

1949

A cianid-rezisztens alternatív légzési út élettani szerepe *Aspergillus* gombafajokban

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Molnár Ákos Péter

Témavezető

Dr. Fekete Erzsébet

Egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács a **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia doktoriprogramja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.
Debrecen, 2018.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Molnár Ákos Péter** doktorjelölt **2013. január-2018. június** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biológia doktoriprogramjának** keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.
Debrecen, 2018.

.....
a témavezető aláírása

A cianid-rezisztens alternatív légzési út élettani szerepe *Aspergillus* gombafajokban

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

a Biológia tudományágban

Írta: **Molnár Ákos Péter** okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**

(biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Fekete Erzsébet

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:

tagok:

..... ..

A doktori szigorlat időpontja:

Az értekezés bírálói:

..... ..

..... ..

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

..... ..

..... ..

..... ..

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A játék színtere: a mitokondrium.....	4
2.2 A mitokondriális légzési lánc és az oxidatív foszforiláció.....	4
2.3 Az alternatív respirációs útvonal.....	8
2.3.1 Az alternatív oxidáz (AOX).....	8
2.3.2 Az AOX élettani szerepe.....	9
2.4. A légzési folyamat metabolikus szabályozása.....	11
2.5. Szerves savak fermentációja.....	12
2.5.1 Citromsav fermentációk technológiája és az AOX.....	13
2.5.2 Itakonsav fermentációk.....	14
2.6. Aflatoxinok és a sterigmatocisztin.....	15
3. Célkitűzések.....	17
4. Anyagok és módszerek.....	19
4.1. <i>Aspergillus nidulans</i>	19
4.1.1 Alkalmazott törzsek.....	19
4.1.2. Törzsfenntartás.....	20
4.1.3. Kísérleti körülmények.....	22
4.1.4. Analitikai módszerek.....	23
4.1.4.1. Száraz sejttömeg (DCW) meghatározása.....	23
4.1.4.2. D-glükóz meghatározása.....	24
4.1.4.3. Sterigmatocisztin (ST) izolálása és meghatározása.....	24
4.1.4.4. Légzésmérés.....	24
4.1.4.5. Genomi DNS izolálás és Southern blot analízis.....	25
4.2. <i>Aspergillus</i> törzsek (CBS).....	26
4.2.1 Alkalmazott törzsek.....	26
4.2.2. Törzsfenntartás.....	26
4.2.3. Kísérleti körülmények.....	28
4.2.4. Analitikai módszerek.....	28
4.2.4.1. Növekedési teszt.....	28
4.3. <i>Aspergillus terreus</i>	29
4.3.1. Alkalmazott törzs.....	29
4.3.2. Törzsfenntartás.....	29
4.3.2. Kísérleti körülmények.....	29
4.3.2.1. Mn mentesítés.....	29
4.3.2.2. Tenyésztések.....	30
4.3.3. Analitikai módszerek.....	31
4.3.3.1. Száraz sejttömeg (DCW), D-glükóz, itakaonsav (IA) Mn ion meghatározása.....	31
4.3.3.2. Légzésmérés.....	31
4.3.3.3. RNS izolálás, Northern blot.....	31
4.4. Bioinformatikai elemzés.....	31

4.5. Felhasznált vegyszerek.....	32
4.6. Reprodukálhatóság.....	32
5. Eredmények.....	33
5.1. <i>A. nidulans</i>	33
5.1.1. A kísérleti stratégia ellenőrzése.....	33
5.1.2. A törzsek biomassa képzése	34
5.1.3. Az alternatív oxidáz aktivitás a stacioner fázis késői szakaszában.....	36
5.1.4. Sterigmatocisztin képződés függ <i>aodA</i> kópiaszámtól az <i>A. nidulans</i> gombában, de csak fény hiányában	37
5.2. <i>Aspergillus</i> törzsek CBS.....	40
5.2.1. <i>Aspergillus</i> törzsek növekedési tesztje, légzésgátló vegyszerek jelenlétében.....	40
5.2.2. A törzsek konidiospóra képzése	40
5.3. <i>Aspergillus terreus</i>	43
5.3.1. <i>A. terreus</i> növekedése KCN és SHAM jelenlétében.....	43
5.3.2. Itakonsav fermentációk	43
5.3.2.1. Előzmények: lombikos kísérletek	43
5.3.2.2. Az itakonsav hozama függ az oldott oxigénszinttől és az AOX aktivitástól ..	46
5.3.3. Az <i>aodA</i> és <i>aodB</i> gén expressziós profil.....	50
6. Diskusszió.....	53
7. Összefoglalás.....	63
8. Summary	67
9. Irodalmi hivatkozások.....	72
10. Tudományos tevékenység	88
11. Köszönetnyilvánítás	91
12. Függelék.....	93

Örök hálával tartozom Szüleimnek és Testvéreimnek. És Nagypám emlékének. Nélkülük nem lehetnék az, aki vagyok.

1. Bevezetés

Az eukariótákon belül jól elhatárolható a gombák birodalma, melynek tagjait rendkívüli diverzitás jellemez (felépítés, méret, életmód stb.). A gombák alapvetően megtalálhatóak a talajban, vízben és a levegőben, akár élőlényekben is (pl. parazita- vagy szimbiontaként). Fontos részei a bioszférának és nem elhanyagolható szerepet töltenek be. Az anyagáramlást és a természet egyensúlyát vigyázzák, hiányuk beláthatatlan következménnyel járna a jelenlegi életre. Eredetük még napjainkban sem tisztázott, feltehetően a tengerben megjelent őseukarióta rendszerből fejlődtek ki, a prekambrium földtörténeti időszakban. Egyes becslések szerint már 1,5 milliárd évvel ezelőtt kialakulhattak a Földön. Elterjedésüket valószínűleg a kevés szerves anyag limitálhatta, a szárazföldön való megjelenésük 500-600 millió évvel ezelőttre tehető. Az első ősgombák nem fotoszintetizáló, aerob élőlények lehettek, más vizsgálat szerint az állatokkal közös őssel rendelkeznek. Az aerob légzésnél a végső elektronakceptor a légköri oxigén (O_2). A folyamat lejátszódásáért a több komponensből felépülő légzési lánc a felelős, mely eukariótáknál a mitokondrium belső membránjában található. A légzés és az ATP (adenozin-trifoszfát) szintézise szorosan összekapcsolódik ezen élőlényeknél, hiszen elektrontranszport lánc működése közben létrejövő protongradiens a hajtóereje ADP-ATP átalakításnak. Az ATP a mikrobák nélkülözhetetlen komponense, kémiai energiatároló molekula, kiemelt szerepe van az anyagcsere folyamatokban, akár reakciók lejátszódásában, vagy a folyamatok szabályozásában. Egyes gombák rendelkeznek ettől eltérően más respirációs útiránnyal is (Joseph-Horne és mtsai., 2001). Az alternatív oxidáz (AOX) az alternatív légzési útvonal (a citokrómoxilázról ágazik le) terminális oxidáza, mely az elektronokat az ubikinonról a molekuláris oxigénre közvetíti és vízzé redukálja azt (Vanlerberghe, 2013). A citokrómoxiláz légzési láncsal ellentétben cianidra érzéketlen, működése nem, ill. minimális ATP szintézissel kapcsolható össze. Az alternatív légzést több, rendszertanilag különböző (prokarióta, alacsonyabb-, magasabb rendű eukarióta) élőlényben kimutatták (Bendall és Bonner, 1971; Lambowitz és mtsai., 1989; Siedow és Umbach, 1995; Stenmark és Norlund, 2003; Joseph-Horne és mtsai., 2001; Tudella és mtsai., 2004; Molen és mtsai., 2006; MacDonald és mtsai., 2009). Ennek az útvonalnak a fiziológiában betöltött feladatát már korábban alaposan megvizsgálták és hosszú múltra tekint vissza növényekben.

Az első gombák feltehetően fonalas szerveződésűek lehettek és nagy valószínűséggel erősen kitettek voltak a korai földtörténeti időszak természeti viszonyosságainak (abiotikus és biotikus tényezők), a túlélés érdekében ezért különböző

védelmi stratégiák kidolgozásával válaszoltak. A cianid-rezisztens alternatív légzésben, az elektronnak a végső elektronakceptorra történő közvetítésén kívül más fontos szerepe is lehet a gombaélettanban (Rogov és Zvyagilskaya., 2014, növényfiziológiában már bizonyított). Az AOX funkciójára-figyelembe véve az evolúciós folyamatokat- több elmélet is létezik, számos kondícióban vizsgálták már aktivitását: oxidatív – és ozmotikus stressz, hő sokk vagy mondjuk szárazság esetében. Az Ascomycota (tömlősgombák) törzsben belül több szervezettel is találkozhatunk, melyek rendelkeznek AOX fehérjével és aktuális tanulmányok középpontjában állnak-pl. *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Botrytis cinerea*. (Tanton és mtsai., 2003; Suzuki és mtsai, 2012; Hattori és mtsai., 2009, Magnani és mtsai., 2007, Huh és Kang 2001; Inoue és mtsai., 2011). Fiziológiai szerepe nem teljesen tisztázott napjainkban, több kérdést is felvet az AOX működése: esetleg a különböző stressz hatások indukálják-e az alternatív légzést, ill. hasonló-e az expressziós mintázat olyan törzsekben, melyek egy nemzettséghez tartoznak, esetleg közeli vagy távoli rokonságban állnak egymással?

A gombák birodalmában az Ascomycota törzsben számos olyan faj található, melyek kutatási és ipari szempontból is jelentős potenciállal bírnak, szinte nap mint nap publikálnak friss tudományos eredményeket róluk. A vizsgálódások elsősorban a gombák fiziológiai folyamataira és genetikájára fókuszál, így átfogóbb képet kaphatunk ezen összetett rendszerek működéséről, hozzájárulva a természet és a bioszféra folyamatainak megértéséhez, valamint nem utolsósorban az emberiség számára hasznos anyagok (pl. primer/szekunder metabolitok, enzimek, stb.) biztonságos, olcsó előállításához. A biotechnológiai úton történő termékek készítése a jövőben kedvezményezett lehet a kémia szintézisek produktumaival szemben, hiszen előállításuk nem igényel extrém paramétereket (hőmérséklet, nyomás, katalizátor jelenléte), valamint természetes alapanyagból indulhat ki, mint a növényi biomassa vagy annak hidrolizátumából származó építőegységek. A gyógyszeriparban már évtizedek óta alkalmazzák a fonalas gombákat, fermentációs technológiával megtermeltetve velük a hatóanyagokat (vagy előanyagokat, melyeket tovább lehet alakítani).

Bizonyos fajokat az iparban alkalmaznak primer metabolitok (pl. *Aspergillus niger*-citromsav), szekunder metabolitok (pl. *Penicillium chrysogenum*- penicillin), enzimek (pl. *Trichoderma reesei*- celulláz) termelésére vagy az élelmiszeriparban használnak fel (pl. *Penicillium camamberti*-sajtkészítés). Az *A. niger* fonalas gomba citromsav fermentációja tankönyvi példának számít, ahol kiemelkedő szerepe van az alternatív respirációnak (Karaffa és Kubicek 2003). Nemcsak a lebontó anyagcserét befolyásolja, hanem a technológiai paramétereket is; magas oldott oxigén (DO) szintet kell tartani fermentáció során, valamint a

tenyészet erőteljes hűtésével is számolni kell. Sejthető, hogy hasonló rendeltetése lehet *P. chrysogenum* fonalas gombánál a penicillin fermentációban, bár még nem vizsgálták (az információ Szentirmai Attila professzor úrral folytatott beszélgetéskor jutott el hozzám).

Az itakonsav (IA) egy telítetlen dikarbonsav, elsősorban műanyag- és műgyanta előállításában használják fel. Az IA előállítása fermentációs úton történik *Aspergillus terreus* fonalas gombával (Batti és Schweiger 1963), szubmerz technika alkalmazásával. A technológiai paraméterek erőteljesen hasonlítanak az *A. niger* citromsav fermentációkra (táptalajalkotók, pH, oldott oxigénszint). Az IA szintézis útját megvizsgálva szembetűnik, hogy a citromsavra, mint előanyagra tekinthetünk a folyamatban (Kuenz és Krull 2018) és hozzá is kapcsol mindjárt egy ésszerű hipotézist; vajon az AOX-nak itt is szerepe lehet a fermentációs folyamatban?

Egyes fajok képesek komoly egészségügyi kockázatot és mezőgazdasági károkat okozni a megtermelt mikotoxinjaik által (pl. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*), éhínséget generálva a fejlődő országokban. Az aflatoxinok (AT) veszélyes rákkeltő mikotoxinok, melyeket az *Aspergillus* nemzetség néhány faja is termel (Rank és mtsai., 2011). Jelenlétükkel súlyos gazdasági károkat okoznak és fogyasztásra alkalmatlanná tehetik a gabona- és zöldségféléket. Az AF bioszintetikus útja (metabolitok, felelős gének) -néhány faj esetében- napjainkban már viszonylag tisztázott. Biztonsági okok miatt az AT vizsgálata nehézségbe ütközik, viszont lehetőség van a kevésbé veszélyes sterigmatocisztint (ST) tanulmányozni (Németh és mtsai., 2016). A ST az AT előanyaga, melyet az *Aspergillus nidulans* fonalas gomba is termel, végtermékként van jelen a tenyészetben (Yabe és Nakajima, 2004; Klejnstrup és mtsai., 2012). Kimutatták, hogy a fénynek, mint ingernek, regulátorként is van hatása a mikotoxin képződésre (Kato és mtsai., 2003). A mikotoxin mennyisége elsősorban növényi olajokon emelkedik meg (Maggio-Hall és mtsai., 2005). -mely a gomba természetes környezetében is előfordul-, ahogy az alternatív légzés intenzitása is. Felmerülhet ismét egy kérdés: vajon lehet-e bármilyen kapcsolat a ST szintézis és az alternatív légzés között?

A fenti sorokat és kérdéseket figyelembe véve nem szabad elsiklani bizonyos tények felett; annak ellenére, hogy a gombák mindig is az életünk részei voltak (akár táplálékként való fogyasztásukra is gondolhatunk) és a tudomány fejlődésével a szolgálatunkba állítottuk őket „jó munkásként”, az evolúciójukról, a fiziológiás folyamataikról, genetikájukról ismereteink még hiányosnak mondhatóak. A PhD dolgozatom egyik célja, hogy a mikológia területére beépítsem a hiányzó tudományos láncszemeket, melyek a későbbiekben segítséget nyújthatnak a természet és bioszféra mesés világának megértéséhez.

2. Irodalmi áttekintés

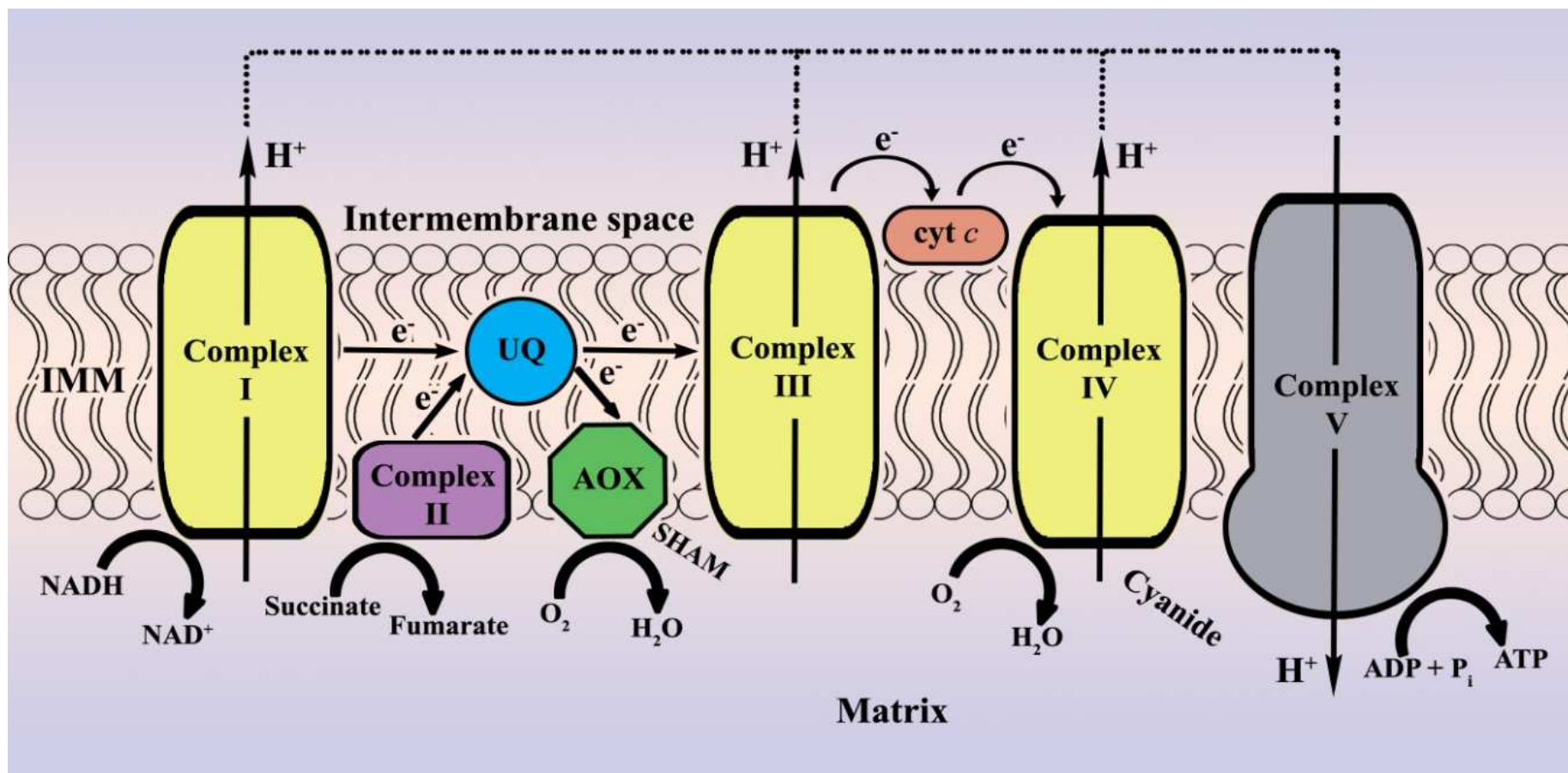
2.1.A játék színtere: a mitokondrium

A mitokondrium az eukarióta sejt energiatermelő „egysége”, mely 0,5-1 μm átmérőjű és 1-7 μm hosszúságú, ellipszoid alakú sejtorganellum. Felépítését tekintve kettős membrán határolja: egy sima felületű külső- és egy belső membrán, mely redőket alakít ki. A redők a belső membrán felületét növelik, ezáltal az oxidatív foszforiláció intenzitását is. A külső membránt 50-50%-ban fehérjék és lipidek, a belső membránt kb. 75%-ban fehérjék alkotják. Szerkezetéből adódóan kettő kamrát különítenek el: egy külső kamrát (membrán közötti tér) és egy belső kamrát, amit a mátrix tölt ki. A mátrixban zajlik le a citrákör és a β -oxidáció, valamint itt található meg a mitokondriális örökítőanyag (mtDNS), RNS és riboszóma (Sarkadi 2007).

2.2A mitokondriális légzési lánc és az oxidatív foszforiláció

A lebontó (katabolikus) folyamatok során magas energiájú vegyületek oxidációja történik meg, elektronok és protonok szabadulnak fel a reakciókban. Aerob élőlények esetében a légzési lánc (1. ábra) áthaladó elektronok a folyamat végén a protonokkal és légköri oxigénnel vízzé redukálódnak. Eukariótáknál a légzési lánc a mitokondrium belső membránjában található, működése közben protonokat pumpál a mátrixból az intermembrán (membrán közötti) térbe. A létrejött proton koncentráció különbséget a sejt ATP szintézisre használja fel.

A légzési lánc gombáknál (hasonlóan a növényekhez és állatokhoz) 4 komplexből álló elektrontranszport rendszer (Joseph-Horne és mtsai., 2001).



1. ábra: Az elektrontranszport lánc és az alternatív oxidáz lokalizációja a mitokondriumban.

Az I. komplex (NADH-dehidrogenáz) a NADH-ról, a II. komplex (szukcinát-dehidrogenáz) FADH_2 -ről származó elektronokat közvetíti az elektrontranszport láncban. Általánosan az I. komplexen 2 elektron közvetítése 4 H^+ membrán közötti térbe történő pumpálásával kapcsolt. A *Neurospora crassa* és az *Aspergillus niger* esetében a fungális I. komplex felépítése jól tanulmányozott, struktúráját tekintve hasonló más élőlényekéhez. Legalább 35 alegységből épül fel és ebből 7-et a mitokondriális genom kódol (Weiss és mtsai., 1991). L-alakú struktúrát mutat, melyben redox csoportok (FMN, FeS fehérjék) találhatóak, a proton transzlokációjáért pedig az alegységek a felelősek (Brandt, 1997; Hofhaus és mtsai., 1991). Az I. komplex a legtöbb gombában jelen van, néhány kivételtől eltekintve (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergii*, *Kluyveromyces lactis*). A II. komplex a szukcinát oxidációjából (szukcinát-fumarát átalakulás) származó elektronokat juttatja az ubikinonra. FAD prosztetikus csoportból, Fe-S fehérjékből [2Fe-2S, 3Fe-4S, 4Fe-4S] és citokróm b_{560} -ból épül fel. A komplex által katalizált reakcióban a szabadenergia-felszabadulás nem elegendő a protontranszlokáció generálásához. Az I. és II. komplexek az ubikinonnak adják át az elektronokat. Az ubikinon kinodiális gyűrűvel rendelkező molekula, a kinon-hidrokinon átalakulás révén szintén elektronok átadására képes (Sarkadi 2007). Az ubikinonról az elektronok a III. komplexre (citokróm –oxidoredukáz), majd a IV. komplexen (citokróm-oxidáz) át az oxigénre kerülnek. A III. komplex a legjobban karakterizált enzimek közé tartozik a légzési láncban belül. Gombáknál a *Saccharomyces cerevisiae* és *Neurospora crassa* III. komplexének struktúráját vizsgálták (Hunte és mtsai., 2000; Weiss és mtsai., 1987). *S. cerevisiae* élesztőnél 10 alegységből épül fel a komplex, ahol a citokróm b-t a mitokondriális genom kódolja. III. komplex hasonlóan az I.-hez, 4 H^+ -t juttat az intermembrán térbe működésekor. A IV. komplex a terminális oxidáz, 4 alegységből épül fel, melyrézatommal rendelkező citokrómokat (cyt a és cyt a_3) tartalmaz. IV. komplex szintén protonokat pumpál az intermembrán térbe az elektrontranszfer közben. A citokróm-oxidázzal az elektronok a molekuláris oxigénre kerülnek és vízzé redukálódnak. A folyamat végén 2 molekula víz létrejöttéhez 4 elektron és 4 proton szükségeltetik, ennek hiányában a sejtre káros molekulák vagy vegyületek keletkezhetnek (szuperoxid gyök, hidrogén-peroxid). A I., III. és IV. komplex az elektronátmenet során protonokat pumpál a membrán közötti térbe, proton-, elektrokémiai gradienst hozva létre. A kiegyenlítődés ATP szintetáz csatornáján keresztül történik. Az ATP szintetáz egy több alegységből felépülő fehérjekomplex- gyakran emlegetik V. komplexként-, melynek az ATP szintetizáló egysége a belső membrán mátrix felőli oldalán helyezkedik el, míg a transzmembrán egysége a belső membránban található és

protoncsatornaként funkcionál (Sarkadi 2007). A visszaáramló protonok energiája fogja hajtani az ADP ATP-vé történő átalakítást, az oxidatív foszforilációt. A légzési lánc különböző vegyületekkel (1. táblázat) szétkapcsolható, így leállítható az elektrontranszfert.

Inhibítor	Hatás helye	Hivatkozás
Cianid (CN ⁻)	Citokróm oxidáz	Slater 1967
Szén-monoxid (CO)	Citokróm oxidáz	
Antimicin A	Citokróm-oxidoreduktáz	
Malonát	Szukcinát-dehidrogenáz	
Rotenon	NADH dehidrogenáz	
Oligomicin	ATP szintetáz	
Dinitrofenol (DNP)	Protonofor; ATP szintetáz	
Atraktilozid	ATP-ADP transzlokáz	Paschkis és mtsai., 1945
Tiouracil	Citokróm oxidáz	
Glutation		
Cisztein HCl		
Nátrium szulfadiazin		
Nátrium szulfatiazol		
Aszkorbin sav		
Hexaklorofén és a különböző szubsztituensei	Citokróm oxidoreduktáz	Bernard és mtsai., 1952
Tetraciklinek	Citokróm oxidoreduktáz	Colaizzi és mtsai., 1965
Piericidin A	NADH-oxidáz	Jeng és mtsai., 1968
Hidroxilamin	Citokróm oxidáz	Utsumi és mtsai., 1969
Hidrazin		
Fenilhidrazin		
Biszulfid		
Alumínium vegyületek	NADH-dehidrogenáz, Citokróm-oxidoreduktáz	Vanlerberghe 2013
Réz vegyületek	membrán permeabilitás	

1. táblázat: A citokrómos útvonal inhibítorai.

2.3 Az alternatív respirációs útvonal

Néhány gombában és növényben a standard légzési lánc mellett van egy alternatív légzési útvonal (Joseph-Horne és mtsai., 2001; Arnholdt-Schmitt és mtsai., 2006). Ennek egyik komponense az ún. alternatív NADH dehidrogenáz (NDH), mely a NADH oxidációjából származó elektronokat az ubikinon rendszerre juttatja, megkerülve az I. komplexet. A NDH nem hoz létre protongradienst, így nincs hajtóereje az ATP szintézisnek. A NDH érzéketlen rotenonra, a mitokondrium belső membránjához kötődik (mátrix felőli vagy a külső részéhez), FAD prosztetikus csoport mellett FMN-t (flavin-mononucleotid) és Fe-S fehérjét tartalmaz (Kerscher, 2000; de Vries és mtsai., 1992). *S. cerevisiae* élesztőnél az I. komplex hiányában esszenciális része a légzési láncnak (Small és McAlister-Henn, 1998). *N. crassa* fonalas gombánál a NDH-t géneket azonosították, melyek 64 és 57 kDa-os fehérjéket kódolnak (Videira és Duarte, 2002; Melo és mtsai., 2001; Duarte és mtsai., 2003), valamint rotenonra érzéketlen légzést már *A. niger*-ben is találtak (Watson és Smith, 1967). Az alternatív útvonal másik fontos eleme a NDH mellett a cianid –rezisztens alternatív oxidáz.

2.3.1 Az alternatív oxidáz (AOX)

A legtöbb aerob mikroba légzése nem állítható le teljesen a citokrómos légzési lánc inhibitoraival (pl. cianid, azid, CO, antimycin A). A jelenségért egy kb. 36 kD-os, vas tartalmú, kinol oxidoreduktáz jellegű enzim a felelős, melyet alternatív oxidáznak (AOX) neveznek és a mitokondrium belső membránjához kötődik. Az AOX funkciójának ellátáshoz vas szükségeltetik (Bendall és Bonner 1971; Minagawa és mtsai., 1990), szerkezetének meghatározása a tisztításának nehézségéből fakad. Az alternatív útvonal a citokromos láncról ágazik le, terminális oxidáza az AOX, mely az ubikinonról származó elektronokat a molekuláris oxigénre közvetíti és vízzé redukálja azokat (Vanlerberghe, 2013). Az alternatív légzést kimutatták már baktériumokban, gombákban, protozoákban, algákban és növényekben egyaránt (Bendall és Bonner, 1971; Lambowitz és mtsai., 1989; Siedow és Umbach, 1995; Stenmark és Norlund, 2003; Joseph-Horne és mtsai., 2001; Tudella és mtsai., 2004; Molen és mtsai., 2006; MacDonald és mtsai., 2009). Működése közben nem generál protongradienst, mivel az elektron elkerüli a III. és IV. komplexet, így nem vagy minimális ATP szintézis történik, az energia hő formájában szabadul fel (Siedow és Moore, 1993; Albury és mtsai., 2009). Az AOX aromás hidroxámsavakra (pl. szalicil-hidroxámsav, jellemző inhibitorai a 2. táblázatban) érzékeny (Vanlerberghe és McIntosh, 1997). Oxigén iránti affinitása jóval kisebb, mint a citokrómos útvonalé, ezért működéséhez magasabb oxigéntenzió szükséges

(Kozma és Karaffa, 1996). Az AOX-t leggyakrabban növényekben, valamint gombákban vizsgálták (Bendall és Bonner, 1971; Lambowitz és mtsai., 1989; Siedow és Umbach, 1995; Tudella és mtsai, 2004). A fungális AOX-t kódoló gének általánosan úgy ismertek, hogy egy gén van a mikroba kromoszómájában, bár néhány gombánál előfordulhat, mint a *N.crassa* esetében, hogy több kódoló génnel is rendelkezik (Tanton és mtsai., 2003). A növényekben több AOX-t kódoló gén található (Clifton és mtsai., 2006), és valószínűleg fiziológiai funkcióval kapcsolhatóak össze. Az *Aspergillus* genus tagjai 1 vagy több AOX izoenzimmel rendelkezhetnek (nem publikált adatunk).

Inhibítor	Hivatkozás
Szalicil-hidroxiámát (SHAM)	
Propil-gallát	Murphy és Lang-Unnasch 1999
Atovaquone	

2. táblázat: Az alternatív oxidáz inhibitorai.

2.3.2 Az AOX élettani szerepe

Az egyik legrégebbi hipotézis szerint csak egy primitív elektrontranszport lánc, mely a citokrómok útján megjelenéséig rendelkezett szereppel, ezt követően funkcióját veszítve fennmaradt néhány fajban. Napjainkban ez a hipotézis cáfolható, hiszen új eredményekkel bizonyítják a jelentőségét az alternatív útvonalnak növény- és gomba élettanban. Evolúciós szempontból az AOX egy eszköz lehetett az ősmikrobáknak a káros oxigén gyors eliminációjára. Az állatok bélcsatornájában, oxigénszegény környezetben megtalálható *Cryptosporidium parvum* parazita számára az AOX teszi elviselhetővé a megnövekvő O₂ szintet (Putignani és mtsai., 2004).

A 20. században elején termogén hatást párosítottak működéséhez növényekben (*Arum* nemzetség). Ebben az esetben a mitokondrium légzési láncában átrendeződés történik, és magas aktivitással az AOX válik az egyetlen terminális oxidázzá, a szubsztrátok oxidációjából származó energia hő formájában szabadul fel. A képződő hő megnöveli a rovarcsalogató illatanyagok kibocsátását (Ito és mtsai., 2009; Zhu és mtsai., 2011; Ito és mtsai 2011).

Energia túlfolyás: az alternatív útvonal abban az esetben működik, ha a citokrómok lánc telített, a sejt szénhidrátellátottságának növelése fokozza az útvonal intenzitását (Day és

Lambers, 1980). A mikroba esetlegesen így képes elkerülni a redox potenciál szélsőséges csökkenését a belső membránban, mely spontán elektronáramlás kialakuláshoz vezetne az ubikinon és az oxigén között, szabad utat engedve a káros reaktív oxigéngyökök (ROS) kialakulásához.

Energia túltöltés: az ADP szint befolyásolja az elektronok megoszlását a két útvonal esetében. Az ADP szint növelésével a citokrómos útvonal működése is intenzívebb lesz, viszont maximális működéskor az alternatív légzési lánc is erősödik. (De Visser és mtsai., 1986).

Szénváz lebontása: az alternatív oxidáz a NADH visszaoxidálását végzi, miközben minimális ATP keletkezik. A magas ATP szint több pontban is szabályozza a szénváz lebontást, az AOX működése révén bizonyos anyagcsere lépések felszabadulnak a gátlás alól. *A. niger* citormsav fermentációnál már ismert a jelenség, míg *Pichia pastoris* élesztőnél pedig a szénforrás kimerülése után az AOX aktivitás erőteljes csökkenése volt detektálható (Kern és mtsai., 2007).

Azoknál az élesztőknél, melyek képesek az aerob metabolizmusra, az aktív AOX mindegyik növekedési fázisban jelen volt, vagy aktivitása megnőtt, ha vas, kén, réz hiányában, a citokrómos útvonal gátlószereinek (cianid, azid, antimycin A) ottlétében növesztették, vagy alacsony oxigénszint esetében (Zvyagilskaya és mtsai., 1991). Az AOX aktivitását *in vivo* számos tényező befolyásolhatja úgy, mint a különböző stresszfaktorok, szénforrások, redox egyensúly, NAD(P)H ellátottság (Del-Saz és mtsai., 2018).

A stressz indukálta AOX aktivitást és expressziót már több növényben és gombában is vizsgálták (Rogov és Zvyagilskaya., 2014). A legtöbb stressz hatás (pl. ozmotikus, magas NaCl koncentráció, hő) egyben oxidatív stresszt is előidéz, melynek során szabadgyökök keletkeznek. Az egyik hipotézis szerint az AOX feladata az oxidatív stressz csökkentése vagy megelőzése. Mitokondriális elektrontranszport lánc működése kedvez ROS képződésének, bár mennyiségük függ a komponensek redukciós állapotától. Az AOX a légzési lánc túlredukálását segíti megelőzni, így csökkentve a képződő ROS mennyiségét, növényekben és gombákban egyaránt (Maxwell és mtsai., 1999; Yip és mtsai., 2001; Angelova és mtsai., 2005; Magnani és mtsai., 2007; Scheckhuber és mtsai., 2011; Xu és mtsai., 2012; Honda és mtsai., 2012). Gombáknál feltételezések szerint az AOX is beletartozik a védelmi arzenálba, ennek alapja, hogy az AOX transzkriptum mennyisége megegyezik pl. oxidatív stressznél *Magnaporthe oryzae*, *Candida albicans* és hő sok hatására *Yarrowia lipolytica* gombákban (Yukioka és mtsai., 1998; Yan és mtsai., 2009; Biriukova és mtsai., 2008).

Funkciói ezzel nem merültek ki, hiszen *Cryptococcus neoformans* és *Paracoccidioides brasiliensis* patogén gombáknál az AOX gén hiányában csökkentett virulenciát tapasztaltak, feltehetően szerepet játszhat az infekciós folyamatban (Akhter és mtsai., 2003; Ruiz és mtsai., 2011).

Növényekben a fény (mely fontos energiaforrás és inger) is befolyásolhatja az alternatív légzést (Yoshida és mtsai., 2007; Dinakar és mtsai., 2010; Florez-Sarasa és mtsai., 2009; Florez-Sarasa és mtsai., 2011). Intenzív fényhatás következtében az alternatív légzés kapacitásának növekedése volt megfigyelhető *Arabidopsis* palántákban (Zhang és mtsai., 2010), míg közönséges búza (*Triticum aestivum*) leveleiben az alternatív légzés a teljes légzésnek a 80%-át tette ki, a fényben eltöltött periódust követően (Azcon-Bieto és mtsai., 1983).

