* **2015**, cikkazonosító: 143720
- Mannazzu I. és munkatársai (2000) Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochim. Biophys. Acta* **1475**, 151–156.
- Memon A.R. és Schröder P. (2009) Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **16**, 162-175.
- Miransari M. (2011) Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnol. Adv.* **29**, 645-653.
- Miskei M., Karányi Zs. és Pócsi I (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet. Biol.* **46**, S105-S120.
- Momose, Y. és Iwahashi, H. (2001) Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2353–2360.
- Monachese M., Burton J.P. and Reid G. (2012) Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6397-6404.
- Narayanan K.B. és Sakthivel N. (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Coll. Interface Sci.* **156**, 1-13.
- Nagy G. és munkatársai (2015) Cellular and nephrotoxicity of selenium species. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **30**, 160-170.
- Ouziad F. és munkatársai (2005) Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **162**, 634–649.
- Pereira Y. és munkatársai (2008) Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicol. Sci.* **106**, 400–412.

Pócsi I. (2011) Toxic metal/metalloid tolerance in fungi - a biotechnology-oriented approach. *Cellular Effects of Heavy Metals* (Bánfalvi G., Ed.), Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, pp. 31-58.

Pócsi I. (2014) „Omikák” a modern biológiában. „Meet the Scientist” előadás, Hajdúnánás, http://www.meetthescientist.hu/eloadasok/2014_01_29_pocsi.pdf;
<https://www.youtube.com/watch?v=w2mQdQ659VE>

Pusztahelyi T., Kovács S., Pócsi I. és Prokisch J. (2015) Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se source production. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **30**, 96-101.

Rajkumar és munkatársai (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1562-1574.

Ruotolo, R., Marchini, G. és Ottonello, S. (2008) Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: a genomic phenotyping study in yeast. *Genome Biol.* **9**: cikkazonosító: R67

Schützendübel A. és Polle A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* **53**, 1351–1365.

Sintubin L., Verstraete W. and Boon N. (2012) Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2422-2436.

Soares E.V. és Soares H.M.V.M. (2012) Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **19**, 1066-1083.

Soares E.V. és Soares H.M.V.M. (2013) Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 6667-6675.

Srivastava N.K. és Majumder C.B. (2008) Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *J. Hazard Mater.* **151**, 1-8.

Thorsen M. és munkatársai (2007) Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol. Genomics* **30**, 35–43.

Thorsen M. és munkatársai (2009) Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **10**, cikkazonosító: 105

Ungvári É. és munkatársai (2015) Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **64**, 298-306.

Vido K. és munkatársai (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8469–8474.

Wang J. és Chen C. (2009) Biosorbents for heavy metal removal and their future. *Biotechnol. Adv.* **27**, 195-226.