Azzal kapcsolatban, hogy a sejtben AOX-t kódoló gén konstitutívan expresszálódik-e, nincs egyértelmű válasz. Bizonyos gombák esetében normál tenyésztési körülmények között is megfigyelhető az alternatív légzés jelenléte, máskor pedig vegyszerek hozzáadásával tudták detektálni a génterméket (Tanton és mtsai., 2003), míg *A. nidulans*-nál a stresszhatások indukálják a struktúrgén kifejeződését (Leiter és mtsai., 2016). A szabályozásával kapcsolatban sincsenek egyértelmű válaszok, hiszen előfordul, hogy transzkripciója folyamatos, viszont a transláció és az aktiváció csak stressz hatására történik meg (Yukioka és mtsai., 1998). *A. nidulans*, *N. crassa*, valamint *P. anserina* gombákban már részletesebben tanulmányozták regulációját AOX-nak és transzkripciós faktor(oka)t is azonosítottak (Chae és mtsai., 2007; Sellem és mtsai., 2009; Suzuki és mtsai., 2012).

Összeségében elmondható, hogy további kérdések merülnek fel az AOX aktivitásával, szabályozásával kapcsolatban, hiszen az irodalmi adatok alapján az eredmények fajonként (akár közeli vagy távoli rokonságot veszünk figyelembe) párhuzamokat és ellentéteket is egyaránt mutatnak.

2.4. A légzési folyamat metabolikus szabályozása

Az elsődleges anyagcsere központi eleme a légzési folyamat, összehangolása más fiziológiás folyamatokkal létfontosságú. A reguláció történhet az intermediereken keresztül (finom), ha gyorsabb szabályozásra van szükség, ill. a génexpresszió felül- vagy alulregulációjával (durva), mely lassabb változást hoz létre. A légzés gyors szabályozása az enzimek metabolitokra való érzékenységén keresztül valósul meg, hiszen a metabolitok kölcsönhatásba léphetnek az enzim szabályozó vagy katalitikus helyeivel, megváltoztatva azok aktivitását. Alapvetően elmondható, hogy a NAD^+/NADH és ADP/ATP aránya nagyban

meghatározza a sejt metabolikus aktivitását, kontrollálva az egyes anyagcsere útvonalakat (glikolízis, citrát-ciklus). A sejtlégzési metabolitok képzése több pontban is szabályozott, jól leírt folyamatokról van szó (Sarkadi 2007). A glikolízisben a foszfoenolpiruvát kontrollja fontos szabályozópont a légzési folyamatban. A P_i aktiválja a fruktóz-6-foszfát átalakulását fruktóz-1,6-biszfoszfáttá, viszont a foszfoenolpiruvát ezt a lépést erősen gátolja. A sejt energiatöltöttsége is befolyásoló tényező a glikolízisben: a magas ATP és H^+ koncentráció/szint foszfo-fruktokináz működését, míg piruvát kinázt a nagy ATP és alanin koncentráció szint gátolja, a fruktóz-1,6-biszfoszfát pedig serkenti. A piruvát –dehidrogenázt allosztérikusan gátolja az acetil-KoA, a NADH és az ATP. A citrát ciklus központi szerepet tölt be a sejtben, hiszen a lebontó és felépítő folyamatokat kapcsolja össze ebben a bioszintetikus körben. A citrát ciklus kontrollja több ponton történik az irreverzibilis reakciókat végző enzimekkel és az oxálacetát koncentrációjával. A citrát-szintáz, az izocitrát-dehidrogenáz és az α -ketoglutarát-dehidrogenáz aktivitását ATP és NADH inhibálja, ellenben az ADP serkenti, valamint az α -ketoglutarát-dehidrogenázt a szukcinil-KoA is gátolja.

Az AOX aktivitását befolyásoló intermediereket növényekben többször vizsgálták. A piruvát és glioxalát mellett a citromsav ciklus dikarbonsavai (α -ketoglutarát, oxálacetát) az alternatív útvonal fokozott működését váltotta ki, addig a trikarbonsavaknak (citrát, izocitrát) hatása nem volt tapasztalható (Selinski és mtsai., 2018). *Hansenula anomala* gombában a flavon hozzáadását követően megszűnt a cianid-rezisztens légzés (Minagawa és mtsai., 1992).

2.5. Szerves savak fermentációja

A mikrobiális úton történő szerves savak (egy- vagy többértékű karbonsav) termelése hosszú múltra tekint vissza. A baktérium- és gombasejtek anyagcseréjében természetes körülmények között is megjelennek a szerves savak (citromsav, itakonsav, fumársav, glükonsav, tejsav; Fekete és Karaffa 2013). A fermentációs ipar nagy mennyiségben előállított termékei közé tartoznak, az élelmiszer-, gyógyszer-, vegyiparban használják fel őket. Anaerob baktériumok esetében a NADH regenerálása történik kis molekulák redukciója révén, melynek során tejsav, vajsav, propionsav, stb. keletkezhet, míg aerob mikroorganizmusok esetében a szénváz tökéletlen lebontása miatt dúsul fel a karbonsavak mennyisége.

A citromsav és itakonsav fermentációs technikája több ponton is hasonlóságot mutat. A citromsav termelése *Aspergillus niger*-rel történik (Bercovitz és mtsai., 1990), míg az itakonsavat *Aspergillus terreus* fonalas gombával állítják elő (Batti és Schweiger 1963; Nubel

és Ratajak 1962; von Fries 1966). Mindkettő mikroba természetes szerves sav túltermelőnek tekinthető, napjainkban rájuk optimalizálták a fermentációs technológiát.

2.5.1 Citromsav fermentációk technológiája és az AOX

A megfelelő törzs alkalmazásával és a technológia tökéletesítésével közel 90%-os (szénforrás/citromsav) termék kihozatal érhető el. A citromsav bioszintézisének kiindulási pontja a glikolízis, melyben 1 mól glükózból 2 mól piruvát keletkezik, ATP és NADH keletkezése mellett. A citrát a C₄ és a C₂ molekularészek kondenzációjával alakul ki (Shu és Johnson, 1948; Martin és Wilson, 1951; Cleland és Johnson, 1954). Az első lépés az előanyagok (oxálcetát és piruvát) kialakítása a sejtben. A piruvát acetyl-CoA -vá történő átalakulása során a felszabaduló szén-dioxid (CO₂) megkötése egy másik piruváton oxálcetsav létrejöttét eredményezi (Cleland-Johnson reakció, Cleland és Johnson 1954). Ez a reakció központi jelentőséggel bír a citromsav bioszintézisében, hiszen ha az oxálcetsav a citrát körben alakulna ki a 6 szénatomos (pl. glükóz) szénforrásból, 2 mól CO₂ keletkezne, lecsökkentve az elméleti kihozatalt. A citoszolikus piruvát karboxiláz enzim alakítja ki a citoplazmában az oxálcetsav molekulát (Ma és mtsai., 1981), melyet a citoszolikus malát dehidrogenáz maláttá konvertál és kerül be a mitokondriumba. A citromsav túltermelésnek kulcsenziméhez értünk: a mitokondrium belső membránjában található trikarbonsav carrier fehérjéhez, a citoszol és mátrix kapujához (Karaffa és Kubicek 2003). Működéséhez szerves ellenion szükségeltetik magas koncentrációban. *A. niger*-ben a citoszolban glikolízis végtermékeként feldúsuló malát transzportját végzi a mátrixban található citrát ellenében (Kaplan és mtsai., 1995). A folyamat végeredményeként a citrát feldúsul a citoplazmában, majd citrát permeáz enzimek sejten kívülre juttatják a szerves savat. A citrát exportja az extracelluláris térbe ATP igényes folyamat. Az *A. niger* képes felvenni és szénforrásként felhasználni a Mn²⁺ ionnal kelált citrátot, viszont Mn²⁺ ion hiányában az export egyirányúsítható.

A biokémiai háttér nagyban meghatározza a technológiai paramétereket, elsősorban a szén- és nitrogénforrást, nyomelemeket, pH-t, levegőztetést kell körültekintően megválasztani (Röhr és mtsai., 1996; Karaffa és Kubicek, 2003; Kirimura és mtsai., 2006; Papagianni, 2007).

Kiemelkedő jelentőséggel bír a szénforrás mennyisége és minősége: magas koncentrációban (10% vagy a feletti) glükóz, szacharóz, maltóz, valamint az ezekből felépülő alapanyagok alkalmazásával történik a fermentáció. A 100 g/L feletti koncentráció alkalmazását a glükóz permeáz enzim indokolja, melynek működéséhez magas külső szubsztrátkoncentráció kell (Torres és mtsai, 1996; Wayman és Matthey 2000). Ennek

következménye, hogy a megnövekszik a foszfo-fruktokináz enzimet stimuláló fruktóz-2,6-biszfoszfát mennyisége, felfokozott glikolitikus fluxust eredményezve.

A kémhatás szintén fontos paraméter. A citromsav termelés során alacsony pH-t (pH 2 alatt) tartanak. Egyrészt megakadályozza a melléktermékek felhalmozódását, másrészt kevés mikroba képes tolerálni a savas környezetet, valamint feltehetően a citrát extracelluláris térbe töréntő transzportjához is szükséges lehet (Kontopidis és mtsai., 1995) .

A citromsav fermentációk alatt magasabb oldott oxigén szintet tartanak, ennek az oka már jól ismert: a cianid-rezisztens alternatív oxidáz működése nélkülözhetetlen a magas kihozatal eléréséhez (Zehentgruber és mtsai., 1980; Kirimura és mtsai., 2000). Az alternatív oxidáz a glikolízisben keletkező NADH regenerálását végzi, ATP generálás nélkül, az energia hő formájában távozik a rendszerből. Működésének köszönhetően a lebontó anyagcsere bizonyos lépései felszabadulnak az ATP gátlás alól. Az AOX-nak közvetlen hatása van a technológiára; a fermentorokat erőteljesen hűteni kell, mely jelentős hányadát képi a gyártási költségeknek.

A fémionok közül a Mn^{2+} ionok jelentősége már ismert (Clark és mtsai., 1966), ezért a tápközeg Mn^{2+} mentesítése mindenképp javasolt, bizonyos ionoknak (Fe^{3+} , Zn^{2+}) pedig szuboptimális koncentrációban kell jelen lenniük (Röhr és mtsai., 1996).

A nitrogénforrással szemben támasztott követelmény, hogy ne emelje a tápközeg pH-ját. A nitrogén és foszfor mennyiségének az optimális érték alatt kell lennie, így kiküszöbölhető a magas szénforrás jelenlétében fellépő túlzott biomassza képződés.

2.5.2 Itakonsav fermentációk

Az itakonsavat (2-metilidén butándisav) a 19.században fedezték fel, a citromsav termikus bomlástermékeként (Baup 1837). Az itakonsav két karboxil csoportot és konjugált kettőskötést tartalmaz, ezért igen reaktív vegyület. Mivel enyhén mérgező, felhasználása korlátozott; elsősorban vegyiparban alkalmazzák építőelemként gyantáknál, ko-polimerként műanyagoknál, abszorbensekhez, lerakódást gátló szerekben (Okabe és mtsai., 2009). Az itakonsavat jellemzően *A. terreus* fonalas gombával állítják elő (Batti és Schweiger 1963; Nubel és Ratajak 1962; von Fries 1966), a nemesített törzsekkel megközelíthető a karbonsav 80 g/L koncentrációja a fermentációban (Riscaldati és mtsai., 2000; Steiger és mtsai., 2013)

Bioszintézisét vizsgálva úgy tűnik, hogy a citromsavét követi, viszont három enzim szükséges pluszban; a cisz-akonitát dekarboxiláz, melyet a *cadA* gén kódol, valamint emellett valószínűleg két génnek van szerepe a transzport folyamatokban. A vélt mitokondriális transzportert a *mttA*, valamint feltehetően plazmamembrán transzportert *amfsA* gének kódolják (Li és mtsai., 2013). A hozamok itakonsav esetében sokszor alulmaradnak a

citromsavhoz képest az irodalom szerint (Okabe és mtsai., 2009), ezért több próbálkozás is történt az *A. niger* itakonsav termelővé alakítására géntranszfer segítségével (Blumhoff és mtsai., 2013; Li és mtsai., 2013; Van der Straat és mtsai., 2014), viszont az IA titerek még így sem közelítették meg az korábbi *A. terreus* fermentációk eredményeit.

Az itakonsav képződésének biokémiája nagy hasonlóságot mutat a citromsavéhoz, tulajdonképpen a citrát az itakonsav előanyagának tekinthető: intenzív glikolízis, citoszolikus oxálcetsav és malát keletkezésében megegyeznek. A különbség a tirkarbonsav carrier működésében található, mely eltérően működik, mint *A. niger*-ben. A mitokondriumba a malát transzportja a *cis*-akonitát ellenére történik. A *cis*-akonitát továbbalakítása a citoszolban megy végbe az akonitát dekarboxiláz által, a reakció végterméke az itakonsav. Az itakonát végül az itakonsav transzporter segítségével sejten kívülre választódik ki.

A fermentációs körülmények is a citromsav előállításához hasonlóak: magas koncentrációban alkalmazott szénforrás (glükóz, melasz), fémion limitáció, jól definiált foszfát mennyiség, alacsonyabb pH (3) beállítása, az irodalomban több tanulmány is foglalkozik a táptalaj és paraméterek optimalizálásával (Kuenz és mtsai., 2012; Hevekerl és mtsai., 2014; Karaffa és mtsai., 2015). A fermentáció során magas oldott oxigénszintet tartanak, melyet önmagában a gombatenyészet növekedése nem indokol. Feltételezhetően az AOX működésével állhat kapcsolatban ezen paraméter szabályozása. A bioreaktoros tenyésztés a gombának rendkívüli stressznek számít, hiszen a magas glükóz koncentráció, intenzív levegőztetés oxidatív, ozmotikus stresszként hat az élőlényre, mely maga után vonja a ROS keletkezését. Az *A. terreus*-nál szilárd fázison lovastatint előállításánál már bizonyított az AOX aktivitása, indukcióját elsősorban a ROS mennyiségével hozzák párhuzamba (Pérez-Sánchez és mtsai., 2017). Folyékony tenyésztésnél érdekes módon nem tudtak alternatív légzést detektálni, bár meg kell jegyezni, hogy a szénforrás mennyisége és minősége is nagyban eltér az itakonsavnál használtaktól, továbbá korábban már azt is leírták más *Aspergillus*-nál (*A. nidulans*; Pócsi és mtsai., 2005), hogy a H₂O₂ nem indukálja az alternatív oxidázt.

2.6. Aflatoxinok és a sterigmatocisztin

Az aflatoxinok (AT) természetben előforduló erősen karcinogén hatású vegyületek, gyűjtőnevüket a termelésükre képes *Aspergillus flavus* mikrobáról kapták. A mikotoxinok a metabolitok nagy és diverz osztályát teszik ki, szerkezetüket tekintve poliketidek közé tartoznak (Hopwood és Sherman, 1990). Több potenciális termelő is az *Aspergillus* genus tagja (Rank és mtsai., 2011). Az opportunistá gomba képes a gabonaféléket, más zöldségeket megfertőzni az aratás előtt vagy a tárolás alatt, ezáltal fogyasztathatlanná téve az élelmiszert,

komoly egészségügyi és gazdasági problémát okozva a trópusi országokban (Wilkinson és mtsai., 2004). Az AT-ok májbetegség kialakulását emberben és állatban egyaránt előidézhetik (Wogan, 1992; Bennett és Klich, 2003). A kevésbé toxikus sterigmatocisztin (ST) az utolsó előtti intermedier az AT B₁ bioszintézisében, (Yabe és Nakajima, 2004; Klejnstrup és mtsai., 2012), *A. nidulans* esetében a folyamat végtermékeként van jelen, a szekunder metabolizmus eredményeként (Barnes és mtsai., 1994). Az *A. nidulans* szintézis útvonalából hiányzik kettő, az átalakításhoz szükséges enzimet kódoló gén (*aflP* és *aflQ*), melyek az *A. flavus* AT génklaszterében jelen vannak (Amaike és Keller, 2011; Yu és mtsai., 2004). Az ST és AT bioszintézise hasonló szabályozó mechanizmussal rendelkeznek (beleértve a transzkripciósfaktorokat is: AflR and AflJ), így lehetőség nyílik az AT szintézis vizsgálatára *A. nidulans*-ban úgy, hogy nem keletkezik veszélyes mikotoxin (Amaike és mtsai., 2013; Németh és mtsai., 2016). Az AT/ST bioszintézis útja jól karakterizált *A. nidulans*-ba (Barnes és mtsai., 1994; Keller és Adams, 1995; Brown és mtsai., 1996), de számos környezeti faktor, mely képzési mechanizmust befolyásolhatja továbbra is tisztázatlan (Maggio-Hall és mtsai., 2005; Keller és mtsai., 1997). A fényről- alapvető környezeti inger, széles hatással-már leírták, hogy változást okoz a ST-termelésben (Kato és mtsai., 2003; Atoui és mtsai., 2010; Bayram és mtsai., 2008; Bayram és mtsai., 2016). A Velvet komplex, a szekunder anyagcsere regulátora, fény által befolyásolt komplex, mely pozitívan szabályozza a ST termelést (Bayram és mtsai., 2008). Három fehérjének (VeA, VelB, LaeA) az összakcsolódásával jön létre a sejtmagban. A *veA* gén deléciónak következtében ST és prekursorainak termelése megszűnt *A. nidulans*, *A. flavus* és *A. parasiticus* gombákban (Kato és mtsai. 2003; Calvo és mtsai., 2004; Duran és mtsai., 2007). A VeA fehérje a N-terminális részében található NSL (Nuclear Localization Signal) doménnal kapcsolódik a α -importin KapA fehérjéhez és így kerül a sejtmagba, ahol regulátor hatását kifejti (Stinnett és mtsai., 2007). Amennyiben fény hatására a fitokróm receptor FphA proteinjével kapcsolódik össze a citoplazmában, transzportja nem történik meg a nukleuszba, így a toxin produkció visszaszorul. A laboratóriumokban alkalmazott *A. nidulans* törzsek javarészt *veA1* genotípussal rendelkeznek, így jelölve a pontmutációt a *veA* gén start kodonjában. A mutációból adódóan a fehérje N-terminális régióról hiányzik 37 aminosav, ezáltal a sejtmag lokalizáció szignálja is (Kim és mtsai., 2002), ezért elengedhetetlen a *veA* genetikai háttér ST produkció vizsgálatához. A *veA* fehérjének a mikotoxin produkció mellett a szexuális/aszexuális szaporodásra is hatása van, *A. nidulans*-ban a gén kiütésével nem formálódtak askospórát tartalmazó kleisztotéciumok, míg a gén overexpressziójánál fénytől függetlenül folyamatosan jöttek létre a kleisztotéciumok (Kim és mtsai., 2002; Kato és mtsai., 2003).

3. Célkitűzések

Az AOX, mint számos élőlényben (köztük élesztő és fonalas gombákban) megtalálható alternatív légzési útvonal terminális oxidáza, több funkcióval is rendelkezik, érdekes és fontos eleme lehet a gombaélettannak, karakterizálása a technológiai fejlődéssel egyszerűsödött. A legrégebbi és egyben a legismertebb módszer az alternatív légzés vizsgálatára az oxigén elektródával történő oxigénfogyasztás nyomonkövetése a tápközegből. Napjainkban a lehetőségek tárháza bővült a molekuláris biológia eszközeivel is, elérhetővé téve számunkra az alternatív útvonallal kapcsolatos hipotézisek gyors és pontos vizsgálatát. Több tanulmány foglalkozik az AOX rendeltetésével, az eredmények diverznek mondhatóak, viszont még több kérdést vetnek fel, melyek megválaszolásra várnak.

(1.) Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy az *Aspergillus nidulans* fonalas gombán keresztül biztonságosan és reprodukálhatóan tanulmányozható az AT előanyaga, a ST. Növényi olajon az AOX aktivitás és a cephalosporin C (szekunder metabolit) produkció közötti összefüggés már jól leírt jelenség (Karaffa és mtsai., 1999). Az *A. nidulans* eltérően más *Aspergillus* fajokhoz (de nem egyedileg) egyetlen AOX-t kódoló génnel rendelkezik (*aodA*). A ST és az *aodA* közötti kapcsolatról is találunk publikációt az irodalomban (Leiter mtsai., 2016), ám az AOX ST szintézisben elfoglalt helye továbbra sem tisztázott teljesen. Célul tűztük ki, hogy különböző *aodA* genetikai háttérrel rendelkező mutáns rendszert (saját promoter alkalmazása, hiány és overexpresszált törzsek) hozzunk létre, majd Németh és mtsai. (2016) által kialakított és leírtjól kontrollált körülmények között vizsgáljuk az AOX szerepét az ST bioszintézisben szilárd és folyékony közegben, valamint azt, hogyan változtatja meg az aktivitása a hozamokat.

(2.) A fény szerepéről és kapcsolatáról a ST bioszintézissel számos publikációt találhatunk (pl. Bayram és mtsai., 2008; Bayram és mtsai., 2016). Növényeknél vannak eredmények a fény hatásáról az AOX aktivitásra, gombáknál kifejezetten ezt az összefüggést még nem vizsgálták. A Velvet komplex regulátor fény által szabályozott protein komplex, befolyása az ST termelésre közismert, kísérletek kivitelezésénél meghatározó paraméter. A finoman szabályozott paramétereknél lehetőségünk nyílik arra, hogy megvizsgáljuk rendelkezik-e ráhatással az AOX aktivitás az ST produkcióra fény jelenlétében.

(3.) Az AOX működését a gomba és növény fiziológiában számos tényező befolyásolja (Vanlerberghe 2013). Ha a citokrómos respiráció légzésgátló inhibíciója következtében leáll, az alternatív légzés felerősödik. Az AOX az oxidatív stressz elleni védekezés egyik fegyvere lehet a mikroorganizmusok számára, lehetővé téve a redox-homeosztázis fenntartását, vagy a gyors adaptációt a környezetükhöz, mely egyben a túlélés

záloga a mikrobák számára. Az *Aspergillus* nemzetség tagjai között számos olyan fajt találunk melyek iparilag hasznos metabolitokat termelnek (pl. *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*), de akad közöttük az egészségre káros mikotoxin producer is (*A. flavus*). Az *A. niger* és *A. fumigatus* alternatív légzésről már adatok állnak a rendelkezésünk (Kirimura és mtsai 1987; Magnani és mtsai., 2007), viszont a genus többi tagjáról tudásunk ezen a téren még hiányos. A CBS segítségével több *Aspergillus* törzs növekedését vizsgálhattuk meg légzésgátló anyagok jelenlétében, következtetések levonva, hogy az AOX elősegíti-e a gombák adaptációs készségét a kedvezőtlen környezeti tényezőkhez.

(4.) A citromsav előállítása napjainkban *A. niger* fonalas gombával történik, jelentős mennyiségben (1,6 millió tonna) előállított szerves sav (Bercovitz és mtsai., 1990). A citrát fermentációjánál a cianid-rezisztens, SHAM érzékeny alternatív oxidáznak a funkciója tisztázott, továbbá a technológiát is meghatározza (Karaffa és Kubicek 2003). Az alternatív respiráció a fermentáció mindegyik szakaszában detektálható (Zehentgruber és mtsai., 1980) és a sejtek energia hozamát csökkenti (Kirimura és mtsai., 2000). Az itakonsav a cis-akonitáton keresztül szintetizálódik citrátból (Kuenz és Krull 2018), a fermentációs technológiáját megvizsgálva párhuzamok fedezhetők fel a citromsavéval. Az *A. terreus* rendelkezik alternatív légzéssel, lovasztatin produkciónál már vizsgálták (Pérez-Sanchez és mtsai, 2017) és hipotézisünk szerint az IA biológiai úton történő előállításánál is szerepe van az AOX-nak, melyet szeretnénk bebizonyítani.

4. Anyagok és módszerek

4.1. *Aspergillus nidulans*

4.1.1 Alkalmazott törzsek

A kísérletek során az 3. táblázatban feltüntetett *Aspergillus nidulans* törzseket alkalmaztuk. Az RDIT 9.32 és RJMP 155.55 jelzéssel rendelkező törzseket Prof. Nancy Keller laboratóriumától (USA, Wisconsin) kaptuk. Első lépésben az alternatív oxidáz (*aodA*) génre (locus AN2099) nézve hiányos vagy több kópia számban tartalmazó (vad törzshöz képest) mutánsokat generáltunk.

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
RDIT 9.32 (FGSC A1252)	<i>veA</i>⁺; <i>aodA</i>⁺	Tsitsigiannis és mtsai., 2004
TN02A3 (FGSC A1149)	<i>veA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>pyrG</i> ; <i>ΔnkuA</i>	Nayak és mtsai., 2006
RJMP 155.55	<i>veA</i>⁺; <i>riboB2</i>; <i>wA3</i>	Németh és mtsai., 2016
AMEF 001	<i>veA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>aodA</i>⁻ ; <i>ΔnkuA</i>	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 1.2 ^a	<i>veA</i>⁺; <i>riboB2</i>; <i>pyroA4</i>; <i>aodA</i>⁻; <i>wA3</i>	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 2.39	<i>veA</i>⁺; <i>pyroA4</i>; <i>aodA</i>⁷⁺ ; <i>wA3</i>	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 3.37 ^b	<i>veA</i>⁺; <i>aodA</i>⁻	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 4.7 ^c	<i>veA</i>⁺; <i>aodA</i>²⁺	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 5.13 ^d	<i>veA</i>⁺; <i>aodA</i>³⁺	Molnár és mtsai.,2018

3.táblázat: A kísérletekben felhasznált *A. nidulans* törzsek.

***aodA*⁻**: alternatív oxidáz negatív; csökkent alternatív légzési kapacitás,

***aodA*⁺**: alternatív oxidáz pozitív; megnövekedett alternatív légzési kapacitás,

^{2+,3+}: *aodA* kópiák száma,

^a; AMEF 001 és RJMP 155.55 törzsek keresztezéséből származó utód, ^b; AMZN 1.2 és RDIT 9.32 törzsek keresztezéséből származó utód, ^c; AMZN 2.13 és RDIT 9.32 törzsek keresztezéséből származó utód, ^d; AMZN 2.39 és RDIT 9.32 törzsek keresztezéséből származó utód.

Az AMEF 001-es törzset transzformációs technika segítségével hoztuk létre TN02A3 törzsből. Az AMEF 001 *aodA* negatív, mely a célgén uridin auxotróf (*pyrG*; orotidin-5'-foszfát dekarboxiláz) markerre történő cseréjével valósult meg a homológ rekombináció során. A géndelécíóhoz szükséges kazettát double-joint PCR segítségével állítottuk elő (Yu és mtsai., 2004). A transzformációt Tilburn és mtsai. (1983) alapján végeztük. A sejtfal líziséhez Glucanex (Novozymes, Koppenhága, Dánia) enzimet használtunk 2,5%-ban (w/v). A mutánsokat kétszeresen tisztítottuk és egy sejtől származó kolóniát hoztunk létre. Az *aodA* gén hiányát PCR segítségével ellenőriztük.

Az AMEF 001 és az RJMP 155.55 keresztezése révén AMZN 1.2 törzset kaptuk, mely *veA*⁺ és *aodA* negatív. Az AMZN 1.2 és az RDIT 9.32 keresztezéséből létrejött az izogenikus AMZN 3.37. A több *aodA* kópiával rendelkező AMZN 2.39 az AMZN 1.2 transzformálásával jött létre. A transzformálás során 10 µg *aodA* fragmentet (2836 bp, azon belül promóter 905 bp és terminátor 836 bp szekvencia mérettel) és 1 µg pTN2 plazmidot alkalmaztunk, mely *A. fumigatus* *riboB2* marker génjét (riboflavin szintézisben résztvevő fehérjét kódol) tartalmazza (Nayak és mtsai., 2006). Az így kapott AMZN 2.13 és 2.39 jelzésű törzseket RDIT 9.32 törzsszel keresztezve kaptuk az izogenikus AMZN 4.7 és 5.13 törzseket. Az *aodA* gén jelenlétét PCR módszerrel, a kópiák számát Southern blot segítségével ellenőriztük.

4.1.2. Törzsfenntartás

A törzsek fenntartása szilárd AMM táptalajon (4., 5., és 6. táblázat) történt D-glükóz szénforráson, melyet 1% -os (w/v) koncentrációban alkalmaztunk. Az inkubáció 37°C-on, 3-4 napig tartott, majd a tenyészeteket felhasználásig 4°C-on (hűtőszobában) tároltuk. A szilárd táptalajon történő tenyésztésnél a tápoldat tartalmazta az adott törzs auxotróf markerét (szükség esetén), valamint 1,5%-os (w/v) koncentrációban bakteriológiai agart.

Az évekig tartó felhasználhatóságért az üveggyapoton átszűrt spóraoldatokat 50%-os glicerinolddal tároltuk -80°C-on.

AMM táptalaj összetétele ^a	
Alkotóelem	Koncentráció (g/L)
NaNO ₃	6
szénforrás	10
Koncentráció (mL/L)	
sóoldat	20
auxotróf markerek	1 mL törzsoldat ^{b; c; d}

4. táblázat: AMM táptalaj összetétele.

^a; pH=6,5, ^b; piridoxin törzsoldat (10mg/100mL), ^c; uridin törzsoldat (0,5M),
^d; riboflavin törzsoldat (20mg/100mL)

Sóoldat összetétele	
Alkotóelem	Koncentráció (g/L)
KCl	26
MgSO ₄ x7H ₂ O	26
KH ₂ PO ₄	76
Koncentráció (mL/L)	
nyomelemoldat	50

5. táblázat: A sóoldat összetétele.

Nyomelemoldat összetétele ^a	
Alkotóelem	Koncentráció (mg/L)
Na-borát	40
CuSO ₄ x5H ₂ O	400
FeSO ₄ x7H ₂ O	714
Na-molibdát	8
ZnSO ₄ x7H ₂ O	800

6. táblázat: A nyomelemoldat összetétele. ^a; pH=2

4.1.3. Kísérleti körülmények

A rázatott lombikos, süllyesztett fermentációs kísérletek AMM2 vagy ezen alapuló komplex táptalajon végeztük (7. és 8. táblázat). Az AMM2 alapvetően nitrogénforrásban tér el az AMM táptalajtól. Szilárd fázisú kísérletek szintén bakterológiai agar (1,5% w/v) felhasználásával történtek. A szénforrást és a marker törzsoldatokat Millipore Millex 0,22 µm-es szűrő (Merk, Darmstadt, Németország) segítségével csíramentesítettük és külön adtuk minden esetben a tápközeghez. A kísérleteknél 50%-os (w/v) D-glükóz és glicerin törzsoldatokból mértük ki a szénforrásokat.

AMM2 táptalaj összetétele ^a	
Alkotóelem	Koncentráció (g/L)
NH ₄ H ₂ PO ₄	8
szénforrás	15
CaCl ₂	0,1
Koncentráció (mL/L)	
sóoldat	20
auxotróf markerek	1 mL törzsoldat ^b

7. táblázat: AMM2 táptalaj összetétele.

^a; pH=6,8, ^b; lásd AMM táptalaj összetétele

Komplex táptalaj összetétele ^a	
Alkotóelem	Koncentráció (g/L)
élesztőkivonat	5
pepton	10
kukoricalekvár	10

8. táblázat: Komplex táptalaj összetétele.

^a; AMM2 táptalaj a táblázatban feltüntetett alkotóelemekkel kiegészítve

A folyékony közegnél a leoltás 10⁶ db *A. nidulans* konídium/ mL mennyiségben történt. A rázott lombikos tenyésztéseknél 500 mL-es Erlenmeyer lombikokat (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) használtunk, melyeket 100 mL táptalajjal

töltöttünk fel. Szénforrás a minimál táptalajban 1,5% (w/v) D-glükóz volt. A lombikos növesztések horizontális rázógépből (Infors AG, Bottmingen, Svájc) 200 rpm-en és 37°C-on zajlottak. A szénforrást és a marker törzsoldatokat Millipore Millex 0,22 µm-es szűrő segítségével csíramentesítettük a fermentorba juttatás előtt.

A fermentációk inokuluma 1%-ban (w/v) glicerint tartalmazott. Az inokulum mennyisége a fermentor térfogatának 10%-át tette ki. 24 H-s korban az előnövesztett tenyészetet zsugorított üvegszűrőn szűrtük és mostuk, majd a micéliumot átkanalztuk a leoltó lombikba és a fermentorba jutattuk. A fermentációk esetében a D-glükóz kiindulási koncentrációja 15 g/L volt. A szénforrást és az egyéb markereket steril törzsoldatokból adtuk hozzá a táptalajhoz. A batch fermentációkat 2,5 L teljes és 2 L hasznos térfogattal rendelkező üvegfermentorokkal végeztük (Sartorius, Göttingen, Németország). A fermentációk szabályozott körülmények között zajlottak- 37°C-on; pH=6,5; betáplált levegő mennyisége=0,5vvm; 30%-os oldott oxigénszint (DO) tartása mellett. Az állandó hőmérsékletet a belső hőcserélő segítségével biztosítottuk, a DO (%) szintet a keverő (6 lapátos Rushton turbina) fordulatszámának változtatásával érték el, a pH szabályozása pedig 3 M-os H₃PO₄ és NaOH oldatok adagolásával történt. A fermentálé párolgásának elkerülése érdekében golyós visszahűtőn (4°C-on) keresztül vezettük át az elmenő levegőt. A tenyészetet a fénytől elzártuk a fermentortest becsomagolásával, vagy folyamatos fehér fényben növesztettük (fényintenzitás: 25 µE m⁻² s⁻¹).

Szilárd táptalajra 1,45x10⁶ db konídiumot oltottunk majd a szélesztés követően sötétben inkubáltuk 37°C-on 5-7 napig.

4.1.4. Anatitikai módszerek

4.1.4.1. Száraz sejttömeg (DCW) meghatározása

A száraz sejttömeg meghatározása 3,5-10 mL fermentléből történt. A micéliumot előre lemért szűrőpapírra vittük, majd vákuum segítségével leszűrtük a folyadék fázist, mostuk és súlyállandóságig szárítottuk 80°C-on. A száraz sejttömeg adatai két különböző mérés átlagából származnak, értékeinek átlagos eltérései nem haladták meg a 14%-ot. A növekedési rátát (g_{DCW}/h) két időpontban levett mintának (mintázási pontokban) DCW növekedéséből számoltuk; a legmagasabb elért értéket tekintettük a tenyészet specifikus növekedési rátájának.

4.1.4.2. D-glükóz meghatározása

A folyékony tenyészetekből vett minták D-glükóz tartalmát HPLC segítségével határoztuk meg. A készülék törésmutató (RI) detektorral rendelkezik. Az elválasztáshoz ioncserélő oszlopot alkalmaztunk (Bio-Rad Aminex HPX-87H+; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), izokratikus elúcióval (10 mM H₂SO₄, 55°C-os kolonna hőmérséklet). A glükóz hasznosítást (g/h) azon két mintavételi pont között számoltuk, ahol a legnagyobb volt a koncentráció csökkenés.

4.1.4.3. Sterigmatocisztin (ST) izolálása és meghatározása

A sterigmatocisztin vegyületet folyékony közegnél (táptalaj+biomassza) 20 mL térfogatú mintákból nyertük ki, etil-acetátos (3x10 mL) extrakcióval. A szerves fázist összegyűjtöttük, majd vákuum bepárló segítségével szárítottuk, végül a mintát 1 mL acetonitrilben oldottuk vissza. Szilárd fázisból történő izoláció során is hasonlóan jártunk el, mint folyadékfázis esetén, annyi eltéréssel, hogy a kivágott agardarabokat felolvasztottuk az extrakciós lépés előtt.

A ST mennyiségének detektálására reverz fázisú HPLC-t (RP-HPLC-UV; HP 1090 Series L/M Liquid Chromatographs, Agilent-Technologies, Waldbronn, Németország) használtunk, mely UV dektorral (245nm-nél mértük az elnyelést) van ellátva. A ST csúcsok azonosítása standard addíciós módszerrel történt, mennyiségét pedig az ST standard oldat 4 pontos kalibrációs egyeneséből számoltuk. Reverz fázisú C18 kolonna segítette az elválasztást, az izokratikus elúció során a mozgófázist víz és acetonitril 4:6 (v/v) arányú, ecetsavval és Na-acetáttal pufferelt elegye alkotta (pH=4,8). Az áramlási sebességet 0,5 mL/percen, a kolonna hőmérsékletét pedig 55°C-on tartottuk.

4.1.4.4. Légzésmérés

Az *A. nidulans* törzsek légzésének vizsgálatát 24 órás korban végeztük el (ekkor volt a legintenzívebb a légzés, de ezen kívül több időpontban is vizsgáltuk a respirációt), AMM2 táptalajon 15 g/L D-glükóz szénforráson. A mérések során Strathkelvin 782 2-Chanel Oxygen rendszert használtunk (Strathkelvin Instruments Kft., North Lanarkshire, Skócia). Az elektróda és termosztált (37°C) mintatartó segítségével 3,5 mL mintából detektáltuk az oxigénfogyasztást. A citokrómoxigénáz légzési lánc szétválasztásához kálium-cianidot (KCN), az alternatív légzés blokkolásához szalicil-hidroxámsavat (SHAM) adagoltunk a mintához. A gátlószereket 10 mM-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A teljes (gátolatlan) légzés a vegyszerek nélkül mért légzési értékek, az alternatív légzési értékek a KCN jelenlétében mért

oxigénfogyasztás mínusz a KCN+SHAM jelenlétében mért fogyasztás. A reziduális légzést a KCN+SHAM jelenlétében mért légzési értékeként definiáltuk. A DCW-t minden mérés után meghatároztuk. A légzési értékeket a Strathkelvin782 Oxygen system számítógépes programjával számoltuk.

4.1.4.5. Genomi DNS izolálás és Southern blot analízis

A tenyészetet miracloth anyagon szűrtük át, majd hideg, steril ioncserélt vízzel mostuk. A vizet alaposan eltávolítottuk és folyékony nitrogénben fagyasztottuk le a mintákat. A sejtfeltáráshoz dörzsmozsarakat használtunk, melyeket szintén folyékony nitrogénnel hűtöttünk. A keletkezett finom törmelékből NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével nyertük ki a genomi DNS-t.

A Southern blot analízis során a Sambrook és Russel (2001) által leírt alapvető eljárást követtük. A DNS mennyiségét NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrofotométerrel (Thermo Scientific) mértük meg. Az agaróz gélelektroforézisnél 5 µg-nyi DNS-t vittünk be a zsebekbe, a digoxigeninnel jelölt specifikus oligonukleotidokat pedig PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) felhasználásával készítettük el, templánként az RDIT 9.32 jelzésű törzs genomi DNS-t használtuk. A hibridizáció eredményét Lumi-Film kemilumineszcens detektáló filmmel (Roche Applied Science) azonosítottuk.

4.2. *Aspergillus* törzsek (CBS)

4.2.1 Alkalmazott törzsek

Az *Aspergillus* törzseket a Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) központtól a kaptuk kísérleteinkhez. A felhasznált 17 törzs a 9. táblázatban található meg.

Faj	Törzs	Hivatkozás
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC1015	Andersen és mtsai., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	CBS513.88	Pel és mtsai., 2007
<i>Aspergillus luchuensis</i>	CBS106.47	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS134.48	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS101740	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus carbonarius</i>	CBS141172	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus aculeatus</i>	CBS172.66	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus versicolor</i>	CBS795.97	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus sydowii</i>	CBS593.65	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	Galagan és mtsai., 2005
<i>Aspergillus oryzae</i>	RIB40	Machida és mtsai., 2005
<i>Aspergillus terreus</i>	NIH2624	Arnaud és mtsai., 2012
<i>Aspergillus fischeri</i>	NRRL181	Fedorova és mtsai., 2008
<i>Aspergillus clavatus</i>	NRRL1	Fedorova és mtsai., 2008
<i>Aspergillus glaucus</i>	CBS516.65	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus wentii</i>	CBS141173	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus zonatus</i>	CBS506.65	de Vries és mtsai., 2017

9. táblázat: A kísérletekben alkalmazott *Aspergillus* törzsek.

4.2.2. Törzsfenntartás

A különböző jelzésű törzseket a CBS-től kapott minimál táptalajon tenyésztettük (10. és 11. táblázat). Az *A. glaucus* esetében a tápközeget nátrium-kloriddal egészítettük ki, 1 M-os koncentrációban. A törzseket 30°C-on növesztettük 4-5 napig, az *A. nidulans*-nál 37°C-on

történt. A hosszútávon történő törzsfenntartás érdekében üveggyapoton átszűrtük a spóraoldatot és 50%-os glicerindatban, -80°C-on tároltuk.

CBS minimál táptalaj összetétele ^a	
Alkotóelemek	Koncentráció (g/L)
NaNO ₃	6
KH ₂ PO ₄	1,5
KCl	0,5
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,5
D-glükóz	10
agar	15
Koncentráció (mL/L)	
Nyomelemoldat	0,2

10. táblázat: CBS minimál táptalaj összetétele.

^a; pH=6

Nyomelemoldat összetétele ^a	
Alkotóelemek	Koncentráció (g/L)
EDTA	10
ZnSO ₄ x7H ₂ O	4,4
MnCl ₂ x4H ₂ O	1,01
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,32
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,315
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x4H ₂ O	0,22
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,47
FeSO ₄ x7H ₂ O	1

11. táblázat: CBS minimál táptalaj nyomelemoldatának összetétele.

^a; pH=4

4.2.3. Kísérleti körülmények

A kísérleteinket kizárólag szilárd MAE táptalajon (12. táblázat, *A. glaucus* gombánál ismét NaCl-ot adtunk a közeghez) végeztük, melyhez légzésgátló vegyszereket adtunk, 10 mM-os végkoncentrációig-KCN, SHAM és KCN+SHAM kombinációkban. A törzseket 30°C-on, 9-12 napig inkubáltuk.

MAE táptalaj összetétele ^a	
Alkotóelemek	Koncentrációk (g/L)
malátakivonat	30
pepton	15
agar	15

12. táblázat: MAE táptalaj összetétele.

^a; pH=5

4.2.4. Analitikai módszerek

4.2.4.1. Növekedési teszt

Agarkorongokat vágunk ki a tenyészetekből és friss MAE táptalajra tettük. 2 napos előnövesztést követően ismét agarkorongokat vágunk ki a tenyészet micéliumos részéből és áthelyeztük a gátlóanyagokat tartalmazó MAE táptalajokra (a kontroll nem tartalmazott légzésgátló anyagokat). Ismét inkubáltuk, majd naponta, meghatározott időpontokban mértük a tenyészetek átmérőjét, valamint fényképezéssel dokumentáltuk a növekedést. Az agarkorong kiindulási átmérője minden esetben 9 mm volt. A mérésekhez a gombák azon tulajdonságát használtuk fel, hogy képesek egyenletes tápanyagellátottságnál (mesterséges) szilárd táptalajon (spóráról, csepről csírázva vagy gombafonal átoltásával) sugárirányú növekedésre, kör alakú kolónia létrehozására. Ennek oka a hifák csúcsnövekedési sajátossága, az optimális tápanyag hasznosításából eredő térkiktöltés.

4.3. *Aspergillus terreus*

4.3.1. Alkalmazott törzs

A munkánk során az NRRL 1960 jelzésű törzset használtuk (13. táblázat), melyet Prof. Peter J. Punt laboratóriumától (Microbiology & Systems Biology, TNO, Zeist, Hollandia) kaptunk.

Törzs	Jellemző	Hivatkozás
NRRL 1960 (CBS 116.46, ATCC 10020)	standard itakonsav túltermelő törzs	Karaffa és mtsai., 2015

13.táblázat: A kísérletekben felhasznált *A. terreus* törzs.

4.3.2. Törzsfenntartás

Az *A. terreus* fonalas gombát komplex táptalajon tartottuk (lásd 14.táblázat) fenn, 30°C-on , 4-5 napig növesztve.

Fenntartó táptalaj összetétele ^a	
Alkotóelemek	Koncentráció (g/L)
D-glükóz	20
kukoricalekvár	20
NaCl	20
Agar	15

14. táblázat: A fenntartó táptalaj összetétele

^a; pH=5

4.3.2. Kísérleti körülmények:

4.3.2.1. Mn mentesítés

A mangánion koncentrációjának csökkentésére Dowex 50 W-X8 (100/200-mesh) kation cserélő gyantával töltött oszlopon engedték át az ioncserélt vizet és a D-glükóz oldatot. Az egyéb komponenseket ebben a vízben oldottuk fel. A végső mangánion koncentrációt $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ törzsoldat segítségével állítottuk be.

4.3.2.2. Tenyésztések

A növekedési tesztet szilárd MAE táptalajon agarkorongos módszerrel végeztük (lásd 12. táblázat, CBS törzsek növekedési tesztje).

Az itkonsav termelés és a Northern blot vizsgálatokhoz Kuenz és társai (2012) által publikált táptalajt alkalmaztuk (15. táblázat, továbbiakban termelői táptalaj). A kísérleteknél 5×10^6 A. terreus konídium / táptalaj mL-jével oltottunk le minden esetben. A tenyésztési körülmények 33°C-on történtek, pH=3-on. A kísérleteknél 18%-os D-glükóz koncentrációt alkalmaztunk. Lombikoknál a rázógép fordulatszámát 100-250 rpm között változtattuk.

RNS izoláláshoz a kísérleteknél 24 H-ig 1% (w/v) D-glicerinnel tartalmú minimál táptalajon növesztettük elő a tenyészetet, majd friss minimál táptalajra mostuk át a gombát, mely szénforrásként 1%-ban (w/v) tartalmazott D-glükózt. 1 H-s inkubálást követően adtuk hozzá különböző kiegészítőket (D-glükóz, D-szorbitol, KCl). A szénhidrátokat 0,1-20%-os (w/v) koncentrációban alkalmaztuk, a KCl végső koncentrációja 1 M volt.

A bioreaktoros tenyésztéseknél 2,5 L teljes, 2 L munkatérfogató üvegfermentorokat (Sartorius, Göttingen, Németország) használtunk, melyek 6 lapátos Rushton-tárcsás keverővel rendelkeznek. A kiindulási pH érték 3 volt, pH szabályozást nem alkalmaztunk. A betáplált levegő mennyiségét 0,75 vvm-re, a hőmérsékletet 33°C-ra állítottuk. Az elmenő levegőt golyós visszahűtőn (4°C) keresztül vezettük át. A különböző DO (%) szinteket állítottunk be a fermentációk során (0-2-30%), melyeket a keverő fordulatszámának változtatásával értünk el. Az optimális tenyésztéshez szükséges paramétereket a fermentor vezérlőegysége szabályozta.

Termelői táptalaj összetétele ^a	
Alkotóelemek	Koncentráció (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,1
NH ₄ NO ₃	3
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1
CaCl ₂ ×2H ₂ O	5
D-glükóz	180
Koncentráció (mg/L)	
FeCl ₃ ×6H ₂ O	1,67
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8
CuSO ₄ ×7H ₂ O	15

15. táblázat: A termelői táptalaj összetétele.

^a; pH=3

4.3.3. Analitikai módszerek

4.3.3.1. Száraz sejttömeg (DCW), D-glükóz, itokaonsav (IA) Mn ion meghatározása

A DCW-t 5-10 ml tenyészetből határoztuk meg, a korábbi fejezetben leírtak szerint (lásd. Anyagok és módszerek; *A. nidulans*). A D-glükóz és az IA mennyiségét HPLC-s módszerrel határoztuk meg, szintén a korábban leírt eszközökkel és paraméterekkel. Mn-ion meghatározás Karaffa és mtsai., (2015) leírtak szerint történt.

4.3.3.2. Légzésmérés

A lombikos kísérletek és a fermentációk során megadott időpontokban mértük a tenyészetek légzését. A mérések során 3,5 mL mintát vettünk, 33°C-on termosztáltuk a légzésmérő celláját (Strathkelvin Instruments Kft., North Lanarkshire, Skócia). A légzés blokkolására KCN-t és SHAM-et alkalmaztunk 10 mM-os végkoncentrációban. A DCW-t minden mérés után meghatároztuk. A respirációs értékeket a korábban leírtak szerint számoltuk (lásd *A. nidulans* fejezet).

4.3.3.3. RNS izolálás, Northern blot

A mintákat miracloth-on szűrtük le, steril hideg vízzel mostuk, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A mintákat folyékony nitrogénnel hűtött dörzsmozsarakban tártuk fel és az RNS-t pedig NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey-Nagel, Németország) segítségével nyertük ki. A RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific) és agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A Northern blot során is a Sambrook és Russel (2001) által leírt alapvető eljárást követtük. A denaturáló agaróz gélelektroforézisnél 5 µg-nyi RNS-t vittünk be a zsebekbe, a digoxigeninnel jelölt specifikus oligonukleotidokat pedig PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) felhasználásával készítettük el, templánként az NRRL-1960 jelzésű törzs genomi DNS-t használtuk. A hibridizáció eredményét Lumi-Film kemilumineszcens detektáló filmmel (Roche Applied Science) azonosítottuk.

4.4. Bioinformatikai elemzés

A nukleotidszekvenciákat National Center for Biotechnology Information (NCBI) és az Joint Genome Institute (JGI) adatbázisokból gyűjtöttük ki.

4.5. Felhasznált vegyszerek

Kísérleteinkben analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk. A táptalajkomponenseket és a finomvegyszereket Sigma-Aldrich Kft.-től, a molekuláris biológiai munka során felhasznált anyagokat pedig a Roche Magyarország Kft.-től szereztük be, minden más eset pedig megemlítésre kerül.

4.6. Reprodukálhatóság

Az publikált eredmények legalább 3-5 független biológiai kísérlet átlagából származnak. Az adatokat SIGMAPLOT programmal (Jandel Scientific, San Jose, CA, USA) értékeltük ki és vizualizáltuk. A kísérletsorozatokon belül standard eltéréseket (SDs) határoztunk meg. A SD eltérés mindig kevesebb volt, mint az átlag 14%-a. Szignifikancia vizsgálatára a légzési értékekben, DCW-ben, valamint D-glükóz koncentrációra a táptalajban az *aodA* mutáns törzsekben (viszonyukat a kontroll törzshöz képest) Student féle t-tesztet végeztünk, a probabilitás adatait (p) az Eredmények fejezetben kerültek feltüntetésre.

5. Eredmények

5.1. *A.nidulans*

5.1.1. A kísérleti stratégia ellenőrzése

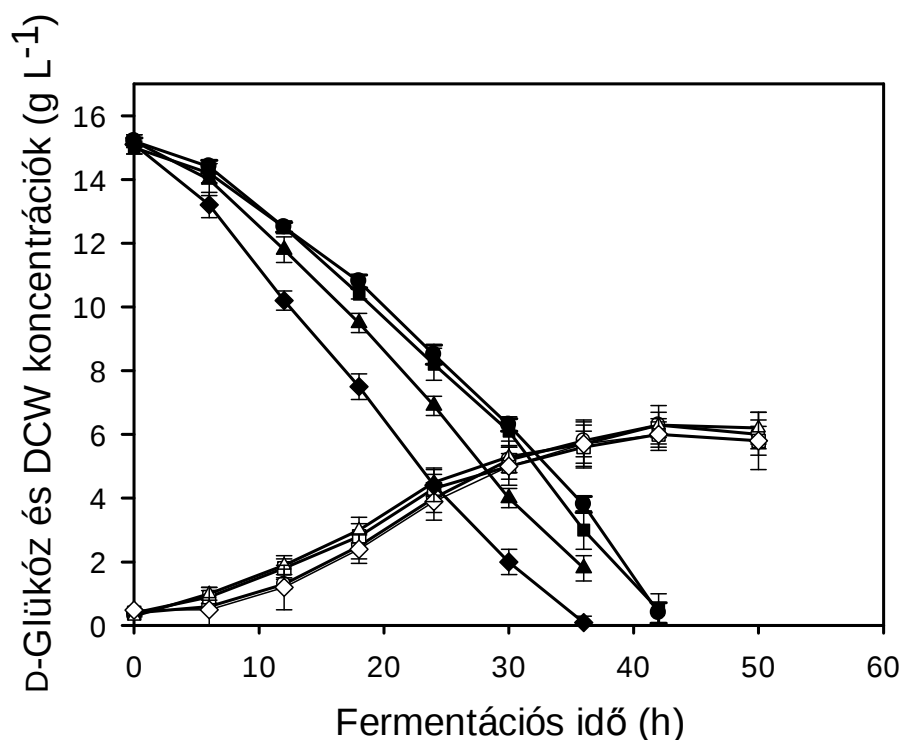
Legelső lépésben az *aodA* gént (locus AN2099) kellett leellenőriznünk, hogy fiziológiailag releváns AOX-t kódol *A. nidulans*-ban, ezért a génre nézve hiánymutáns ($\Delta aodA$) és a túltermelő (OE) törzsek légzését hasonlítottuk össze a vad törzshöz képest (RDIT 9.32). A leoltás követően, 24 H elteltével (exponenciális fázisban) mértük meg a respirációt, mikor a légzési értékek valószínűsíthetően a legmagasabbak (16. táblázat). A hiánymutáns esetében a teljes légzési értékek (minden gátlószer hiányában) csak kis mértékben tértek el a vadhoz képest. Ezzel szemben az OE mutánsok légzési aktivitása megnövekedett értéket ($p < 0.1$) mutatott, mely arányos volt az *aodA* kópiaszámmal. Cianid jelenlétében az oxigén felvételi ráta vad törzsnél ötödére esett vissza, így a teljes légzésnek kb. a 20%-át tette ki a cianid-rezisztens légzés frakciója. A $\Delta aodA$ mutánsnál a légzés drasztikusan lecsökkent cianid jelenlétében: a respirációs értékek $1 \mu\text{M O}_2\text{min}^{-1}\text{gramm}^{-1}$ (száraz sejtmegre vonatkoztatva) alá estek vissza, mely a teljes légzésnek 4%-át tették ki. Másrészt az OE mutánsoknál a cianid-rezisztens légzés megnövekedett ($p < 0.1$) a gátlószer jelenlétében, mely szintén pozitívan korrelált az *aodA* kópiaszámmal. Statisztikailag azonos eredményeket kaptunk függetlenül attól, hogy a tenyészetet fényben vagy sötétben növesztettük. Ennek tükrében azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az *aodA* expressziója nem függ a fény jelenlététől vagy hiányától. Szükségesnek tartottuk az igazolását annak, hogy cianid-rezisztens légzésért az AOX felelős, ezért kísérleteket végeztünk SHAM gátlószer jelenlétében. AOX-függő légzési értékeket a cianid-rezisztens légzésből számoltuk, levonva belőle SHAM és cianid jelenlétében felvett értékeket (Bahr és Bonner, 1973). Tenyésztési körülménytől függetlenül, a reziduális légzés a cianid-rezisztens légzésnek 10 és 15% közötti értékekét tette ki a vad típus esetében (az eredmény nincs feltüntetve). Az *aodA* hiánymutánsnál a SHAM hozzáadása jelentősen nem változtatta meg a cianid-rezisztens légzés oxigénfelvételét, feltehetően azon enzimek miatt, melyek a molekuláris oxigént használják az elektrontarnszeptor láncon kívül. Ezen eredmények alapján az *aodA* egy fiziológiailag releváns, SHAM érzékeny, cianid-rezisztens terminális oxidázt kódol *A. nidulans* gombában, melynek aktivitását meghatározhatjuk a cianid jelenlétében történő oxigén felvétellel.

	idő (h)	vad törzs	<i>aodA</i> hiánymutáns	<i>aodA</i> ⁺ 2 kópia	<i>aodA</i> ⁺ 3 kópia
Teljes légzés ($\mu\text{M O}_2/\text{min/g}_{\text{DCW}}$)	24	20.7 $\pm$ 0.7	19.4 $\pm$ 0.5	25.4 $\pm$ 1.0	30.6 $\pm$ 1.1
	90	8.5 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.1
Cianid-rezisztens légzés ($\mu\text{M O}_2/\text{min/g}_{\text{DCW}}$)	24	4.4 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.3	12.8 $\pm$ 0.5
	90	3.4 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.4
Cianid-rezisztens frakció (%)	24	21.2	4.1	35.8	41.8
	90	40.0	4.7	72.2	86.0

16. táblázat: A teljes- és cianid-rezisztens specifikus légzési ráták és cianid-rezisztens frakciók százaléka *aodA* hiányos és több kópiás *A. nidulnas* mutánsokban a vad törzshöz képest. A 24 és 90 H-s korban mért légzési értékek láthatóak a táblázatban. A tenyésztések folyékony minimál tápközegekben, 15 g/L D- glükózon történtek.

5.1.2. A törzsek biomassza képzése

Mivel az *aodA* overexpresszált (OE) törzsek oxigénfelvétele megemelkedett a vad törzshöz képest, megvizsgáltuk a növekedésüket D-glükózon. A kísérleteink célja az volt, hogy találunk-e eltéréseket a biomassza képzés vagy a szénforrás hasznosítása terén, mely korrelál az *aodA* kópiaszámmal. A törzsek süllyesztett fermentációiból származó kinetikus adatok alapján a fungális biomassza formálásban, valamint ezzel egyidejűleg a specifikus növekedési rátákban nem találtunk szignifikáns eltéréseket a mért pontokban (2. ábra, 17. táblázat).

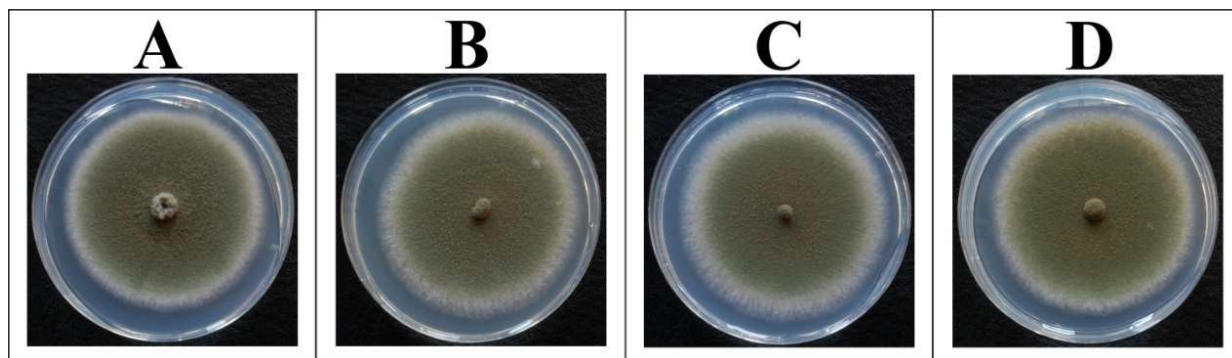


2. ábra: Az *A. nidulans* törzsek növekedésének (fehér és nyitott szimbólumok) és D-glükóz koncentráció (fekete és zárt szimbólumok) változásának időprofilja a süllyesztett fermentációk során, sötétben. A vad típust a körök [●,○], az *aodA* hiánymutánst a négyzetek [■,□], a 2 kópiás mutánst a háromszögek [▲,△], a 3kópiás mutánst a gyémánt [◆,◇] szimbólumok jelölik.

Törzs	Glükóz hasznosítási ráta (gh ⁻¹)	Növekedési ráta (g _{DCW} h ⁻¹)
vad típus (RDIT 9.32)	0.31 ± 0.03	0.15 ± 0.02
<i>aodA</i> hiány (AMZN 3.37)	0.29 ± 0.03	0.14 ± 0.02
<i>aodA</i> ⁺ , 2 kópia (AMZN 4.7)	0.37 ± 0.03	0.15 ± 0.01
<i>aodA</i> ⁺ , 3 kópia (AMZN 5.13)	0.44 ± 0.03	0.15 ± 0.02

17. táblázat: A kísérletek során alkalmazott *A. nidulans* törzsek D-glükóz hasznosítási- és növekedési rátái. A kísérletek minimál táptalajon, 15 g/L kiindulási D-glükóz koncentráción történtek.

Ezeket az eredményeket támasztotta alá fényben, szilárd táptalajon végzett plates kísérleteink, melyeknél a pont-leoltással indított tenyészetek átmérőjét vizsgáltuk (3. ábra).



3. ábra: A tanulmányozott *A. nidulans* törzsek növekedése szilárd táptalajon, fény jelenlétében. A kísérletek minimál tápközegen, 15 g/L D-glükózon történtek. A; vad típus (RDIT 9.32), B; *aodA* hiánymutáns (AMZN 3.37), C; *aodA*⁺, 2 kópia (AMZN 4.7), D; *aodA*⁺, 3 kópia (AMZN 5.13).

Az eredményeink alátámasztják azt a korábbi tanulmányt, amely szerint az *aodA* hiányos törzs hasonló gyorsassággal növekszik, mint a vad (Suzuki és mtsai, 2012). Ezzel szemben a táptalajban maradt D-glükóz koncentrációkban jelentős ($p < 0.1$) eltéréseket találtunk, mely befolyásolta a törzsek D-glükóz felvételi rátáját (17. táblázat). Az *aodA* gén kópiaszáma az OE mutánsokban pozitívan korrelál a D-glükóz felvételével; a cianid-rezisztens alternatív légzés és a D-glükóz felvételi rátája párhuzamosan megemelkedett. Megjegyezendő, hogy a vad és a hiánymutáns törzsnél a reziduális D-glükóz koncentrációkban nincs szignifikáns eltérés, ebből következően az *aodA* gén hiánya nincs hatással a D-glükóz felvételi rátára (17. táblázat). Továbbá statisztikailag hasonló eredményeket kaptunk fény jelenlétében vagy hiányában, ami azt sejteti, hogy az *A. nidulans* növekedését nem befolyásolja a fény (legalábbis ezen kísérleteknél).

5.1.3. Az alternatív oxidáz aktivitás a stacioner fázis késői szakaszában

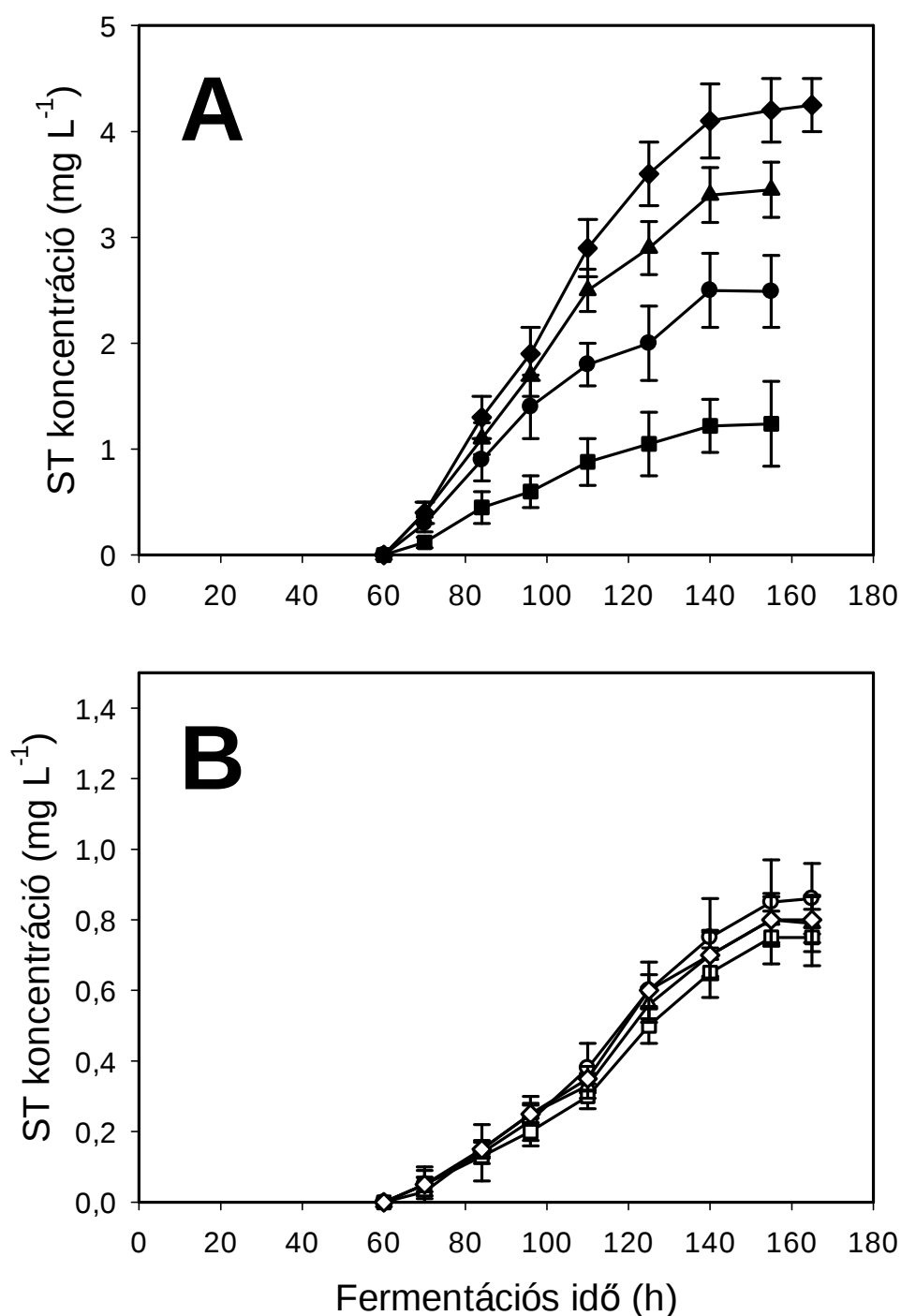
A ST képződés alacsony specifikus növekedési rátán figyelhető meg (Németh és mtsai., 2016). Következésképpen a D-glükózt tartalmazó táptalajon a szénforrás kimerülése után detektálható a ST, a stacioner fázis késői szakaszában. A kísérleteinkben, valamint Németh és mtsai. által alkalmazott körülményeknél az inokulációtól számítva 90 H elteltével érte el a ST képződési ráta a maximumot, a maximális ST koncentrációt pedig 140 H-s korban észleltük batch tenyésztéseknél.

A különböző *aodA* kópiaszámmal rendelkező *A. nidulans* törzsek a szénforrásban kimerült, késői stacioner fermentációs szakasz során mért teljes légzésében jelentős eltérés mutatkozott a 24 H-s korú tenyészetekhez képest (16. táblázat). Mindegyik törzs esetében az

oxigén felvételi ráta csökkenését ($p < 0.1$) tapasztaltuk, bár a változás mértéke függött az *aodA* kópiaszámtól. A vad és a hiánymutáns törzsek légzése 40%-ára, míg az OE törzseknél erőteljesebben csökkenés volt megfigyelhető, a 20%-ára esett vissza a 24 H-s értékekhez képest. A törzsek teljes légzése a gyors növekedési fázisban intenzívebb az *aodA* kópiaszám függvényében, míg a késői stacioner fázisban az OE tenyészetek alacsonyabb légzési értékeket produkáltak, mint a vad tenyészet. Fontos megjegyezni, hogy a cianid-rezisztens légzés az OE tenyészeteknél ebben a növekedési szakaszban jelentősen hozzájárult a teljes légzéshez az exponenciális szakaszban mértékkel ellentétben. Mindazonáltal a cianid-rezisztens frakció közreműködése a teljes légzésben növekedési fázistól függ: mindegyik törzsnél, kivétel az *aodA* hiánymutánsnál, a cianid-rezisztens frakció aránya megduplázódott az exponenciális fázistól (24 H) a késői stacioner fázisig (90 H). A fermentáció késői szakaszában az oxigén felvétel akár 86%-áért a cianid-rezisztens frakció volt a felelős a 3 kópiás törzsnél, míg a vad törzsnél ez az érték megközelítőleg 40%, mely a 3 kópiás tenyészetre volt jellemző 24 H-s korban. A törzsek légzési rátái a késői stacioner fázisban jelentősen lecsökkentek, viszont a cianid-rezisztens terminális oxidáz számottevően hozzájárult a teljes légzéshez az *aodA* kópiaszám függvényében.

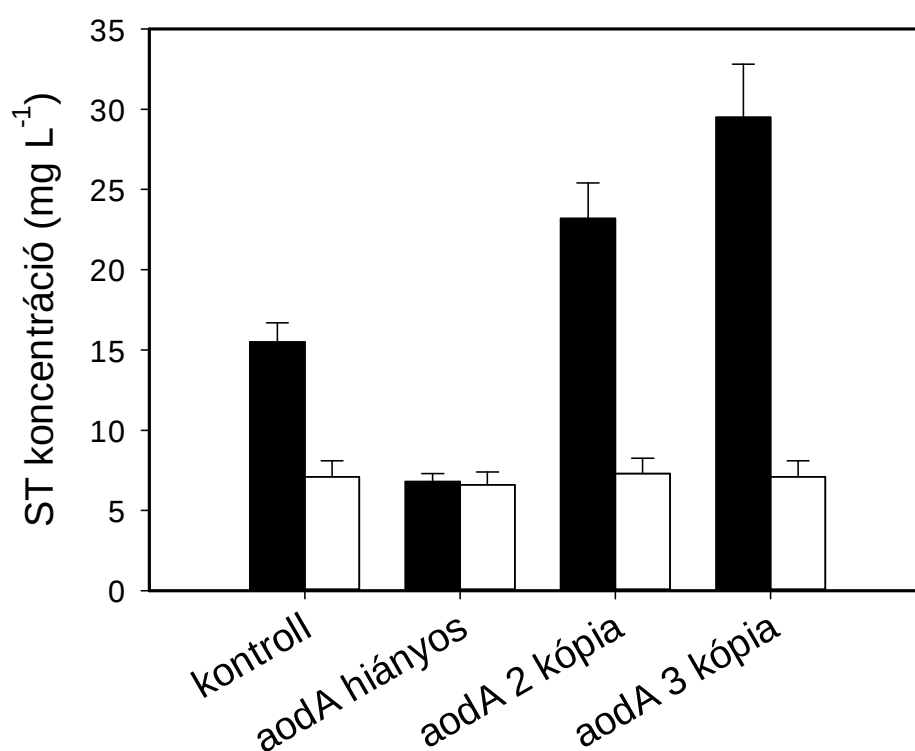
5.1.4. Sterigmatocisztin képződés függ *aodA* kópiaszámtól az *A. nidulans* gombában, de csak fény hiányában

Az *A. nidulans* törzsek növekedésének kinetikája hasonló volt az általunk használt D-glükóz tartalmú minimál táptalajon, míg a glükóz felvételi ráta és az AOX aktivitás a kópiaszámmal arányosan változott, fényhatástól függetlenül. Mivel vizsgálataink arra irányultak, hogy van-e kapcsolat ST képződés és az AOX aktivitás között az *A. nidulans*-ban, ezért detektáltuk a ST koncentráció változását a tenyészetekben (4. ábra). Minőségi oldalról megközelítve, az időprofilok hasonlóak voltak: ST termelést csak a szénforrás (D-glükóz) kimerülése után detektáltunk, a növekedés megszűnését követően. Mennyiségi oldalról nézve pedig statisztikailag szignifikáns különbségeket tapasztaltunk: ST volumetrikus hozama (mgL^{-1}) az *aodA* hiánymutánsnál 50%-kal esett vissza vad törzshöz képest, sötétben tenyésztéskor. Az OE törzsek ST hozama ugyanezen körülmények között megközelítőleg 50-70%-kal meghaladták a kontrollt (vad törzs), szintén korrelációt mutatva a kópiaszámmal. Fontos, hogy az eredmények mást mutattak, mikor fény jelenlétében történtek a tenyésztések: a ST volumetrikus hozama mindegyik tenyészetnél a harmadára esett vissza a kontroll sötétben elért hozamához képest és statisztikailag változatlan maradt függetlenül az *aodA* kópiaszámtól.



4. ábra: ST termelés időprofilja *A. nidulans* sülyesztett tenyészeteknél minimál táptalajon, 15 g/L D-glükóz jelenlétében, sötétben (A; fekete szimbólumok), valamint fényben (B; fehér szimbólumok). A vad típust a körök [●,○], az *aodA* hiánymutánt a négyzetek [■,□], a 2 kópiás mutánt a háromszögek [▲,△], a 3 kópiás mutánt a gyémánt [◆,◇] szimbólumok jelölik. A két ábrán eltérő az y tengely skálája, mivel fényben a ST koncentrációk 1 mgL⁻¹ alatti értékek.

A fény hatását a plates kísérleteink is megerősítették (5. ábra). Bár a ST hozamok jól levegőztetett süllyesztett fermentáció esetében alul maradtak a szilárd közegnél kapott eredményekhez, a tendencia hasonló: sötétben, az *aodA* hiánymutáns 60%-kal kevesebbet, az OE mutánsok pedig többet ($p < 0.1$) termeltek a vad típusnál, valamint a ST megtermelt mennyisége és *aodA* kópiaszáma között pozitív korreláció fedezhető fel. Fényben ez a korreláció nem tapasztalható, mindegyik törzs statisztikailag változatlan mennyiségű mikotoxint termel ($p < 1$), amely megközelítőleg fele a kontroll sötétben termelt ST mennyiségnek. Az *aodA* hiánymutáns, az alternatív légzés hiányában, sötétben vagy fényben sem mutatott jelentős eltérést a ST felhalmozás terén.



5. ábra: *A. nidulans* törzsek sterigmatocisztin termelése platen, sötétben (fekete oszlop ■) és fényben (fehér oszlop □), minimál táptalajon, 15 g/L D-glükóz jelenlétében. A minták a leoltástól számított 5. nap kerültek levételre.

5.2. *Aspergillus* törzsek CBS

5.2.1. *Aspergillus* törzsek növekedési tesztje, légzésgátló vegyszerek jelenlétében

Az általunk vizsgált fajok mindegyike rendelkezett legalább egy (feltételezett) alternatív oxidázt (aox) kódoló génnel (6. ábra). A kontroll tenyészetek többsége gyors, sugárirányú növekedést mutatott, míg *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. wentii* fajoknál lassabb, valamint *A. glaucus*-nál gyenge növekedés tapasztaltunk (6. ábra). Fontos megjegyezni az *A. aculeatus* kivételével, a legintenzívebb növekedés minden esetben a gátlószer nélküli tenyészeteknél volt megfigyelhető.

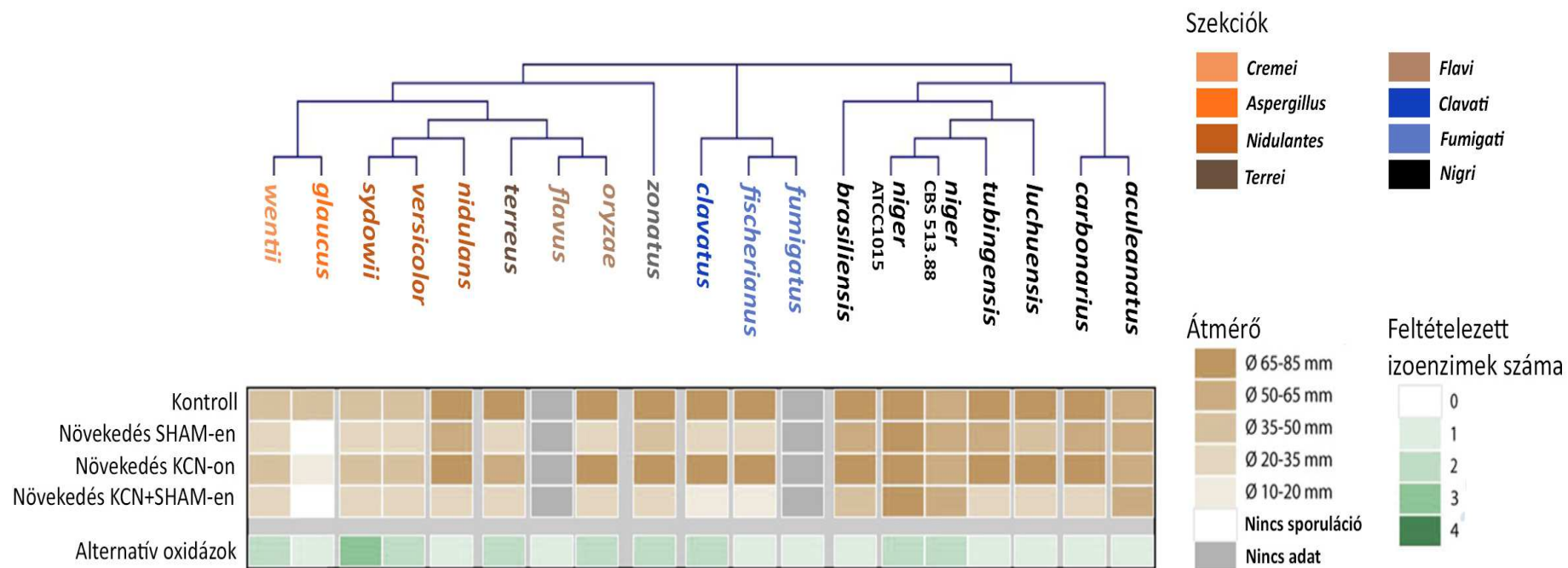
A növekedési tesztek alapján az *Aspergillus* fajok jól növekednek kálium-cianid (KCN) jelenlétében, mely a mitokondriális elektronszállítási láncot blokkolja, de különbségek is fellelhetők: *A. niger* törzsek, *A. terreus*, *A. carbonarius*, *A. nidulans*, *A. fischeri*, *A. tubingensis*, *A. luchuensis* növekedése ellentétben a további törzsekkel, megközelítőleg egy napos késéssel maradt el a kontrolljukhoz képest (részletes növekedési görbék a Függelék fejezetben találhatóak meg). Minimális gyarapodás volt detektálható az *A. glaucus* tenyészetekben. A kontroll után átlagosan a KCN tartalmú táptalajon gyarapodott legjobban az átmérő, mely az aktív cianid-rezisztens légzés meglétére enged következtetni.

Szalicil-hidroxámsav (SHAM) hozzáadásánál az alternatív oxidáz gátlása a növekedés jóval visszaesett a kontrollhoz és a KCN-os kezeléshez képest, viszont még mindig jelentősebb volt a növekedés, mint az KCN+SHAM kezeléssel tenyésztetknél. *A. versicolor* tenyészet átmérőjének csekély gyarapodása volt megfigyelhető, valamint az *A. glaucus* gombánál SHAM jelenlétében számszerűsítve ezt az értéket, 0 volt. *A. aculeatus* esetében a SHAM tartalmú táptalajon a tenyészet gyarapodás megközelítette a kontrollét.

Leggyengébb növekedés kivétel nélkül KCN+SHAM jelenlétében volt. Az *A. niger* törzsek, *A. terreus*, *A. carbonarius*, *A. luchuensis* gombáknál rapid gyarapodás történt még a két légzésgátló jelenlétében is, a többi *Aspergillus* törzshöz képest. Az *A. glaucus* ezen körülmények között is képtelen volt növekedni.

5.2.2. A törzsek konidiospóra képzése

Laboratóriumi körülmények között a tömlősgombákra az ivartalan konidiospóra képzése jellemző. Az *Aspergillus*oknak mikroszkóppal is jól felismerhető konídiumtartójának képlete, valamint konidiospóráinak színe gyakran szabad szemmel is észlelhető (vizuális értékelés lehetősége). A szilárd táptalajos kísérleteknél figyelemmel kísértük az egyes tenyészetek konidiospóra megjelenését is (18. táblázat).



6. ábra: Az *Aspergillus* fajok növekedése szilárd táptalajon, kópiaszám függvényében.

Sporuláció				
Faj	kontroll	KCN	SHAM	KCN+SHAM
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC1015)	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i> (CBS513.88)	+	+	+	+
<i>Aspergillus tubingensis</i>	+	+	+	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus carbonarius</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus aculeatus</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus luchuensis</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus sydowii</i>	+	+	+	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus terreus</i>	+	+	+	-
<i>Aspergillus fischeri</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus clavatus</i>	+	+	+	-
<i>Aspergillus glaucus</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus wentii</i>	+	+	+	-
<i>Aspergillus zonatus</i>	-	-	-	-

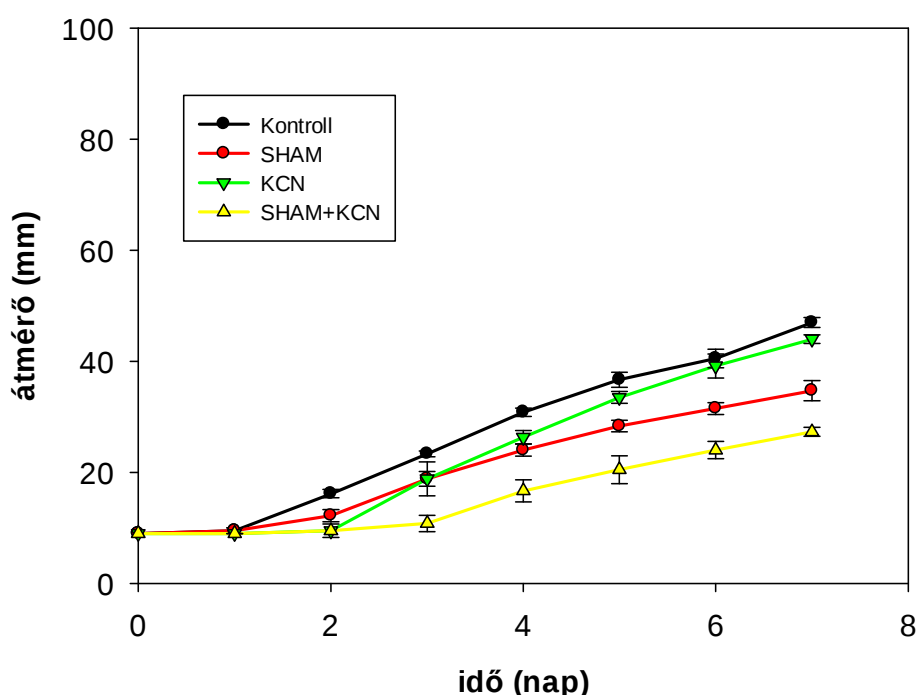
18. táblázat: A törzsek konidiospóra képzése, +; spórázott, -; nem képzett spórát.

Az *A. niger* törzsek és az *A. carbonarius* minden körülmény között tudott spórát képezni. Az *A. vesicolor*, *A. glaucus*, *A. fischeri*, *A. zonatus* gombákon egyáltalán nem jelent meg a konidiospóra, még a kontrollnál sem. Az *A. brasiliensis*, *A. aculeatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae* SHAM tartalmú táptalajon nem képzett spórát, minden más esetben pedig igen. *A. luchuensis* tenyészetén 10 nap elteltével vált vizuálissá a konidiospóra. Az *A. sydowii*, *A. tubingensis*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. wentii* mikrobáknál csak a KCN+ SHAM jelenlétében maradt el a spórázás (18. táblázat).

5.3. *Aspergillus terreus*

5.3.1. *A. terreus* növekedése KCN és SHAM jelenlétében

Elsőként megvizsgáltuk az *A. terreus* NRRL-1960 jelzésű törzsének a növekedését légzésgátló anyagok jelenlétében. Amennyiben a gomba képes növekedni KCN-on, feltételezhető az aktív AOX protein jelenléte. A KCN-ot és SHAM-at vagy kombinációjukat 10 mM-os koncentrációban alkalmaztuk. Hasonló eredményt kaptunk, mint az előzőleg tesztelt NIH2624 törzsnél (7. ábra): a kontroll tenyészet átmérője gyarapodott a leggyorsabb ütemben, majd két napos csúszással SHAM-on és KCN-on is megindult a növekedés. Lassú gyarapodás volt észlelhető SHAM+KCN jelenlétében. A végső átmérőben az egyes sorozatoknál a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérés mutatható ki ($p < 0.1$).



7. ábra: *A.terreus* növekedési görbéje szilárd MAE táptalajon, 10mM-os légzésgátló vegyszerek jelenlétében. A görbék azonosítója az ábrán látható.

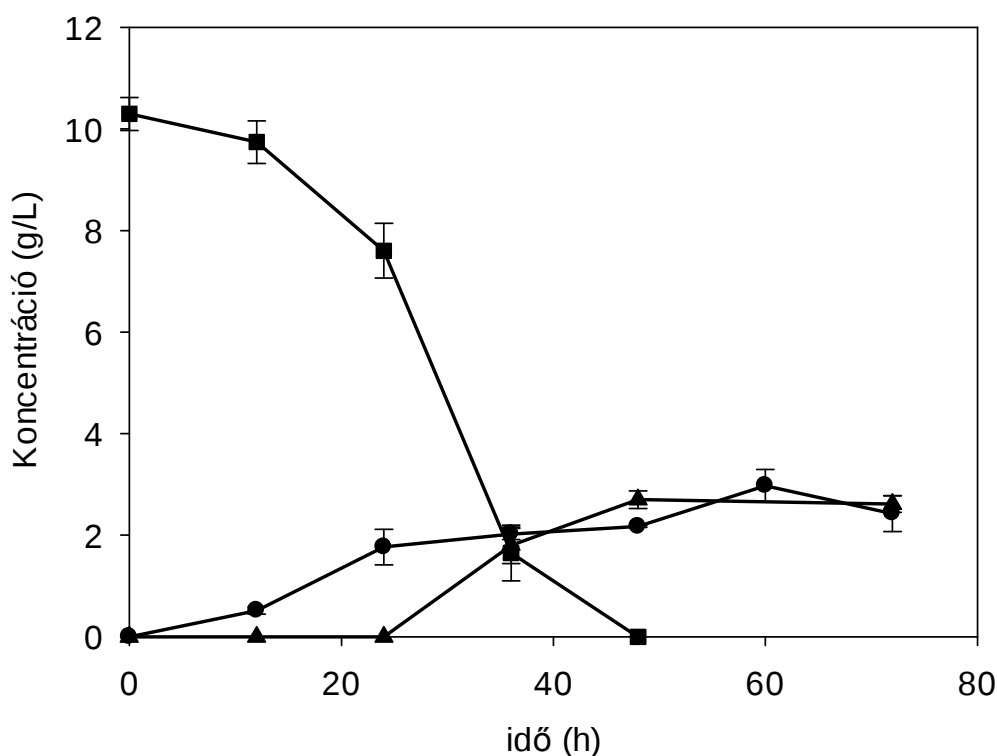
5.3.2. Itakonsav fermentációk

5.3.2.1. Előzmények: lombikos kísérletek

A táptalajok a tenyésztéseknél minden esetben Mn^{2+} limitáltak voltak ($Mn^{2+} < 4\mu g/L$), elősegítve a jobb hozam elérését (Karaffa és mtsai., 2015). Első lépésben rázatott lombikos kísérleteket indítottunk, melynek során különböző rpm-et állítottunk be. Az IA lombikban történő termelésénél 250 rpm-et alkalmaztunk, mely szükségesnél intenzívebb

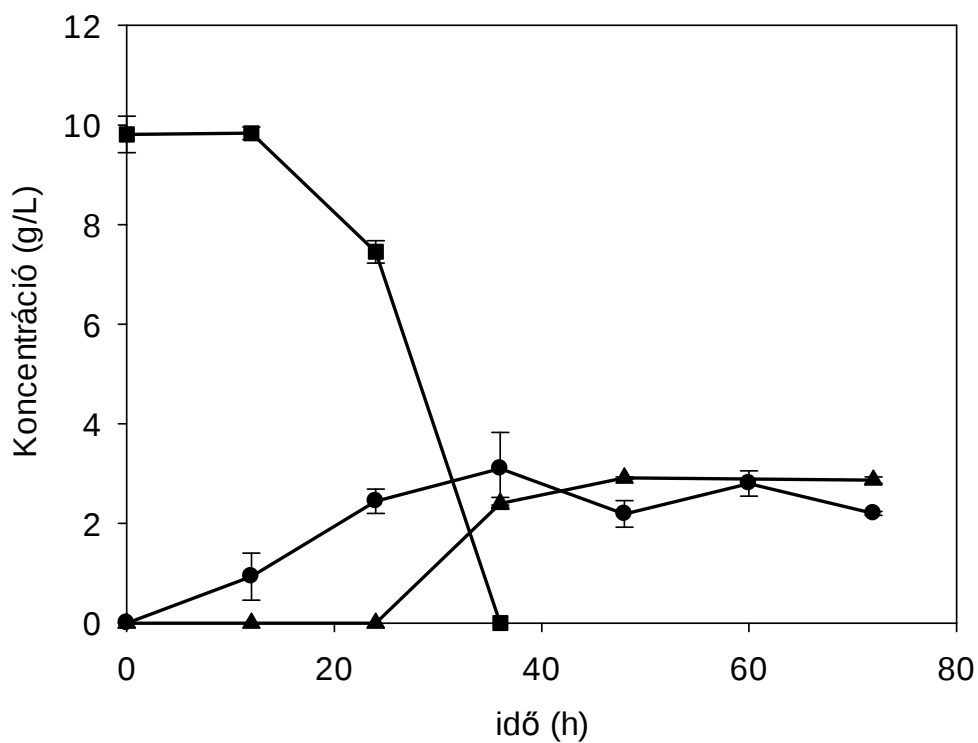
oxigénellátottságot biztosít a tenyészet számára a szerves sav előállításához (saját tapasztalatunk)-ezzel definiálva magas DO (%) szintet. Alacsonyabb fordulatszám alacsonyabb DO (%) szintet eredményez, így 100 rpm-en határoztuk meg a rázatást (Kuenz és mtsai.(2012) 120rpm-en végezték kísérleteiket, magas IA titert elérve).

Alacsonyabb és magasabb DO (%) szinten is szintetizált IA-t az *A.terreus* (8. és 9. ábra). A képződött biomassza végső koncentrációjában (~ 3g/L) statisztikailag számottevő eltérés nem találtunk, a DCW gyarapodás valamivel lassabban indult meg az alacsonyabb DO (%) szinten. A görbék alapján a D-glükóz felvételében volt tapasztalható különbség. Megemelt DO (%) szint emelkedett D-glükóz felvételi rátát eredményezett ($0.62 \pm 0.01 \text{ gh}^{-1}$), míg a másik esetben lassabbat ($0.49 \pm 0.04 \text{ gh}^{-1}$), az adatok statisztikailag szignifikáns elérést mutattak ($p < 0.1$).

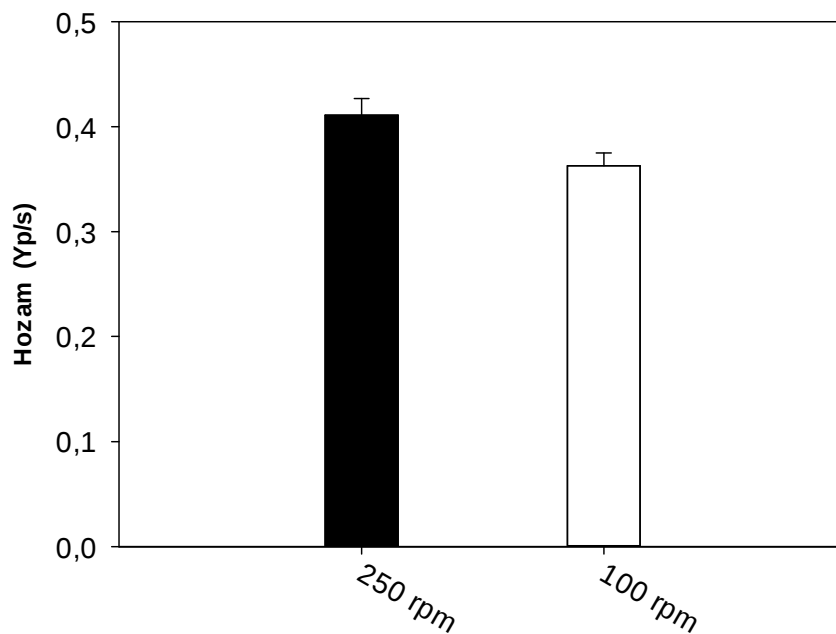


8. ábra: IA termelés időprofilja *A. terreus* süllyesztett tenyészeteknél, termelői táptalajon, 100 rpm-en, 10 g/L D-glükóz jelenlétében, a biomasszát a fekete kör [●], a D-glükóz koncentrációt a fekete négyzet [■], az itakonsavat a fekete háromszög jelöli [▲].

Az IA mennyisége mindkét tenyészetben 36. H-nál jelent meg és az idő előrehaladtával a koncentrációja növekedett. A legmagasabb titer a 48. H-ra keletkezett. Moláris hozamok (10. ábra) terén a két tenyészet között jelentős különbség mutatkozott ($p < 0.1$).



9. ábra: IA termelés időprofilja *A. terreus* süllyesztett tenyészeteknél, termelői táptalajon, 250 rpm-en, 10 g/L D-glükóz jelenlétében, a biomasszát a fekete kör [●], a D-glükóz koncentrációt a fekete négyzet [■], az itakonsavat a fekete háromszög jelöli [▲].

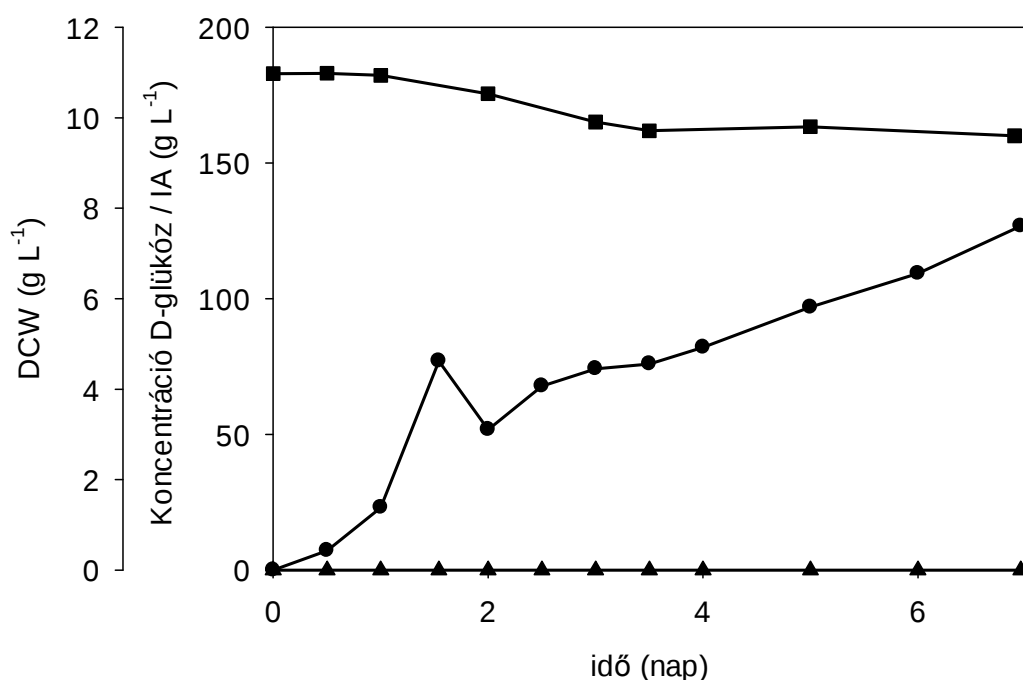


10. ábra: IA hozam a 250- és 100 rpm-en rázatott lombikok esetében, termelői táptalajon, 10 g/L D-glükóz jelenlétében, a fekete oszlop a 250 rpm-en elért hozam (■) és fehér oszlop 100 rpm-en (□).

A lombikos tenyésztésnél fermentációs szempontból fontos paramétereknek (DO (%), pH) a finom szabályozása és nyomonkövetése nem lehetséges, viszont az eredményei elmozdították a jól kontrollált körülmények között történő fermentoros tenyésztés irányába a kísérleteinket.

5.3.2.2. Az itakonsav hozama függ az oldott oxigénszinttől és az AOX aktivitástól

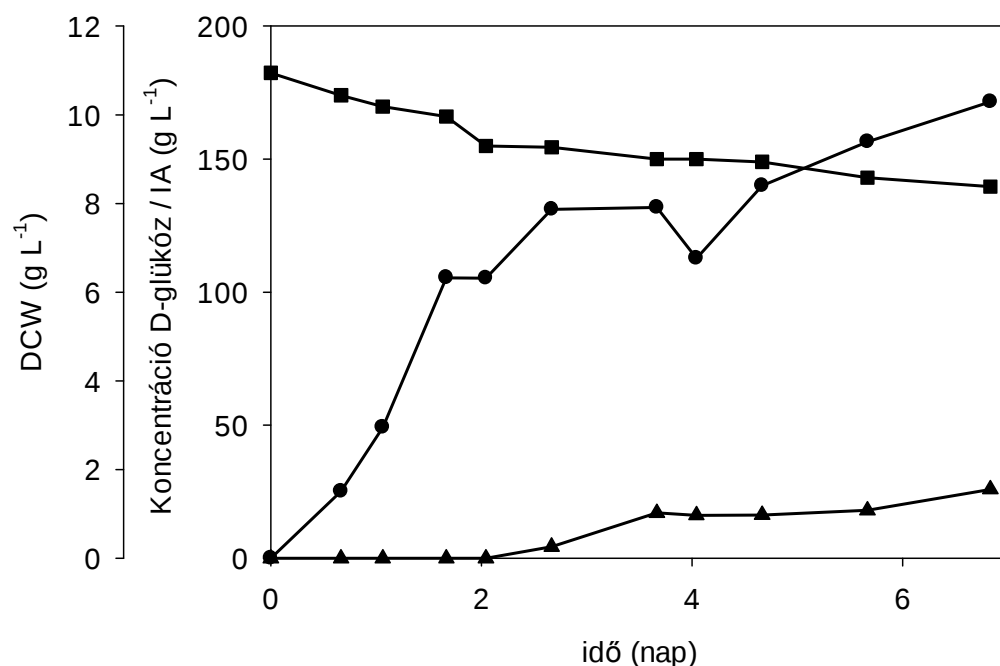
Szubmerz tenyésztésnél lehetőségünk nyílik a paraméterek állandosításával kizárni a környezeti tényezők befolyását a szerves sav produkcióra. Kísérleteinkben különböző DO (%) szinteket állítottunk be a fermentor vezérlőegységének segítségével.



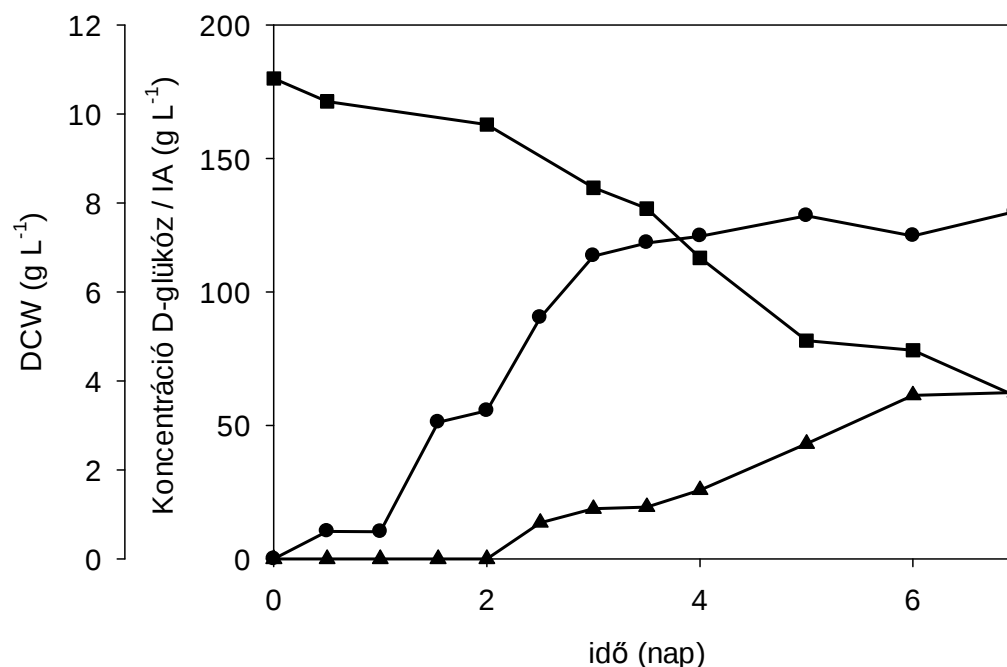
11. ábra: IA termelés időprofilja *A. terreus* sülyesztett tenyészeteknél, termelői táptalajon, szabályozatlan DO szint mellett, 180 g/L D-glükóz jelenlétében, a biomassát a fekete kör [●], a D-glükóz koncentrációt a fekete négyzet [■], az itakonsavat a fekete háromszög jelöli [▲].

0%-os DO szintnél (11. ábra) a tenyészetre lassú glükózfelvétel volt jellemző, 7 nap elteltével sem esett a szénforrás koncentrációja 150 g/L alá. A DCW változását lassú, ám folytonos növekedés jellemezte, a felvett szénforrás biomassza formálásra fordítódott. A klasszikus növekedési fázisokat nem tudtuk elkülöníteni ebben az esetben. IA-t 7. napon sem detektáltunk.

2%-os DO szintnél (12. ábra) eltérő fermentációs profilt kaptunk, mint 0%-nál. A tenyészet valamivel gyorsabban hasznosította a D-glükózt, melynek eredményei a biomassza



12. ábra: IA termelés időprofilja *A. terreus* sülyesztett tenyészeteknél, termelői táptalajon, DO (%)= 2 mellett, 180 g/L D-glükóz jelenlétében, a biomasszát a fekete kör [●], a D-glükóz koncentrációt a fekete négyzet [■], az itakonsavat a fekete háromszög jelöli [▲].



13. ábra: IA termelés időprofilja *A. terreus* sülyesztett tenyészeteknél, termelői táptalajon, DO (%)= 30 mellett, 180g/L D-glükóz jelenlétében, a biomasszát a fekete kör [●], a D-glükóz koncentrációt a fekete négyzet [■], az itakonsavat a fekete háromszög jelöli [▲].

gyarapodása és az IA megjelenése a fermentáléban (megjegyezendő, hogy a D-glükóz koncentrációja 7.napon esett 140g/L alá). Az IA-t 48 H után tudtuk detektálni, mennyisége idővel emelkedett a folyékony közegben, ám a 4. naptól a felvett D-glükóz mennyisége nem arányos a keletkezett IA koncentrációval, így látható, hogy a szénforrás konverziója nem a szerves savban, sokkal inkább a biomassza növekedésben nyilvánult meg, hasonlóan, mint a 0%-os DO szintnél.

Legmagasabb IA titert 30%-os oldott oxigénszint mellett tudtunk elérni (13. ábra). A fermentációs profilban látható, hogy 3,5. naptól a biomasszát minimális gyarapodás jellemezte és a 7. naptól kevesebb, mint 1 g/L-el gyarapodott (a citromsav és itakonsav termelésnél a száraz sejtömeg mennyiségének kontrollja nagyban befolyásolja a hozamot). 30%-on a D-glükóz felvétele is gyorsabb volt, mint a másik két esetben (ahol a D-glükóz koncentrációk nem esettek 130g/L) alá. Hasonlóan a 2%-os DO szinthez, 48 H után tudtunk IA kimutatni a tenyészetből, viszont a végső koncentrációja kb. 2x-e lett, mint az alacsonyabb DO (%) szinten.

A moláris hozamok jelentős eltérésekre reflektáltak (19. táblázat): DO (%) szint kontrollálása nélkül nem tudtunk hozamot produkálni IA-ra nézve (fontos megjegyezni, hogy 7 napos fermentációs időn belül, mely nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a későbbi időpontban az IA megjelenhet a fermentáléban). A megfelelő oxigéntenziónál közel 50%-os hozam produkálható (szénforrás még nem merült ki, így elméletben magasabb hozam is elérhető). Az oxigén limitációt még elkerülve, viszont alacsony szinten tartva a DO (%) -t a moláris hozam kb. 40%-kal csökkenhet, a megemelt szinthez képest. Az oldott oxigénszint és a moláris hozamok között korrelációt lehet felfedezni: magasabb szint tartása magasabb hozamot eredményezhet.

DO (%)	0	2	30
Hozam (Yp/S)	0	0.19	0.47

19. táblázat: IA hozamok különböző DO (%) szintek esetében, 7 nap után.

A tenyészetek respirációjában is különbségeket találtunk (20. táblázat). A táblázatban a 40 H és 140 H-s légzési értékeket tüntettük fel. Kísérletünk (lásd Függelék, F19. ábra) során azt tapasztaltuk, hogy a legintenzívebb légzés (mind teljes és cianid-rezisztens) 24 és 48 H között detektálható (a tenyészet ekkor exponenciális növekedési fázisban van), majd ezt követően a légzési értékek csökkenés volt megfigyelehető a fermentációk végéig. Minél magasabb volt az DO (%) szint a fermentációnál, annál magasabbak voltak a tenyészetek respirációs értékei. Legalacsonyabb intenzitása a teljes légzésnek 0%-on volt megfigyelhető: a 30%-os DO-nál az értékek 60%-ára, 2%-osnál pedig 46,4%-ára csökkent. A cianid-rezisztens légzést mindegyik esetben detektáltunk, jelentősége a korai növekedési fázisban a magasabb DO (%) szintnél volt (a légzés közel 40%-át adhatta a cianid-rezisztens frakció). Megközelítőleg a 6. naptól az alacsonyabb DO (%) szinten emelkedett meg az alternatív légzés kapacitása, a teljes respiráció közel 44%-át tette ki. Érdekes, hogy 2%-os szintnél 6. naptól az AOX aktivitása visszaesett, a cianid-rezisztens frakció csak a 4%-ot adta légzésnek.

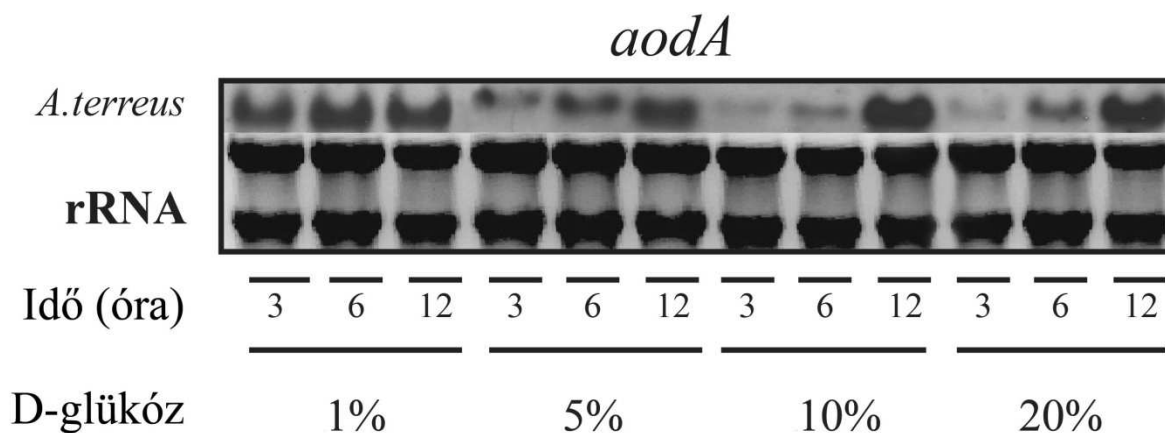
Az AOX emelkedett aktivitásához elegendhetlen a magas oxigéntenzió, vélhetően már a korai termelői fázisban is részt vesz az alternatív respiráció. Az eredmények tükrében az lehet a sejtésünk, hogy DO (%) szint meghatározza a tenyészetnek a respirációs értékeit, egyben az AOX működését is, befolyásolva így az IA hozamot, tehát az AOX aktivitás és IA hozam között korreláció van.

	idő (h)	DO(%)=0	DO(%)=2	DO(%)=30
Teljes légzés	40	55.68	103.7	136.6
($\mu\text{M O}_2/\text{min/g}_{\text{DCW}}$)	140	23.39	12.2	27.72
Cianid-rezisztenslégzés	40	11.24	30.8	55.39
($\mu\text{M O}_2/\text{min/g}_{\text{DCW}}$)	140	10.4	0.96	5.9
Cianid-rezisztens frakció (%)	40	20.18	29.7	40.55
	140	44.4	7.37	21.28

20.táblázat: A teljes- és cianid-rezisztens specifikus légzési ráták és cianid-rezisztens frakciók százaléka *A. terreus* szülyesztett fermentációk során, különböző DO (%) szinteknél, termelői táptalajon, 180 g/L D-glükózon. A táblázatban a 40 H és 140 H-s értékeket tüntettük fel.

5.3.3. Az *aodA* és *aodB* gén expressziós profil

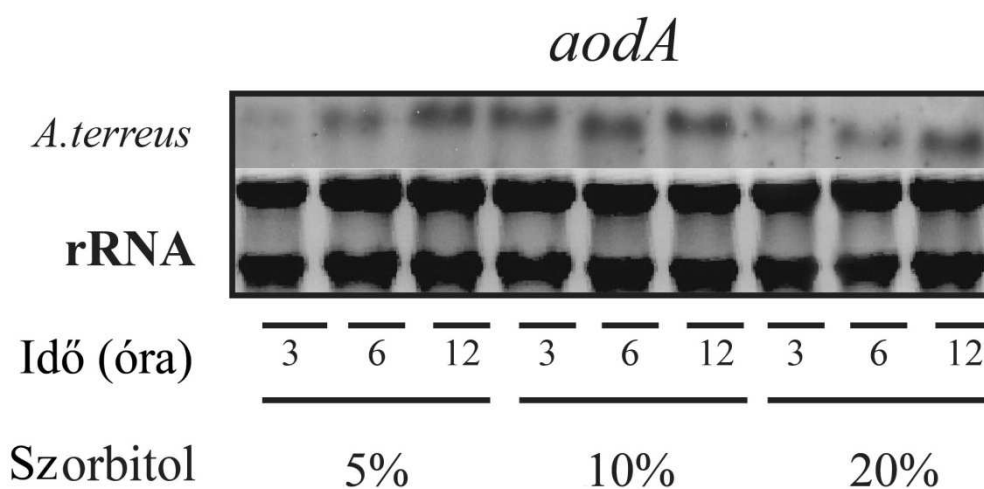
A D-glükóz, D-szorbitol, valamint KCl jelenlétében vizsgáltuk a feltehetően AOX-t kódoló gének expresszióját.



14. ábra: Az *aodA* gén expressziós profilja különböző D-glükóz koncentrációknál, termelői táptalajon.

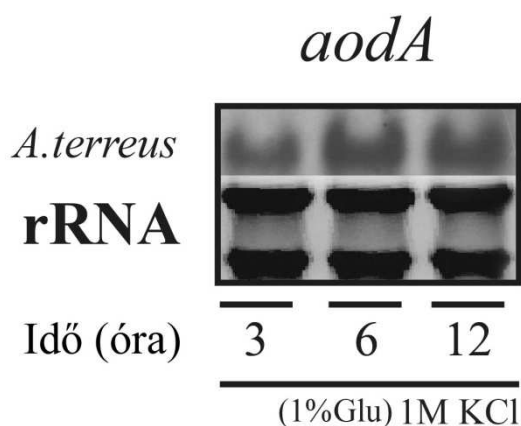
Az *aodA* mindegyik D-glükóz koncentrációnál és időpontban expresszáldott (14. ábra). 1%-nál erőteljes expressziót detektáltunk, mely eltérő mintázatot mutatott a magasabb koncentrációkhoz képest. 5, 10 és 20%-nál a 3. és 6. órában gyengébb kifejeződés látható, míg 12. órában már jelentősebb az mRNS mennyisége. 10 és 20%-os D-glükóz koncentráció megfelel az IA előállítás szénforrás koncentrációjára vonatkozó kritériumnak (és a kísérletek is termelői táptalajon történtek), így a Northern blot eredményéből feltételezhetjük az *aodA* gén expressziós profilját termelői körülmények között. IA fermentációinknál (180 g/L D-glükóz kiindulási koncentrációnál) kapott expresszió mintázat azonos a 20%-ossal, valamint 24 órában is ki tudtunk mutatni mRNS-t (kép nem került feltüntetésre). Ez annak a sejtésnek engedhet teret, hogy az *aodA* gén az IA fermentáció alatt konstitutívan expresszáldik. A magasabb szénforrás koncentrációknál észrevehető, hogy az idő előrehaladtával egyre több génterméket tudtunk azonosítani. Az *aodB* gén vizsgálatakor ugyanezen körülmények és időpontok között nem tudtunk génexpressziót kimutatni.

D-szorbitolt használtunk az ozmotikus sokkhatás kiváltására (15. ábra). A cukoralhoholt szintén magas koncentrációkban (5-20%) alkalmaztuk. Az *aodA* expressziós mintázata hasonló a D-glükózéhoz: a későbbi mintavételezési pontokban erősebb jelet detektálhatunk, mint a korábban. Szembetűnő viszont, hogy jóval kevesebb mRNS-t tudtunk kimutatni, mint a D-glükóznál. Az *aodB* gén ezen körülmények között sem expresszáldott.



15. ábra: Az *aodA* gén expressziós profilja különböző D-szorbitol koncentrációknál, termelői táptalajon, 10 g/L-es D-glükóz szénforráson.

1 M-os KCl-nál továbbra is csak az *aodA* génterméket tudtuk azonosítani, az *aodB* gén nem expresszálódott (16. ábra). Erős kifejeződés volt megfigyelhető mindegyik időpontban, viszont megjegyezendő, hogy a mintázat hasonlít az 1%-os D-glükózéhoz.



16. ábra: Az *aodA* gén expressziós profilja 1 M-os KCl koncentrációknál, termelői táptalajon, 10 g/L-es D-glükóz szénforráson.

A D-szorbitolon és KCl-on végzett Northern analízis mellé számszerűsített légzésértékeket is kapcsoltunk (21. táblázat), vizsgálva a cianid-rezisztens légzés kapacitását (különböző koncentrációjú D-glükózon a fermentációknál már volt adatunk, lásd pl. Függelék F19. ábra).

	idő (h)	5% D-szorbitol	10% D-szorbitol	20% D-szorbitol	1M KCl
Teljes légzés ($\mu\text{M O}_2/\text{min/g}_{\text{DCW}}$)	3	7.7 ± 1.0	5.4 ± 1.2	8.4 ± 0.5	17.1 ± 0.9
	6	13.7 ± 0.9	6.9 ± 2.6	7.8 ± 0.2	21.3 ± 2.2
	12	12.5 ± 1.7	12.0 ± 3.5	14.4	23.3 ± 1.2
Cianid-rezisztens légzés ($\mu\text{M O}_2/\text{min/g}_{\text{DCW}}$)	3	-	0.4	-	-
	6	0.4	-	0.5	0.6
	12	1.5	-	-	0.5

21. táblázat: *A. terreus* légzési értékei D-szorbitolon és KCl-on, termelői táptalajon, 10 g/L D-glükóz jelenlétében.

A D-szorbitol koncentrációjától függetlenül a teljes respirációs értékek időben növekedést mutattak, a legmagasabb értéket minden esetben a 12 H-s korra érték el, nagyságrendi különbségeket nem találtunk közöttük. Érdekes, hogy minimális cianid-rezisztens légzést tudtunk mérni, az AOX kapacitásának ezen körülmények között úgy tűnik nincs jelentősége. KCl-on a későbbi mintákban szintén emelkedés volt megfigyelhető a teljes légzési kapacitásban, viszont hasonlóan az előbb említett körülményekhez, nem tudtunk vagy minimális alternatív légzési kapacitást detektáltunk.

6. Diszkusszió

(1.) Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójában található potenciális AT termelő gombák- pl. az *A. flavus* és *A. parasiticus*- egynél több *aod* génnel rendelkeznek (nem publikált adatunk), az *A. nidulans* esetében csak egy alternatív oxidázért felelős gént találtak (Tanton és mtsai., 2003; Suzuki és mtsai., 2012). Kísérleteink megerősítették, hogy az *aodA* kópiaszáma pozitívan korrelál a cianid-rezisztens, SHAM érzékeny alternatív légzés kapacitásával. Munkánkban a különböző *aodA* kópiaszámmal rendelkező törzseknél az expersszió az eredeti promoter segítségével történt, lehetőséget adva arra, hogy egy ideális rendszert állítsunk fel a sterigmatocisztin szintézis és alternatív oxidáz aktivitás kölcsönhatásának tanulmányozására.

Nemrég publikált eredmények szerint a nitrát-indukálható promotert használó, szabályozatlan deregulációja az AOX-nak negatív hatással volt az ST hozamra. (Leiter és mtsai., 2016). Hasonlóan, a *Pichia pastoris* élesztőben arra a következtetésre jutottak, hogy általában a mesterséges AOX overexpresszálása negatív hatású, mely a kódoló gén precíz regulációjára hívja fel a figyelmet (Kern és mtsai., 2007). Továbbá megemlítenéd, hogy a nitrát gátolja az AT termelést sok *A. flavus* és *A. parasiticus* törzsben (Klich 2007; Luchese és mtsai., 1993). Laboratóriumi *A. nidulans* törzsnél (melynél ismert a származási vonal, ellenben a természetben előforduló izolátumoknál), azt találták, hogy az ammónium tartalmú táptalaj ST termelést eredményezett sülyesztett tenyészetekben, míg ugyanaz a táptalaj nitráttal nem (Morrice és mtsai. 1998). Kísérleteinkben az AOX gén overexpressziójának egy finomabb módszerével (saját promoterét alkalmazva) vizsgáltuk a kópiaszám viszonyát a ST mikotoxin termeléshez, jól definiált, ammónium tartalmú szintetikus minimál táptalajon, szénforrásként pedig D-glükózt adva a tenyészethez, körültekintően kontrollált fermentációs körülmények között.

A fermentációk kinetikus adatai jól mutatják, hogy a ST produkció a külső szénforrás (D-glükóz) kimerülése után indult meg, következésképpen a ST bioszintézis alapja a tartalék szénforrás lebontása. Egyes irodalom szerint a tartalék lipidek játszanak kiemelkedő szerepet a ST/AT bioszintézisben (Fanelli és Fabbri 1989). A lipidek az *Aspergillus*-szal szennyezett magokban megemelik a mikotoxin hozamát növényeken (Maggio-Hall és mtsai., 2005). A vegetatív eredetű, olajtalanított szubsztrátok jelentősen kevesebb AT-t eredményeznek, de ez a hatás megfordítható növényi olaj hozzáadásával (Ma és mtsai., 2015). A β -oxidációban a zsírsavak acetyl-KoA-vá történő degradációja megkönnyíti a peroxisómákban a korai ST intermedierek képződését *A. nidulans*-nál (Kistler és mtsai., 2015; Keller 2015). A zsírsavak és a poliketid típusú szekunder metabolitok (mint a ST is) között mély kapcsolat leledzik. A

bioszintézisükben az acetyl-CoA és malonyl-CoA, mint építőegységek vesznek részt, anabolikus redukáló ágensként a NADPH-nak van jelentősége és az első lépést a zsírsav-szintáz (EC 2.3.1.85) katalizálja (Brown és mtsai., 1996). *A. versicolor* gombánál a zsírsavak a gyors növekedési fázisban képződtek, majd a külső szénforrás kimerülését követően a zsírsav készletet felhasználva tartotta fenn a stacioner növekedést, egyidejűleg a ST képzéssel (Chavant és mtsai., 1977). Az *A. versicolor*, mint fő forrása a ST szennyezésnek az élelmiszereknél és állati takarmányoknál, közelebb rokonságban áll az *A. nidulans* gombafajjal, mint más *Flavi* szekcióba tartozókkal és a ST génklaszter teljesen konzervatív a két faj esetében (De Vries és mtsai., 2017).

A *Sordariomycetes* osztályba tartozó *Acremonium chrysogenum* tömlősgombánál az AOX aktivitást erősen stimulálta, ha a cukor alapú táptalajt növényi olajjal egészítették ki, magával vonzva a cephalosporin C produkció növekedését (Karaffa és mtsai., 1999). *Podospora anserina* esetében az AOX overexpressziója (saját promotérével) a tartalék zsírsavak koncentrációjának növekedését és a 2-oxoglutarát csökkenését eredményezte, mely a celluláris anyagcsere átfogó újrendezésére enged következtetni (Bovier és mtsai., 2014). A III. komplex antimycines gátlására (légzési stressz) a *P. anserina* *aodA* gén megemelt transzkripciójával válaszolt, mialatt a steady-state koncentrációja palmitátnak kétszeresére megemelkedett. Ezért úgy gondoljuk, hogy az AOX tartozéka és lipid tartalék pedig a táplálója a késői stacioner növekedési fázisban megemelkedett ST termelésnek, amikor a kiindulási szénforrás (D-glükóz) kimerült, viszont még a biomassa nem kezdte meg a sejtfal poliszacharidjainak az autolízisét.

Felmerül a kérdés, hogy az AOX milyen mechanizmussal járul hozzá a ST termeléshez. A ST produkció főleg a késői stacioner fázisban történik, amikor a növekedés effektíve 0 vagy negatív. ST szintézishez jelentős mennyiségben van szükség acetyl-CoA-ra és ATP-re, valamint NADPH-ra (Yabe és Nakajima 2004). A katabolikus redukáló ágens (NADH) visszaoxidálása a COX légzési láncon tartalék szénforrás hasznosítása során ATP képződéshez vezet. Bár a növekedés hiányában a micélium nem igényel több energiát, az oxidatív foszforiláció ezen körülmények között gátlólag hat a szénanyagcserére. A COX útvonal helyettesítése az AOX-zal lehetővé teszi a gombának a NADH visszaoxidálását, fenntartva a redox homeosztázist alacsony ATP produkcióval, mikor kevés energiára van szüksége. A magasabb ST hozamoknál sötétben voltak a tenyésztések. Az ST termelés pozitívan korrelált AOX aktivitással a szilárd felületen és a sült fermentációknál.

Másik aspektusból megközelítve, az AOX az anabolikus redukáló ágensek formációjában járulhat hozzá a ST bioszintéziséhez. A NADPH a pentóz-foszfát útvonal

oxidatív részében képződik (Chen és mtsai., 2015; Wasylenko és mtsai., 2015), mely a glükóz-6-foszfát folyamatos rendelkezésre állását követeli meg, melyhez a glükoneogenezis megnövekedett fluxusa is hozzájárul, amikor az elsődleges szénforrás (D-glükóz) kimerül. Az *A. nidulans* az *acuM* és *acuK* regulátor gének mutációjának következtében acetáton nem növekedett, sem más C2 vagy C4 szénforráson, melyek a trikarbonsav-ciklusban (TCA) katabolizálódnak. A két gén, eltekintve a foszfoenolpiruvát karboxikináztól (*AcuF*) és fruktóz-1,6-biszfoszfátáztól (*AcuG*), az *aodA* és mitokondriális carrierek kódoló géneket szabályozzák. Ezt a két cink tartalmú regulátort *P. anserina* gombában is tanulmányozták- Rse2 és Rse3 néven ismertek-, az AOX overexpressziójára, a glükoneogenezis kulcsenzimjeire, a NADH:ubikinon oxidoreduktázra (EC 1.6.5.9)- a légzési lánc I. komplex megkerülésében segédkezik- vannak hatással (Bovier és mtsai., 2014; Sellem és mtsai., 2009). A glükoneogenezis és az AOX egy szabályozás alá esik, mely megkönnyíti a metabolikus fluxus váltását a TCA ciklustól a zsírsav szintézis felé. A zsírsav szintézis közvetlenül nem szabályozott a Rse2 és Rse3 elemek által.

A másik kapcsolódási pont a reaktív oxigén gyökök (ROS) elleni védekezésben keresendő. *A. terreus* szilárd-fázisú lovasztatin fermentációnál a megemelt levegőztetéskor magas titert és AOX aktivitást, valamint alacsonyabb ROS felhalmozódást írtak le (Peréz-Sanchez és mtsai., 2017). A kutatók szerint az AOX aktivitás közvetetten emelte meg a lovastatin termelést, a ROS felhalmozódás kapcsán. Ennek fényében, korábban már leírták, hogy az oxidatív stressz (ROS koncentráció növekedését generálva) stimulálja a mikotoxin termelést *Aspergillus*okban, míg az antioxidáns ágens a táptalajban redukálja azt (Fountain és mtsai., 2016; Kim és mtsai., 2008; Jayashree és mtsai., 2000; Narasaiah és mtsai., 2006; Reverberi és mtsai., 2008). Egyik munka szerint az AT termelés és bioszintézis a ROS vegyületek csökkentéséhez járul hozzá (Kenne és mtsai., 2018), másik tanulmány arra mutat rá, hogy az AT bioszintézis a ROS vegyületek forrása (Roze és mtsai., 2015). Mindenesetre az AOX nem mérsékli a ROS mennyiségét, nem kapcsolódik közvetlenül az antioxidáns produkcióhoz, de a redox állapot egyensúlyának fenntartásáért működik, amikor a TCA cikluson és a citokrómox légzési láncon áthaladó fluxut csökkenti, így redukálva ROS vegyületek keletkezését a mitokondriumban.

(2.) Fényben (az egyik legfontosabb környezeti tényező) is vizsgáltuk a különböző *aodA* háttérű mutánsokat. Az elmélet szerint a velvet transzkripció faktor (amitől a ST bioszintézis függ-Kato és mtsai., 2003) a nukleuszban koncentrálódik, amikor a gomba sötétben, D- glükózos minimál táptalajon növekszik, de a citoszolban marad fény hatására (Stinnett és mtsai., 2007; Palmar és mtsai., 2013). A hatás komplexitását érzékeltetve a

mikotoxin termelésben, a gomba élesztő-kivonatot tartalmazó táptalajon több ST-t termelt, ha megvilágították a tenyészetet (Kato és mtsai., 2003). Ami a látható fény befolyását illeti az ST bioszintézisre, az irodalomban találhatunk érdekességeket- *A. parasiticus* tenyészetnél az AT hozamot a hőmérséklet befolyásolta; 20 és 25 °C-on fényben többet termelt a gomba, mint sötétben, bár 30 °C-on a fordított lett az eredmény (Bennett és mtsai., 1981, megjegyezendő, hogy az *A. nidulans* tenyésztéshez az optimális hőmérséklet 37 °C). A fény hatása az ST bioszintézisre ugyanúgy, mint a velvet nukleuszba jutása függ a (kezdeti) glükóz koncentrációtól- legalábbis minimál táptalajos plates kísérletek kiértékelésénél (Atuoi és mtsai., 2010); 1 %-os (w/v) szénforrásnál sötétben, 2 %-osnál (w/v) pedig fényben volt emelkedett hozam. Mindkét szénforrás koncentrációnál és környezeti körülménynél a velvet fehérje a nukleuszban volt megtalálható. A kísérleteinknél a korábban Németh és mtsai. (2016) által megállapított táptalajt és paramétereket használtuk, a velvet vad típusú törzs kétszer annyit termelt sötétben, függetlenül attól, hogy a növesztés platen vagy fermentorban történt. Eredményeink az *aodA* mutánsokkal arra utalnak, hogy az alapvető produkciós szint ("stage 1") megvilágításkor érdemben nem változik az AOX jelenlététől vagy hiányától, vagy pontos mennyiségétől, tehát az alternatív/teljes légzés aránya nem befolyásolja- ez igaz a szilárd felületen növesztetett micéliumra és a sülyesztett tenyészetben képződött biomasszára. Érdekes módon, hasonló mennyiségű ST detektáltunk az *ΔaodA* mutáns tenyészetében-alternatív légzés hiányos-, amikor fényben tenyésztettünk, folyékony közegben és platen is. Úgy gondoljuk, hogy bármilyen emelkedés a ST szintézisben az alapszint felett ("stage 2") csak sötétben (37 °C-on és 1,5 (w/v) % kiindulási D-glükóz koncentrációnál) vaslósulhat meg az olyan genetikai háttérrel rendelkező törzseknél, melyeknél AOX expresszió történik, lehetővé téve a gombának az alternatív légzés és a citokrómoxim légzés közötti arányok változtatását. Ebből adódóan úgy sejtjük, hogy a csak "stage 2" expressziója irányított a velvet komplex által és a "stage 1" (alapszint) expressziójához nem szükséges velvet protein-viszont azonosítottak egy gént (*rsmA*), melynek overexpressziója helyreállítja a *veA* gén hiányát a ST bioszintézisben (Shaaban és mtsai., 2010).

A gombák képesek a ST/AT bontására, amikor mikotoxint adnak a fungális tenyészethez, függetlenül attól, hogy tudnak-e ST/AT termelni (Kenne és mtsai., 2018; Doyle és Marth 1978; Zhang és mtsai., 2014) . Korábban demonstrálták, hogy az *A. nidulans* ST degradációs rátája jóval alacsonyabb, mint a ST termelődése az általunk alkalmazott körülmények között (Németh és mtsai., 2016), valamint a ST az inokulációt követően 158-168 órában emelkedik meg függetlenül a genetikai háttértől és a fény jelenlététől vagy hiányától. Nem valószínű, hogy az ST degradációs képességében felmerülő különbségek

magyarázhatnák az eredményeinket, de nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget, hogy a különbségek a degradációs képességben változást idézhetnek elő a de novo ST bioszintézisben az AOX overexpressziós háttérű mutánsokban, mikor a tenyészet fénytől védve növekszik.

(3.) Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek tagjai több AOX izoenzimmel rendelkezhetnek (nem publikált eredményeink). Feltehetően *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. fischeri*, *A. nidulans* és *A. glaucus* egyetlen AOX enzimet, *A. niger*, *A. clavatus*, *A. zonatus*, *A. oryzae*, *A. versicolor* és *A. wentii* 2 izoenzimet, míg az *A. sydowii* 3 izoenzimet birtokol (De Vries és mtsai., 2017). Az általunk vizsgált *Nigri* szekcióba tartozó fajoknál csak az *A. niger* rendelkezik 2 izoenzimmel, míg a többi tagnak kifejezetten egyetlen AOX proteinjük van. A feltételezett izoenzimek száma szekciónként eltérést mutat: *Nidulantes*-ben 1-3-ig, *Flavi*-ban és a *Fumigati*-ban 1-2-ig változik. A rokonsági viszonyokat megvizsgálva, azt vehetjük észre, hogy a szorosabb (közelebbi) kapcsolatban álló fajoknál az izoenzimek számában (így a kódoló génekben is) a hasonlóság jellemző. Egyes vizsgált *Aspergillus* fajok genomja 2-3 paralóg génnel rendelkezik, hasonlóan a *Neurospora crassa* és *Candida albicans* mikrobákhoz (Tanton és mtsai., 2003, Huh és Kang 2001), a fő paralóg egy duplikációs eseménynek lehetett a következménye, a második *aod* gén ezért fedezhető fel más *Ascomycota* vonalakban (Fekete és mtsai., 2014).

Az AOX működése közben nem hoz létre protongradienst, ennek ellenére az I. komplexnél és az ubikinon révén mégis proton kerül az intermembrán térbe, így minimális ATP keletkezhet. ATP több ponton is létrejöhet a lebontó anyagcsere során, legnagyobb mennyiségben aerob élőlényeknél a terminális oxidációban. Amennyiben a légzési lánc szétkapcsolása KCN-dal történik, veszteség éri a sejtet energiatermelés terén, mely a növekedésre is kihathat, hiszen a felépítő folyamatok egyes lépései rendkívül energiaigényesek. A malátakivonat, mint táptalaj, növényekben előforduló szénhidrátokat tartalmazhat (keményítő, szacharóz, egyéb cukrok; Harris 1962), folyamatos, természetes szén- és energiaforrást biztosít a fonalas gombák számára. A táptalaj változatos összetétele lehetőséget ad az integratív anyagcserére-amiben az AOX szerepe már jól ismert-lehetőséget adva az alternatív légzés „kiteljesedéséhez”. A KCN tartalmú táptalajon a sejtek nem voltak képesek a kontroll ütemében növekedni, hiszen a légzést szétkapcsoló szernek következtében lényegesen kevesebb ATP előállítása történhetett. A SHAM-on a növekedés gyorsasága szintén elmaradt a kontrolltól, viszont KCN-ostól is. A SHAM az AOX inhibitora (Lambowitz és Slayman 1971), ebből következően az elektronok mitokondriális

elektrontranszport láncban haladnak az oxigén irányába, proton koncentráció különbséget kialakítva és ATP szintézist eredményezve.

Feltehető a kérdés, hogy miért növekedtek jobban KCN-on a tenyészetek, mint SHAM-on. Korábban már leírták, hogy a *Sclerotinia sclerotiorum* fonalas gomba izolátumainak a növekedése jelentősen lecsökkent SHAM-val kiegészített táptalajon (Xu és mtsai., 2012). Bár a citokrómoxigén-oxidáz útján, a szénforrás (pl. glükóz) teljes oxidációjakor jóval több ATP jön létre, mint az alternatív útvonalon, nem szabad elfelejtenünk arról, hogy AOX révén a lebontó anyagcsere ATP szabályozott lépései felszabadulhatnak a gátlás alól, így gyorsabb metabolikus fluxus generálódhat. ATP létrejöttével más folyamatokban is találkozhatunk: glükóz lebontásnak tankönyvi esetét nézzük, a terminális oxidáción kívül a glikolízisben és a citrát körben is keletkezik energia (és redukáló erő), mely fedezheti a sejt energiaigényét az anabolikus folyamatokban. Az intenzív anyagcsere során a glikolízisben és a citrát körben is fontos intermedierek szintetizálódnak (pl. acetyl-CoA, piruvát, α -ketoglutarát, stb.), melyek támogatják a felépítő anyagcsere folyamatokat. A növényeknél egy hipotézis szerint, bizonyos körülmények között (pl. magas citoszolikus energiatöltöttség) az alternatív útvonal működése révén hozzájárul a bioszintetikus reakciók végbementeléséhez, szénvázat szolgáltatva számukra (Day és mtsai., 1995). A gyengébb növekedés még egy lehetséges választ sejtett: az AOX meglétének és működésének fontos szerepe lehet a micéliális növekedésben normál körülmények között. Irodalom alapján a gombáknál két csoport kezd kirajzolódni. Az egyik gyűlekezetbe a *H. anomala*, *N. crassa*, *M. grisea* gombák is beletartoznak, melyeknél normál tenyésztésnél nem detektálható AOX aktivitás vagy expresszió (Minagawa és Yoshimoto 1987, Lambowitz és mtsai., 1989, Yukioka és mtsai., 1998). A másikon pedig ugyanezen körülményeknél jelentősége van az AOX-nak -pl. *U. maydis* (Juarez és mtsai., 2006) vagy a *Sclerotinia sclerotiorum* (Xu és mtsai., 2012). Fontos továbbá megjegyezni, hogy a tenyészetek indítása nem spóráról, hanem exponenciális fázisban lévő gombafonalak átoltásával történt. SHAM a spórák germinációjára is hatással lehet: *B. cinerea* spóránál a SHAM-as kezelés késleltette a csírázást (Inoue és mtsai., 2011). Megjegyezendő, hogy a késleltetett germinációt az azoxystrobin és SHAM együttes alkalmazása váltotta ki, eredményesebb hatással, mint az azoxystrobin és n-propil-gallát kombináció. Esetünkben a KCN+SHAM tartalmú táptalajon növekedés mértéke erősen redukálódott, bizonyos esetekben megállt.

Laboratórium körülmények között akkor tekintjük lefutottnak egy tömlősgomba életciklusát, ha képes konidiospórát képezni. Egyes fajoknál (pl. *A. zonatus*, *A. glaucus*) nem tapasztaltunk spórázást egyik táptalajon sem (a vizsgálat időtartama alatt), feltehetően a

táptalaj vagy más környezeti tényező (hőmérséklet, páratartalom) nem lehetett ideális. A kísérleteinkben nem talákoztunk olyan tenyésztettel, mely kifejezetten csak KCN-on nem tudott volna spórát formálni, ezzel szemben SHAM-en több fajnál is elmaradt a spóráképzés. Hogy AOX-nak szerepe lehet-e konidiospóra képzésben még nem tisztázott egyértelműen. Az *aodA* deléciója vagy overexpressziója *A. nidulans*-ban a konidiospóraszám csökkenésével járt a kontrollhoz képest (Leiter és mtsai, 2016), életciklussal kapcsolatban, más mikrobában a micélium-élesztő differenciálódásban írták le szerepét (Martins és mtsai., 2011).

A több izoenzim birtoklása nem csak a gombák birodalmában jellemző, algáknál és növényeknél is megfigyelhető (Mathy és mtsai., 2009, Selinski és mtsai., 2018). Kísérleteinkben a 2 AOX izoproteines fajok tenyésztete gyorsabban növekedett, valamint a *Nigri* szekcióba tartozóké, ami AOX növekedésben betöltött szerepére enged következtetni. A biotechnológiai iparban jelentős mikroszkópikus gombák javarészt 2 AOX fehérjével rendelkeznek, találunk köztük potenciális toxin előállítókat, valamint hasznos szekunder metabolit termelőket is. A második AOX-t kódoló gén birtoklása fiziológiás előnyt jelenthet az *Aspergillus* nemzetség tagjainak.

(4.) Az *A. terreus* a *Terrei* szekcióban található, a 6. ábra alapján közelebbi kapcsolatban áll a biotechnológiai szempontból modellszervezetnek számító az *A. nidulans*-szal vagy az *A. oryzae* gombával, -melyet keleten a koreai élelmiszeripar használnak koji fermentációra, (Kwang-Won és mtsai., 2012)-, mint a citromsav előállítás meghatározó alakjával, az *A. niger*-rel.

A. niger-ben citromsav termelő körülmények között már megfigyelték a cianid-rezisztens légzést (Kirimura és mtsai., 1987), melynek inhíbiója a produktivitás csökkenésével járt (Kirimura és mtsai., 2000), ezzel szemben *A. terreus* itakonsav fermentációknál nem vizsgálták részletesen az AOX szerepét. A megfelelő levegőztetés fontos kritérium az IA *A. terreus*-szal végzett előállításnál, a levegőztetés leállása csökkent produktivitást vagy a teljes leállását eredményezheti az IA termelésnek (Gyamerah 1995; Kuenz és mtsai., 2012; Nelson és mtsai 1952). Az DO (%) szint kialakításának egy fermentorban technikailag kettő meghatározó része van (többet is felsorolhatunk, pl. fermentor geometriája, torlók kialakítása stb., de ettől tekintsünk most el): az előző sorokban említett levegőztetés és kevertetés. A kevertetésnek számos feladata van egy aerob fermentációnál; azon kívül, hogy megakadályozza a tápkomponensek koncentráció-, pH-, és hőmérséklet gradiens kialakulását a vizes fázisban, a betáplált levegőbuborékokat felaprózza, útjukat meghosszabbítja, lehetővé téve az oxigén beoldódását a fermentlébe. A

kevertetés költséges része a fermentációknak, viszont szerepe elengedhetetlen a megfelelő DO (%) szaturáció eléréséhez, mely az AOX működéséhez is szükségeltetik.

Az IA fermentációknál a levegőztetés és a kevertetés jelentőségét korábban már vizsgálták (Park és mtsai., 1993). A keverőelem fordulatszámát 200-400rpm között változtatták, a levegőztetés mértékét konstans 0,5 vvm-en tartották. A 200 rpm-es fordulatszám nem tudta a megfelelő oxigénellátottságot biztosítani, így 20 g/L alatti IA koncentrációt tudtak elérni, melyet párhuzamba lehet vonni a DO (%) kontroll nélküli fermentációkkal, ahol nem tudtunk 7 napon belül IA-t detektálni a fermentléből. A kísérleteinknél a leoltást követően 12 H-val a tenyészet belép a gyorsuló növekedési szakaszba, majd 24 H-s kor elérésénél pedig az exponenciális fázisba, ami 50. H-ig is eltarthat. Az előbbi szakaszt a gyorsuló, az utóbbit pedig az intenzív anyagcsere és szaporodás jellemzi, a tenyészet nagy mennyiségben igényli az aerob légzés elektronakceptorát, az oxigént. Az oxigén limitációnak a fellépése az exponenciális fázisban lehetett az oka a tenyészet növekedési ütemének visszaesésének. 2 és 30%-on a gombatenyészet biomasszájának gyorsütemű gyarapodása volt észlelhető, viszont a környezet (fermentlé) nem volt oxigénhiányos. Ezen időtartam alatt mértük a legintenzívebb respirációs értékeket, mind teljes és alternatív légzésben. Az AOX működéséhez magas oxigéntenzio igényel (Kozma és Karaffa 1996), melyet megfelelő szabályozással biztosítottunk a tápközegben. Az alternatív légzés magasabb DO (%) szinteken volt erőteljesebb, ezekben az esetekben 48. H után megjelent az IA a vizes közegben, míg az oxigén limitáció esetében nem; ez arra enged következtetni, hogy azon fermentációk esetében indul meg a szerves sav kiválasztása, ahol AOX aktív, eszerint, amennyiben az ideális oxigénszaturáció biztosított a tápközegben, az alternatív légzés megemelkedése korrelál az IA titerrel.

Korábban már rámutattak, hogy a folyamatos, megfelelő levegőztetése a tenyészetnek a termelő fázis alatt elengedhetetlen (Kuenz és mtsai., 2012). A gomba képes újra IA szintetizálására az oxigén limitáció fellépését követően, megközelítőleg 1 napot vesz igénybe a termelés újraindulása, alacsonyabb produktivitással (Gyamerah 1995; Pfeifer 1952). A DO (%) kontroll nélküli fermentációban erős stressz érhet a tenyészetet, a folyamatot egészében az oxigén limitáció jellemezte. Az oxigénszegény környezet, mint stresszforrás, kiválthatta az AOX aktivitásának növekedését idővel- korábban *A. fumigatus* patogénnél hipoxiás környezetben magasabb alternatív légzési értékeket írtak le (Grahl és mtsai., 2012).

Igaz, hogy Park és mtsai. IA-t is mértek a fermentlében alacsony kevertetés mellett (ahol minimális DO (%) szintet feltételezünk), de fontos megjegyezni, hogy eltérő törzset és alacsonyabb kiindulási D-glükóz koncentrációt alkalmaztak. A keverő fordulatszámának

emelésével sikerült megemlíteni az IA koncentrációját, viszont magas fordulatszáma micélium károsodását okozhatja (Park és mtsai., 1993). Ugyanebben a tanulmányban megvizsgálták az DO (%) szint hatását a produktivitás kapcsán, igaz jóval magasabb értékeken (20; 40; 60) és mindegyik esetben hasonló titert kaptak (6 napos fermentációk). Kísérleteinkben 2% és 30%-ot állítottunk be, mely 25,9 és 62,28 g/L-es IA produkcióhoz vezetett. Összevetve az eredményeket arra következtethetünk, hogy az IA képződésnek az alacsony DO (%) szint nem kedvez, magasabb oxigénszaturáció alkalmazásával jobb hozamok érhetőek el. Ebből adódóan az eredményeink (az irodalmi adatokat figyelmebe véve) azt is sugallják, hogy a túlzottan megemelt DO (%) szint nem jár együtt feltétlen a magas IA titerrel, tehát az DO (%) szint ideális beállítása javasolt az *A. terreus* IA fermentációk során.

Az AOX-t kódoló gének expresszióját részletesen tanulmányozták a citromsav termelés során (Hattori és mtsai., 2009). Az *A.niger aox1* génjének kifejeződését Northern blot-tal vizsgálták, hasonló mintázatot kaptunk *A. terreus* IA termelő körülményeknél: minden D-glükóz koncentrációnál detektáltak *aox1* transzkriptumot, még 1 (w/v) %-nál is (ahogy *A.terrus*-nál is), valamint a mRNS a citromsav fermentációja alatt folyamatosan jelen volt a sejtekben. Ezt erősíti, hogy Zehentgruber és mtsai. (1980) szerint az alternatív respiráció folyamatosan jelen van a citromsav fermentációknál, minden növekedési fázisban. Az IA fermentációknál is ezt tapasztaltuk, hiszen az alternatív légzést mindegyik szakaszban ki tudtuk mutatni (pontosan 12 H-tól számszerűsítettük a respirációs értékeket, a germinációt követő órákban nehéz biztonságosan kimutatni az oxigénfelvételt).Az *aox2* géntermék nem észpresszáldott citrát termelő körülmények között, csak úgy, mint az *aodB* gén.A szénforrás minősége nem volt hatással az *aox1* expressziójára *A. niger*-ben, D-glükózon és glicerinen is kifejeződött a gén. A legnagyobb specifikus aktivitását az AOX-nak az korai exponenciális (2. nap) fázisban mérték. Az aktivitása teljes kultivációs idő alatt detektálható volt, majd 4. nap az értéke felére csökkent és maradt konstans a fermentáció végéig (6-8 nap). Ehhez hasonlóan az *A.terreus*-nál a rapid növekedés- 24 és 48 H közé tehető, ekkor mértük a legmagasabb oxigénfelvételi rátákat- befejeztével a teljes/alternatív respirációs értékek csökkenését figyeltük meg és növekvő transzkriptum mennyiséget detektáltunk az idő előrehaladtával. Gyanítható, hogy az *aodA* génnek az IA produkció alatt-hasonlóan az *aox1* génhez-konstans az expressziója (bár nem vizsgáltuk végig a fermentáció ideje alatt) és az alternatív légzés szintén végigkíséri a fermentáció mindegyik szakaszát. Az irodalmi adatok és saját eredményeink között összecsengés fedezhető fel, mely arra enged következtetni, hogy az AOX-nak hasonló funkciója lehet IA biológiai előállításában, mint citromsavéban.

Az AOX, a cianid-rezisztens légzésért felelős fehérje az oxidatív stressz csökkentésében segédkezik több mikroorganizmusban (Millenaar és Lambers 2003). A fonalas gombák az extracelluláris ozmotikus nyomás ellen igyekeznek védekezni a metabolikusan odaillő oldott anyagok felhalmozásával (pl. glicerin). Nagy mennyiségű D-szorbitol ozmotikus sokkot vált ki, egyben oxidatív stresszt is. Az *aodA* génnél gyenge, konstitutív kifejeződés volt megfigyelehető a kísérletekben, mind D-szorbitolon és KCl-on. *A. niger*-nél EGFP segítségével vizsgálták az *aox1* gént, D-glükózon, megemelkedett transzkriptumot detektálva (Kirimura és mtsai., 2006). A respirációs értékekből azt állapíthajuk meg, hogy az alternatív légzésnek nincs jelentősége az ozmotikus sokknál *A. terreus*-ban (legalábbis az általunk vizsgált körülmények között), az mRNS képződött, viszont AOX aktivitást nem vagy csak minimálisat tudtunk detektálni, tehát a fehérje szintézis nem történt meg. Az expressziós profil felveti a lehetőségét annak is, hogy az *aodA* gén kifejeződése konstitutív a gombában (nem állítjuk, ennek alátámasztására többfajta körülmény között is meg kell vizsgálni a génkifejeződést és a hozzá párosuló alternatív légzés kapacitását).

Citromsav előállításnál a citokrómoxáz légzési lánc aktivitása lecsökken, még az alternatív megemelkedik (Wallrath és mtsai., 1991). Az alternatív oxidáz nem hoz létre proton gradienst, ezáltal kevesebb ATP keletkezik a sejtben. Az Embden-Meyerhof-Parnas (EMP; glikolízis) út és a Krebs-Szent-Györgyi (citrátciklus) enzimjeinek aktivitása függ az ATP mennyiségétől (Strasser és mtsai., 1994; Michal 1999). Az AOX a NADH gyors visszaoxidálása révén fejtheti ki hatását az itakonsav előállítás biokémiájában, biztosítva a sejtnek a szénvázat, melyből a citrát, majd az itakonát szintetizálható. A citrát előanyaga az itakonátnak, fermentációs körülmények is hasonlóak; mindkét esetben erőteljes levegőztetést igényel a folyamat (amit a biomassza képzés önmagában nem indokolna), de AOX funkciója az itakonsav előállításában még nem teljesen tisztázott, bár az eredményeink alapján gyanítható, hogy azta szerepetvégezheti, mint a citromsavgyártásban. Az AOX funkciójának bizonyításához és megértéséhez elengedhetetlen a jövőben az *aodA* és *aodB* géndelációs mutánsoknak a tesztelése az IA termelékenység kapcsán.

7. Összefoglalás

Az *Aspergillus* genus tagjai fontos helyet foglalnak el biotechnológiában (De Vries és mtsai., 2017), termeljenek akár hasznos metabolitokat, vagy veszélyes toxinokat. A kísérleteinkben lehetőségünk nyílt a nemzetség fajainak vizsgálatára, melynek során a cianid-rezisztens alternatív oxidáz (AOX) funkcióját tanulmányoztuk a gombafiziológiában, valamint kapcsolatát pirmer és szekunder metabolit termeléssel. Az alternatív légzést vizsgálták már növényekben stressz alatt, továbbá válaszáat a fényre is megfigyelték (Vanlerberghe 2013; Xu és mtsai., 2011).

Az *A. nidulans* sterigmatocisztin (ST) produkciója révén biztonságosan vizsgálható az aflatoxinok bioszintézise (AT) laboratóriumi körülmények között (Amaike és mtsai., 2013; Németh és mtsai., 2016). Az AOX és ST bioszintézis kapcsolatát korábban vizsgálták (Leiter és mtsai., 2016), ahol a nitrát-indukálható promotert használó, szabályozatlan deregulációja az AOX-nak negatív hatással volt az ST hozamra-ennek ellenére az eredmények kérdéseket vetettek fel bennünk. Célul tűztük ki, hogy alaposan megvizsgáljuk, milyen hatással rendelkezik az AOX aktivitás a ST bioszintézisre, hogyan változnak meg a termékhozamok jelenlétében vagy hiányában, figyelembe véve a fény hatását, mint külső ingert. Kutatásunkhoz elengedhetetlen volt, hogy megfelelő *aodA* (AOX-t kódó gén; locus AN2099) genetikai háttérrel rendelkező mutáns rendszert hozzunk létre (*aodA* hiány- és több kópiás törzsek). A következő lépésben **bizonyítottuk, hogy az *aodA* egy fiziológiai releváns cianid- rezisztens AOX-t kódol**, melyet légzésméréssel erősítettünk meg. A hiánymutáns alternatív légzési értékei cianid jelenlétében erőteljesen visszaesetek a vad törzshöz képest, ehhez képest az OE törzseknél pedig növekedést detektáltunk, mely arányos volt a kópiaszámmal (statisztikailag alátamásztva). A légzési értékek függetlenek voltak attól, hogy fényben vagy sötétben történtek a tenyésztéseink. A törzsek között a növekedési rátában nem, viszont a D-glükóz hasznosításában különbségeket találtunk; a hiánymutáns vadhoz hasonlóan, míg a OE törzsek intenzívebben vették fel a környezetükben található szénforrást. A korábban Németh és mtsai (2016) által megtervezett fermentációs körülményekkel végeztük el kísérleteinket folyékony és szilárd fázison a mutánsokkal figyelemmel kísérve az ST termelést fényben vagy annak hiányában. Érdekes módon, az OE törzsek alternatív légzési kapacitása jelentősen megemelkedett a késői stationer növekedési fázisban a vad és *aodA* hiánymutánhoz képest. **Az eredményeink azt mutatták, hogy a sterigmatocisztin képződés függ *aodA* kópiaszámtól *A. nidulans* gombában, de csak fény hiányában**, mind szubmerz, mind szilárd felületen törénő tenyésztésnél. A ST produkcióban két szakaszt különítettünk el („stage 1” és „stage 2”). Az eredményeink azt mutatják, hogy fényben az *ΔaodA*

tenyészetekben az ST mennyisége a „stage 1” alapszintre csökkent vissza (hasonlóan a sötétben is). Ez azt sejteti, hogy a fény jelenlétének csak a „stage 2” fázisban (mikor az ST mennyisége elkezd emelkedni) van szerepe, továbbá azt is, hogy azon AOX-zal rendelkező törzsek produktivitása növekszik, amelyeknél lehetséges a citokrómos- és alternatív légzés közötti arány változtatása. Úgy gondoljuk, hogy **az AOX többfajta módon járulhat hozzá az ST bioszintézishez: a NADH visszaoxidálását végzi, így nem keletkezik ATP, hozzájárulva a szénváz fluxus fenntartásához. A másik kapcsolódási pont a ROS elleni védekezésben elfoglalt funkciója lehet; bár az AOX nem mérsékli a ROS mennyiségét és nem kapcsolódik antioxidáns bioszintézishez, a redox egyensúly fenntartásáért működik, amikor a TCA és a citokrómos légzési láncon áthaladó fluxust csökkenti, redukálva így a ROS vegyületek képződését.** A NADPH, mint redukáló ágens, a pentóz-foszfát útvonal oxidatív részében keletkezik (Chen és mtsai., 2015; Wasylenko és mtsai., 2015), a glükóz-6-foszfát ellátottságát igényli, melyhez a glükoneogenezis megnövekedett fluxusa is hozzájárul, amikor az elsődleges szénforrás (D-glükóz) kimerül. Az *A. nidulans* az *acuM* és *acuK* regulátor gének az *aodA* és mitokondriális carriereket kódoló géneket szabályozzák. *P. anserina* gombában is tanulmányozták (Rse2 és Rse3 néven); az AOX overexpressziójára, a glükoneogenezis kulcsenzimjeire, a NADH:ubikinon oxidoreduktázra vannak hatással. **Feltételezzük így, hogy az AOX az anabolikus redukáló ágensek formációjában járulhat hozzá a ST bioszintéziséhez.**

Az AOX expresszióját és aktivitását légzésgátló anyagok, valamint más stressz hatások felerősíthetik (pl. Yukioka és mtsai., 1998; Tanton és mtsai., 2003; Leiter és mtsai., 2016). A kálium-cianid (KCN) a citokrómos légzési lánc szétkapcsolását (Slater 1967), míg a szalicil-hidroxámsav (SHAM) az alternatív oxidáz inhibícióját végzi (Murphy és Lang-Unnasch 1999). A kísérletekben alkalmazott CBS-es *Aspergillus* fajok mindegyike rendelkezik legalább egy AOX-t kódoló génnel, egyes esetekben akár 2- vagy 3-mal. **A rokonsági viszonyokat megvizsgálva, azt vehetjük észre, hogy a szorosabb (közelebbi) kapcsolatban álló fajoknál az izoenzimek számában (így a kódoló génekben is) a hasonlóság jellemző.** Szilárd malátakivonatot tartalmazó táptalaj felhasználásával tettük lehetővé az AOX aktivitás kiteljesedését, az egyes sorozatokban pedig KCN-ot vagy SHAM-at, valamint a kettő kombinációját alkalmaztuk. A KCN tartalmú táptalajon a sejtek nem voltak képesek a kontroll ütemében növekedni, hiszen a légzést szétkapcsoló szernek következtében lényegesen kevesebb ATP előállítása történhetett. A SHAM-on a növekedés gyorsasága szintén elmaradt a kontrolltól, viszont KCN-ostól is. Esetünkben a KCN+SHAM tartalmú táptalajon növekedés mértéke erősen redukálódott, bizonyos esetekben megállt.

Tapasztalataink szerint nem volt olyan eset, hogy a tenyészetek kizárólag KCN jelenlétében nem képeztek konidiospórát, ezzel ellentétben SHAM-on több törzsnél is elmaradt a spóraformálás, mely felvetheti az AOX szerepét a gomba életciklusában. Kísérleteinkben a 2 AOX izoproteines fajok tenyésztete gyorsabban növekedett, valamint a *Nigri* szekcióba tartozóké, ami **AOX növekedésben betöltött szerepére enged következtetni**. A biotechnológiai iparban jelentős mikroszkópikus gombák javarészt 2 AOX fehérjével rendelkeznek, találunk köztük potenciális toxinelőállítókat, valamint hasznos szekunder metabolit termelőket is. **Egy illetve a második AOX-t kódoló gén birtoklása fiziológias előnyt jelenthet az *Aspergillus* nemzetség tagjainak.**

Az *A.terreus* gombával történő itakonsav (IA) előállításnak a körülményeit több tanulmány is taglalja (Boruta és Bizukojc 2017; Kuenz és Krull 2018). *A. niger* citromsav fermentációknál korábban megfigyelték a cianid-rezisztens légzést (Zehentgruber és mtsai. 1980; Kirimura és mtsai., 1987), melynek inhíbiója a produktivitás csökkenésével járt (Kirimura és mtsai., 2000), ezzel szemben *A. terreus* IA fermentációknál ilyen részletesen még nem vizsgálták az AOX szerepét. A megfelelő levegőztetés fontos kritérium az IA *A.terreus*-szal végzett előállításnál, a levegőztetés leállítása csökkent produktivitást vagy a teljes leállását eredményezheti az IA termelésnek (Gyamerah 1995; Nelson és mtsai 1952), valamint korábban már rámutattak, hogy a tenyészet megfelelő és folyamatos levegőztetése elengedhetetlen a termelői fázis alatt (Kuenz és mtsai., 2012). DO (%) szabályozott fermentációknál tanulmányoztuk az AOX aktivitását (expressziós analízis és légzésmérés) és az IA produkciót. Az IA képződésnek az alacsony DO (%) szint nem kedvez, magasabb oxigénszaturáció alkalmazásával jobb hozamok érhetőek el. Ebből adódóan az eredményeink (az irodalmi adatokat figyelmebe véve) azt is sugallják, hogy a túlzottan megemelt DO (%) szint nem jár együtt feltétlen a magas IA titerrel, tehát a **DO (%) szint ideális beállítása javasolt az *A. terreus* IA fermentációk során. Az eredményeinkből arra tudunk következtetni, hogy az IA hozama függ az oldott oxigénszinttől és az AOX aktivitástól.** Gyanítható, hogy az *aodA* génnek az IA produkció alatt-hasonlóan az *A. niger aox1* génjéhez-konstans az expressziója (bár nem vizsgáltuk végig a fermentáció ideje alatt) és az alternatív légzés szintén végigkíséri a fermentáció mindegyik szakaszát. Az *aox2* géntermék (*A. niger*-ben) nem expresszáldott citrát termelő körülmények között, csak úgy, mint az *aodB* gén, *A.terreus*-ban. Egyéb sokknál (ozmotikus-, sóstressznél) konstitutív expressziót tapasztaltunk, viszont ehhez nem kapcsolódott az alternatív légzés kapacitásának növekedése, ami arra utal, hogy a kifejeződés folyamatos, viszont a transzláció folyamata nem indult meg. Az irodalmi adatok és saját eredményeink között összecsengés fedezhető fel, mely arra enged

következtetni, hogy az **AOX-nak hasonló funkciója lehet IA biológiai előállításában, mint citromsavéban.** Az AOX szerepének bizonyításához és megértéséhez elengedhetetlen a jövőben az *aodA* és *aodB* géndeléciós mutánsok a tesztelése az IA termelékenység kapcsán.

8. Summary

Alternative oxidase (AOX) (oxygen oxidoreductase, nonelectrogenic; EC 1.10.3.11) occurs in many organisms: in plants and fungi, but also in animals and protists (Bendall and Bonner, 1971; Lambowitz et al., 1989; Siedow and Umbach, 1995; Stenmark and Norlund, 2003; Joseph-Horne et al., 2001; Tudella et al., 2004; Molen et al., 2006; MacDonald et al., 2009). This cyanide-resistant terminal oxidase is located on the matrix side of the mitochondrial inner membrane. Unlike most of the cytochrome C oxidase (COX) subunits, alternative oxidase is encoded in the nuclear genome and it provides an “alternative” for the electron flow opposite to the canonical cytochrome-dependent pathway (Joseph-Horne et al., 2001). The branching point is at the level of coenzymeQ (ubiquinone/ubiquinol), thus complexes III and IV of the electron transport system are bypassed. As a consequence, the alternative pathway after NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), which oxidizes NADH to NAD⁺ and reduces ubiquinone to ubiquinol while translocating four protons, moves fewer protons across the inner mitochondrial membrane to generate a proton gradient, and thus provides less ATP by oxidative phosphorylation (Del-Saz et al. 2018). The energy of the four-electron oxidation of ubiquinol by oxygen to water is dissipated as heat. Additionally, the alternative respiration route is resistant to inhibitors of cytochrome complexes III and IV such as antimycin A, cyanide, or azide. AOX can be selectively blocked by aromatic hydroxamic acids such as salicylhydroxamate (SHAM; Vanlerberghe and McIntosh, 1997). Most of the *Aspergilli* species harbour two or even three homologue genes encoding an AOX in their genome—*A. nidulans* owns single gene and *A. terreus* possess two isoenzymes.

This thesis describes the role of AOX in different and its physiological functions in different *Aspergillus* species and its role in sterigmatocystin (ST) and itaconic acid (IA) biosynthesis in *A. nidulans* and *A. terreus*.

1. The relationship between AOX activity and ST synthesis in light and dark. To verify that *aodA* (locus AN2099) indeed encodes a physiologically relevant AOX in *A. nidulans*, we compared the specific respiration rates of the deletion ($\Delta aodA$) and overexpressed (OE) mutants to a wild-type reference strain. Results were unequivocal and confirmed our thesis. After that, the *A. nidulans* strains were studied in liquid (submerged, batch) cultures, employing well-controlled cultivation conditions conducive to ST synthesis in bioreactors. Kinetics of growth in our D-glucose minimal medium was similar in every *A. nidulans* strain investigated in this thesis, while D-glucose utilization rates as well as AOX activity—both early in the rapid growth stage and late in the carbon-depleted, stationary phase of cultures—were proportional to the *aodA* copy number, regardless of the presence or

absence of light. The copy number of the *aodA* gene in the OE mutants was positively correlated to the observed D-glucose uptake, that is, the cyanide-resistant alternative respiration and the D-glucose uptake rate increased in parallel. It should be noted, however, that residual D-glucose concentrations did not significantly differ between the wild-type reference and the *aodA* deletant, that is, the lack of alternative oxidase activity did not affect the D-glucose uptake rate. To analyse the relationship between the aforementioned parameters and ST formation in *A. nidulans*, we monitored ST concentrations in the cultures (medium and biomass). Interestingly, the alternative respiratory rates increased significantly during late stationary growth phase in OE strains compare to wild type and *aodA* deletant strains. In qualitative terms, these timeprofiles were similar in that ST production did not occur before the complete depletion of D-glucose and the cessation of growth. Quantitatively, however, statistically significant differences were found. ST volumetric yield (mgL^{-1}) of the *A. nidulans* *saodA* deletant strain was about half (50%) of that of the wild-type reference when grown in the dark. By contrast, *aodA* OE mutants featured a 50–70% increase in ST yield relative to the control strain, again in a copy-number-dependent manner. Importantly, results were quite different when cultures were continuously illuminated: ST volumetric yields of all cultures went down to about a third of what the control strain produced when grown in the dark, and were statistically unvarying, regardless of the presence, absence, or the copy number of *aodA*. We supposed that, the AOX contributes different mechanisms to ST production. Recycling of the catabolic reducing equivalents (NADH) released during the mobilization of reserve carbon sources by COX would result in high ATP formation. However, in the absence of growth, mycelia do not require high(er) energy levels, and oxidative phosphorylation under such conditions inhibits further carbon catabolism. A switch from COX to AOX would enable the fungus to reoxidize NADH and maintain redox homeostasis without concomitant ATP production under low-energy-requiring conditions. Another aspect of the contribution of AOX to ST biosynthesis could be related to the formation of the anabolic reducing equivalents. NADPH is mostly generated by the oxidative part of the pentose phosphate pathway (Chen et al., 2015; Wasylenko et al., 2015), which requires the continuous availability of glucose-6-phosphate, and this is facilitated by the increased flux through gluconeogenesis when the primary carbon source (D-glucose) is exhausted. In *A. nidulans*, mutations in the regulator genes *acuM* and *acuK* do not allow growth on acetate, nor on other C2 and C4 carbon sources that need the tricarboxylic acid (TCA) cycle to be catabolized (Suzuki et al., 2012). Apart from phosphoenolpyruvate carboxykinase (*AcuF*) and fructose-1,6-bisphosphatase (*AcuG*), they—importantly—also control *aodA* and genes encoding mitochondrial carriers. These two

zinc-cluster regulators have also been studied in *P. anserina*—known there as Rse2 and Rse3—where they are likewise responsible for the overexpression of AOX, the key enzymes of gluconeogenesis, as well as a NADH:ubiquinone oxidoreductase (EC 1.6.5.9) that allows bypassing of complex I of the electron transport chain (Bovier et al., 2014, Sellem et al., 2009). Gluconeogenesis and AOX are thus controlled integrally by the same regulon that facilitates a shift of the metabolic flux towards fatty acid biosynthesis from the TCA cycle. Another possibility may lie in the potential protection from reactive oxygen species (ROS). We should note, AOX does not actively reduce ROS, nor is directly implicated in the production of antioxidant, but operates to maintain the redox balance while lowering the flux through the TCA cycle and the cytochrome electron transport chain such that less ROS will be produced in the mitochondria.

Irrespective of the mechanisms by which AOX activity stimulates ST synthesis, this incentive is clearly subordinate to antagonistic effects associated with the presence of light. The canonical theory is that the velvet transcription factor, on which ST synthesis strictly depends (Kato et al., 2003), is concentrated in the nucleus when the fungus grows in the darkness on a minimal D-glucose medium, but resides in the cytosol when the fungus grows in the light. Our results with the *aodA* mutant backgrounds imply that a basal level production under illumination (“stage 1”) is essentially unchanged regardless of the absence or presence of AOX, or its exact amount; that is, it seems irresponsive to the ratio of the alternative/total respiration. Intriguingly, essentially the same levels of ST were detected in cultures of the *ΔaodA* deletion strain—devoid of alternative respiration—when cultivated protected from light, both in liquid and on plates. Our results further suggest that any increase in ST synthesis over the basal level (“stage 2”) can only be realized in the darkness (at 37°C and 1.5% (w/v) initial glucose concentration) in genetic backgrounds that express AOX, that is, in strains that allow varying the ratio between alternative respiration and cytochrome-mediated respiration. We therefore speculate that only “stage 2” expression is mediated by the velvet complex, and that “stage 1” (basal level) expression may not require the velvet protein (to act) per se.

2. Physiological function of the AOX in different *Aspergilli*. All examined strains showed the presence of at least one AOX encoding gene. Growth experiments were performed using potassium-cyanide (KCN) and SHAM or theirs combination. Results of the experiments confirmed that, the *Aspergillus* species could grow well in presence of KCN, better than in case of addition of SHAM. The worst growth was detected on SHAM and KCN. Lack of the conidiaspore formation was visible in presence of SHAM in some species, but solely on KCN was not detected, implying the function of AOX in spore formation. *Nigri*

section and those strains, which possess 2 AOX isoenzymes presented higher tolerance to KCN and SHAM and grew faster than others. In some fungi it is proved AOX has effect on the growth (Juarez et al., 2006; Xu et al., 2012) therefore our data suggest that, the AOX has an important role in growth of the mycelia in these *Aspergillus* species. Our experiments imply that the second alternative oxidase presents a physiological advantage to species of *Aspergillus* which are important producers of toxic as well as beneficial secondary metabolites, fermentation agents to make food-proof products and enzymes.

3. The relationship between AOX and IA production. The biotechnical production of IA is studied well recently (Boruta and Bizukojc 2017; Kuenz and Krull 2018). Citric acid is an early intermediate of itaconic acid synthesis, and we assumed that the reason for high dissolved oxygen levels in itaconic acid production would be similar to the one in citric acid production. The cyanide-resistant alternative respiration has been observed during the citric acid fermentations (Zehentgruber et al., 1980; Kirimura et al., 1987), the inhibition of AOX led to decreased citric acid yields (Kirimura et al., 2000) and nonetheless, the role of the AOX has not been investigated in IA fermentations yet. The process technologies currently used are similar to those applied for industrial citric acid production by the related species *A. niger*, including strong aeration and agitation of the fermentor. To this end we demonstrated that *A. terreus* is capable of growth-supporting respiration in the presence of cyanide ions, and that this activity proportionally and significantly increases with dissolved oxygen levels in the growth medium. The genome of *A. terreus* specifies two paralog genes (*aodA* and *aodB*), each putatively encoding an alternative oxidase. In our experiments, the AOX activity (respiratory measurements and expression profile) and concentration of IA were examined in dissolved oxygen (DO %) controlled fermentations. Lower saturation of oxygen (DO (%)=0) has a negative effect on IA productions and respiratory rates (both of total and alternative) in contrast the increased DO (%) levels correlated with higher IA yield and oxygen uptake values. We conclude that (considering the earlier study, Park et al. 1993) the well increased DO (%) is not necessary (after a certain level) to contribute higher IA yields, therefore the fine regulation of dissolved oxygen level is suggested. Results imply the IA production depends on the AOX activity which required high oxygen saturation. We supposed that, the AOX encoding gene is expressed during the IA fermentation similar to *aox1* gene in citric acid fermentations carried out with *A. niger*. Such as *aox2* gene product in *A. niger*, we could not detect the *aodB* in *A. terreus*. On the other hand, *aodA* was expressed in treated cultures (osmotic- and saltshock), although minimal cyanide-resistant respiration was measured in this conditions suggests that the translation process is not implemented. Our supposition is the

cyanide-resistant respiration plays the same function in *A. terreus* like in *A. niger* citric acid fermentations. To examine and prove the role of AOX in IA production is indispensable to create and test *aodA* and *aodB* deletion mutants in the future.

9. Irodalmi hivatkozások

1. Akhter S, McDade HC, Gorlach JM, Heinrich G, Cox GM, Perfect JR: Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2003, 71(10):5794-5802.
2. Albury MS, Elliott C, Moore AL: Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiol Plant* 2009, 137(4):316-327.
3. Amaike S, Affeldt KJ, Keller NP: Genetics, Biosynthesis, and Regulation of Aflatoxins and other *Aspergillus flavus* Secondary Metabolites. In: *Agricultural Applications*. Edited by Kempken F. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013: 59-74.
4. Amaike S, Keller NP: *Aspergillus flavus*. *Annu Rev Phytopathol* 2011, 49:107-133.
5. Andersen MR, et al.: Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res* 2011, 21(6):885-897.
6. Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Slokoska LS: Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res* 2005, 109(Pt 2):150-158.
7. Arnaud MB, et al.: The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Res* 2012, 40(Database issue):D653-659.
8. Arnholdt-Schmitt B, Costa JH, de Melo DF: AOX--a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends Plant Sci* 2006, 11(6):281-287.
9. Atoui A, Kastner C, Larey CM, Thokala R, Etxebeste O, Espeso EA, Fischer R, Calvo AM: Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2010, 47(12):962-972.
10. Azcon-Bieto J, Lambers H, Day DA: Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative pathway in leaf respiration. *Plant Physiol* 1983, 72(3):598-603.
11. Bahr JT, Bonner WD, Jr.: Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway. *J Biol Chem* 1973, 248(10):3446-3450.
12. Barnes SE, Dola TP, Bennett JW, Bhatnagar D: Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia* 1994, 125(3):173-178.
13. Baup: Ueber eine neue Brenzcitronensäure. *Archiv der Pharmazie* 1837, 59(1):39-41.

14. Bayram O, Feussner K, Dumkow M, Herrfurth C, Feussner I, Braus GH: Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development. *Fungal Genet Biol* 2016, 87:30-53.
15. Bayram O, et al.: VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 2008, 320(5882):1504-1506.
16. Bendall DS, Bonner WD: Cyanide-insensitive Respiration in Plant Mitochondria. *Plant Physiology* 1971, 47(2):236-245.
17. Bennett JW, Dunn JJ, Goldsman CI: Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 1981, 41(2):488-491.
18. Bercovitz A, Peleg Y, Battat E, Rokem JS, Goldberg I: Localization of pyruvate carboxylase in organic acid-producing *Aspergillus* strains. *Appl Environ Microbiol* 1990, 56(6):1594-1597.
19. Biriukova EN, Medentsev AG, Arinbasarova A, Akimenko VK: [Respiratory activity of yeast *Yarrowia lipolytica* under oxidative stress and heat shock]. *Mikrobiologiya* 2008, 77(4):448-452.
20. Blumhoff ML, Steiger MG, Mattanovich D, Sauer M: Targeting enzymes to the right compartment: metabolic engineering for itaconic acid production by *Aspergillus niger*. *Metab Eng* 2013, 19:26-32.
21. Boruta T, Bizukojc M: Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2017, 33(2):34.
22. Bovier E, Sellem CH, Humbert A, Sainsard-Chanet A: Genetic and functional investigation of Zn(2)Cys(6) transcription factors RSE2 and RSE3 in *Podospora anserina*. *Eukaryot Cell* 2014, 13(1):53-65.
23. Brandt U: Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1318(1-2):79-91.
24. Brown DW, Adams TH, Keller NP: *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(25):14873-14877.
25. Calvo AM, Bok J, Brooks W, Keller NP: veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(8):4733-4739.

26. Chae MS, Nargang CE, Cleary IA, Lin CC, Todd AT, Nargang FE: Two zinc-cluster transcription factors control induction of alternative oxidase in *Neurospora crassa*. *Genetics* 2007, 177(4):1997-2006.
27. Chavant L, Le Bars J, Sancholle M: [Lipid metabolism in *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiragoschi. Relation to biogenesis of sterigmatocystin]. *Mycopathologia* 1977, 60(3):151-155.
28. Chen H, Hao G, Wang L, Wang H, Gu Z, Liu L, Zhang H, Chen W, Chen YQ: Identification of a critical determinant that enables efficient fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Sci Rep* 2015, 5:11247.
29. Cleland WW, Johnson MJ: Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*. *J Biol Chem* 1954, 208(2):679-689.
30. Clifton R, Millar AH, Whelan J: Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1757(7):730-741.
31. Colaizzi JL, Knevel AM, Martin AN: Biophysical study of the mode of action of the tetracycline antibiotics. Inhibition of metalloflavoenzyme NADH cytochrome oxidoreductase. *J Pharm Sci* 1965, 54(10):1425-1436.
32. Day DA, Wiskich JT: Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J Bioenerg Biomembr* 1995, 27(4):379-385.
33. de Visser R, Brouwer KS, Posthumus F: Alternative Path Mediated ATP Synthesis in Roots of *Pisum sativum* upon Nitrogen Supply. *Plant Physiology* 1986, 80(2):295-300.
34. de Vries RP, et al.: Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol* 2017, 18(1):28.
35. De Vries S, Van Witzenburg R, Grivell LA, Marres CA: Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1992, 203(3):587-592.
36. Del-Saz NF, Ribas-Carbo M, McDonald AE, Lambers H, Fernie AR, Florez-Sarasa I: An In Vivo Perspective of the Role(s) of the Alternative Oxidase Pathway. *Trends Plant Sci* 2018, 23(3):206-219.

37. Dinakar C, Raghavendra AS, Padmasree K: Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: role of pyruvate and malate in activating AOX. *Physiol Plant* 2010, 139(1):13-26.
38. Doyle MP, Marth EH: Aflatoxin is degraded by mycelia from toxigenic and nontoxigenic strains of aspergilli grown on different substrates. *Mycopathologia* 1978, 63(3):145-153.
39. Duarte M, Peters M, Schulte U, Videira A: The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem J* 2003, 371(Pt 3):1005-1011.
40. Duran RM, Cary JW, Calvo AM: Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, 73(5):1158-1168.
41. F. MF, H. L: The Alternative Oxidase: in vivo Regulation and Function. *Plant Biology* 2003, 5(1):2-15.
42. Fanelli C, Fabbri AA: Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia* 1989, 107(2-3):115-120.
43. Fedorova ND, et al.: Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* 2008, 4(4):e1000046.
44. Fekete E, P. Molnár Á, Asadollahi M, Balázs S, Karaffa E, Karaffa L: Analysis of the physiology of an *Aspergillus nidulans* mutant lacking the *aoxA* (cyanide-resistant alternative oxidase encoding) gene. In. 16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, Skócia; 2014.
45. Florez-Sarasa I, Flexas J, Rasmusson AG, Umbach AL, Siedow JN, Ribas-Carbo M: In vivo cytochrome and alternative pathway respiration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with altered alternative oxidase under different light conditions. *Plant Cell Environ* 2011, 34(8):1373-1383.
46. Florez-Sarasa I, Ostaszewska M, Galle A, Flexas J, Rychter AM, Ribas-Carbo M: Changes of alternative oxidase activity, capacity and protein content in leaves of *Cucumis sativus* wild-type and MSC16 mutant grown under different light intensities. *Physiol Plant* 2009, 137(4):419-426.
47. Fountain JC, et al.: Responses of *Aspergillus flavus* to Oxidative Stress Are Related to Fungal Development Regulator, Antioxidant Enzyme, and Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Expression. *Front Microbiol* 2016, 7:2048.

48. Galagan JE, et al.: Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 2005, 438(7071):1105-1115.
49. Gould BS, Bosniak MA, Neidleman S, Gatt S: Effect of hexachlorophene and related bisphenolic compounds on the dehydrogenases and cytochrome system of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 1953, 44(2):284-297.
50. Grahl N, Dinamarco TM, Willger SD, Goldman GH, Cramer RA: *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Mol Microbiol* 2012, 84(2):383-399.
51. Gyamerah M: Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995, 44(3):356-361.
52. H VF: Verfahren zur fermentativen Herstellung von Itaconsäure durch submers-aerobe Schimmelpilzgärung. In.: DE Patent 1(219):430; 1966.
53. Han K-H, Park J-S, Chae KS, Han D-M: Simple identification of *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Microbiology* 2010, 48(6):885-887.
54. HANS L: The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Cell Environ* 1980, 3(5):293-302.
55. Harris G: The Structural Chemistry of Barley and Malt. In: *Barley and Malt*. Edited by Cook AH: Academic Press, London; 1962: 431-582.
56. Hattori T, Kino K, Kirimura K: Regulation of alternative oxidase at the transcription stage in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid production. *Curr Microbiol* 2009, 58(4):321-325.
57. Hevekerl A, Kuenz A, Vorlop KD: Influence of the pH on the itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, 98(24):10005-10012.
58. Hofhaus G, Weiss H, Leonard K: Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J Mol Biol* 1991, 221(3):1027-1043.
59. Honda Y, Hattori T, Kirimura K: Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J Biosci Bioeng* 2012, 113(3):338-342.
60. Hopwood DA, Sherman DH: Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* 1990, 24:37-66.

61. Huh WK, Kang SO: Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J* 2001, 356(Pt 2):595-604.
62. Huiwen M, P. KC, M. R: Malate dehydrogenase isoenzymes in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 1981, 12(2):147-151.
63. Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmanith T, Michel H: Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 2000, 8(6):669-684.
64. Inoue K, Tsurumi T, Ishii H, Park P, Ikeda K: Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett* 2012a, 326(1):83-90.
65. Inoue K, Tsurumi T, Ishii H, Park P, Ikeda K: Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett* 2012b, 326(1):83-90.
66. Ito-Inaba Y, Hida Y, Inaba T: What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. *Planta* 2009, 231(1):121-130.
67. Ito K, Ogata T, Kakizaki Y, Elliott C, Albury MS, Moore AL: Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*. *Plant Physiol* 2011, 157(4):1721-1732.
68. Jayashree T, Subramanyam C: Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radic Biol Med* 2000, 29(10):981-985.
69. Jeng M, Hall C, Crane FL, Takahashi N, Tamura S, Folkers K: Inhibition of mitochondrial electron transport by piericidin A and related compounds. *Biochemistry* 1968, 7(4):1311-1322.
70. Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM: Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1504(2-3):179-195.
71. Juarez O, Guerra G, Velazquez I, Flores-Herrera O, Rivera-Perez RE, Pardo JP: The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *Febs j* 2006, 273(20):4603-4615.
72. Kaplan RS, Mayor JA, Gremse DA, Wood DO: High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 1995, 270(8):4108-4114.

73. Karaffa L, Coulier L, Fekete E, Overkamp KM, Druzhinina IS, Mikus M, Seiboth B, Novak L, Punt PJ, Kubicek CP: The intracellular galactoglycome in *Trichoderma reesei* during growth on lactose. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97(12):5447-5456.
74. Karaffa L, Diaz R, Papp B, Fekete E, Sandor E, Kubicek CP: A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015, 99(19):7937-7944.
75. Karaffa L, Kubicek CP: *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, 61(3):189-196.
76. Karaffa L, Sandor E, Kozma J, Kubicek CP, Szentirmai A: The role of the alternative respiratory pathway in the stimulation of cephalosporin C formation by soybean oil in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999, 51(5):633-638.
77. Kato N, Brooks W, Calvo AM: The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* 2003, 2(6):1178-1186.
78. Keller NP: Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nat Chem Biol* 2015, 11(9):671-677.
79. Keller NP, Adams TH: Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *SAAS bulletin, biochemistry and biotechnology* 1995, 8:14-21.
80. Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Phillips TD, Burow GB: pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 1997, 87(6):643-648.
81. Kenne GJ, et al.: Activation of Aflatoxin Biosynthesis Alleviates Total ROS in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins (Basel)* 2018, 10(2).
82. Kern A, Hartner FS, Freigassner M, Spielhofer J, Rumpf C, Leitner L, Frohlich KU, Glieder A: *Pichia pastoris* "just in time" alternative respiration. *Microbiology* 2007, 153(Pt 4):1250-1260.
83. Kerscher SJ: Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1459(2-3):274-283.
84. Kim H, Han K, Kim K, Han D, Jahng K, Chae K: The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2002, 37(1):72-80.
85. Kim JH, Yu J, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, Varga J, Bhatnagar D, Cleveland TE, Nierman WC, Campbell BC: Elucidation of the functional genomics of

- antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Int J Food Microbiol* 2008, 122(1-2):49-60.
86. Kirimura K, Hattori T, Kino K: Novel aspects as for molecular mechanisms of citric acid fermentation. *Bioscience and Industry* 2006, 64:17-22.
 87. Kirimura K, Hirowatari Y, Usami S: Alterations of Respiratory Systems in *Aspergillus niger* under the Conditions of Citric Acid Fermentation, vol. 51; 1987.
 88. Kirimura K, Yoda M, Shimizu H, Sugano S, Mizuno M, Kino K, Usami S: Contribution of cyanide-insensitive respiratory pathway, catalyzed by the alternative oxidase, to citric acid production in *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000, 64(10):2034-2039.
 89. Kistler HC, Broz K: Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Front Microbiol* 2015, 6:68.
 90. Klejnstrup ML, Frandsen RJ, Holm DK, Nielsen MT, Mortensen UH, Larsen TO, Nielsen JB: Genetics of Polyketide Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites* 2012, 2(1):100-133.
 91. Klich MA: *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol Plant Pathol* 2007, 8(6):713-722.
 92. Klich MA, Cary JW, Beltz SB, Bennett CA: Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. *Mycologia* 2003, 95(6):1252-1260.
 93. Kontopidis G, Matthey M, Kristiansen B: Citrate transport during the citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 1995, 17(10):1101-1106.
 94. Kozma J, Karaffa L: Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J Biotechnol* 1996, 48(1-2):59-66.
 95. Kuenz A, Gallenmuller Y, Willke T, Vorlop KD: Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, 96(5):1209-1216.
 96. Kuenz A, Krull S: Biotechnological production of itaconic acid-things you have to know. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018, 102(9):3901-3914.
 97. Lambowitz AM, Sabourin JR, Bertrand H, Nickels R, McIntosh L: Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol* 1989, 9(3):1362-1364.
 98. Lambowitz AM, Slayman CW: Cyanide-resistant respiration in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 1971, 108(3):1087-1096.

99. Leiter E, et al.: Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci Rep* 2016, 6:20523.
100. Li A, Pfelzer N, Zuijderwijk R, Brickwedde A, van Zeijl C, Punt P: Reduced by-product formation and modified oxygen availability improve itaconic acid production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97(9):3901-3911.
101. Luchese RH, Harrigan WF: Biosynthesis of aflatoxin--the role of nutritional factors. *J Appl Bacteriol* 1993, 74(1):5-14.
102. Ma H, Zhang N, Sun L, Qi D: Effects of different substrates and oils on aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus*. *European Food Research and Technology* 2015, 240(3):627-634.
103. Machida M, et al.: Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 2005, 438(7071):1157-1161.
104. Maggio-Hall LA, Wilson RA, Keller NP: Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 2005, 18(8):783-793.
105. Magnani T, Soriani FM, Martins VP, Nascimento AM, Tudella VG, Curti C, Uyemura SA: Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett* 2007, 271(2):230-238.
106. Mario B, Schweiger LB: Process for the production of itaconic acid. In.: US Patent 3,078,217; 1963.
107. Martin SM, Wilson PW: Uptake of C₁₄O₂ by *Aspergillus niger* in the formation of citric acid. *Arch Biochem Biophys* 1951, 32(1):150-157.
108. Martins VP, Dinamarco TM, Soriani FM, Tudella VG, Oliveira SC, Goldman GH, Curti C, Uyemura SA: Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell* 2011, 10(2):237-248.
109. Mathy G, et al.: Proteomic and functional characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1. *J Proteome Res* 2010a, 9(6):2825-2838.
110. Mathy N, Hebert A, Mervelet P, Benard L, Dorleans A, Li de la Sierra-Gallay I, Noirot P, Putzer H, Condon C: *Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Mol Microbiol* 2010b, 75(2):489-498.

111. Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L: The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(14):8271-8276.
112. McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF: Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *Journal of Experimental Biology* 2009, 212(16):2627.
113. Melo AM, Duarte M, Moller IM, Prokisch H, Dolan PL, Pinto L, Nelson MA, Videira A: The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J Biol Chem* 2001, 276(6):3947-3951.
114. Michal G: Carbohydrate and citrate cycle. In: *Biochemical Pathways: An atlas of biochemistry and molecular biology*. Edited by Michal G: John Wiley & Son/Spektrum Akademischer Verlag; 1999: 27-45.
115. Minagawa N, Koga S, Nakano M, Sakajo S, Yoshimoto A: Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* 1992, 302(3):217-219.
116. Minagawa N, Sakajo S, Komiyama T, Yoshimoto A: Essential role of ferrous iron in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* 1990, 267(1):114-116.
117. Minagawa N, Yoshimoto A: The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *J Biochem* 1987, 101(5):1141-1146.
118. Molen Teresa A, Dominic R, Sarah P, P. MD: Characterization of the alternative oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to oxidative stress and a shift in nitrogen source. *Physiol Plant* 2006, 127(1):74-86.
119. Molnár Á, Németh Z, Fekete E, Flippin M, Keller N, Karaffa L: Analysis of the Relationship between Alternative Respiration and Sterigmatocystin Formation in *Aspergillus nidulans*. *Toxins (Basel)* 2018, 10(4):168.
120. Morrice J, MacKenzie DA, Parr AJ, Archer DB: Isolation and characterisation of the acetyl-CoA carboxylase gene from *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* 1998, 34(5):379-385.
121. Murphy AD, Lang-Unnasch N: Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43(3):651-654.
122. Narasaiah KV, Sashidhar RB, Subramanyam C: Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* 2006, 162(3):179-189.

123. Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR: A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 2006, 172(3):1557-1566.
124. Nelson GEN, Traufler DH, Kelley SE, Lockwood LB: Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* in 20-Liter Fermentors. *Industrial & Engineering Chemistry* 1952, 44(5):1166-1168.
125. Nemeth Z, Molnar AP, Fejes B, Novak L, Karaffa L, Keller NP, Fekete E: Growth-Phase Sterigmatocystin Formation on Lactose Is Mediated via Low Specific Growth Rates in *Aspergillus nidulans*. *Toxins (Basel)* 2016, 8(12).
126. Nubel RC, Ratajak EJ: Process for producing itaconic acid. In.: US Patent 3,044,941; 1962.
127. Okabe M, Lies D, Kanamasa S, Park EY: Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, 84(4):597-606.
128. Palmer JM, Theisen JM, Duran RM, Grayburn WS, Calvo AM, Keller NP: Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet* 2013, 9(1):e1003193.
129. Papagianni M: Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv* 2007, 25(3):244-263.
130. Park YS, Ohta N, Okabe M: Effect of dissolved oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters* 1993, 15(6):583-586.
131. Paschkis KE, Cantarow A, Tillson EK: Inhibition of Cytochrome Oxidase (Paraphenylendiamine Oxidase) of the Thyroid Gland by Thiouracil and Other Compounds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1945, 60(1):148-152.
132. Pel HJ, et al.: Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 2007, 25(2):221-231.
133. Perez-Sanchez A, Uribe-Carvajal S, Cabrera-Orefice A, Barrios-Gonzalez J: Key role of alternative oxidase in lovastatin solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017, 101(19):7347-7356.
134. Pfeifer VF, Vojnovich C, Heger EN: Itaconic acid by fermentation with *Aspergillus terreus*. *Industrial & Engineering Chemistry* 1952, 44(12):2975-2980.

135. Pocsí I, Miskei M, Karányi Z, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla G, Prade RA: Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures--linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics* 2005, 6:182.
136. Putignani L, Tait A, Smith HV, Horner D, Tovar J, Tetley L, Wastling JM: Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 2004, 129(Pt 1):1-18.
137. Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC: Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol* 2011, 115(4-5):406-420.
138. Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Camera E, Fabbri C, Picardo M, Fanelli C, Fabbri AA: Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryot Cell* 2008, 7(6):988-1000.
139. Riscaldati E, Moresi M, Federici F, Petruccioli M: Effect of pH and stirring rate on itaconate production by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol* 2000, 83(3):219-230.
140. Rogov AG, Sukhanova EI, Uralskaya LA, Aliverdieva DA, Zvyagil'skaya RA: Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry (Mosc)* 2014, 79(13):1615-1634.
141. Roze LV, Laivenieks M, Hong SY, Wee J, Wong SS, Vanos B, Awad D, Ehrlich KC, Linz JE: Aflatoxin biosynthesis is a novel source of reactive oxygen species--a potential redox signal to initiate resistance to oxidative stress? *Toxins (Basel)* 2015, 7(5):1411-1430.
142. Ruiz OH, Gonzalez A, Almeida AJ, Tamayo D, Garcia AM, Restrepo A, McEwen JG: Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, 5(10):e1353.
143. S. CD, K. I, H. H: Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. *Biotechnol Bioeng* 1966, 8(4):465-471.
144. Sarkadi L: *Biokémia mérnök szemmel*. 66, 160-167, 319-320. oldal. Budapest: Typotex; 2007.
145. Scheckhuber CQ, Houthoofd K, Weil AC, Werner A, De Vreese A, Vanfleteren JR, Osiewacz HD: Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the aging model *Podospora anserina*. *PLoS One* 2011, 6(1):e16620.

- 146.Selinski J, Hartmann A, Deckers-Hebestreit G, Day DA, Whelan J, Scheibe R: Alternative Oxidase Isoforms Are Differentially Activated by Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates. *Plant Physiol* 2018, 176(2):1423-1432.
- 147.Sellem CH, Bovier E, Lorin S, Sainsard-Chanet A: Mutations in two zinc-cluster proteins activate alternative respiratory and gluconeogenic pathways and restore senescence in long-lived respiratory mutants of *Podospora anserina*. *Genetics* 2009, 182(1):69-78.
- 148.Shaaban MI, Bok JW, Lauer C, Keller NP: Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot Cell* 2010, 9(12):1816-1824.
- 149.Shu P, Johnson MJ: The Interdependence of Medium Constituents in Citric Acid Production by Submerged Fermentation. *J Bacteriol* 1948, 56(5):577-585.
- 150.Siedow JN, Moore AL: A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1993, 1142(1):165-174.
- 151.Siedow JN, Umbach AL: Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *Plant Cell* 1995, 7(7):821-831.
- 152.Slater EC: [8] Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. In: *Methods in Enzymology*. vol. 10: Academic Press; 1967: 48-57.
- 153.Small WC, McAlister-Henn L: Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1998, 180(16):4051-4055.
- 154.Steiger MG, Blumhoff ML, Mattanovich D, Sauer M: Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front Microbiol* 2013, 4:23.
- 155.Stenmark P, Nordlund P: A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Lett* 2003, 552(2-3):189-192.
- 156.Stinnett SM, Espeso EA, Cobeno L, Araujo-Bazan L, Calvo AM: *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* 2007, 63(1):242-255.
- 157.Strasser H, Burgstaller W, Schinner F: High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 1994, 119(3):365-370.
- 158.Suzuki Y, Murray SL, Wong KH, Davis MA, Hynes MJ: Reprogramming of carbon metabolism by the transcriptional activators AcuK and AcuM in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2012, 84(5):942-964.

159. Tanton LL, Nargang CE, Kessler KE, Li Q, Nargang FE: Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 2003, 39(2):176-190.
160. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW: Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 1983, 26(2-3):205-221.
161. Torres NV, Riol-Cimas JM, Wolschek M, Kubicek CP: Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996, 44(6):790-794.
162. Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP: Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2004, 3(6):1398-1411.
163. Tudella VG, Curti C, Soriani FM, Santos AC, Uyemura SA: In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(1):162-172.
164. Utsumi K, Oda T: Inhibition of energy transfer reactions in mitochondria by hydroxylamine. *Arch Biochem Biophys* 1969, 131(1):67-73.
165. van der Straat L, Vernooij M, Lammers M, van den Berg W, Schonewille T, Cordewener J, van der Meer I, Koops A, de Graaff LH: Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact* 2014, 13:11.
166. Vanlerberghe GC: Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int J Mol Sci* 2013, 14(4):6805-6847.
167. Vanlerberghe GC, McIntosh L: ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997, 48:703-734.
168. Videira A, Duarte M: From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1555(1-3):187-191.
169. Wallrath J, Schmidt M, Weiss H: Concomitant loss of respiratory chain NADH: ubiquinone reductase (complex I) and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991, 36(1):76-81.
170. Wasylenko TM, Ahn WS, Stephanopoulos G: The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng* 2015, 30:27-39.

171. Watson K, Smith HE: Rotenone and amytal insensitive coupled oxidation of NADH by mitochondria from *Aspergillus niger*. *J Biochem* 1967, 61(4):527-530.
172. Wayman FM, Matthey M: Simple diffusion is the primary mechanism for glucose uptake during the production phase of the *Aspergillus niger* citric acid process. *Biotechnol Bioeng* 2000, 67(4):451-456.
173. Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D: The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur J Biochem* 1991, 197(3):563-576.
174. Weiss H, Linke P, Haiker H, Leonard K: Structure and function of the mitochondrial ubiquinol: cytochrome c reductase and NADH: ubiquinone reductase. *Biochem Soc Trans* 1987, 15(1):100-102.
175. Wilkinson HH, Ramaswamy A, Sim SC, Keller NP: Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia* 2004, 96(6):1190-1198.
176. Wogan GN: Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res* 1992, 52(7 Suppl):2114s-2118s.
177. Xu F, Yuan S, Lin H-H: Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals. *Plant Signaling & Behavior* 2011, 6(1):55-58.
178. Xu T, Yao F, Liang WS, Li YH, Li DR, Wang H, Wang ZY: Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and resistance to oxidative stress of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Microbiol* 2012, 50(4):594-602.
179. Yabe K, Nakajima H: Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, 64(6):745-755.
180. Yan L, Li M, Cao Y, Gao P, Cao Y, Wang Y, Jiang Y: The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009, 64(4):764-773.
181. Yip JY, Vanlerberghe GC: Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiol Plant* 2001, 112(3):327-333.
182. Yoshida K, Terashima I, Noguchi K: Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. *Plant Cell Physiol* 2007, 48(4):606-614.
183. Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW: Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(3):1253-1262.

184. Yu K-W, Lee S-E, Choi H-S, Suh HJ, Ra KS, Choi JW, Hwang J-H: Optimization for rice koji preparation using *aspergillus oryzae* CJCM-4 isolated from a korean traditional meju. *Food Science and Biotechnology* 2012, 21(1):129-135.
185. Yukioka H, Inagaki S, Tanaka R, Katoh K, Miki N, Mizutani A, Masuko M: Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1442(2-3):161-169.
186. Zehentgruber O, Kubicek CP, Röhr M: Alternative respiration of *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 1980, 8(2):71-74.
187. Zhang DW, Xu F, Zhang ZW, Chen YE, Du JB, Jia SD, Yuan S, Lin HH: Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Environ* 2010, 33(12):2121-2131.
188. Zhang W, Xue B, Li M, Mu Y, Chen Z, Li J, Shan A: Screening a strain of *Aspergillus niger* and optimization of fermentation conditions for degradation of aflatoxin B(1). *Toxins (Basel)* 2014, 6(11):3157-3172.
189. Zhu Y, Lu J, Wang J, Chen F, Leng F, Li H: Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *J Integr Plant Biol* 2011, 53(1):7-13.
190. Zvyagil'skaya RA, Kotelnikova AV: Structure and Functional Activity of Yeast Mitochondria (Monograph). *Series Biological Chemistry [in Russian]* 1991, 36:172.

10. Tudományos tevékenység

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Molnár Á P, Németh Z, Fekete E, Flipphi M, Keller N P, Karaffa L

Analysis of the relationship between alternative respiration and sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*.

Toxins. 2018, 10, 168. **Impakt faktor: 3,030**

2. De Vries R P, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Uchima C A, Anderluh G, Asadollahi M, Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram Ö, Benocci T, Braus-Stromeier S, Caldana C, Cánovas D, Cerqueira G, Chen F, Chen W, Choi C, Clum A, Corrêados Santos R A, De Lima Damásio A R, Diallinas G, Emri T, Fekete E, Flipphi M, Freyberg S, Gallo A, Gournas C, Habgood R, Haimaut M, Harispe L, Henrissat B, Hildén K, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karányi Zs, Kraševac N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk E, Lapidus A, Levasseu A, Lindquist E, Lipzen A, Logrieco A, MacCabe A, Mäkelä M, Malavazi I, Melin P, Meyer V, Mielnichuk N, Miskei M, **Molnár Á P**, Mulé G, Ngan C Y, Orejas M, Orosz E, Ouedraogo J P, Overkamp K, Park H S, Perrone G, Piumi F, Punt P, Ram A, Ramón A, Rauscher S, Record E, Riaño-Pachón D M, Robert V, Röhrig J, Ruller R, Salamov A, Salih N, Samson R, Sándor E, Sanguinetti M, Schütze T, Sepčić K, Shelest E, Sherlock G, Sophianopoulou V, Squina F, Sun H, Susca A, Todd R, Tsang A, Unkles S, van de Wiele N, van Rossum-Uffink D, de Castro Oliveira J V, Vesth T, Visser J, Yu J H, Zhou M, Andersen M, Archer D, Baker S, Benoit I, Brakhage A, Braus G, Fischer R, Frisvad J, Goldman G, Houben J, Oakley B, Pócsi I, Scazzocchio C, Seiboth B, vanKuyk P, Wortman J, Dyer P, Grigoriev I

Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*.

Genome Biology. 2017, 18, 28. **Impakt faktor: 11.908**

További közleménynek

1. Németh Z, **Molnár Á P**, Fejes B, Novák L, Karaffa L, Keller N P, Fekete E

Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*.

Toxins. 2016, 8, 354. **Impakt faktor: 3.030**

2. Jónás Á, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Jäger Sz, **Molnár Á P**, Szentirmai A, Karaffa L
Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and
expression analysis of the putative permease and hydrolase genes.

Journal of Antibiotics 2014, 67, 489-497. **Impakt faktor: 1.730**

Az értekezés témájában elhangzott előadások

Molnár Á P

Aspergillus terreus fermentációk során az oldott oxigén szint pozitívan korrelál az alternatív
oxidáz kifejeződésével és a végső hozammal.

A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium,
Keszthely (2016)

További előadások

Molnár Á P

Az alternatív oxidáz gén expressziójának vizsgálata két stresszhatásnak kitett fonalas
Ascomycota fajban.

A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely (2014)

Idegennyelvű poszterek

1. **Molnár Á P**, Asadollahi M, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Karaffa L

Expression analysis of alternative oxidase gene (aodA) in *Aspergillus nidulans* in response to
high osmolarity stress.

15th Iranian& International Congress of Microbiology, Teherán (2014)

2. Jónás Á, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Jäger SZ, **Molnár Á P**, Karaffa L

Lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the
putative permease and hydrolase genes.

12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország (2014)

3. Fekete E, **Molnár Á P**, Asadollahi M, Balázs SZ, Sándor E, Karaffa L
Analysis of the physiology of an *Aspergillus nidulans* mutant lacking the *aodA* (cyanide-resistant alternative oxidase encoding) gene.
16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, Skócia (2014)
4. Asadollahi M, **Molnár Á P**, Fekete E, Karaffa L, Flippin M, Sándor E
Distribution of the cyanide-resistant alternative oxidase in the fungal class of Eurotiomycetes (Ascomycota, Pezizomycotina).
15th Iranian & International Congress of Microbiology, Teherán (2014)
5. Kolláth I S, **Molnár Á P**, Fekete E, Sándor E, Soós Á, Kovács B, Kubicek CP, Karaffa L
Production of itaconic acid from D-xylose by *Aspergillus terreus*.
5th Central European Forum for Microbiology [CEFOM] Keszthely (2017)
6. Karaffa L, Németh Z, **Molnár Á P**, Fejes B, Novák L, Keller NP, Fekete E
Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*.
29th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, CA (2017)
7. Kolláth I S, **Molnár Á P**, Fekete E, Sándor E, Soós Á, Kovács B, Kubicek CP, Karaffa L
Production of itaconic acid from D-xylose by *Aspergillus terreus*.
2nd Symposium on Plant Biomass Conversion by Fungi, Utrecht, Hollandia (2017)
8. Kolláth I S, **Molnár Á P**, Fekete E, Karaffa L
Itaconic acid production from D – xylose by *Aspergillus terreus*.
14th European Conference of Fungal Genetics, Haifa, Izrael (2018)

11. Köszönetnyilvánítás

Úgy gondolom, hogy a köszönetnyilvánítás nagyon fontos része a PhD értekezésnek, hiszen az alapjául szolgáló publikációka kutatócsoport együttes munkájának eredménye. Egy értekezés megszületéséhez alapos irodalmi jártasság, jól átgondolt kutatási terv, összehangolt kísérletes munka, számos megbeszélés és rengeteg számítógép előtt töltött idő (az eredmények kiértékelése és ábrázolása, értelmezése) igényeltetik. Amelyik kutató úgy gondolja, hogy egyedül vitt véghez mindent, az csak áltatja magát.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Karaffa Levente** egyetemi docensnek, hogy mindig támogatott és biztatott a munkám során. Rengeteget tanultam beszélgetéseinkből. A publikációk elkészítésében nyújtott segítségén túl a tudományos gondolkodásmódom és a hozzátartozó szemléletem kialakítását, formálását is köszönöm. Jövőbeli célom, hogy minél több közös tudományos eredménnyel gazdagíthassuk ismereteinket a fonalas gombák élettanában.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Fekete Erzsébet** egyetemi docensnek, akihez mindig bátran fordulhattam, ha segítségre volt szükségem. Nagyon sokat tanított a molekuláris biológiáról, az ismereteket, útmutatásaitkísérleteimben is alkalmaztam. Törzsfelnevelési tapasztalatai nélkül nem jöhettek volna létre az eredményeink.

Köszönettel tartozom **Dr. Németh Zoltán** egyetemi tanársegéd kollégámnak, aki nélkül szintén nem születhettek volna meg az eredmények. Fiatal kora ellenére nagy szakismerettel rendelkezik a fermentációs technológia területén, amit a kísérleteknél is kamatoztattunk.

A CBS-es munka kapcsán köszönetet mondok **Ronald De Vries** professzornak, hogy részesei lehettünk a kutatásnak és lehetőséget biztosított, hogy az *Aspergillus* törzsekkel dolgozhassunk, továbbá **Dr. Mojtaba Asadollahi** kutatónak, akivel együtt dolgozhattam; a közös munka minden perce öröm volt. Thank you, Moji.

Köszönetemet fejezem ki **Michel Flippi** kutatónak a publikációimhoz nyújtott segítségéért.

Köszönöm **Fekete Zoltán** tanszéki mérnökünk támogatását, aki a fermentoraink működésének minden folyamatát ismeri.

Köszönöm **Fejes Balázs** PhD hallgatónak a segítségét és a baráti beszélgetéseket, aki már MSc-s hallgatóként is kiemelkedő tudással rendelkezett.

Külön köszönet és hála illeti **Mizsák Anita** szakdolgozót, aki fáradhatatlanul segített a kísérletekben. BSc-s hallgatóként, fiatal kutatók számára irigylésre méltó szorgalommal, tudásvágygal és laboratóriumi tapasztalattal rendelkezik. Bízom benne, hogy sikerült elindítanom a kutatóvá való válás hosszú, rögös útján.

Kántor Andor szakdolgozónak is köszönöm a sok segítségét, figyelemre méltó művészi vénát birtokol, melyre az ábrák tervezésénél figyeltem fel. Remélem a későbbiekben fel is tudja majd használni ezta fajta tehetségét.

Továbbá szeretném megköszönni azoknak is, akik valamilyen úton-módon segítettek vagy támogattak az értekezés elkészítésében.

Köszönöm szépen!

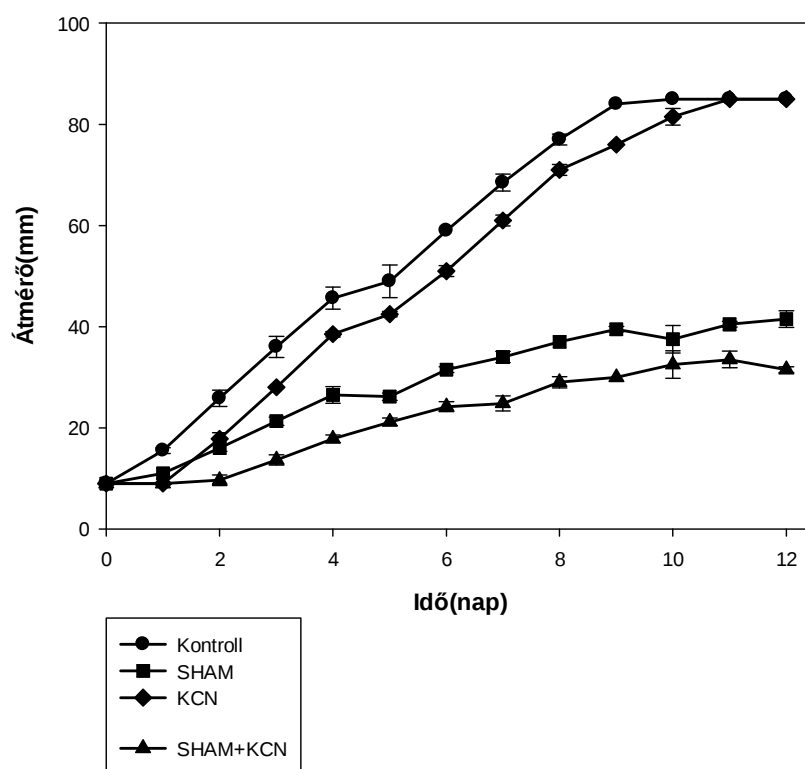
A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A disszertáció elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

12. Függelék

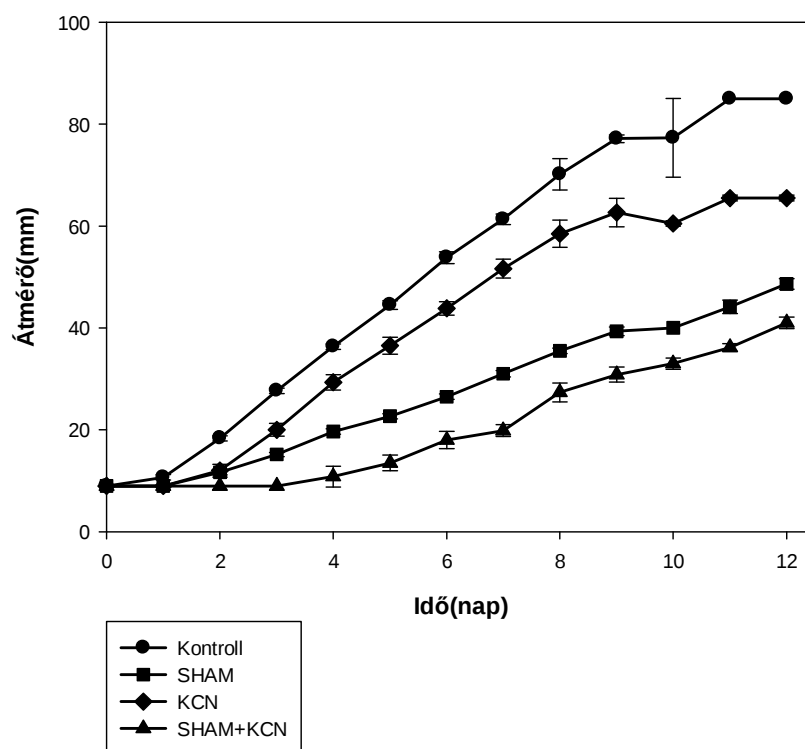
Az *Aspergillus* törzsek növekedési görbéje; az egyes ábrákon a kontroll, SHAM-, KCN-, valamint SHAM+ KCN jelenlétében mért kolónia átmérők láthatóak. Minden kísérletnél 6 átmérőt mértünk le, a grafikonokon eredmények átlagait $\pm$ standard deviáció (SD) értékeit ábrázoltuk (F1-18. ábra).

A.nidulans (FGSC A4)



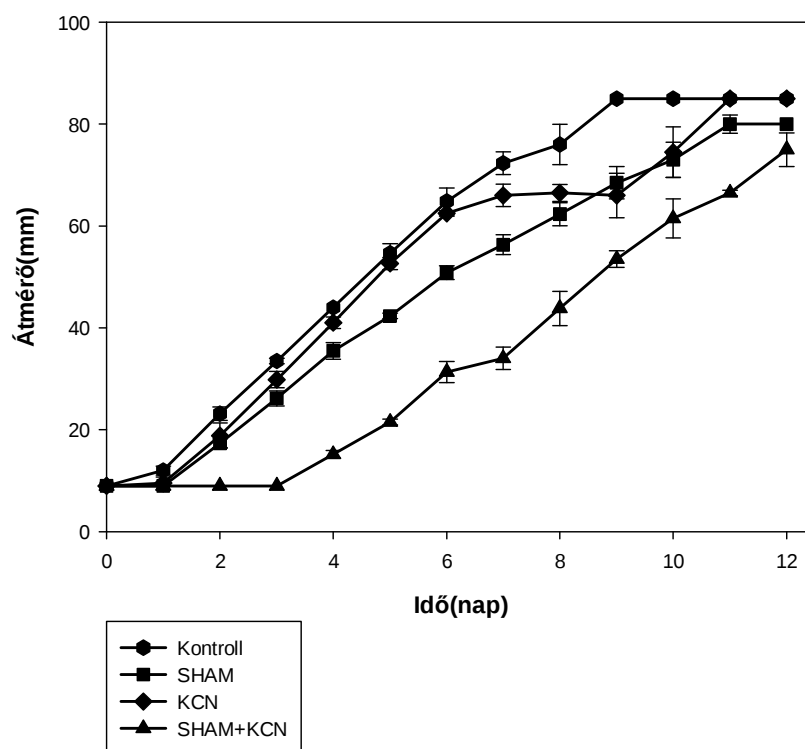
F1. ábra: *A.nidulans* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.terreus* (NIH2624)**



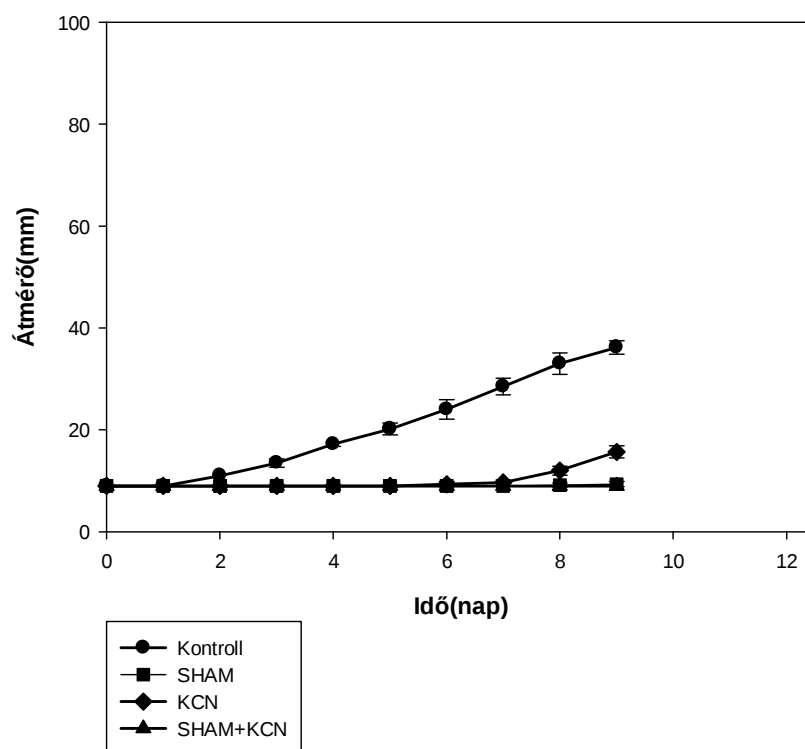
F2. ábra: *A.terreus* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.niger* (CBS513.88)**



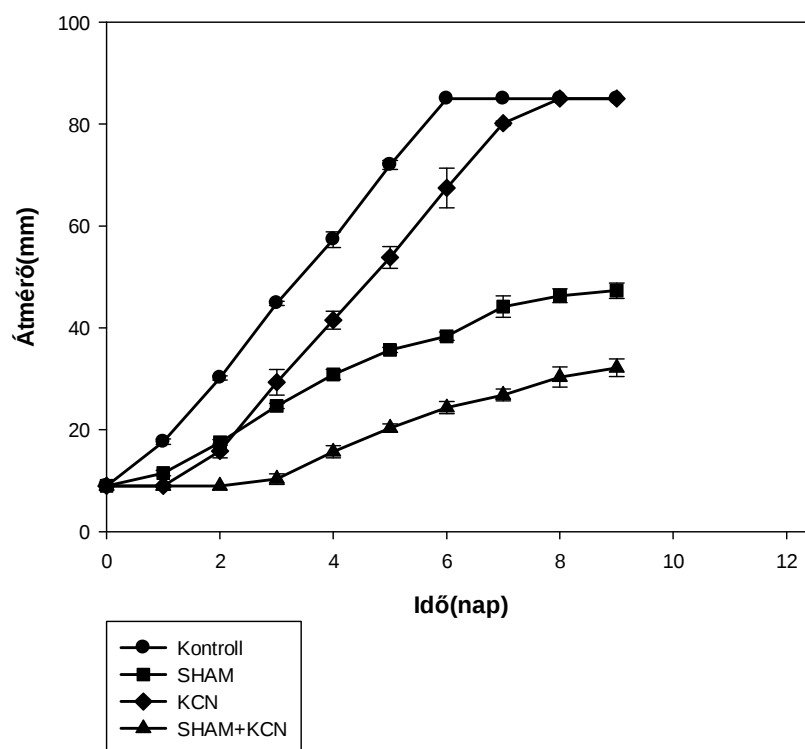
F3. ábra: *A.niger* (CBS513.88) növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.glaucus* (CBS516.65)**



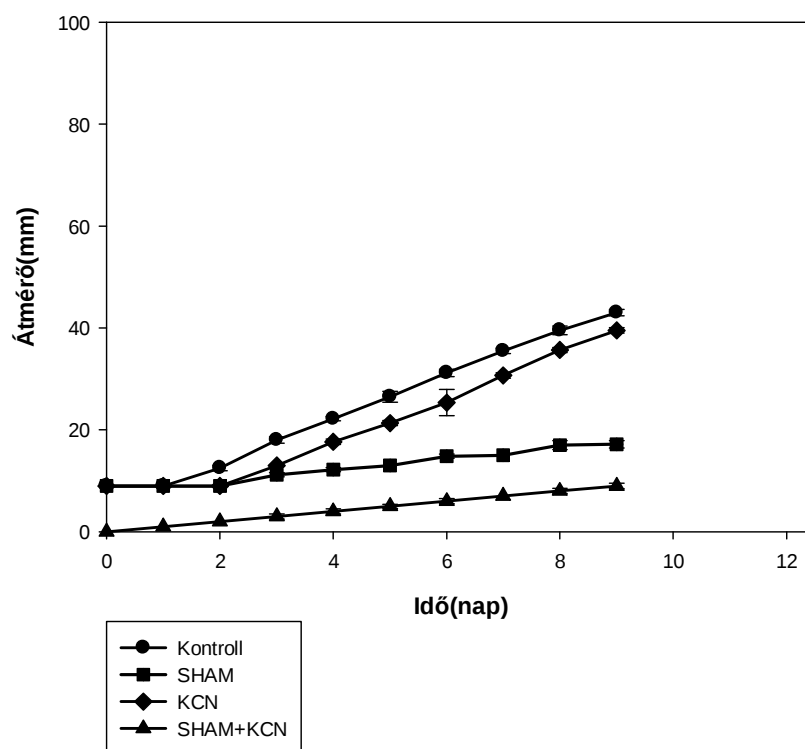
F4. ábra: *A.glaucus* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.tubingensis* (CBS134.48)**



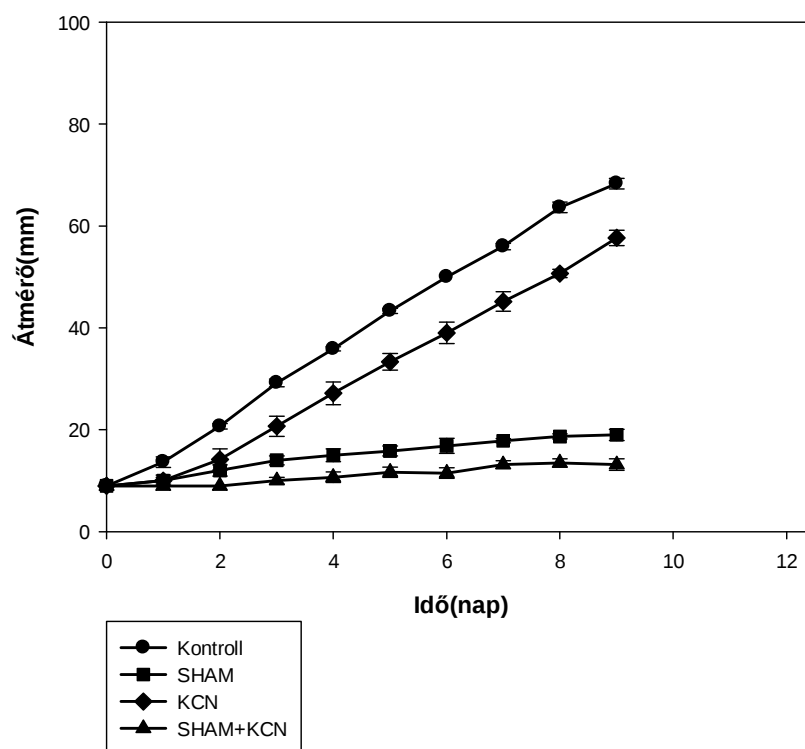
F5. ábra: *A.tubingensis* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.sydowii* (CBS593.65)**



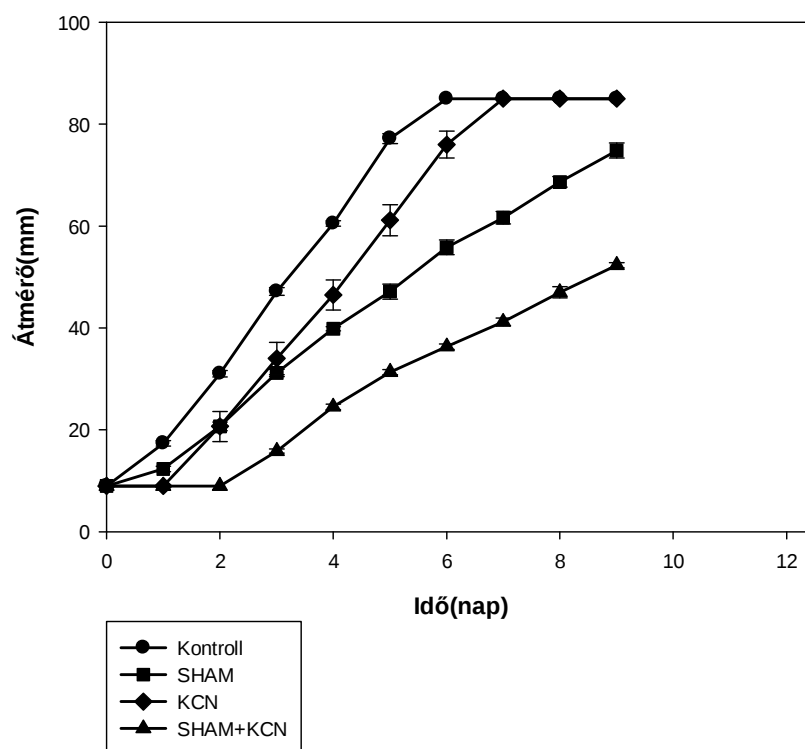
F6. ábra: *A.sydowii* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.clavatus* (NRRL1)**



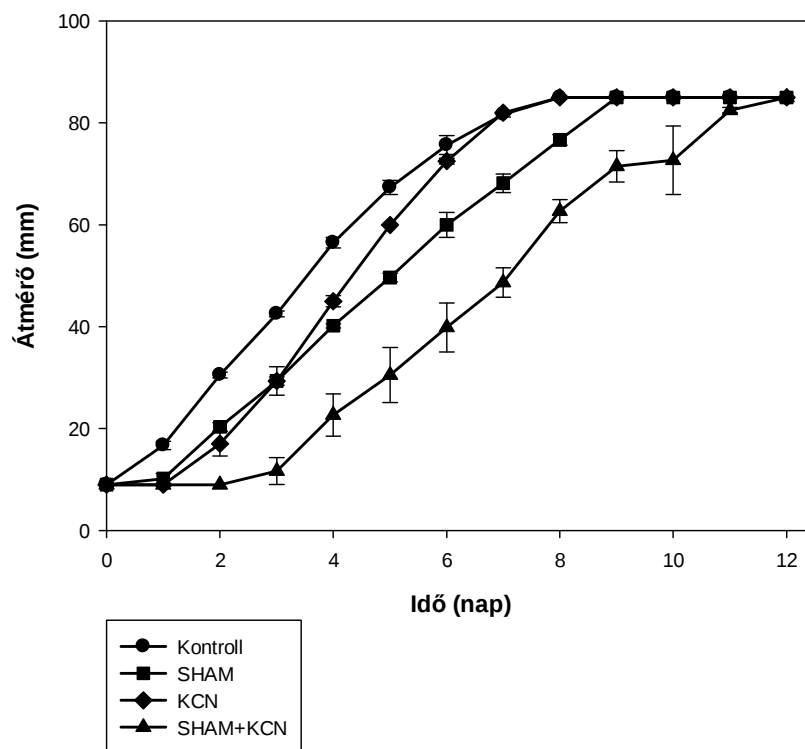
F7. ábra: *A.clavatus* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.luchuensis* (CBS106.47)**



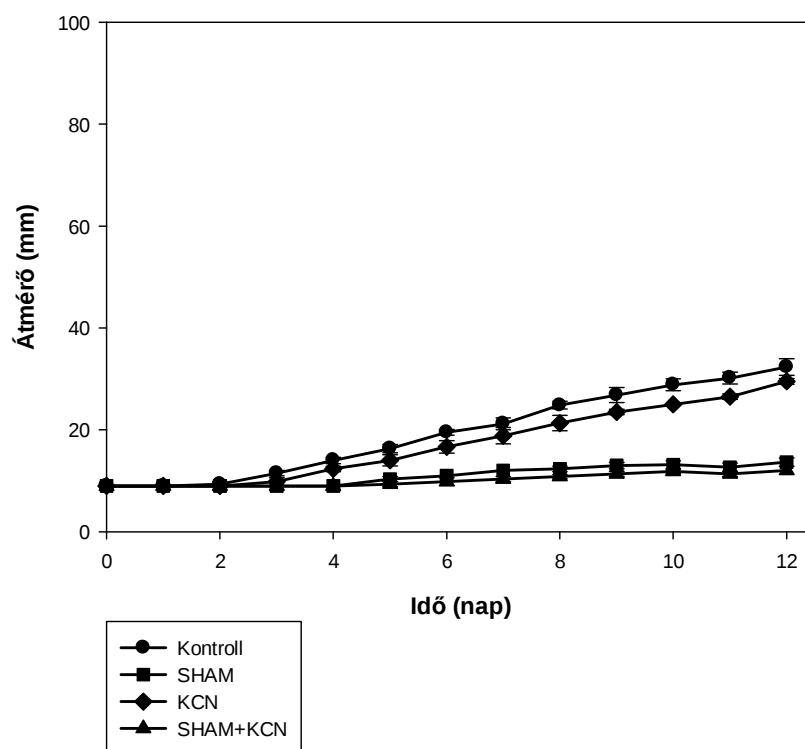
F8. ábra: *A.luchuensis* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.niger* (ATCC1015)**



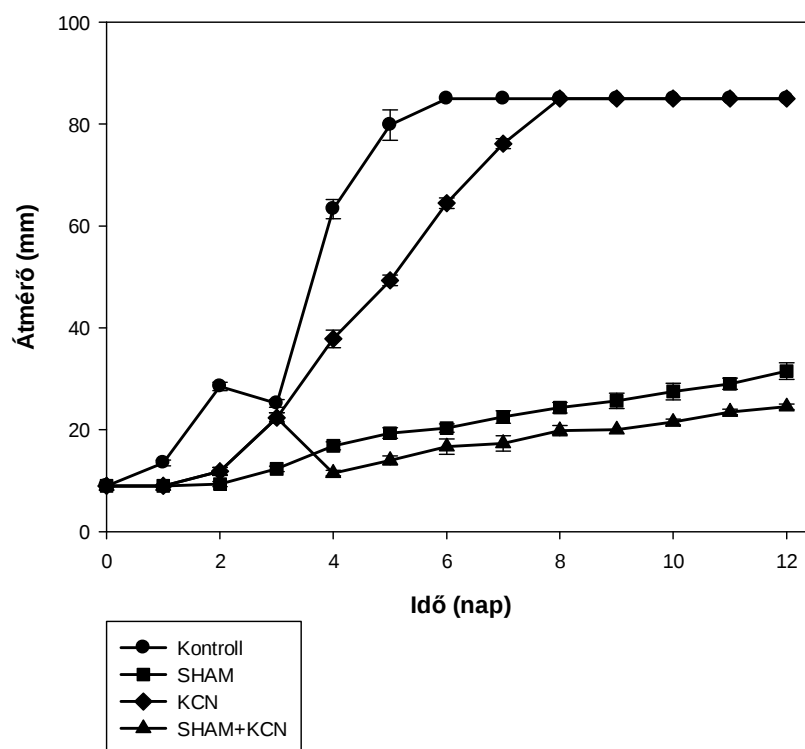
F9. ábra: *A.niger* (ATCC1015) növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.versicolor* (CBS795.97)**



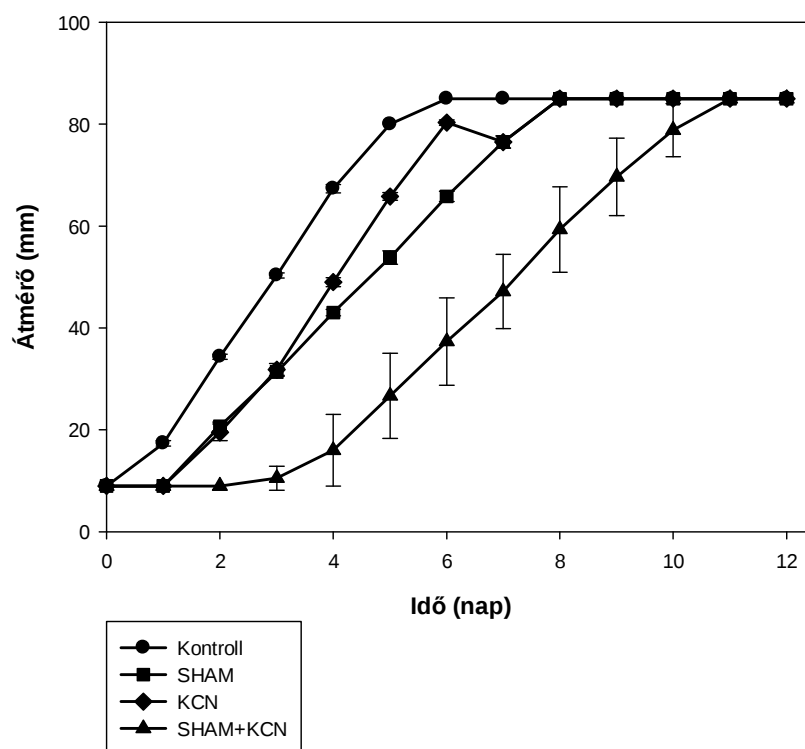
F10. ábra: *A. versicolor* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.fischeri* (NRRL181)**



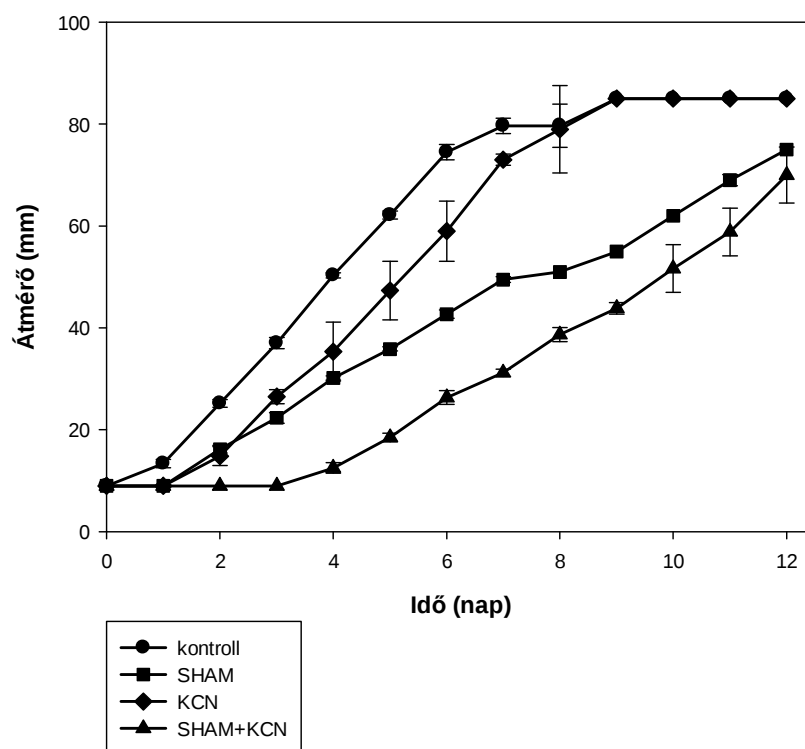
F11. ábra: *A. fischeri* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A. brasiliensis* (CBS101740)**



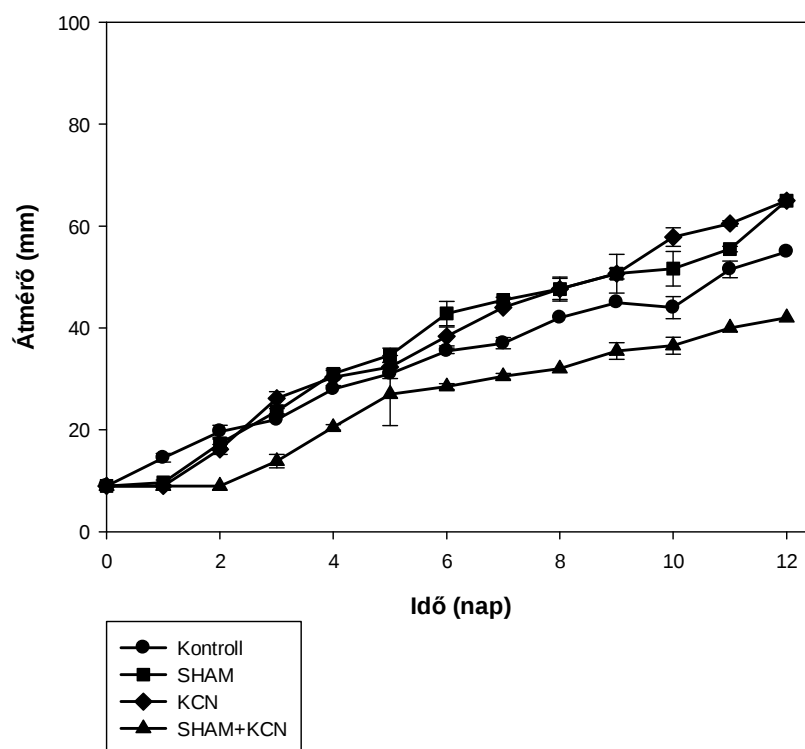
F12. ábra: *A. brasiliensis* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A. carbonarius* (CBS141172)**



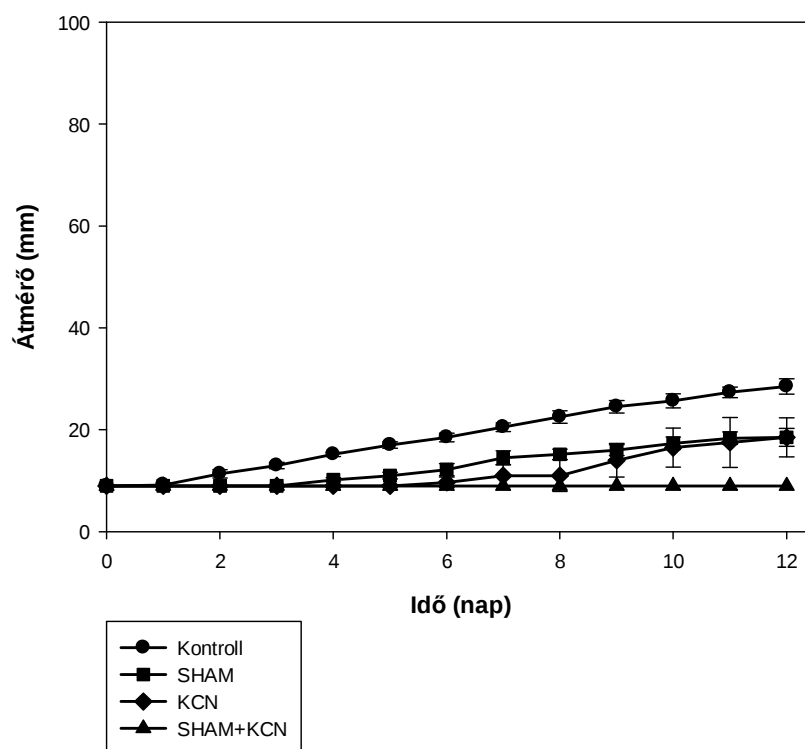
F13. ábra: *A. carbonarius* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A. aculeatus* (CBS172.66)**



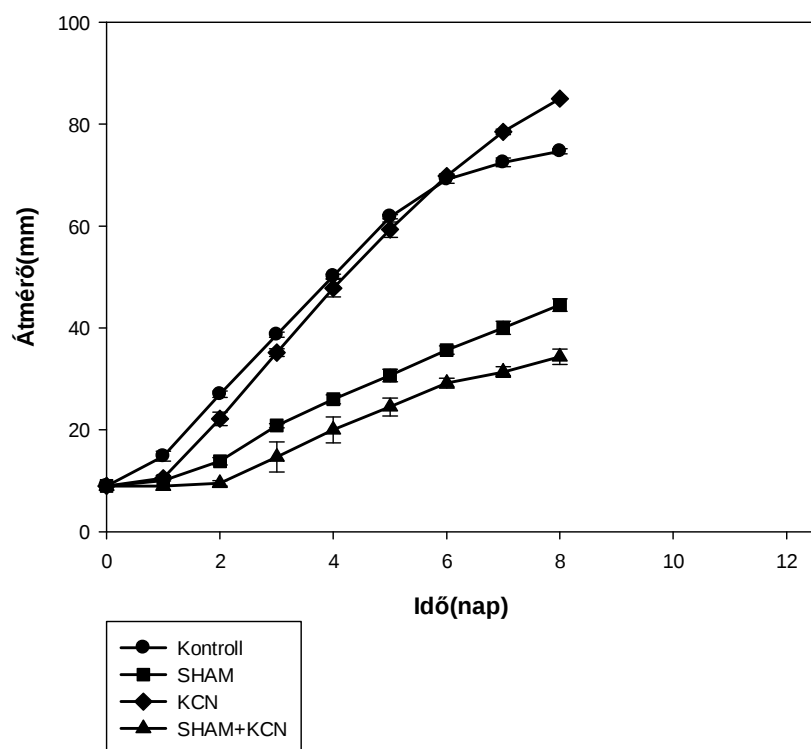
F14. ábra: *A. aculeatus* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A. wentii* (CBS141173)**

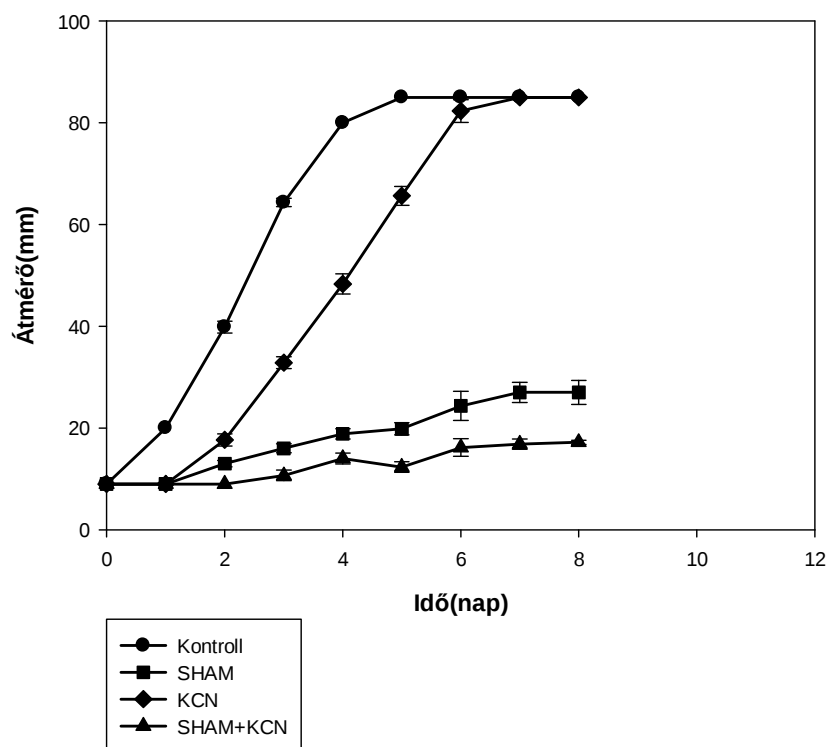


F15. ábra: *A. wentii* növekedési görbéje szilárd táptalajon

***A.oryzae* (RIB40)**



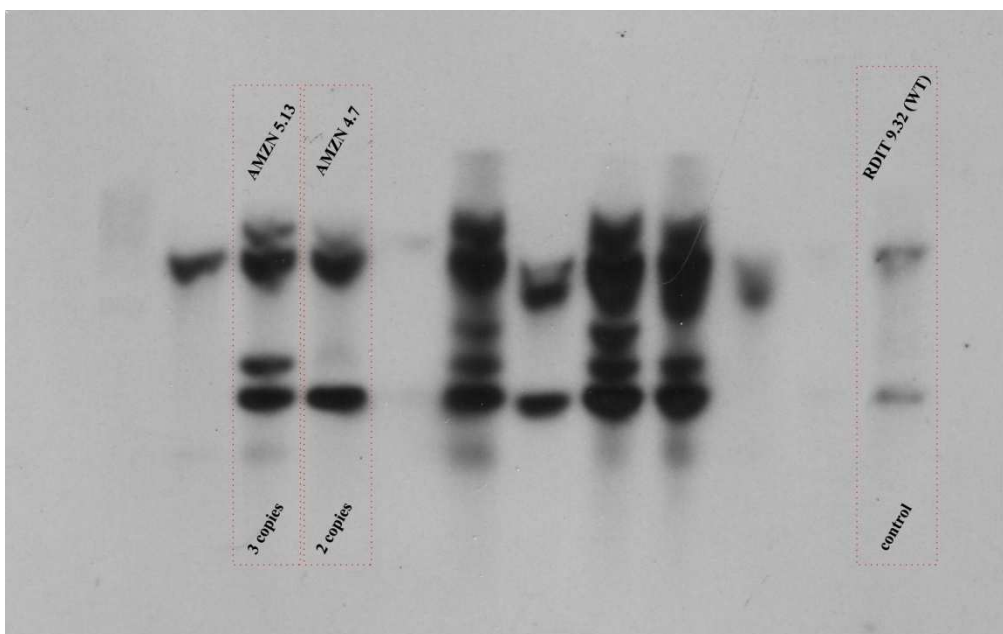
**F16. ábra: *A. oryzae* növekedési görbéje szilárd táptalajon
A.zonatus (CBS506.65)**



F17. ábra: *A. zonatus* növekedési görbéje szilárd táptalajon

F1.táblázat: Primerek és plazmidok melyeket az *A. nidulans* gombával való munka során alkalmaztunk.

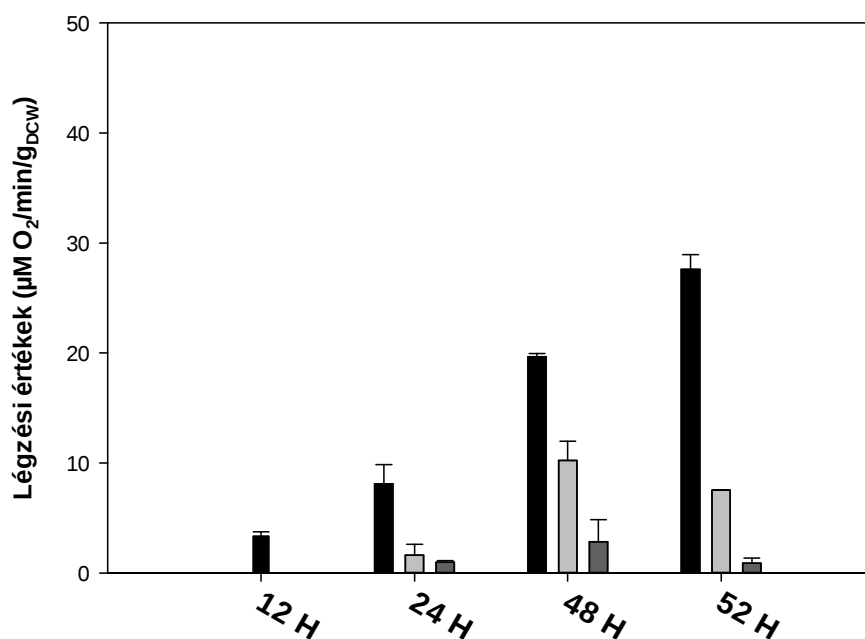
Primerek		Szekvenciák (5'-3')	Megjegyzés
veA+	Forward	TGTGTTATCCCATCAAGAGG	Han és mtsai. (2010)
	Reverse	CTTGGCGCTGTAGACGATAA	
aodA	Forward	ATCCGCCCCTCGTCAAAAAAT	Molnár és mtsai.(2018)
	Reverse	TCAAACAACCTCCTCTCGT	
deletion cassette			Molnár és mtsai.(2018)
P1	Forward	AAAGTAGTCTCAGCGTAGCCT	aodA_5_flanking; funkcionális gén fragmenthez (aodA)
P2	Reverse	CGGTTGAGCCGTTTCAGGTACAGTACATGCAGGTAATGTTTCGCAATAGC	aodA_5_flanking
P3	Forward	TATGGTCCTGACATATCTGGTGGATCTACGAGAGGAGGTTGTTTGAG	aodA_3_flaking
P4	Reverse	AAAGATGAAAGGACAGGTGG	
P5	Forward	ATGTACTGTACCTGAACCG	pyr4
P6	Reverse	AGATCCACCAGATATGTCAG	
P7	Forward	TTTATTCTCGGCGTTTGTC	aodA nested
P8	Reverse	TAGAATAACAGCGGAAATGG	
P9	Reverse	CTCAACTAATAATCAATGCGC	funkcionális gén fragmenthez(aodA)
aox_copyF	Forward	TAGTCTCAGCGTAGCCTCTTC	aodA; Southern blothoz
aox_copyR	Reverse	GCGGATTGATTATTAGTTGAG	
Plasmid	Gene	Remark	
pTN2	riboB2	Nayak és mtsai. (2006)	



F18. ábra:Southern blotanalízis eredménye különböző *aodA* kópiaszámú *A. nidulans* törzseknél.

F2. táblázat: Primerek, melyek az *A. terreus* gombával való munka során alkalmaztunk.

Primerek		Szekvenciák (5'-3')	Megjegyzés
<i>A.terreus</i>	Forward	TCCCAAATCCTATCTTCTCG	Tanulmányunkban. Fragment hossza: 955 bp
<i>aodA</i>	Reverse	GCTTCCTTCTTCTCCCATAG	
<i>A.terreus</i>	Forward	TTTGCTTTACGCCCTTCCTCG	Tanulmányunkban. Fragment hossza: 957 bp.
<i>aodB</i>	Reverse	GCTCTCCACCTGTTCCCTCAAG	



F19. ábra: *A. terreus* légzési értékei termelői táptalajon, 100 g/L D-glükózon, 12, 24, 48 és 52 H-s korban, lombikos kísérleteknél. A fekete oszlop a teljes (gátolatlan) légzést, világosszürke a cianid-rezisztens alternatív légzést, a sötétszürke oszlop pedig a reziduális légzést jelöli.